

Е. Н. МИХАЙЛОВ

# ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Допущено Главным управлением высшего и среднего сельскохозяйственного образования Министерства сельского хозяйства СССР в качестве учебного пособия для специализированных факультетов вузов и техникумов

ТАШКЕНТ ЁҚИТУВЧИ 1984

Автор — заслуженный деятель науки и техники Узбекской ССР, доктор сельскохозяйственных наук, профессор Ташкентского ордена Дружбы народов сельскохозяйственного института. Книга является первой, за после ние четверть века, издаваемой в нашей стране сводкой современных знаний в области инфекционных болезней тутового шелкопряда, способов борьбы с ними. Предназначена в качестве учебного пособия для специализированных факультетов вузов и техникумов, будет полезна для студентов заочного обучения и слушателей курсов повышения квалификации агрономов-шелководов, может быть использована аспирантами, научными работниками.

Рецензенты: заместитель министра сельского хозяйства УзССР *Таджиев Э. Х.*; директор Среднеазиатского научно-исследовательского института защиты растений МСХ СССР, доктор биол. наук, член-корр. ВАСХНИЛ *Алимухамедов С. Н.*; декан факультета шелководства ТашСХИ, доктор с.-х. наук, профессор *Рахманбердыев К.*

*ЕВГЕНИЙ НИКОЛАЕВИЧ МИХАЙЛОВ*

## **ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА**

Учебное пособие для специализированных  
факультетов вузов и техникумов

*Ташкент · Уқитувчи · 1984*

Редактор *Ф. Д. Трофимов*  
Художественный редактор *В. П. Слабунов*  
Технический редактор *Т. И. Грешникова*  
Корректор *А. Т. Юлдашева*

ИБ 2607

Сдано в набор 21.02.82. Подписано в печать 18.06.84. Р-07518. Формат 60x90/16. Бумага тип №1. Литературная гарн. Кегль 10 без шпон. Печать высокая. Усл. п. л. 18,5. Усл. кр.-отт. 18,5. Изд. л. 21,18. Тираж 5000. Зак. 2634. Цена 1 р.

Издательство «Уқитувчи» Ташкент, Навои, 30.  
Договор № 6 — 284 — 81.

Головное предприятие ТППО «Матбуот» Государственного комитета УзССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. Ташкент, Ул. Навои, 30. 1984.

М 3804020700 139 1984—84  
353(04)—84

© Издательство «Уқитувчи», 1984 г.

## В В Е Д Е Н И Е

Шелководство — существенный сырьевой источник народного хозяйства Советского Союза. За годы 10-й пятилетки шелководы продали государству 230 290 т коконов (в среднем 46 тыс. т в год), что на 15% больше, чем в предыдущую пятилетку, и выполнили план на 110%. Начало 11-й пятилетки (1981 г.) было отмечено успешным выполнением плана на 113%, и заготовка коконов в СССР впервые достигла 50,7 тыс. т. В 1982 г., в ознаменование 60-летия образования СССР, план заготовки коконов снова был перевыполнен. Шелководство и тутоводство — два основных звена отрасли — непосредственно не участвуют в решении Продовольственной программы, выдвинутой майским (1982 г.) Пленумом ЦК КПСС, однако успехи в деле производства коконов содействуют ее успешному выполнению, усиливая экономическую мощь нашего сельского хозяйства.

Успехи, достигнутые отечественным шелководством, могли быть более значительными, если бы не болезни тутового шелкопряда — одной из главных причин убыли гусениц во время выкормки, снижения урожая коконов и ухудшения их качества. К сожалению, достоверных данных о размерах гибели гусениц от болезней нет. Известные представления об этом могут дать сведения об урожайности коконов. Средняя урожайность коконов с одного грамма гусениц по Советскому Союзу в целом в 1981 г. составляла 3,12 кг, или 60,2 кг коконов с одной коробки грены; это значит, что при 41 800 гусениц в коробке и средней массе кокона 1,7 г, потери гусениц составили 15,28%. От общего количества заготовленных коконов 50 782 тыс. т это составит 7759 тыс. т, что значительно превосходит заготовительные возможности каждой из двух наиболее производительных республик — Азербайджана (4885 тыс. т) и Туркмении (5128 тыс. т), если не считать Узбекистана (31 879 тыс. т), где заготавливается более 60% коконов, производимых в СССР. В ряде республик урожайность с 1 г гусениц значительно ниже средней по Советскому Союзу и убыль гусениц за время выкормки достигает половины и более их численности.

