



- phone: Protection by melatonin // Biomed. Res. 2012. Vol. 23, № 1. P. 147–151.
10. Çenesiz M., Atakişi O., Akar A., Onbilgin G., Ormanci N. Effects of 900 and 1800 MHz electromagnetic field application on electrocardiogram, nitric oxide, total antioxidant capacity, total oxidant capacity, total protein, albumin and globulin levels in Guinea pigs // J. Veterinary Med. Fac. Kafkas Univ. Vol. 17, № 3. P. 357–362.
  11. Moussa S. A. Oxidative stress in rats exposed to microwave radiation // Romanian J. Biophys. 2009. Vol. 19, № 2. P. 149–158.
  12. Dabala D., Surcel D., Szanto C., Miclaus S., Botoc M., Toader S., Rotaru O. Cellular response in experimental exposure to electromagnetic fields // Rev. Roum. Sci. Techn. Électrotechn. et Énerg. 2008. № 53. P. 21–29.
  13. Dabala D., Surcel D., Szanto C., Miclaus S., Botoc M., Toader S., Rotaru O. Oxidative and Immune Response in Experimental Exposure to Electromagnetic Fields // Electromagnetic Field, Health and Environment. 2008. Vol. 29. P. 105–109.
  14. Pompella A., Maellaro E., Casini A.F., Ferrali M., Ciccolli L., Comporti M. Measurement of lipid peroxidation in vivo: comparison of different procedures // Lipids. 1987. № 22. P. 206–211.
  15. Величковский Б. Т. Экологическая пульмонология (Роль свободнорадикальных процессов). Екатеринбург, 2003. 141 с.
  16. Жигулина В. В. Биохимический ответ организма на стресс (Обзор литературы) // Верхневолж. мед. журн. 2014. № 4. С. 25–30.

УДК 579.26

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ – АССОЦИАНТОВ ЯБЛОННОЙ ТЛИ (*APHIS POMI* DEGEER, 1773)

Е. В. Глинская, В. В. Аникин, Р. А. Верховский, А. А. Абалымов

Саратовский государственный университет  
E-mail: elenavg-2007@yandex.ru, anikinvasiliiv@mail.ru



Изучены биологические особенности ассоциативных микроорганизмов яблонной тли, паразитирующей на древесных растениях на территории Саратовской области. Выделено 12 видов бактерий из 2 родов. 94.2% видов способны расщеплять глюкозу; 76.5% – сахарозу. Щелочное значение pH предпочитают 100% изолятов. *Bacillus funiculus*, *B. clausii*, *B. oleronius*, *B. soli* обладают пектиназной активностью, 83% видов имеют фермент нитрогеназу, 58% видов способны к расщеплению целлюлозы.

**Ключевые слова:** ассоциативные бактерии, яблонная тля, Саратовская область.

### Biological Properties of Bacteria – Associants *Aphis Pomi* Degeer, 1773

Е. В. Glinskay, В. В. Anikin,  
Р. А. Verchovsky, А. А. Abalymov

The biological features of associative microorganisms *Aphis pomi* in the Saratov Region were studied. 12 species of bacteria from 2 genera were isolated. 94.2% of the species are able to use glucose; 76.5% – saccharose. Alkaline pH is preferred 100% of the isolates. *Bacillus funiculus*, *B. clausii*, *B. oleronius*, *B. soli* have pectinase activity, 83% of the species have the enzyme nitrogenase, 58% of species are capable to recove cellulose.

**Key words:** bacteria - associants, *Aphis pomi*, Saratov Region.

DOI: 10.18500/1816-9775-2015-15-3-48-51

В последние годы интерес исследователей все чаще привлекают микроорганизмы, ассоциированные с макроорганизмами. Изучение симбиотических отношений – это важный этап пони-

мания функционирования экосистем, разработки новых микробиологических методов ограничения численности паразитических микроорганизмов и основа создания уникальных препаратов на основе факультативных симбионтов [1–5].

Целью настоящей работы являлось определение биологических особенностей ассоциативных микроорганизмов яблонной тли (*Aphis pomi*), обитающей на территории право- и левобережья Саратовской области.

