

Л. А. Чил-Акопян, Л. П. Пучинян

### Опыт применения антибиотиков в борьбе с пебриной тутового шелкопряда

Пебрина долгое время была бичом шелководства. Решающую роль в устраниении этого заболевания сыграло открытие Пастером передачи возбудителя заболевания через грену и введение в гренажное производство целлюлярного способа приготовления грены. Однако целлюлярный гренаж громоздок по техническому выполнению, отнимает много сил и средств и не дает возможности упростить и удешевить производство грены.

Предложенный Поярковым (1955) биологический метод борьбы с пебриной явился принципиально новым методом, довольно эффективным, хотя и не лишенным ряда существенных недостатков (Ованесян и Лобжанидзе, 1957; Астауров и др., 1962).

Значительным достижением в отношении простоты применения, эффективности действия и экономичности явился метод термического обеззараживания грены (Астауров, Ованесян и Лобжанидзе, 1952; Ованесян и Лобжанидзе, 1958). Некоторое отрицательное влияние прогревов на оживляемость грены рассматривается Астауровым (1962) даже как положительный фактор отбора наиболее жизнеспособной грены. Тем не менее, не лишены оснований поиски иных, более совершенных способов обеззараживания грены, особенно с применением антибиотических веществ.

Известно, что в настоящее время в медицине, ветеринарии и растениеводстве антибиотики с успехом применяются как мощные лечебные и профилактические средства в борьбе с различными бактериальными, грибными и протозойными заболеваниями. Достоинством антибиотиков является то, что они могут успешно применяться в растениеводстве и живот-

новодство как эффективные противоинфекционные средства для обеззараживания семян растений, семени животных, икры рыб при их разведении и т. д. При этом достигается ликвидация внутренней инфекции, а обработка антибиотиками не оказывает отрицательного действия на зародыш и последующее развитие животных, растений и рыб. Данные науки в этой области в настоящее время используются в практике растениеводства, животноводства и рыбоводства.

В шелководстве накоплен опыт применения некоторых антибиотиков, результаты которого обобщены в ряде отечественных и зарубежных работ (Murthy, Sreenivasaya, 1953; Сафаров, Алиев, 1960; Африкян и др., 1961). Основной целью этих работ являлось использование антибиотиков в виде подкормки с листом шелковицы для предупреждения и лечения гусениц тутового шелкопряда в основном от возбудителей опасных бактериальных болезней. Чрезвычайно заманчивым является применение антибиотиков как средств для обеззараживания грены от возбудителей различных заболеваний. В данной работе мы приводим материал исследования, полученный при применении различных препаратов антибиотиков для целей обеззараживания грены тутового шелкопряда против возбудителя пебрины.

Основным условием успешного применения антибиотиков для целей обеззараживания грены должно быть отсутствие отрицательного действия на ее оживление и знание различных вопросов проникновения и сохранения их в грене.

Проведенные в Институте микробиологии АН АрмССР работы в этом направлении вскрыли интересные и весьма перспективные возможности (Л. А. Чил-Акопян, Р. А. Бобикян, Э. К. Африкян, 1962). Установлено, что почти все водорасторимые препараты антибиотиков, которые в настоящее время нашли практическое применение в медицине и сельском хозяйстве, лишены в терапевтических концентрациях токсического действия на процессы оживления грены. При вымачивании грены в водных растворах большинства испытанных препаратов последние проникают в зародыш грены и в последующем обнаруживаются в мурашах тутового шелкопряда. Раз-

личные антибиотики проникают в ткани грен и накапливаются в них в неодинаковой степени.

Проникновение ряда антибиотиков в грену и сохранение в ней, отсутствие неблагоприятного на зародыш влияния дают основание испытать их на противопебринозное действие, так как пебрина является внутренней инфекцией, передающейся по наследству. Несомненно, перспективными в этом отношении должны оказаться антибиотики с противопротозойным действием. В данных исследованиях испытаны все доступные нам препараты антибиотиков с самым различным спектром действия. В опытах не применялись препараты, которые в ранних исследованиях оказались токсичными для гусениц тутового шелкопряда.

Следует отметить, что грана является довольно удобным материалом для изучения характера действия различных препаратов на оживление зародыша, токсичность и т. д. С другой стороны, пебринозный материал может быть использован для работ по изысканию противопротозойных антибиотиков и других лекарственных соединений.