Кроме болезней существуют еще механические причины потерь: падение гусениц с выкормочных стеллажей, потери или повреждение их при смене подстилки, ранение и расхищение различными вредите-

лями выкормок. Снижение урожая может быть вызвано уменьшением веса коконов под влиянием неблагоприятных условий года и недокорма гусениц из-за нехватки листьев шелковицы. Данных, которые позволили бы судить о роли каждой из причин в отдельности, нет. Однако опыт показывает, что потери от болезней с полной очевидностью превышают все остальные. Кроме того, борьба с болезнями — сложное мероприятие, тогда как потери от механических и других причин могут быть предотвращены шелководами простыми средствами.

По данным 1979 г., СССР занимает третье место в мире по размерам годового производства коконов, после КНР — 228 тыс. т (включая 42 тыс. т коконов диких шелкопрядов) и Японии — 81,3 тыс. т. Япония — наиболее передовая по использованию научных методов в шелководстве, по уровню агротехники, урожайности и качеству коконов. Однако, по данным Министерства сельского хозяйства и лесоводства Японии, инфекционные заболевания шелкопряда намного снижают урожай коконов (табл. 1).

Таблица 1

Ущерб, причиняемый шелководству Японии болезнями  
(1956 — 1967)

Год	Сбор и убыль коконов			Состав болезней, %			
	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж
1956	109169	12415	11,4	75,8	10,1	11,8	2,3
1957	119454	10473	8,8	65,6	8,7	21,8	3,9
1958	116724	10814	9,3	72,8	9,0	14,4	3,8
1959	110854	8024	7,2	66,8	8,0	17,2	8,0
1960	111208	9429	8,5	75,0	9,7	10,3	5,0
1961	115287	9001	7,8	72,6	11,5	5,5	10,4
1962	109065	8551	7,8	72,4	8,5	7,9	11,2
1963	110916	9515	8,6	65,5	11,4	9,2	13,9
1964	111648	7293	6,5	78,0	9,1	7,8	5,1
1965	105513	5030	4,8	72,7	9,7	9,4	8,2
1966	105392	4564	4,3	67,3	12,9	10,8	9,0
1967	114476	5193	4,5	66,5	11,0	9,0	13,5

А — фактическое производство коконов, т; Б — потери коконов от болезней, т. В — потери от болезней, % к фактическому сбору коконов; Г — фляшериеподобные заболевания бактериального и вирусного происхождения; Д — ядерный полиэроз; Е — микозы; Ж — гибель гусениц от отравления химикатами, промышленными отходами, паразитарного происхождения (клещи, нематоды), затопление выкормок и т. д.

Общий ущерб, причиняемый болезнями японскому шелководству, исчисляется в пределах около 5%. Мы не располагаем столь же детальными (по каждому виду инфекций) данными, собираемыми и анализируемыми в Японии в течение почти столетия. Сведения, которые более или менее точно отражают состояние дел на наших выкормках, позволяют считать, что ущерб, наносимый болезнями тутового шелкопряда, у нас выше.

Отсутствие данных о средней массе кокона в сочетании с рядом других сведений лишает нас возможности сделать более обстоятельное заключение. Кроме того, величина урожая коконов сама по себе

не дает еще правильного представления о потерях, вызванных болезнями.

Болезни не только уменьшают сбор коконов, но и ухудшают их качество, сказываются на размерах и составе заготовительного брака.

Количество сортовых коконов в заготовках 1980 г. по СССР составляло 85,5%, а по Узбекистану — 87%. В среднем за годы 10-й пятилетки в Узбекистане коконы отборные и 1-го сорта составляли 14,5%, а по браку и карапачаху вместе взятым — 17,7%. Анализ состава коконных браков в разных зонах шелководства и в разные годы показал, что доля явного участия инфекционных болезней в их возникновении колеблется от 72 до 98%. Следовательно, среди 13—14% несортных утрех из четырех коконов (если не у всех) причиной некачественности были болезни гусениц (К. М. Рождественский и др., 1981).

Не все виды брака являются результатом заболевания гусениц. Наиболее характерны недовитые внутрипятнистые коконы с резко выраженными черными или грязно-коричневыми сквозными пятнами и деформированной, легко сминаемой оболочкой — *карапачах*. В отдельные годы по некоторым областям количество карапачаху возрастает до 5% и более.

Среди заготовительного брака часто встречаются *недовитые коконы* с тонкой оболочкой, с просвечивающей через нее куколкой. Если в таких коконах находится мертвая неразложившаяся и высохшая гусеница или куколка, это значит, что выкормка поражена стрептококками. Недовитые коконы с живой куколкой менее характерны, так как причиной их появления могут быть не столько болезни, сколько недокорм, систематическое голодание гусениц. Бракованные коконы содержат меньше шелка, особенно недовитые: карапачах (лучшая его часть) — около 28,4%. Сортовые же коконы дают 31% и более полноценного шелка-сырца механической или автоматической размотки. Коконные отходы идут не на размотку, а на пеньяж (их расщепляют и превращают в вату), где выход шелковых полуфабрикатов меньше.

