

Р.А.Бобикян, А.И.Маркарян, Э.К.Африкян

ДЕЙСТВИЕ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ЯЙЦА АСКАРИДЫ И НЕМАТОДЫ - *Rhabd. macroserca*

В последние годы значительное внимание уделяется вопросам использования микроорганизмов и образуемых ими физиологически активных веществ для борьбы с гельминтами и патогенными нематодами. Некоторые работы в этом направлении успешно внедрены в практику. Так, в США, во Флориде, в борьбе с нематодами цитрусовых с хорошим результатом применяются некоторые виды грибов. Антибиотики гигромицины и актиномицины успешно испытаны при гельминтозных заболеваниях. Кучаева (1961) испытала в борьбе с дубовым шелкопрядом ряд нативных антибиотиков актиномицетного происхождения, получив положительные результаты с некоторыми из них. Имеются сообщения об энтомоцидной активности ряда антибиотиков против амбарных вредителей (Steinhaus, Bell, 1953), новобеоцина к яблонной плодовой гнили (Harriss, 1967), антимицина А ко многим вредоносным насекомым (Rido, Spyhalski, 1950) и другим антибиотическим веществам (см. Синицына, 1968). В наших работах было показано, что некоторые антибиотики актиномицетного происхождения обладают высокой токсичностью при скармливании гусеницам тутового шелкопряда (Африкян, 1963; Afrikian, 1965).

Помимо антибиотиков, микроорганизмы способны к образованию многих соединений, которые могут быть использованы для борьбы с различными гельминтами и нематодами. Работы в этой области относятся к проблеме биосанации внешней среды и представляют первостепенный интерес, тем более, что предложенные химические средства для обезвреживания нечистот, особенно от яиц гельминтов, не дают должного эффекта.

Особый интерес приобретают работы в области изыскания эффективных методов микробиологического обезвреживания нечистот от яиц гельминтов, в частности в борьбе с аскаридозом. Исследованиями ряда авторов установлено губительное действие различных почвенных бактерий и грибов на личинки анкилостомид, причем особенно активными оказались культуры хищных грибов (Сопрунов и Сопру-

нова, 1953; Тендетник, 1957; Ей, Алахвердян и Каримов, 1961). В опытах Гуджабидзе и Преображенской (1959) выявлено сильное угнетение развития яиц аскарид *Ascaris suum* под влиянием нативных фильтратов культур — *Act. olivaceus* и некоторых бактерий, выделенных из почв полей орошения. Было отмечено также снижение инвазионности яиц. Скрипка (1964), Скрипка и др. (1966, 1968) также установили, что культуры некоторых актиномицетов, в особенности, из серий *Coeruleus*, *Violeus* значительно подавляли развитие этих яиц аскарид. Систематического исследования о действии отдельных бактерий на гельминты не проведено.

Японскими авторами получены из культуры актиномицета пиридидины А и В (Tamura et al., 1963, 1964; Takahashi et al., 1963), а из штаммов энтомопатогенных грибов деструксин (Tamura et al., 1964), обладающие выраженным инсектицидным действием.

В течение 1963–1964 гг. в нашей лаборатории были изготовлены нативные препараты из культур ряда энтомогенных бактерий и грибов, которые испытывались старшим научным сотрудником Института эпидемиологии и гигиены им. Н.Б.Акопяна Министерства здравоохранения Армянской ССР А.И.Маркарян на развитие и инвазионность яиц *Ascaris lumbricoides* (Маркарян, 1967).

Материалы и методы

Опыты проводились на яйцах, собранных из фекалий, инвазированных аскаридами людей или извлеченных из матки аскарид. Перед постановкой опытов яйца освобождались от микрофлоры промыванием 2–3 раза стерильной водой и заливались жидкостью Барбагалла или 2,5% раствором медного купороса. В жидкости яйца оставлялись в течение 1–2 дней. Опыты проводились в основном с яйцами на стадии протопласта, в некоторых случаях с личинками.