По ходу работы предстояло разрешить ряд методических вопросов. Проводилась как обработка грен антибиотиками, так и подкормка гусениц их растворами.

При обработке зараженной грене водонерастворимыми антибиотиками (виоларин, нистатин, трихомицин, антибиотики: 1, 1811—19,719, 2886), последние растворялись предварительно в минимально возможном количестве винного спирта, а затем разбавлялись водой до необходимой концентрации. Концентрации водорастворимых антибиотиков брались по возможности высокие, чтобы добиться максимального проникновения препарата в зародыш и организм гусеницы и более рельефно выявить его действие на пебрину.

В опыте использована пебринозная грана, полученная из биологической лаборатории факультета шелководства Тбилисского сельскохозяйственного института. Обработка производилась в декабре в холодном помещении при температуре 7—10°C.

В каждом варианте опыта было взято около 150 грен с помощью мерки. Отмеренная грана заворачивалась

в марлю, погружалась в растворы антибиотиков и выдерживалась 2 часа. Контрольная гrena одновременно выдерживалась в воде. Через 2 часа грену в марле вынимали, раскладывали на фильтровальных листках, оставляли для просушки в том же помещении и через сутки закладывали в холодильник на зимовку при температуре +3 +4°C до весны (апрель).

Обработанная антибиотиками гrena инкубировалась весной в термостате при 24°C. Оживление происходило во всех вариантах растянуто, в течение 4—5 дней.

В процессе оживления проверялось наличие всех испытанных препаратов антибиотиков в оболочках грены и их проникновение в зародыш. Применялась следующая методика: скорлупки грены, после ее оживления, мураши и гусеницы разного возраста раскладывались по несколько штук на дно чашки Петри и заливались растопленным и остуженным до 45°C МПА, с диффузно засеянной культурой тест-объекта. В качестве последних были выбраны культуры золотистого стафилококка и спороносной палочки из группы *Bac. idosus-agglomeratus* (штамм 314). Предварительно была испытана чувствительность указанных тест-объектов и выбраны соответствующие культуры, чувствительные к действию отдельных антибиотиков. Для повышения чувствительности метода заливаемый в чашки мясопептонный агар разводился водой 1 : 2.

Для лучшей фиксации скорлупок и мурашей до заливки МПА на чашку прежде наносилась капля МПА и в нее помещались испытуемые объекты. Чашки Петри оставлялись на несколько часов в холодном месте для лучшей диффузии, а затем переносились в термостат при 27°C на сутки. Наличие антибиотика определялось по зоне угнетения тест-организма вокруг испытуемых объектов. В нашем опыте при осенней обработке грены из испытанных 28 антибиотиков проникали в мураши 10.

Данные по проникновению в зародыш грены (мурашей) испытанных антибиотиков в разных концентрациях представлены в табл. 1. Некоторые из этих антибиотиков обнаружи-

Таблица 1

Обнаружение антибиотиков в зародыше грены тутового шелкопряда  
(Обработка грены растворами антибиотиков в декабре 1962 г., определение наличия антибиотиков в мае 1963 г.)

Антибиотик (растворитель)	Использован- ные концентра- ции антибиоти- ков	% оживле- ния	Обнаружение антибиотика	
			в оболо- чке грены	в му- рашах
1	2	3	4	5
Пенициллин (вода)	50.000 ед/мл	92,2		++
	10.000	82,9	+++	+
	1.500	88,4	+++	+
Стрептомицин (вода)	50.000	90	+++	++
	10.000	87,4	+++	++
	1.500	89	+++	-
Биомицин (вода)	10.000	90,7	+++	++
	1.500	93	+++	-
	300	92,3	+++	-
Террамицин (вода)	10.000	84,2	+++	++
	1.500	90	++	-
	300	83,8	+	-
Тетрациклин (вода)	10.000	84,3	+++	-
	1.500	88,9	++	-
	300	84,7	+	-
Гриземин (вода)	100	86,3	+++	++
	18	86,8	+++	+
	3	87,7	+++	-
Эритромицин (спирт + вода)	4.600	90,7	+++	++
	800	86,8	+++	+
	150	89	++	+
Колимицин (вода)	26 мг/мл	82,1	+++	++
	5	92	+++	++
	1	84,9	+++	+
Неомицин (вода)	10	не учтено	+++	++
	2	86,5	—	-
	0,3	85,5	—	-
Канамицин (вода)	10	82,7	+++	-
	2	88,5	+++	-
	0,3	89	+++	-
Амфомицин (вода)	10	90,2	+++	++
	2	89	+++	+
	0,3	85	+++	-