Результатом заболевания являются также *коконы-глухари*, содержащие мертвых и разложившихся гусениц или куколок, погибших чаще всего от желтухи, реже — от бактериальной септицемии. Если такие коконы встряхнуть, стука куколки не слышно, поэтому их называют глухарями: вместе с карапачахом глухари составляют примерно 8% урожая. При несвоевременной морке коконов процент брака, главным образом глухарей, становится еще значительнее, так как болезнь развивается не только во время завивки, но и на протяжении всего периода окукливания. На гренажных заводах, где дырявые коконы после вылета бабочек, подвергают выборочному осмотру, среди внешне здоровых коконов содержатся куколочки, которые гибнут или оказываются настолько ослабленными, что, превратившись в бабочку, не могут выйти из кокона. В прежние годы на гренажных заводах Узбекистана невыход бабочек достигал 3,9%, причем половина этой цифры — по причине инфекционных болезней.

К большому сожалению, шелководство, в составе своей агрономической службы, не ведет систематических наблюдений за заболева-

емостью выкормок, обеспечивающих научно обоснованное диагностирование болезней, накопление данных об эпизоотиях, компетентный систематический анализ этих данных, прогнозирование заболеваний шелкопряда. В результате меры борьбы с болезнями на выкормках шелколичных червей носят безадресный характер (за неимением достоверного диагноза) и не соответствуют особенностям той или иной инфекции, эффективность их низкая. Единственной сферой планомерной деятельности шелководов в области борьбы с болезнями остается гренопроизводство, одна из главных задач которого — приготовление грены, свободной от зараженности возбудителем пемрины. Но и эта задача выполняется недостаточно успешно. Несмотря на то, что по результатам заводского микроскопирования значительное количество кладок оказываются забракованными, государственный контроль в продукции гренажных заводов ежегодно обнаруживает достаточное количество зараженной грены. Так, в Узбекской ССР за годы 10-й пятилетки на гренажных заводах, по результатам сплошного микроскопирования бабочек, было забраковано 4 242 074 кладки грены, а по итогам последующего анализа государственным контролем готовой продукции оказались забракованными 44 765 коробок грены. Причина — в значительной зараженности пемриной многих районов племенных выкормок, в невыполнении в полной мере и с необходимой тщательностью обязательных правил приготовления грены и в недостатках микроскопического анализа на заводах, включая уровень квалификации персонала, выполняющего эту операцию.

В основу современной техники приготовления грены положен принцип целлюлярного гренаж, предложенный Л. Пастером более ста лет назад. В то время ученые при помощи простенького светового микроскопа «поднимали целину» современной инфекционной микробиологии. С легкой руки Пастера микроскоп стал эмблемой гренопроизводства, а шелководство приобрело ореол «самой ученой» по тому времени отрасли сельского хозяйства. Принятая тогда техника микроскопирования сохранилась на наших заводах в своей первооснове почти без изменений, если не считать внедрения фазово-контрастного устройства для контроля за тщательностью работы микроскопистов. Гренажная микроскопия позволяет обнаружить споры возбудителя пемрины, но возможность диагностировать другие болезни шелкопряда с помощью этого доставшегося нам от старых времен метода весьма ограничена.

Во времена становления целлюлярного гренаж в препарате из растертой бабочки микроскопист, обнаружив бактерии, мог определить их принадлежность только к основным морфологическим группам. Представления относительно их вида и болезнетворной роли были тогда весьма смутными; предосторожности ради кладки грены от таких бабочек резервировали в качестве неполноценных. Современная диагностика бактериозов выявляет видовую и даже сортиетную принадлежность бактерий, но для этого одного только микроскопирования, включая наиболее современные методы, недостаточно. Ограничены возможности световой микроскопии и для обнаружения вирус.

Текущее столетие ознаменовалось выдающимися научными открытиями, многие из которых оказали и продолжают оказывать влияние на расширение наших знаний в области болезней насекомых. Исследования теперь ведутся не только на клеточном, но и на молекулярном уровне, с использованием электронных микроскопов. Особое внимание уделяется многочисленным вирусным заболеваниям шелковичных червей, открытым в последние десятилетия и, как оказалось, наносящим наибольший вред шелководству.

В наших управлениях шелководства отсутствуют специализированные подразделения, ответственные за состояние борьбы с болезнями тутового шелкопряда. Необходимость в них давно уже определена, потому что ветеринарная служба Министерства сельского хозяйства СССР не в силах уделить внимание нуждам шелководства, а должное понимание их требует соответствующей специальной подготовки. Последнее, однако, не освобождает агрономический персонал, на всех уровнях его деятельности, от необходимости овладеть развернутым и углубленным пониманием состояния наших знаний в области инфекционной микробиологии и болезней тутового шелкопряда в полном соответствии с достижениями современной науки.