Испытания проводились в стерильных часовых стеклах, куда вносились по 5 мл МПБ или картофельного настоя, 2 мл нативных фильтратов микроорганизмов и 2–3 капли суспензии яиц *Ascaris lumbricoides* (около 2000–3000 штук). Часовые стекла затем помещались в чашки Петри и инкубировались при 27°. В среднем, яйца выдерживались в нативных фильтратах 30 дней. В контрольных вариантах яйца содержались в воде и стерильной питательной среде, которая применялась для выращивания тех или иных культур микроорганизмов.

Результаты опыта учитывались каждые 3-4 дня по выявлению стадий развития яиц на 100-200 штук по отдельным вариантам опытов. Инвазивность яиц устанавливалась путем заражения белых мышей. Для каждого штамма использовалось по 10-15 мышей, а с каждой культурой проводилось по 5-6 серий опытов.

Объектами исследований служили выделенные и изученные нами 15 культур бактерий-кристаллофоров и 9 энтомогенных штаммов группы *Bac. cereus-thuringiensis*. Были испытаны некоторые культуры грибов актиномицетов, также выделенных в нашей лаборатории из больных мускардиной гусениц тутового шелкопряда. Изучалось также действие культуральной жидкости отдельных штаммов-антагонистов *Bac. subtilis-mesentericus* и культуры *Bac. megaterium*.

Культуры микроорганизмов выращивались на среде Придхема (Pridham, Gottlieb, 1948) следующего состава (г):

KH_2PO_4	- 2,38
K_2HPO_4	- 5,65
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	- 2,64
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	- 1,0
NaCl	- 0,5
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	- 0,0064
$\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	- 0,0011
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	- 0,0015
MnSO_4	- 0,008
Глюкоза	- 10,0
Дистил. вода	- до 1000,0 мл.

К среде добавлялись $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - 2 мг/л и дрожевой автолизат 10 мл/л, конечный pH 6,8-7,0. Среда стерилизовалась при 0,5 атм 20 мин. При выращивании культуры актиномицета в среду добавлялся мел 3-5 г/л. Штаммы микроорганизмов выращивались в колбах в условиях глубинного выращивания на качалке при 150-200 об/мин, инкубация 28°. Бактериальные культуры инкубировались 5 дней, грибные - 8-10 дней.

В качестве тест-организма для изучения антигельминтозного действия мы использовали копрокультуру нематоды *Rhabditis megascera*, полученную нами от проф. Дешена (Deschiens) из Института Пастера в Париже. Данная культура применялась Дешеном и его сотрудниками в аналогичных целях по изысканию химических

средств борьбы с гельминтами (Deschiens, 1943, 1944). В своих исследованиях мы применяли следующую методику.

Культура нематоды *Rhabd. macroserga* поддерживалась на кроличьем кале в смеси с почвой. Использовали испражнения кроликов, вскармливаемых естественной пищей (морковь, капуста, зелень и т.д.). Испражнения животных, поддерживаемых на синтетической диете, для этих целей не пригодны. Кал собирался вместе с подстилкой-почвой, к нему добавлялось некоторое количество воды и растиралось ложкой. Полученная гомогенная масса заполнялась в чашки Петри почти наполовину - слоем около 1 см. Чашки заворачивались бумагой и стерилизовались в автоклаве при 1 атм 30 минут. После автоклавирования они выдерживались при комнатной температуре одни сутки для высушивания и переносились в холодильник для хранения и последующего использования. Каждый раз заготавливается партия чашек для использования на 2-3 месяца.

Засев культуры нематоды осуществлялся переносом некоторого количества её копрокультуры (около 1-2 г массы кал-почва) из чашки 10-15 -дневной инкубации. Посевной материал берется прокаленным и остуженным металлическим шпателем из середины чашки, причем, поверхностный слой культуры удаляется. При внесении этого материала в другую чашку она осторожно и быстро перемешивается с испражнениями и почвой. Засеянные чашки хранятся при комнатной температуре.

