

Л. А. ЧИЛ-АКОПЯН, И. А. КИРАКОСЯН,
А. Ю. ИСМАИЛОВА, Ю. Л. КОЧАРЯН

БАКТЕРИАЛЬНАЯ МИКРОФЛОРА ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА В ДИНАМИКЕ ЕГО РАЗВИТИЯ

Микрофлора тутового шелкопряда изучалась еще в ранние годы становления микробиологии. Работами Пастера [22] были выявлены основные группы возбудителей инфекционных заболеваний тутового шелкопряда, а в последующие годы исследователями многих стран была изучена роль отдельных видов бактерий в патологии этого насекомого [4, 8, 12—15, 20, 21].

Нормальная микрофлора тутового шелкопряда и ее роль в жизнедеятельности этого насекомого так же, как в патогенезе его различных инфекций, изучены слабо. Имеющиеся данные свидетельствуют о зависимости ее от микрофлоры поедаемого корма и среды обитания [8, 11—15, 21, 24]. Исследования показали важную роль нормальной микрофлоры в физиологии развития и жизнедеятельности многих видов насекомых [2, 3, 17, 18].

Целью наших исследований являлось изучение качественного и количественного составов микрофлоры тутового шелкопряда в динамике его развития. Одновременно изучалась эпифитная микрофлора листа шелковицы и подстилки в связи с кишечной микрофлорой гусениц этого насекомого.

Работа проводилась в условиях производственной выкормки Ереванской племенной шелководческой станции (ПШС).

Наблюдения велись над 5 гусеницами, содержавшимися каждая отдельно и двумя группами по 15 гусениц в каждой. Экскременты для анализа брались один-два раза в каждом возрасте и 3 раза—в последнем, пятом возрасте. Для сбора экскрементов гусениц высаживали на стерильные листки бумаги. Спустя 1—2 часа экскременты собирали, взвешивали и после разведения водой наносили на среду, разлитую в чашки Петри. Аналогично производился анализ куколок, бабочек и грен. Микрофлора скармливаемого гусеницам листа и подстилки анализировалась одновременно с экскрементами.

Количественный и качественный анализы микрофлоры производились на четырех агаризованных средах: МПА, СР-1, МПА+сусло, среда Эшби. Мясопептонный агар использовался для учета бактерий, смесь суслоагара (Балинг—7°) с мясопептонным агаром (1:1)—для грибов и лучшей дифференциации спорообразующих бактерий, в соответствии с рекомендацией Мишустина [9]. Для выявления актиномицетов высеив производился на агаризованную синтетическую среду СР-1, по Красильникову [5], а олигонитрофилов—на эшбиагар. Бактерии из естественной и патогенной микрофлоры тутового шелкопряда в дальнейшем выделялись в чистую культуру для детального морфо-физиологического изучения и идентификации.

Таблица 1

Динамика микрофлоры гусениц тутового шелкопряда, скормливаемого листа и подстилки по стадиям развития (количество микробов в тыс. на 1 г обследованного образца)

Возраст	День возраста	Образцы	Всего микроорганизмов	Всего бактерий	Грибы	Спорообразующие бактерии					Неспороносные бактерии			
						всего	Bac. cereus		Bac. subtilis-mesentericus	спороносы разные	всего	энтерококки		Colt-aerogenes
							Cr ⁺ *	Cr ⁻				всего	в том числе Enteroc. sp.	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	2	лист шелковицы (корм) гусеницы подстилка	7,8	7,2	—	—	—	—	—	—	7,2	4,0	—	3,2
			0,8	0,7	—	—	—	—	—	—	0,7	0,3	—	0,1
			2,8	2,0	—	0,2	—	0,2	—	—	1,6	0,4	—	0,6
2	2	лист шелковицы (корм) экскременты подстилка	5,8	0,8	4,8	0,7	—	0,5	0,2	—	0,1	—	—	—
			8,2	6,9	1,0	0,3	—	—	0,1	0,2	6,6	3,0	—	3,2
			2,9	2,6	0,2	0,2	—	—	0,1	0,1	2,4	0,9	—	1,4
3	1	лист шелковицы (корм) экскременты подстилка	7,8	2,5	4,6	0,5	—	—	—	—	—	—	—	—
			33,0	24,0	5,0	10,0	5,0	5,0	—	—	14,0	—	—	11,0
			2,5	2,0	0,4	0,5	—	0,3	—	0,2	1,5	0,4	—	0,3
4	2	лист шелковицы (корм) экскременты подстилка	4,9	4,4	0,2	0,8	—	0,3	0,3	0,2	3,6	1,9	0,2	1,5
			2,8	1,4	1,2	0,8	0,4	—	0,2	0,2	0,6	0,2	—	0,2
			22,6	19,6	1,0	3,2	—	0,2	3,0	—	16,4	6,0	—	4,4
	4	лист шелковицы (корм) экскременты подстилка	3,5	2,6	0,8	0,8	0,2	—	0,4	0,2	1,8	0,9	—	0,7
			3,6	3,2	0,3	0,6	—	—	0,5	0,1	2,6	1,3	0,5	1,1
			11,0	9,8	0,8	1,8	—	0,4	1,2	0,2	8,0	2,2	—	4,8