1	2	3	4	5
Амицетин (вода)	10 мг/мл 2 0,3	82,3 89,2 83,8	+++ + -	-
Хлоромицетин (вода)	10 2 0,3	89,2 89,3 93	- - -	-
Дигидроновобиоцин (вода)	10 2 0,3	89,2 83,8 86,9	++ ++ ++	-
Виоларин (спирт + вода)	6 1 0,2	87,9 90 91,9	++ ++ ++	++
Трихомицин (спирт + вода)	1.000 200 30	не учтено 82,7 86,5	- - -	-
Нистатин (спирт + вода)	30.000 ед/мл 5.000 1.000	89,3 83,5 86,6	- - -	-
Фумагилин (спирт + вода)	20.000 3.500 600	85,8 92,6 86,5	- - -	-
Гризофульвин (спирт + вода)	10 мг/мл 2 0,3	85,6 86,3 88,1	- - -	-
Субтилин (вода)	5 мг/мл 1 0,15	87,1 84,5 92,7	++ ++ +	-
Бацитрацин (вода)	10 2 0,3	89,7 90,9 88,4	- - -	-
Грамицидин (спирт + вода)	10 2 0,3	90,2 82,4 85,9	++ ++ +	-
Полимиксин М (вода)	10 2 0,3	91,3 84,3 89,6	+	-
Полимиксин В (вода)	10 2 0,3	83,4 90,1 88,2	++ ++ +	-
Антибиотик I (спирт + вода)	1 0,2 0,03	87,6 85 89,1	++ ++ -	-

1	2	3	4	5
719 (спирт + вода)	5 мг/мл 1 0,15	91,1 94,8 94,8	+++	—
1811-19 (спирт + вода)	5 1 0,15	85,2 88,9 82,2	— — —	—
2886 (спирт + вода)	2 0,4 0,05	85,3 84,4 88,7	++ ++ +	—

## Примечание:

- (+) — Зона угнетения тест-организма 1—3 мм,  
 (++) . . . . . 4—5 мм,  
 (+++) . . . . . больше 6 мм,  
 (—) отсутствие зоны угнетения.

ваются в мурашах при обработке сравнительно разными концентрациями (пенициллин, колимицин, эритромицин, стрептомицин). Другие антибиотики, проникая в довольно больших количествах в оболочку грен, не обнаруживаются в мурашах; в основном это антибиотики полипептидной природы. Интересно, что некоторые антибиотики — стрептомицин, эритро-

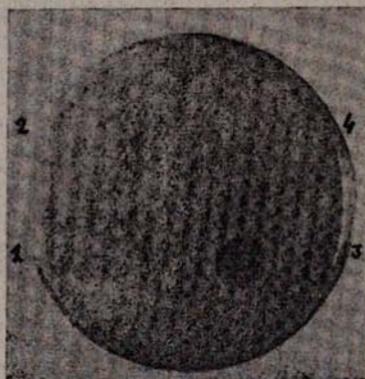


Рис. 1. 1,2—контрольная грана (скорлупки и мураши); 3—грана, обработанная стрептомицином—500 ед/мл (скорлупки). 4—мураши из граны, обработанной стрептомицином.

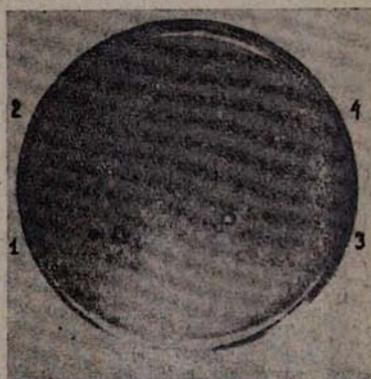


Рис. 2. 1,2—грана, обработанная террамицином (500 ед/мл) и мураши, вышедшие из нее; 3,4—грана, обработанная биомицином (500 ед/мл), и мураши, вышедшие из нее.