Для поддержания культуры нематоды мы осуществляли систематические пересевы её в двух чашках каждые 15 дней. В летний период, когда температура в комнатах достигала 35-36°, пересевы производились каждые 7-10 дней. Перед посевом хранимых в холодильнике чашек они проверялись на стерильность. Загрязненные, заплесневевшие чашки отбраковывались. После пересева исходная чашка хранилась несколько дней, пока микроскопия отвитой не показывала наличия роста засеянной культуры.

Изучение действия микроорганизмов и их продуктов проводилось внесением их или непосредственно в чашку с копрокультурой нематоды, или добавлением в часовое стекло, куда вносилось некоторое количество 4-5-дневной культуры *Rhabd. macroserga*. В последнем случае на часовое стекло вносились разные концентрации микробных продуктов в физиологическом растворе и после перемеши-

вания с копрокультурой оно помещалось в чашку и инкубировалось при 25°. Учет результатов производился через 24–28 часов, а в дальнейшем, на 7–10 сутки-микроскопией при увеличении 70–150. Гибель нематод учитывалась по количеству форм, потерявших подвижность.

Обсуждение результатов

В таблице I подытожены результаты опытов по характеру действия указанных культур микробов на развитие яиц и инвазионность аскарид. Как видно из приведенных данных, большинство испытанных штаммов не оказывают влияния на строение и развитие яиц аскарид *Ascaris lumbricoides* и их инвазионное действие. Среди них культуры бактерий *Bac. cereus - thuringiensis*, образующие и не образующие энтомоцидные токсины, штаммы-продуценты *Bac. subtilis - mesentericus*, *Bac. megaterium* и пенициллов. Штамм дубчатого грибка, дифференцируемый нами как *A. globisporus citreus* и активно продуцирующий антибиотик широкого спектра действия, также был лишен угнетающего действия на развитие яиц аскарид.

Неблагоприятное влияние на аскариды не проявляла культура № 647, образующая термостабильный энтомоцидный токсин. Данная культура кристаллофора в процессе хранения диссоциировала в аспорогенную расу и образовывала лишь этот токсин. Серологически она относится к типу *berliner*. Таким образом, следует заключить, что энтомоцидные метаболиты бактерий *Bac. cereus - thuringiensis*, как параспоровые кристаллы, так и растворимый термостабильный токсин, очевидно лишены токсического воздействия на яйца аскарид и их инвазионность. По-видимому, подобным влиянием не обладают вегетативные формы и споры указанной группы, поскольку в наших опытах применялись нативные фильтраты жизнеспособных бактерий.

Замедление эмбрионального развития яиц отмечено под влиянием нативного фильтрата штамма 805, описываемого как разновидность *Bac. thuringiensis v. caucasicus* /Африкян, Чил-Акопян, 1968/. Несколько более сильным ингибирующим действием обладал биотинзависимый штамм 273, приписанный к группе бактерий *Bac. subtilis-mesentericus*, но выделяемый как новая систематическая категория спорообразующих бактерий /Африкян, 1970/.

Более сильное действие отмечается при использовании нативных фильтратов грибов *Fusarium sporothrichella* и *Beauveria bassiana*. Наблюдения над стадиями развития яиц спустя 10 дней обнаруживают дегенеративные изменения бластулы и гастулы, а процент яиц на стадии личинок в конце опыта в среднем вдвое меньше, чем в контрольных вариантах. Подобным действием обладают культуры бактерий *Bac.coagulans* и особенно *Bac.sereus* шт.652. Испытанный штамм *Bac.coagulans* был выделен нами из подвергнутого порче консервированного томата. Штамм *Bac.sereus* № 652 выделен нами в 1959 г. из погибшей куколки тутового шелкопряда при выкормке на племенной станции шелководства в районе г.Еревана.

Культура этого штамма образует на МПА типичные колонии *Bac.sereus* — плоские, зернистые, сильно ризоидные. Вегетативные клетки — короткими цепочками, подвижные I, 0-I, Ix2,5 мкр. Споры овальные 0,8—0,9x1,3—1,5 мкр, клетки не раздувают.