## Глава I. НЕКОТОРЫЕ ПОНЯТИЯ ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ

Всякий живой организм, в том числе и организм насекомого, находится под постоянным воздействием факторов внешней среды: пищи, климата, лучистой энергии, микроорганизмов. Иногда воздействие внешних факторов оказывается столь значительным, что нарушает нормальное физиологическое состояние организма. В результате в нем возникают глубокие изменения, в том числе вызванные ответной реакцией организма, направленной на нормализацию его жизнедеятельности. Развивается трудно обратимое, угрожающее жизни состояние, которое называют *болезнью*. Наука, изучающая изменения, формирующие болезнь, называется *патологией*.

Развитие болезни — *патогенез* складывается из ряда последовательно возникающих явлений. Часть из них направлена на устранение причин, вызывающих болезнь, на ликвидацию нанесенного ущерба; к ним относятся защитные реакции организма, воспалительные явления и другие формы проявления иммунитета. Наряду с этим, во время болезни наблюдаются перерождение тканей в пораженных органах, их омертвление и разрушение, вызванное длительным нарушением обмена веществ, недостатком кислорода или отравлением ядами, появившимися в процессе заболевания. Им противостоят явления регенерации — восстановления функции тканей путем их обновления и репарации — возмещения полученного повреждения компенсирующим новообразованием («репаративная регенерация»).

Каждое заболевание характеризуется проявлением признаков — симптомов. На основании этих патологоанатомических, патофизиологических особенностей болезни или же обнаружения ее возбудителя ставят диагноз, определяют вид болезни.

Учение о первопрочине, вызвавшей заболевание, называется *этиологией*. Существуют болезни, вызванные функциональными расстройствами нервной, эндокринной, пищеварительной системы, иных физиологических процессов, и болезни травматические, причиной которых являются ранения или увечье. Широко распространены болезни, вызванные микроорганизмами: их этиологическим началом являются болезнетворные бактерии, грибы, вирусы, простейшие. Проникновение их в организм, сопровождающееся болезненными явле-



ниями, называется *инфекцией*, а сами болезни — *инфекционными*. Первоначальный этап развития инфекции, когда внешних признаков еще нет, называется *инкубационным, скрытым периодом*. Различают еще *инвазионные* болезни, применительно к паразитам животного происхождения, в том числе простейшим.

Характерная особенность инфекционных болезней — их заразительность, способность передаваться от больного организма здоровому. Известны, впрочем, болезни человека и животных, инфекционная природа которых бесспорна и, тем не менее, их заразительность проявляется крайне слабо. Иногда для обозначения способа передачи инфекции и степени ее заразности отмечают ее большую или меньшую контагиозность. Многие инфекции способны превращать единичные заболевания в массовые. Наука, изучающая условия и способы возникновения эпизоотий — массовых заболеваний животных, в том числе насекомых, называется *эпизоотологией*, в отличие от эпидемии и эпидемиологии — у человека.

### 1.1. Инфекция

Взаимоотношение между микроорганизмами и остальным миром животных и растений часто принимает характер тесного сожительства — *симбиоза*. Одна из сторон такого сожительства — *комменсализм* (нахлебничество), когда в открытых полостях животных (в кишечнике) представители микрофлоры питаются, не принося явного вреда своему носителю. Примером могут служить многочисленные простейшие (жгутиконосцы) у термитов и др.; явление комменсализма может быть отнесено к части пассантной (франц. *passant* — прохожий) бактериальной флоры пищеварительного тракта гусеницы тутового шелкопряда.

Иногда сожительство становится настолько тесным, что деятельность микробов-симбионтов оказывается жизненно необходимой для носителя, они как бы составляют часть организма своего хозяина. У насекомых встречаются даже особые органы — мицетомы, содержащие микробов-симбионтов. Найдены они у многих жуков, бабочек, цикад, муравьев и др. Симбионты участвуют в пищеварении, помогая хозяину усваивать труднопереваримые вещества. Например, у жуков из семейства точильщиков личинка выгрызает в старых деревьях, деревянных постройках, мебели замысловатую сеть ходов, а симбионты в эпителиальных клетках из средней кишки своими ферментами помогают личинке переваривать трудно доступные вещества древесины — клетчатку и лигнин.