мицин—сохранялись в мурашах через сутки после оживления при кормлении их листом, а биомицин обнаруживался через двое суток. Ряд антибиотиков не был обнаружен как в оболочке грены, так и в мурашах. По-видимому, они инактивируются по ходу инкубации грены или обладают плохой способностью проникать в оболочку. Что касается оживления грены, то в вариантах с некоторыми антибиотиками отмечается сравнительное угнетение оживления грены. Как правило, это относится к использованию высоких концентраций некоторых испытанных антибиотиков. Интересно отметить, что при обработке грены антибиотиками непосредственно перед ее оживлением эти вещества не обнаруживаются в зародыше грены (Чил-Акопян, Бобнян, Африкян, 1962). В последних опытах также было подтверждено это положение. Это указывает на то, что время обработки антибиотиками (осенью или весной) имеет решающее значение для проникновения антибиотиков в грену.

Изучение влияния антибиотиков на зараженную пебриной грену проводилось как на погибших мурашах, так и на 17-дневных гусеницах тех вариантов, в которых обнаружено проникновение антибиотика в зародыш. Микроскопии подвергались по одному, как мураши, так и гусеницы. Следует отметить, что во всех вариантах опыта, в частности в контрольных (без обработки антибиотиками), мы не наблюдали 100% заражения мурашей пебриной. Более регулярно отмечалось заражение взрослых гусениц, по внешнему виду значительно отличающихся от остальных.

Сводные данные по этому разделу работ (по вариантам с самыми высокими концентрациями антибиотиков) представлены в табл. 2. Данные опыта, приведенные в указанной таблице, говорят о том, что ни в одном варианте с использованием антибиотика нельзя подметить явного противопебринозного действия.

Нами был также поставлен опыт по подкормке антибиотиками гусениц третьего возраста, зараженных пебриной (оживленных из пебринозной грены). Однако, так как среди зараженных гусениц встречались здоровые, что помешало бы дальнейшему учету действия антибиотиков, проведено дополн-

нительное заражение. Для этого из отмытых спор пебрины с антибиотиками готовили суспензию (200 млн. спор в 1 мл). После суточной выдержки спор с антибиотиками ими обрабатали листья и подкормили гусениц, зараженных пебриной (в каждом варианте по 50—60 штук). Контрольных гусениц подкармливали листьями, обработанными водной суспензией спор с таким же титром. Микроскопия гусениц через сутки показала почти полное заражение как контрольных, так и опытных вариантов, кроме вариантов тетрациклина и гриземина.

Таблица 2  
Влияние антибиотиков на развитие пебрины

Антибиотик	Обследовано гусениц	
	всего	в том числе зараженных
Пенициллин	15	5
Стрептомицин	14	7
Биомицин	12	5
Террамицин	5	5
Эритромицин	16	11
Виоларин	14	8
Колимицин	29	11
Неомицин	17	9
Амфомицин	14	8
Гриземин	5	5
Контроль (обработка водой без антибиотика)	32	17

мина, где заражено было меньше половины гусениц (табл. 3). Далее, после вторичной подкормки спорами пебрины с антибиотиками, тех же гусениц подкармливали чистыми антибиотиками.

Целью этого опыта было выявление губительных для пебрины антибиотиков на живых гусеницах. Однако микроскопия гусениц после 4-дневной, а затем 10-дневной подкормки антибиотиками во всех вариантах показала почти полное их заражение, кроме варианта подкормки гриземином, в котором гусеницы погибли от полиэдроза, и зараженными пебриной оказалось только 22 %. Микроскопия гемолимфы подопытных гусениц показала, что в ней у 30—100 % гусениц также обнаруживаются споры пебрины.

По ходу этих исследований выявлялось проникновение и сохранение антибиотиков в гемолимфе гусениц (табл. 4).

Таблица 3

Действие антибиотиков на развитие пебрины у гусениц, полученных из зараженной греци

Антибиотики	Концентрации	Количество гусениц, зараженных спорами пебрины, в %				количество гусениц, гемолимфа которых заражена пебриной, в %
		через сутки после подкормки спорами пебрины с антибиотиками	после 4-дневной подкормки антибиотиками	после 10-дневной подкормки антибиотиками		
Пенициллин	50000 ед/мл	100	100	85	50	
Стрептомицин	50000	100	80	100	33	
Биомицин	8000	100	100	100	100	
Бацитрацин	10 мг/мл	62	100	62	42	
Полимиксин М	10	83	100	100		
Полимиксин В	10	100	100	100		
Террамицин	10	87	80	100	50	
Тетрациклин	10	37	60	100	50	
Гриземин	10	44	100	22		
Канамицин	10	100	100	100	45	
Амицецин	10	100	100	100	45	
Левомицетин	10	87	75	85	33	
Грамицидин	10	100	83	100	83	
Фитобактериомицин	5	60	100	100	100	
Субтилин	5	100	60	100	50	
Эритромицин	5	85	100	83	66	
Амфомицин	5	75	100	66	50	
Контроль (без подкормки антибиотиками)		100	99	66	25	