На ломтике картофеля — короткий желтоватый, слабозернистый рост без пигментации ломтика. Желатину интенсивно разжижает, молоко пептонизирует, крахмал гидролизует. Ацетилметилкарбинол образует, нитраты восстанавливает. Индол и сероводород не образуются. Каталазу интенсивно продуцирует, инвертазу не образует.

Культура усваивает глюкозу, фруктозу, рибозу, мальтозу, трегалозу, целлобиозу, рафинозу (слабо), глицерин и цитраты. Слабо усваиваются сахароза и лактоза, не усваиваются арабиноза, рамноза, ксилоза, галактоза, манноза, сорбоза, инулин, мелибиоза, мелезитоза, маннит, дульцит, салицин.

Антагонистические свойства данного штамма оказались слабо выраженными. Не было обнаружено антагонизма по отношению к культурам стафилококка, кишечной палочки, дрожжей (*Candida albicans*, *Torula utilis*). Слабое угнетение роста нами было установлено лишь к отдельным штаммам *Bac.sereus*, *Bac. megaterium*.

Сводные данные опытов, подытоженные в таблице 2, показывают, что в целом культуры бактерий *Bac.thuringiensis*, образующие кристаллоподобные энтомоцидные токсины, не обладают выраженным губительным действием на нематоды. Угнетение развития и частичная гибель нематод от испытанных культур бактерий, очевидно, не стоит в связи с их энтомопатогенным действием или образованием специфических энтомоцидных токсинов в виде параспоральных включений.

Таблица I
Влияние различных микроорганизмов на аскариды

Характер действия	Ш т а м м ы		Другие микроорганизмы
	Вас. thuringiensis	Вас. cereus	
Без влияния на строение и развитие яиц, отсутствие инвазионного действия	berliner 647 galleriae 812, 818, 820, 821, 822, 829, 833 sotto-dendrolimus 784 caucasicus 811, 828, 831	sotto-dendrolimus 631, 657 несеро- типир.- 621, 720, 721, 806, 808, 809	Вас. mesentericus fuscus шт. 26, " citreus шт. 63, " gallophilus шт. 1. С. II, С. II, Вас. subtilis шт. 76, Вас. megaterium шт. 240, Act. globisporus, Act. sp. шт. 13, P. cyclopium P. glaucum, Beauveria sp., 806, 867, 868, Fusarium bulbigenum v. nivens.
Замедление эмбрионального развития	caucasicus 805		Вас. biotini шт. 273
Задержка развития и дегенеративные изменения яиц, подавление инвазионного действия		sotto-dendrolimus 652	Fusarium sporothrichella Beauveria bassiana шт. 10, Вас. coagulans шт. 5

Это видно из приводимых данных таблицы: как продуценты подобных токсинов, так и культуры *Вас. cereus*, лишенные этой способности, обладают свойством угнетать развитие нематод. В наших опытах внесение в копрокультуру поромковидных форм препаратов, изготовленных на основе выделенных нами культур бактерий, в большинстве случа-

Влияние различных энтомопатогенных микроорганизмов и бактериальных инсектицидов на нематоды *Rhabd. masoensis*

Характер действия	Штаммы <i>Bac. thuringiensis</i> по серотипам	Штаммы <i>Bac. cereus</i>		Другие микроорганизмы
		Бактериальные инсектицидные препараты по серотипам	титр в клетках млрд/г	
Без влияния на развитие нематод	<i>galleriae</i> 812, 821 <i>causcasicus</i> 831	809 <i>galleriae</i> БИП-811 <i>causcasicus</i> БИП-811 БИП-837 несеротипир. БИП-827	6 85 57 93	<i>Bac. biotini</i> шт. 273 <i>Beauveria bassiana</i> шт. Тб.
Угнетение развития и частичная гибель нематод	<i>galleriae</i> - 822 <i>causcasicus</i> 805, 828	808 <i>causcasicus</i> БИП-811	400	<i>Bac. mesentericus citreus</i> шт. 63, " " <i>gallophilus</i> шт. 2П, 7П, <i>Bac. coagulans</i> шт. 5

ев не проявляет губительного действия на нематоды.