Работа проводилась на базе кафедры микробиологии и физиологии растений и лаборатории молекулярной биологии Саратовского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского в период с 2014 по 2015 г.

Объектом исследования являлись бескрылые особи яблонной тли, собранные в весенне-летний период 2014 г. с деревьев яблони домашней (*Malus domestica* Borkh., 1803), растущих на дачных участках Саратовского, Хвалынского, Энгельсского и Пугачевского административных районов Саратовской области в период с мая по август 2014 г. Систематическое положение насекомых определяли по Блэкмэну и Эстопу [6].

В ходе исследования было изучено 1600 особей тли.

Перед бактериологическим посевом в лаборатории насекомых усыпляли эфиром. Поверхность насекомых обрабатывали 70%-ным



этиловым спиртом путем полного погружения в течение 10 мин. После чего насекомых промывали в физиологическом растворе. Далее 10 насекомых гомогенизировали в ступке с 0,5 мл физиологического раствора, в котором общая масса насекомых составляла 0,005 г. После этого проводили посев по 0,1 мл суспензии на питательные среды: ГРМ-агар (Россия, Оболенск), картофельную среду (КС) (200 г картофеля на 1 литр воды + 2% голодного агара).

Бактериологические посеы культивировали при температуре 28°C в течение 48 – 72 ч. Далее проводили количественный учет выросших колоний микроорганизмов и отсеивали выделенных штаммов на скошенные питательные среды. Идентификацию выделенных штаммов проводили по Определителю бактерий Берджи [7].

В ходе исследований нами были изучены биологические свойства микроорганизмов, такие как: способность к использованию различных сахаров (глюкоза, сахароза, маннит, лактоза, ксилоза, арабиноза, мальтоза, сорбит), цитрата натрия, способность к гидролизу крахмала, желатина, продукции сероводорода, аммиака, индола. При изучении ферментативной активности определяли наличие у выделенных штаммов каталазы и оксидазы.

При определении устойчивости выделенных штаммов к абиотическим факторам изучали способность к росту при различных показателях рН среды (5, 6, 9, 10), концентрациях NaCl в среде (7, 10, 15%), действию температурного фактора (+10 и +43°C).

При выявлении факторов фитопатогенности выделенные штаммы исследовали на наличие целлюлолитической и пектиназной активности.

Выявление пектиназы проводили путем постановки теста на мацерацию. Тестовыми объектами служили корнеплоды моркови и свёклы, а также клубни картофеля. В стерильные чашки Петри с дисками фильтровальной бумаги помещали кусочки растительных органов, площадь которых составляла 1 см<sup>2</sup>. После чего на каждый из кусочков бактериологической петлей наносили исследуемую культуру. Чашки Петри инкубировали при температуре 28°C в течение 48 ч. Учет проводили по наличию зон мацерации [8].

Наличие целлюлазы определяли путем посева на среду Гетченсона – Клейтона следующего состава (г/л): КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> – 1.0; MgSO<sub>4</sub> – 0.5; FeSO<sub>4</sub> – 0.01; NaNO<sub>3</sub> – 2.5; карбоксиметилцеллюлоза – 10; агар – 20 [9].

Изучение способности к фиксации молекулярного азота, связанной с наличием фермента нитрогеназы, осуществляли на безазотистой среде Эшби следующего состава (г/л): маннит – 20.0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.2; MgSO<sub>4</sub> – 0.2; NaCl – 0.2; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0.1; CaCO<sub>3</sub> – 5.0; агар – 20.0; рН 7.1–7.3 [10].

В результате проведенных исследований из 1600 особей яблонной тли было выделено 18 штаммов бактерий, которые были отнесены к 2 родам (*Bacillus* и *Pseudomonas*) и 12 видам [10, 11].

В ходе постановки биохимических тестов нами были проведены исследования сахаролитических свойств микроорганизмов – ассоциантов яблонной тли (табл. 1).