Таблица 4

Проникновение и сохранение антибиотиков в гемолимфе гусениц тутового шелкопряда после подкормки листом, обработанным растворами антибиотиков

(Зоны угнетения тест-бактерий в мм; однократная подкормка антибиотиками)

Антибиотики	Наличие антибиотиков в гемолимфе спустя:		
	2 часа	1 сутки	2 суток
Контроль	0	0	0
Амфомицин	2	3	2
Канамицин		4	3
Террамицин	4	2	3
Полимиксин В		4	4
Стрептомицин		8	6
Тетрациклин		2	3
Эритромицин		7	

Работа проводилась следующим образом: гусениц в начале четвертого возраста, подкормленных листом, обработанным антибиотиками (концентрации указаны в табл. 3), слегка кололи иглой между 5 и 6-м сегментами и каплю выступившей гемолимфы наносили на поверхность мясопептонного агара в чашках Петри с чувствительной к антибиотику культурой.

В качестве контроля наносили каплю гемолимфы гусеницы, не подкармливающейся антибиотиками. После суточной инкубации вокруг капли гемолимфы на мясопептонном агаре выявлялась зона угнетения роста тест-культуры. Опыты показали, что антибиотики (амфомицин, террамицин) проникают в гемолимфу гусеницы через 2 часа после подкормки. Испытание ряда антибиотиков показало их сохранение в гемолимфе гусениц через 1 и 2 суток после подкормки. Надо отметить, что в наших опытах гемолимфа контрольных гусениц также давала слабую зону подавления роста тест-культуры. Однако эта зона в большинстве случаев была очень незначительной по сравнению с опытными вариантами (1 мм и менее). Это явление, по всей вероятности, объясняется естественными бактерицидными свойствами гемолимфы.

Суммируя вышеизложенное, можно прийти к заключению, что несмотря на проникновение антибиотиков в гемолимфу и сохранение их в ней, обеззаражающего от пебрины действия в организме гусеницы не происходит. Не обеззараживает от пебрины также проникновение антибиотиков в зародыш греней. Возможно, что антибиотики неактивны против спор пебрины, присутствующих в зараженной гусенице и грене наряду с вегетативными формами (планонты, меронты). Действие антибиотиков на неспоровые формы пебрины должно служить предметом особого изучения.

### Выводы

Испытано действие 28 препаратов различных антибиотиков на зараженную пебриной грену и гусениц тутового шелкопряда. Во всех испытанных вариантах ни один из использованных антибиотиков не выявил противопебринозного действия.

Одновременно изучалось проникновение и сохранение антибиотиков в зародыш грены и гемолимфу тутового шелкопряда. Опыты показали, что при осенней обработке грены водными растворами антибиотиков многие из них (например пенициллин, стрептомицин, биомицин, террамицин и др.) проникают и обнаруживаются в зародыше при весеннем оживлении. При подкормке гусениц листом, обработанным растворами антибиотиков (в концентрации пенициллина и стрептомицина—50 000 ед/мл, биомицина—8000 ед/мл, остальные от 5 до 10 мг/мл), последние, по крайней мере, в течение двух дней обнаруживаются в гемолимфе.