Среди культур, служивших нам основой для приготовления таких препаратов, имелись представители *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* и *Bac. thuringiensis* var. *galleriae*. Лишь препарат одной культуры № 811 разновидности *caucasicus* проявлял угнетающее действие на нематоды. В этих опытах применялось введение препарата в концентрации 5%. Во всех случаях препараты вносились в копрокультуру нематод в 2-х концентрациях: по 2 мл 0,5% и 5% растворов препарата. Как правило, применялись препараты без наполнителей, чтобы добиться возможно массовой дозы бактерий.

Представляет интерес угнетающее действие на развитие нематод некоторых культур группы *Bac. mesentericus*. Среди подобных культур имеются весьма интересные штаммы. Так, культура № 63 — очень выраженный антагонист ко многим видам микроорганизмов. Этот штамм идентифицируется нами как *Bac. mesentericus citreus* в связи с характерной пигментацией лимонного цвета. Штаммы С₂П и С₇П — галофильные культуры, выделенные нами из пухлого солончака. Штамм *Bac. coagulans* выделен из томата, подвергнутого порче. Он выделен нами из образцов томатного сока, производства Ереванского консервного завода. Все эти культуры являлись активными антагонистами ко многим видам микробов.

Энтомопатогенный грибок *B. bassiana*, выделенный из погибшей гусеницы тутового шелкопряда, пораженной мускардиной, не проявил губительного действия на нематоды. Аналогичное было установлено и с культурой нового типа спорообразующих бактерий, характеризующегося зависимостью от биотина.

Полученные нами результаты исследований указывают на отсутствие связи между энтомопатогенным действием спорообразующих бактерий и угнетением развития нематод. Губительное действие на нематоды связано с образованием микроорганизмами активных метаболитов другого рода. Не исключена возможность, что это действие обусловлено влиянием антибиотиков токсической природы.

В ходе работ по изучению болезней тутового шелкопряда в нашей лаборатории было выделено из погибших гусениц 32 культуры грибов и актиномицетов. Нативные фильтраты этих культур, выраженные в течение 8 дней на МПБ с 1% глюкозы, пептонкартофельном отваре (ПКО) с 0,5% пептона и 1% глицерина, а также на среде СР II (Красильников, 1950), были испытаны на оживление гусениц тутового

шелкопряда. Результаты опытов со штаммами, угнетающими оживление грены, представлены в таблице 3. Наиболее сильное греноедное влияние было отмечено у штаммов энтомопатогенных грибов *Bac. verticillata* и *Beauveria*, выращенных на МПБ. Как правило, подобное действие не отмечается при выращивании культур микробов на пептонкартофельном отваре и синтетической среде. Испытанные

Таблица 3

Влияние нативных фильтратов энтомопатогенных грибов на оживление грены тутового шелкопряда (выдержка в фильтратах 30 мин.)

Культура гриба	Питательная среда	Количество грен-нинок	Колич. оживших грен-нинок	% ожив-ления
<i>Beauveria bassiana</i> шт. Тб.	МПБ	I67	I2I	72
	ПКО	I67	I37	82
	СРП	I66	I38	83
<i>Beauveria globulifera</i> Bu-8	МПБ	I70	I33	78
	ПКО	I55	I28	82
	СРП	I66	I39	84
<i>Beauveria</i> sp. шт. 89	МПБ	200	59	29
	ПКО	I59	I37	86
	СРП	I48	I69	97
<i>Beauveria</i> sp. шт. I48	МПБ	I75	II5	66
	ПКО	I75	I45	83
	СРП	I59	I34	84
<i>Spicaria verticillata</i> Bu-9	МПБ	I75	72	4I
	ПКО	I65	I30	79
	СРП	I62	I35	83
Контроль (обработка пит. средой)	МПБ	I87	I58	84
	ПКО	I5I	I33	88
	СРП	I68	I45	86

штаммы энтомопатогенных грибов не обладали антибиотическим действием по отношению к *St. aureus*, *B. coli*, *Candida pseudotropicalis*, *Mycobacterium* B-5, *Bac. cereus* шт. 6I4. По-видимому, греноедное действие этих штаммов энтомопатогенных организмов связано с биосинтезом токсических продуктов другой природы.