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
5	2	лист шелковицы (корм)	4,1	2,8	1,2	0,8	0,2	0,2	0,4	—	2,0	0,8	—	1,0
		экскременты	14,9	8,6	5,0	5,3	2,5	2,5	0,3	—	3,3	1,3	0,3	1,7
		подстилка	28,6	25,2	2,8	3,2	2,0	—	1,2	—	22,0	20,0	20,0	—
	5	лист шелковицы (корм)	20,0	15,8	3,0	10,6	10,0	—	—	0,6	5,2	1,8	—	2,8
		экскременты	31,2	4,7	21,0	1,9	1,8	—	0,1	—	2,8	2,2	2,1	0,4
		подстилка	110,0	81,0	20,0	40,0	40,0	—	—	—	41,0	40,0	40,0	—
	8	лист шелковицы (корм)	27,0	25,1	1,2	0,8	—	—	—	0,8	24,3	21,2	20,0	1,8
		экскременты	81,0	72,5	3,5	0,5	—	0,4	0,1	—	72,0	62,0	35,0	8,0
		подстилка	950,0	480,0	400,0	—	—	—	—	—	480,0	460,0	400,0	20,0
Кукол- ка	7	лист шелковицы	26,7	20,5	4,0	2,0	0,2	—	0,6	1,2	18,5	9,0	2,0	7,4
		куколка	4,5	3,3	0,2	0,3	—	0,3	—	—	3,0	2,2	2,0	0,8
		подстилка, оставленная на 7 дней	2700,0	2010,0	500,0	—	—	—	—	—	2010,0	2000,0	2000,0	10,0
	1	бабочка	3,7	3,4	0,2	0,6	—	0,6	—	—	2,8	2,4	0,6	0,2

Примечания: 1. Отсутствие групп и видов микроорганизмов в ряде образцов указывает на их небольшое количество, не более 100 клеток на 1 г исследуемого образца.

2. Знаком Cg^+ обозначены культуры — кристаллофоры; Cg^- — некристаллофоры.

Параллельно с изучением валового содержания бактерий, актиномицетов и грибов определялся их состав микрокопированием препаратов из них и дифференциацией культурально-морфологических признаков. Морфология клеток в цикле развития культуры изучалась в живых препаратах. Отдельные представители разных видов бактерий изучались в электронном микроскопе на наличие жгутиков. Окраска по Граму производилась в модификации Синева по описанию Лебедевой [7]. Усвоение источников углеродного питания изучалось на модифицированной среде Придхема и Готлиба [23]. Ряд биохимических особенностей определялся общепринятыми микробиологическими методами [10, 19].

Результаты изучения антагонистических свойств выделенных культур бактерий использовались при видовой и групповой дифференциации бактерий [1, 6].

В табл. 1 приведены основные группы микроорганизмов, обнаруженных при анализе микрофлоры листа шелковицы, экскрементов и подстилки по стадиям развития тутового шелкопряда. Приводимые данные характеризуют микрофлору типичного варианта исследованных гусениц.

Результаты анализов свидетельствуют о том, что в начальном периоде развития в микрофлоре экскрементов преимущественно обнаруживались неспороносные бактерии, а спороносные практически отсутствовали.