Некоторые микроорганизмы агрессивно относятся к своему носителю, питаясь его живыми тканями. Это *паразиты*. Организмы, питающиеся мертвым органическим веществом, называются *сапрофитами*. Организмы, которые могут питаться и существовать только за счет живой ткани, называются *облигатными паразитами* (например, возбудитель пембрины, вирусы). Среди сапрофитов встречаются условные паразиты, для болезнетворной деятельности которых нужны благоприятные условия, ослабляющие сопротивляемость поражаемого

ими организма; это могут быть неблагоприятные внешние (экологические) условия развития и существования насекомого, экстремальные (чрезвычайные) внешние воздействия или, наконец, хроническое заболевание, вызванное умеренным — по силе воздействия на организм — первичным поражением каким-либо другим микробом. Граница между паразитами и сапрофитами утрачивается в тех случаях, когда микробы с одинаковым успехом могут питаться живой плазмой клетки и мертвым органическим веществом. К этой категории относятся, по-видимому, большинство бактерий и грибов, способных вызвать заболевание насекомых.

Болезнетворные свойства микробов определяются их вирулентностью и токсичностью. Вирулентность — это способность патогена внедряться в ткани живого организма, размножаться в них и вызывать заболевание; количественно вирулентность измеряется минимальной дозой микроба, способной вызвать заболевание. Микроб может быть вирулентен по отношению к определенному виду насекомого в зависимости от степени их восприимчивости и от путей проникновения в организм — ворот инфекции. Так, споры возбудителя пембины тутового шелкопряда не могут заразить комнатную муху. Гусеницы тутового шелкопряда наиболее восприимчивы к пембине в середине каждого возраста, причем воротами инфекции служит рот и заражаются они вместе с пищей. Вирулентность — генетически обусловленный признак микроба. Вместе с тем его проявление зависит от условий существования микроба. Внешние факторы, ослабляющие микроба, понижают его вирулентность. Питание мертвым органическим веществом — сапрофитизм, как правило, ослабляет вирулентность, а проведение культуры микроба через восприимчивый организм путем его заражения (так называемый *пассаж*) усиливает.

Болезнетворность микробов определяется также способностью образовывать токсины. Продуктами микробной клетки, способными причинить вред зараженному организму, являются также некоторые ферменты, особенно протеолитические (расщепляющие белки протоплазмы клеток), так называемые *ферменты патогенности*, а также некоторые промежуточные продукты разрушения тканей, пораженных микробом.

Вирулентность и токсичность сочетаются у болезнетворных микроорганизмов в различных соотношениях. В абсолютном проявлении оба эти свойства антагонистичны. Вирулентность в большей степени отвечает интересам паразитизма; для существования паразита нужна жизнедеятельная ткань. Токсины смертельны для нее и организма в целом; это лишает паразита возможности дальнейшего существования, если он не в состоянии перейти к сапрофитному способу питания. Очень вирулентные бактерии быстро размножаются и распространяются в зараженном организме, сообщая инфекционному процессу так называемый *генерализованный, всеобщий характер*. Исключением могут служить случаи вирулентности, когда оккупационная деятельность бактерий ограничена определенной тканевой приуроченностью (средством); так, стрептококки шелкопряда обнаруживают четко выраженную приуроченность к эпителиальной ткани средней кишки

и даже после впрыскивания в гемолимфу (жидкость общей полости насекомых, сочетающая функцию крови и лимфы) они сначала размножались в ней, но потом мигрировали в зону эпителия. Существуют совершенно не вирулентные, но чрезвычайно токсичные бактерии, например, для теплокровных — столбнячная *бацилла*, встречающаяся в верхних горизонтах почвы, богатых органическим веществом; болезнетворные свойства этого сапрофита проявляются только при попадании его на рану. Питаясь на ограниченном участке механически разрушенной мертвой ткани, эта *бацилла* отравляет организм ядовитым веществом — токсинами, всасывающимися с раневой поверхности, расширяет зону омертвения, вызывая тяжелый токсикоз и смерть.

## 1.2. Иммуниет

Болезнетворные микробы при заражении встречают большее или меньшее противодействие организма. Организм может противостоять не только самим микроорганизмам, но и их токсинам. Невосприимчивость, устойчивость к инфекционным болезням называется *иммуниетом*.

Чаще всего иммуниет носит относительный характер. Это значит, что восприимчивость зависит от дозы возбудителя болезни, его вирулентности, токсичности и места проникновения в организм. Например, многие насекомые оказываются менее восприимчивы при заражении одними и теми же бактериями через рот, чем при заражении через поврежденные кожные покровы. Степень невосприимчивости зависит также от состояния организма, его возраста, стадии онтогенеза и от наследственных (врожденных) особенностей.