Таблица 1

Биохимическая активность микроорганизмов – ассоциантов яблонной тли, %

Название теста	Результат		
	положительный	отрицательный	
Рост в анаэробных условиях	82.4	17.6	
Каталазная активность	100	0	
Оксидазная активность	94.2	5.8	
Использование цитрата	35.3	64.7	
Редукция нитратов	82.4	17.6	
Гидролиз:	желатина	53	47
	крахмала	70.6	29.4
Образование кислоты из:	глюкозы	94.2	5.8
	маннита	64.7	35.3
	арабиноа	35.3	64.7
	ксилозы	76.5	23.5
	сахарозы	76.5	23.5
	сорбита	29.5	70.5
	лактозы	17.6	82.4
	мальтозы	41.2	58.8



Анализ полученных данных показал, что 94,2% видов способны расщеплять глюкозу; 76,5% – сахарозу, что согласуется с данными о химическом составе флоэнного сока. В его состав у плодовых растений входят сахароза, глюкоза, фруктоза, олигосахариды (стахиоза, вербаскоза) и полиолы (маннит) [12]. Наименее востребованными углеводами являлись сорбит и лактоза, которые утилизировали 29,5 и 17,6% видов микроорганизмов-ассоциантов соответственно.

Рост в анаэробных условиях показали 82,4% от всего числа выделенных видов, что обусловлено обитанием микроорганизмов во внутренней среде насекомых.

Кроме того, был изучен диапазон устойчивости выделенных из тли бактерий к некоторым физико-химическим факторам: температура, pH, концентрация NaCl в среде. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

## Устойчивость микроорганизмов – ассоциантов яблонной тли к физико-химическим факторам, %

Название теста		Результат	
		положительный	отрицательный
Температура культивирования, °С	10	53	47
	43	47	53
Концентрация NaCl, %	7	82.4	17.6
	10	76.5	23.5
	15	0	100
Диапазон pH	5	53	47
	6	59	41
	8	100	0
	11	82.4	17.6

Выявлено, что щелочное значение pH предпочитают 100% изолятов. Все бактерии-ассоцианты культивировались при температуре 28°C. При понижении температуры на 18°C наличие роста наблюдалось у 53%, а при повышении на 15°C – лишь у 47% изолятов. Наличие 15% NaCl в среде стало летальным для 100% исследуемых штаммов.

Результаты изучения мацерирующей активности показали, что штаммы *Bacillus funiculus*, *B. clausii*, *B. oleronius*, *B. soli* расщепляют весь спектр растительных объектов. *B. niacini* и *B. bataviensis*, напротив, не проявляют способности к деструкции растительных тканей (табл. 3).

Таблица 3

## Способность микроорганизмов – ассоциантов яблонной тли к мацерации растительных тканей

Вид бактерий	Морковь	Свёкла	Картофель
<i>Pseudomonas sp.</i>	–	+	+
<i>Bacillus bataviensis</i>	–	–	–
<i>Bacillus lentus</i>	–	+	+
<i>Bacillus funiculus</i>	+	+	+
<i>Bacillus nealsonii</i>	–	+	+
<i>Bacillus soli</i>	+	+	+
<i>Bacillus horikoshii</i>	–	+	+
<i>Bacillus clausii</i>	+	+	+
<i>Bacillus niacini</i>	–	–	–
<i>Bacillus pumilus</i>	–	+	+
<i>Bacillus halodurans</i>	–	+	+
<i>Bacillus oleronius</i>	+	+	+

Анализ результатов по изучению целлюлолитической активности показал, что 58% штам-

мов способны к расщеплению целлюлозы на среде Гетченсона – Клейтона (табл. 4).



Таблица 4

**Целлюлолитическая активность микроорганизмов – ассоциантов яблонной тли**

Вид бактерий	Целлюлолитическая активность
<i>Pseudomonas</i> sp.	–
<i>Bacillus bataviensis</i>	–
<i>Bacillus lentus</i>	+
<i>Bacillus funiculus</i>	+
<i>Bacillus nealsonii</i>	–
<i>Bacillus soli</i>	–
<i>Bacillus horikoshii</i>	+
<i>Bacillus clausii</i>	+
<i>Bacillus niacini</i>	+
<i>Bacillus pumilus</i>	–
<i>Bacillus halodurans</i>	+
<i>Bacillus oleronius</i>	+

Рост на безазотистой среде Эшби, связанный с наличием фермента нитрогеназы и фиксацией молекулярного азота, проявили 83% изолированных штаммов (табл. 5). Во флоэмном соке очень низкое содержание аминокислот [13]. Недостаток органического азота тли восполняют за счёт азотофиксирующих ассоциативных микроорганизмов [14, 15].