Микрофлора свежего листа, который дается в корм ранним возрастам шелкопряда, сравнительно бедна микроорганизмами и представлена главным образом неспорообразующими бактериями. В дальнейшем отмечается постепенное загрязнение ее бациллярной флорой.

Чрезвычайно важно отметить, что в микрофлоре листа шелковицы со временем начинают преобладать бактерии группы *Bac. cereus-thuringiensis*—возбудители наиболее опасных бактериозов. Начиная с 4-го возраста в эпифитной микрофлоре листа обнаруживались спороносные бактерии, образующие энтомоцидные кристаллоидные токсины. В отдельных вариантах бактерии данной группы составляли до половины всего микробного населения. Обнаружение в составе микрофлоры листа, скормливаемого поздним возрастам шелкопряда, заметного числа *Bac. subtilis-mesentericus* и *Bac. mycoides* является показателем его загрязненности.

Валовое число микроорганизмов экскрементов и подстилки, по данным наших исследований, постепенно увеличивается, достигая максимума к середине 5-го возраста, после чего отмечается резкий спад количества микрофлоры, особенно бациллярных форм. По мере развития гусениц на фоне общего нарастания численности микроорганизмов обнаружены значительные колебания. У гусениц 4 и 5 возрастов отмечается более высокая, по сравнению с начальными возрастами, инфицированность возбудителями опасных бактериозов.

Грибная флора особенно обильна в подстилке при повышенной влажности. В неубираемой подстилке она достигает 0,5 млн и более зародышей на 1 г обследованного субстрата.

Актиномицеты обнаруживались в незначительном количестве. Бо-

лее высокий процент приходится на группу микобактерий. Последние регулярно выявлялись в небольших количествах в составе микрофлоры обследованных субстратов, однако в отдельных случаях, особенно в неубираемой подстилке, они обнаруживались в количестве десятков и сотен тысяч клеток на 1 г.

В составе неспорозоносных бактерий показательное развитие группы энтерококков (*Enterococcus* sp.), нередко являющихся возбудителями бактериозов тутового шелкопряда. Количество их сильно возрастает в кишечной микрофлоре гусениц 5-го возраста. В микрофлоре скормливаемого листа они почти не отмечались, исключая конец 5-го возраста. Ряд культур доминантных групп энтеробактерий идентифицированы нами как представители рода *Brevibacterium*, описанного у некоторых насекомых [18]. Бактерии группы *coli-aerogenes* обнаруживались почти регулярно во всех обследованных образцах. Состав их непостоянен и резко меняется в зависимости от стадий развития шелкопряда и внешних условий.

Как видно из таблицы, в составе микрофлоры кишечника куколки обнаружены спорообразующие бактерии *Bac. cereus*, а также патогенные культуры, трактуемые нами как энтеробактерии. По данным наших анализов, микрофлора бабочек и грены, хранившихся в течение одного года или летнего сезона, представлена неспорозоносными бактериями — кокковидными формами. Нередко обнаруживались также грибные микроорганизмы. Микрофлора мурашей представлена в основном банальной микрофлорой, значительно изменчивой в зависимости от загрязненности.

Микробиологические анализы на среде Эшби показали незначительное распространение в кишечной микрофлоре гусениц, в основном со 2-го возраста, олигонитрофильных микроорганизмов. Сравнительно обильны эти бактерии в эпифитной микрофлоре листа шелковицы.

Полученные нами данные подтверждают результаты исследований цитированных авторов относительно тесной связи микрофлоры шелкопряда с микробным населением поедаемого корма и условиями внешней среды, способствующими развитию той или иной группы микроорганизмов.

Проведенные исследования позволяют нам сделать следующие выводы.

Состав кишечной микрофлоры тутового шелкопряда непостоянен и находится в тесной зависимости от микрофлоры поедаемого корма и условий внешней среды.

Общее количество микроорганизмов по мере развития гусениц увеличивается и доходит до максимума в середине 5-го возраста.

В составе микрофлоры листа шелковицы, кишечника гусениц и подстилки доминируют энтерококки и бактерии группы *coli-aerogenes*. Регулярно обнаруживаются *Bac. cereus* и *Bac. thuringiensis*.