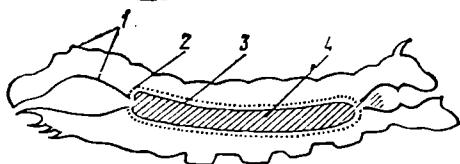
Иммуниет может быть врожденным или приобретенным. Врожденный иммуниет, определяемый систематическим положением организма (видовыми особенностями), часто носит абсолютный характер: организм оказывается совершенно невосприимчив к возбудителю данного заболевания, так как последний не находит в организме условий развития. Так, человека нельзя заразить пединой шелкопряда, а шелкопряда — туберкулезом. В некоторых случаях с помощью экспериментального воздействия (т. е. крайними мерами) — длительным голоданием, охлаждением или перегреванием организма — удается нарушить абсолютный иммуниет, чем доказывается условность такого деления.

На определенной ступени развития животного мира, наряду с врожденным иммуниетом, становится возможным приобретенный иммуниет. В результате перенесенной болезни образуется естественный приобретенный иммуниет. Искусственный приобретенный иммуниет возникает под влиянием предохранительных прививок убитыми или ослабленными микробами или их токсинами (точнее — анатоксинами, т. е. токсинами, лишенными ядовитых свойств).

**Противоинфекционная защита насекомых.** У членистоногих, в том числе у насекомых, наиболее существенное средство защиты от паразитических организмов — кожный покров. Опыты искусственного заражения показали, что многие бактерии могут попасть в тело шелко-

пряда только через свежие ранки. Через полчаса после нанесения ранок количество заразившихся шелколичных червей было в девять раз меньше, чем при заражении через 5 мин после ранения. Объясняется это тем, что при соприкосновении с воздухом гемолимфа густеет, подсыхает, закрывая ранку и меланизируется. *Меланизация* — образование темно-коричневого пигмента — ферментативный процесс окисления и полимеризации полифенолов в капле гемолимфы в присутствии кислорода воздуха, может оказать если не бактерицидное (убивающее бактерий), то во всяком случае бактериостатическое действие (приостанавливающее их размножение). Заражение через неповрежденную кожу может быть осуществлено только паразитическими грибами в результате разрушительного действия их ферментов на покровы насекомого.

Кроме наружной периферии тела шелкопряда, механическая защита простирается также в открытые



1. Периферическая защита гусеницы против инфекции:

1 — хитинизированные покровы и выстилка передней и задней кишок; 2 — эпителий средней кишки; 3 — перитрофическая мембрана; 4 — зона защитного действия кишечного сока.

тельного средства механической защиты — перитрофической (околопищевой) мембраны и, что, по-видимому, более существенно, резко выраженных бактериостатических и бактерицидных свойств кишечного сока (рис. 1).

Неповрежденные клетки и ткани насекомых способны противостоять внедрению паразитических микроорганизмов. Так, обширная группа обычных гнилостных бактерий при введении их в гемолимфу гусениц тутового шелкопряда способна вызвать общее заражение крови — септицемию. При этом омываемые кровью ткани в начальный период инфекции чаще всего не поражаются бактериями. Даже при септицемии, вызванной весьма вирулентными для тутового шелкопряда видами бактерий, проникновение их в ткани, окружающие общую полость, наблюдается с наступлением предсмертной агонии или после смерти гусениц. До этого момента скопление бактерий наблюдается в непосредственной близости от некоторых тканей, сами же они не содержат бактерий. Еще отчетливее выражено это явление применительно к паразитическим грибам. Заражение гусениц шелкопряда через неповрежденные кожные покровы приводит к обильному размножению гриба в гемолимфе, но гифы прижизненно не проникают в окружающие ткани, происходит это в основном только после смерти гусеницы. Сопrotивляемость живой клетки проникновению в нее микро-

организмов — общебиологическое явление: амеба в дождевой луже — этот почти голый комочек протоплазмы, окруженный со всех сторон многочисленными бактериями, не подвергается их нападению, тогда как мертвую они немедленно атакуют. Но жизнедеятельные клетки насекомых недоступны не для всех болезнетворных микроорганизмов. Некоторые паразитические простейшие, в том числе микроспоридии, способны проникать в живые клетки, а при заражении вирусами клетки даже оказывает этому свое содействие с помощью пиноцитоза (виropексиса). Подробнее об этом говорится в гл. 3, в разделе «Процесс проникновения вируса в клетку».



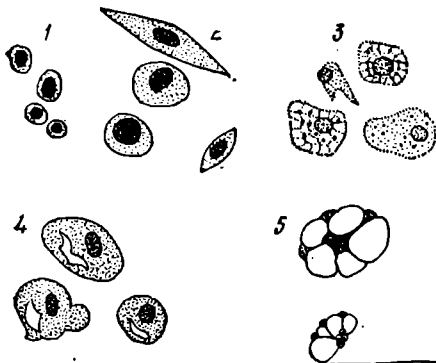
И. И. Мечников (1845 — 1916).