Выводы

1. Испытанные культуры бактерий *Bac. thuringiensis* не обладают токсическим действием на развитие яиц и инвазивное действие аскарид *Ascaris lumbricoides*. Губительное действие на эти процессы отмечено у ряда культур спорообразующих бактерий других видов и грибов.

2. Большинство изученных культур *Bac. thuringiensis* и все испытанные инсектицидные препараты этих бактерий не обладают губительным действием на развитие нематод *R. macrocerda*. Нативные фильтраты отдельных культур *Bac. cereus-thuringiensis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. coagulans* угнетают развитие нематод в копрокультуре и вызывают их частичную гибель.

3. Установлено токсическое действие энтомопатогенных грибов на оживление гренн, не вызванное образованием антибиотиков.

Ռ-Հ-Բարիկյան, Հ-Ի-Մարգարյան, Է-Գ-Աֆրիկյան

ԻՆՏՆՈՒՊՈԼՈՐԱՆԵ ՄԻԿՐՈՐԳԱՆԻՅԱՆԵՐԻ ԱՋՐԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
ՍՏՆԱՐԴՆԵՐԻ ԶՎԵՐԻ ԵՎ REABD. MACRO CERCA
ԵՆՍՏՈՒՄՑԻ ՎՐԱ

Ա Մ Փ Ռ Փ Ո Ւ Մ

Փորձարկված *Bac. thuringiensis* տեսակի բակտերիաները առքսիկ ազդեցություն չեն ցուցաբերում *Ascaris lumbricoides*-ի ձվերի զարգացման և ինվազիոն համակության վրա: Այդ պրոցեսների վրա առքսիկ ազդեցություն նկատվել է այլ տեսակներին զառկանող մի շարք սպորափոր բակտերիաների և սնկերի կողմից:

Bac. thuringiensis տեսակի որոշ բակտերիաներ և նրանց բուր ինսեկտիցիդային պրոպարաներ մշտող ազդեցություն չեն ունենում նեմատոդաների՝ *R. macrocerca* զարգացման վրա, իսկ *Bac. cereus-thuringiensis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. coagulans* խմբերին զառկանող առանձին կուլտուրաների նախիկ ֆեդուկները մշտում են նեմատոդաների զարգացումը կոպրոկուլյարայի վիճակում և առաջաց-

նույն նրանց մասնակի մահացութիւնը:

Հաստատւած է Ենտոմոպաթոգեն սնկերի տոքսիկ ազդեցութիւնը թթենու շերամի գրեհայի արթնացման պրոցեսների վրա: Այդ ազդեցութիւնը կապւած է անտիբիոտիկների առաջացման հետ:

R.H.Bobikian, I.A.Markarian, E.G.Afrikanian.

THE ACTION OF ENTOMOPATHOGENIC MICROORGANISMS
ON EGGS OF ASCARIS AND NEMATODE RHABD.MACROCERCA

S u m m a r y

The tested cultures of *Bac.thuringiensis* have not toxic action on the development of eggs and invasive activity of *Ascaris lumbricoides*. This action has been established during the tests with other sporeforming bacteria and fungi.

The growth of nematodes *Rhabd.macrocerca* is not inhibited by the action of insecticide preparation from *Bac.thuringiensis* cultures. The inhibitory action has been noted under the influence of native filtrates of some cultures of *Bac.cereus-thuringiensis*, *Bac.mesentericus*, *Bac.coagulans*.

Some cultures of entomopathogenic fungi have fungicide action on the viability and growth of silkworm eggs. This action is not connected with the formation of antibiotics.