Լ. Ա. ՉԻԼ-ՉԱԿՈՔՅԱՆ, Ի. Ա. ԿԻՐԱԿՈՍՅԱՆ, Ա. ՅՈՒ. ԻՍՄԱԻԼՈՎԱ, ՅՈՒ. Լ. ՔՈՉԱՐՅԱՆ

ԹԹԵՆՈՒ ՇԵՐԱՄՈՐԴԻ ԲԱԿՏԵՐԻԱԼ ՄԻԿՐՈՖԼՈՐԱՆ ԸՍՏ ՉԱՐԳԱՅՄԱՆ ՓՈԽԼԵՐԻ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Թթենու շերամորդի աղիքային տրակտի միկրոֆլորայի ընդհանուր բանակը ավելանում է ըստ զարգացման փուլերի և հասնում է իր մաքսիմումին 5-րդ հասակի կեսերին:

Շերամորդի աղիքային տրակտի միկրոֆլորայի տեսակային կազմը սերտորեն կապված է թթենու տերևի էպիֆիտ և արտաքին միջավայրի միկրոֆլորայից: Աղիքային միկրոֆլորայի բակտերիալ կազմը հիմնականում ներկայացված է ոչ սպորավոր բակտերիաներով:

Սպորավոր բակտերիաներից հիմնականում հանդիպում են *Bac. cereus* և *Bac. thuringiensis* բակտերիաները, որոնք հանդիսանում են էնտոմոցիդ սոքսին արտադրող կոպտուրաներ:

Էնտոմոպատոգեն միկրոֆլորայի գերակշռումը 4-րդ—5-րդ հասակներում հաստատում է այդ հասակների որդերի մոտ բակտերիալ հիվանդությունների հաճախականությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Африкян Э. К. Бактерии-антагонисты и их применение, Изд. АН АрмССР, Ереван, 1959.
2. Гукасян А. Б. Труды сектора микробиологии АН АрмССР, Ереван, в. 11, 111, 1961.
3. Гукасян А. Б. Сб. Микроорганизмы в борьбе с вредителями лесного хозяйства, М., 191—199, 1966.
4. Жмуйдзинович В. Г. Тр. Кавказской шелкостанции за 1891 г., Тифлис, 4, 107, 1892.
5. Красильников Н. А. Актиномицеты-антагонисты и антибиотические вещества, 1950.
6. Красильников Н. А. Успехи совр. биол., 31, 3, 346, 1951.
7. Лебедева М. Н. Руководство к практическим занятиям по микробиологии, 1950.
8. Михайлов Е. Н. Болезни и вредители шелкопрядов, М., 1958.
9. Мишустин Е. Н. Микробиология, 17, 3, 201, 1948.
10. Омелянский В. Л. Практическое руководство по микробиологии, Изд. АН СССР, М.—Л., 1940.
11. Райвич Л. Тр. комитета шелководства Моск. общества с/х., 19, М., 1916.
12. Штейнхауз Э. Микробиология насекомых, М., 1950.
13. Штейнхауз Э. Патология насекомых, М., 1952.
14. Штибен В. Д. Болезни червей и борьба с ними, М., Ташкент, 1933.
15. Штибен В. Д. Бактериозы гусениц тутового шелкопряда, Изд. САОГИЗ, Ташкент, 1934.
16. Hurpin B. Ann. de la nutrition et de l'alimentation, 16, 6, 155, 1962.
17. Hurpin B. In: Insect pathol. a. microbiol. control. Ed. P. A. Van. der Laan Amsterdam, 135, 1967.
18. Lysenko O. J. Insect Pathol., 1, 1, 1959.
19. Manual of microbiol. methods, Y., 1957.
20. Masera E. Bac. sper. di Padova (Ann. della R. Staz.), 47, 99, 1934.
21. Paillot A. Traité des maladies du ver à soie. Doie., Paris, 1930.
22. Pasteur L. Etude sur la maladies des vers à soie, 1870.
23. Pridham T. G., Gottlieb D. J. Bacteriol., 56, 1, 107, 1948.
24. Rusu I., Bica V. Lucrări stiint. Stat. centr. cercetari sericult. si apicult., 4, 103, 1963.