Насекомые проявляют невосприимчивость по отношению к весьма губительным для человека биогенным ядам животного и растительного происхождения, ко всем почти микробным экзотоксинам, от которых наиболее сильно страдают теплокровные животные. Насекомые более устойчивы и к змеиным ядам. С другой стороны, они более чувствительны к эндотоксинам, освобождающимся при разрушении микробной клетки, а также к некоторым другим веществам — к желчи, например, или — что вовсе неожиданно — к эмульсии из растертой грены.

Помимо средств пассивной защиты от болезнетворных микробов организм насекомого обладает также средствами активной защиты и прежде всего фагоцитозом. И. И. Мечников отводил главную роль в защите организма фагоцитам и, основываясь на этом, разработал теорию *клеточного иммунитета*. Фагоцитами он назвал клетки крови, способные поглощать и переваривать микробов, а также избавлять организм от других посторонних тел — заноз, зерен туши, кармина или крахмала.

Активное проявление иммунитета у насекомых зависит в основном от активности фагоцитарной реакции клеток гемолимфы — гемоцитов. *Гемоциты тутового шелкопряда* представлены пятью основными типами: пролейкоциты, незернистые гемоциты, зернистые гемоциты, энцитойды, сферулоциты (рис. 2).

*Пролейкоциты* — молодые, мелкие, интенсивно окрашенные клетки с крупным ядром, окруженным небольшим количеством цитоплазмы. Они растут, размножаются делением и дифференцируются в другие типы гемоцитов. *Незернистые гемоциты* (макронуклециты, веретеновидные гемоциты) — более или менее крупные клетки с гомогенной цитоплазмой и относительно крупным ядром; участники фагоцитоза.



2. Гемоциты тутового шелкопряда.

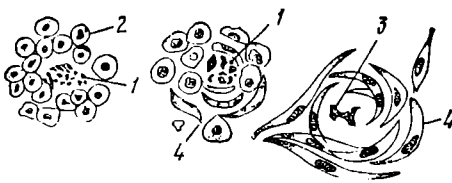
1 — пролейкоциты (гематобласты); 2 — азерно-зернистые гемоциты; 3 — зернистые гемоциты (гранулоциты); 4 — эритроциты; 5 — сферулоциты.

*Зернистые гемоциты* (гранулоциты) — крупные клетки неправильного очертания с выступами, напоминающими псевдоподии амёб; с бледно окрашенной цитоплазмой и оксифильной зернистостью в ней, с маленьким ядром; активные фагоциты. *Эритроциты* — немногочисленные, крупные, круглые или овальные клетки с удлинённой вакуолью, с темноокрашенным зернистым ядром; напоминают эритроциты; не фагоцитируют. *Сферулоциты* — клетки с многочисленными крупными сферическими вакуолями (или неокрашивающимися сферическими включениями), с маленьким ядром, зажатом между ними; цитоплазма почти неразличима. Появление их в большом количестве связано с лизогенной деятельностью форменных элементов крови по отношению к микробам или с приближением метаморфоза, где они участвуют своим секретом в цитолитических процессах (в разрушении личиночной ткани).

Инфекция вызывает мобилизацию наиболее активной группы кровяных клеток, нормальное количественное соотношение отдельных категорий гемоцитов меняется. Эта реакция начинается с уменьшения числа прогемоцитов и увеличения активно фагоцитирующих типов клеток; затем, через сутки-двое, количество молодых форменных элементов крови начинает восстанавливаться. Явление фагоцитоза наблюдается не сразу после заражения, чаще всего через час-полтора. Интенсивность его зависит от температуры воздуха: ниже 15°С фагоцитарная реакция прекращается.

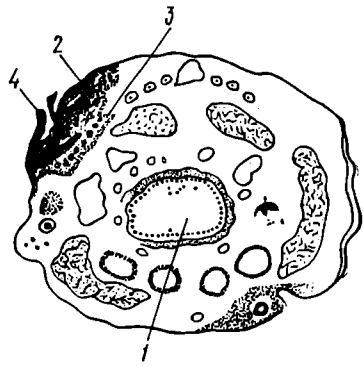
К разным микроорганизмам фагоциты относятся неоднозначно и при смешанном заражении различными видами микробов фагоцитоз носит четко выраженный избирательный характер: так, из смеси палочковидных бактерий и микрококков, характеризующихся примерно одинаковой вирулентностью, фагоциты предпочтительно поглощают микрококков (Метальников, 1927). Фагоцитоз микроспоридий у тутового шелкопряда протекает вяло. Есть виды бактерий, которых фагоциты тутового шелкопряда не заглатывают совсем или, заглатывая, не переваривают их и сами разрушаются; в этих случаях гусеницы гибнут быстро.