### Լ. Ա. ԶԻՒ-ՀԱԿՈԲՅԱՆ, Լ. Պ. ՊՈՒԶԻՆՅԱՆ

### ԹԹԵՆՈՒ ՇԵՐԱՄԻ ՈՐԴԻ ՊԵՐՔԻՆԱԾ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՆ ԴԵՄ ԱՆՏԻԲԻՈՏԻԿՆԵՐԻ ԿԻՐԱՌՈՄԱՆ ՓՈՐՁԸ

### Ա մ փ ո փ ո ւ մ

Հետազոտությունների նպատակն է եղել թթենու շերամի պերդինա հիվանդության հարուցիչի նկատմամբ գտնել էֆեկտիվ անտիբիոտիկ նյութ: Այդ նպատակով փորձարկվել են 28 տարրեր անտիբիոտիկ նյութեր: Պարզվել է, որ փորձարկված անտիբիոտիկներց և ոչ մեկը հակառակ բրդինային ազդեցություն չի ցուցաբերել:

Նման հետազոտությունների ընթացքում ուսումնասիրվել է նաև թթենու շերամի որդի սաղմի և նրա հեմոլիմֆայում անտիբիոտիկ նյութերի ներթափանցման ու պահպանման հատկությունը: Պարզվեց, որ թթենու շերամի գրենայի աշնանային մշակման ժամանակ որոշ անտիբիոտիկ նյութեր (պենիցիլին, ստրեպտոմիցին, բիոմիցին, տերամիցին և այլն) սաղմի մեջ են թափանցում և գրենայի գարնանային զարթնելու ժամանակ հայտնաբերվում են:

Որոշ անտիբիոտիկ նյութերի (պենիցիլին, ստրեպտոմիցին՝ 50.000 մ/մլ, բիոմիցին՝ 8000 մ/մլ, մնացածները՝ 5-ից մինչև 10 մ/մլ կոնցենտրացիաներով) ջրային լուծույթներով մշակված թթենու տերմիներով շերամի որդերին կերակրելու դեպքում, անտիբիոտիկ նյութերը հայտնաբերվում և պահպանվում են շերամի որդի հեմոլիմֆայում 2 օր:

L. A. Chil-Hakobian, L. P. Pouchinian

**On the use of antibiotics in the control of silkworm  
Nosema bombycis infection**

S u m m a r y

28 preparations of different antibiotics have been tested against larvae and silkworm eggs infected by *Nosema bombycis*.

The data have been shown the absence of antibiotic action on *Nosema bombycis* in all experiments.

Investigations have been carried out on the penetration of tested antibiotics in the hemocoel of larvae and in embryos after their treatment by antibiotics.

The most preparations have been found in the embryo after 4 months conservation of silkworm eggs.

ЛИТЕРАТУРА

1. Астауров Б. Л., Беднякова Т. А., Верейская В. Н., Острыакова-Варшавер В. П. Действие высоких температур на грену шелковичного червя. М., Изд. АН СССР, 1962.
2. Астауров Б. Л., Ованесян Т. Т., Лобжанидзе В. И. Обеззараживание пебриозной грены тутового шелкопряда кратковременными прогревами в горячей воде. Докл. ВАСХНИЛ, 1952, № 3, 44.
3. Африкян Э. К., Туманян В. Г., Чил-Акопян Л. А., Бобян Р. А., Саруханян Л. Б., Авакян З. Г. Эффективность антибиотиков при бактериозах тутового шелкопряда и повышение его продуктивности. ДАН АрмССР, 1961, 32, № 3, 155.
4. Ованесян Т. Т., Лобжанидзе В. И. Некоторые итоги работ по биологическому методу борьбы с пебриой. Бюллетень научно-технической информации Грузинск. НИИШ, № 2, Тбилиси, 1957, МСХ ГССР, 53.
5. Ованесян Т. Т., Лобжанидзе В. И. Первые итоги опытов по прижизненному обеззараживанию оплодотворенной грены тутового шелкопряда с помощью кратковременных прогревов в горячей воде. Труды Ин-та морфологии животных им. А. И. Северцева, 1958, вып. 21, 184.
6. Поярков Э. Ф. Биологический метод борьбы с пебриой шелкопряда. Научно-исслед. работы САНИИШ, Ташкент. Изд. АН УзССР, 1955.
7. Сафаров К., Алиев А. Влияние антибиотиков на биологические и технологические свойства тутового шелкопряда. «Соц. сельское хозяйство Азербайджана», 1960, № 8, 37.

8. Чил-Акопян Л. А., Бобикян Р. А., Африкян Э. К. Применение антибиотиков как средство для обеззараживания грены тутового шелкопряда. Научно-технический сборник легкой промышленности. Ереван, 1962, № 4, 3.
9. Murthy M. R. V. a. Sreenivasaya M. Effect of antibiotic in the growth of the silkworm, *Bombyx mori* L. „Nature“, 1953, 172, 684.