Таблица 5

**Способность микроорганизмов – ассоциантов яблонной тли к фиксации молекулярного азота**

Вид бактерий	Фиксация N <sub>2</sub>
<i>Pseudomonas</i> sp.	+
<i>Bacillus bataviensis</i>	+
<i>Bacillus lentus</i>	+
<i>Bacillus funiculus</i>	–
<i>Bacillus nealsonii</i>	+
<i>Bacillus soli</i>	–
<i>Bacillus horikoshii</i>	+
<i>Bacillus clausii</i>	+
<i>Bacillus niacini</i>	+
<i>Bacillus pumilus</i>	+
<i>Bacillus halodurans</i>	+
<i>Bacillus oleronius</i>	+

Таким образом, наши исследования показали, что организм яблонной тли является средой обитания для достаточно широкого круга сапрофитических бактерий. Насекомое обеспечивает этих бактерий пищевым субстратом, тем самым сглаживая негативное влияние факторов внешней среды. Ассоциативные бактерии же, в

свою очередь, могут участвовать в решении ряда физиологических проблем организма хозяина, связанных с питанием растительными соками.

**Список литературы**

1. Leach J. G. Insect Transmission of Plant Diseases. Denver : Daya Publishing House, 2007. 615 p.
2. Dunbar H. E., Wilson A. C., Ferguson N. R., Moran N. A. Aphid Thermal Tolerance Is Governed by a Point Mutation in Bacterial Symbionts // PLoS Biol. 2007. Vol. 15. P. 231–242.
3. Stavrinides J., Mc Closkey J. K., Ochman H. Pea aphid as both host and vector for the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* // Appl. and Envir. Microbiology. 2009. Vol. 75, № 7. P. 2230–2235.
4. Oliver K. M., Degnan H., Burke G. R., Moran N. A. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits // An. Rev. of Entomol. 2010. Vol. 55. P. 247–266.
5. Tsuchida T., Koga R., Sakura M., Fukatsu T. Facultative bacterial endosymbionts of three aphid species, *Aphis craccivora*, *Megoura crassicauda* and *Acyrtosiphon pisum*, sympatrically found on the same host plants // Science. 2006. Vol. 14. P. 211–232.
6. Blackman R. L., Eastop V. F. Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs. L. : The Natural History Museum, 2006. 1439 p.
7. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. N.Y. : Springer, 2001. Vol. 3. 1450 p.
8. Головин П. Н., Арсеньева М. В., Тропова А. Т., Шестиперова З. И. Практикум по общей фитопатологии. Л. : Колос, 1977. 239 с.
9. Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. Практикум по микробиологии. М. : Академия, 2005. 608 с.
10. Глинская Е. В., Верховский П. А., Абальмов А. А. Ассоциативные микроорганизмы яблонной тли (*Aphis pomi* DeGeer, 1773), паразитирующей на древесных растениях правобережной зоны Саратовской области // Энтомол. и паразитол. исслед. в Поволжье. 2015. Вып. 12. С. 114–117.
11. Глинская Е. В., Абальмов А. А., Верховский П. А. Ассоциативные микроорганизмы яблонной тли (*Aphis pomi* DeGeer, 1773), паразитирующей на древесных растениях левобережной зоны Саратовской области // Энтомол. и паразитол. исслед. в Поволжье. 2015. Вып. 12. С. 117–121.
12. Медведев С. С. Физиология растений. СПб. : Изд-во СПбГУ., 2004. 336 с.
13. Dinant S., Bonnemain J. L., Girousse C., Kehr J. Phloem sap intricacy and interplay with aphid feeding // Comptes Rendus Biologies. 2010. Vol. 333. P. 504–515.
14. Bishop P. E., Premakumar R. Alternative nitrogen fixation systems // Biological nitrogen fixation. N.Y. : Chapman & Hall, 1992. P. 736–762.
15. URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/7/55> (дата обращения: 25.06.2015).