Активность отдельных фагоцитов часто оказывается недостаточной для избавления насекомого от угрожающей ему гибели. Фагоцитирующие гемоциты, нагруженные микробами, сливаются в гигантские многоядерные клетки (синцитии), внутри которых микробы подвергаются разрушению; синцитий окружается форменными элементами крови, которые образуют вокруг всей массы изолирующую



### 3. Инкапсуляция бактерий в гемолимфе гусеницы:

1 — бактерии; 2 — гемоциты, формирующие синцитий вокруг бактерий; 3 — лизированные бактерии; 4 — образование соединительнотканной капсулы, изолирующей бактерий.



4. Образование пигментированного абсцесса (гноиника) после заражения пчелиной молью бактерией, вызывающей газовую гангрену у теплокровных организмов (*Bacillus perfringens*); на поперечном разрезе гусеницы:

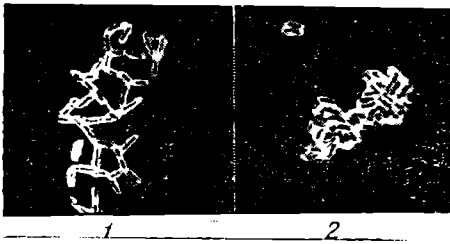
1 — кишечник; 2 — гноиник; 3 — линия соединительнотканной инкапсуляции гноиника и его изолирование от внутренней полости; 4 — разрыв кутикулы и вскрытие гноиника (по С. И. Метальникову).

оболочку. Образование таких капсул можно наблюдать через несколько часов после инъекции насекомому культуры микроба (рис. 3).

У высших животных с развитой нервной системой и замкнутым кровообращением картина фагоцитарной защиты усложняется переходом белых кровяных клеток (лейкоцитов) сквозь стенки сосудов в пораженные участки. Под влиянием притока крови ткани набухают и краснеют, температура тела повышается. Все эти явления сопровождают особую реакцию организма, называемую *воспалительным процессом*. У насекомых защитная деятельность фагоцитов не осложнена явлениями воспаления, однако в литературе описаны образования, напоминающие гноиники у высших животных и возникающие при введении насекомым в гемолимфу бацилл сибирской язвы. Гемоциты окружают бактерии, образуя на участках их скопления под кутикулой изолирующую капсулу. Кутикула в этом месте постепенно темнеет, затем лопается и скопления гемоцитов с полупереваренными бактериями обнажаются в виде гноиника (рис. 4). Происходит это потому, что гемоциты под кожей выделяют ферменты, растворяющие мертвевшую ткань, и гноиник прорывается. Гемоциты же, расположенные с внутренней стороны под фокусом поражения, участвуют в образовании соединительнотканного ограждения, изолирующего гноиник от полости насекомого и кровяного тока.

**Гуморальный иммунитет насекомых.** Фагоцитоз подготавливается предварительным воздействием на микроорганизмы особыми химическими веществами плазмы крови — опсонинами, которые изменяют состояние наружного слоя оболочки микробов, способствуя захвату их фагоцитами. Нечто подобное присуще плазме гемолимфы насекомых. В какой-то мере целлюлярный (клеточный) фактор защиты у насекомых тоже находится в зависимости от активности гуморального фактора. Теория гуморального иммунитета (П. Эрлих, 1898), объяснявшая невосприимчивость организма к действию болезнетвор-

ных микроорганизмов защитными свойствами сыворотки крови, была первоначально выдвинута в противовес теории целлюлярного иммунитета И. И. Мечникова. Защитные белки (гамма-глобулины) вырабатываются организмом в ответ на проникновение в кровь и ткани микробов или их ядов; гамма-глобулины (они же иммуноглобулины) обнаруживаются в сыворотке крови животного при помощи серологических реакций в результате взаимодействия молекул глобулина с белками тех микробов, в ответ на присутствие которых они возникли. Реакцию можно наблюдать в капле сыворотки иммунизированного животного на предметном стекле или в пробирке. Если в сыворотку крови животного (кролика, морской свинки и т. д.), иммунизированного определенным видом бактерий, ввести бактерии такого же вида, то появится осадок рыхлых хлопьев, образовавшихся вследствие их *агглютинации*, склеивания (рис. 5). С инфекционным агентом более мелким, чем клетки бактерий — с вирусами или молекулами микробного токсина, серологическая реакция проявит себя в виде *преципитации* — образования мелкодисперсного осадка из взвеси этих частиц. Защитные глобулины (иммуноглобулины) способны также вызывать лизис, разрушение клеточной структуры инфекционного агента; в зависимости от объекта лизирования их называют бактериолизинами, цитоллизинами и



5. Агглютинация бактерий: начальная (1) и конечная (2) фазы реакции.

т. д. Наконец, токсины связываются антитоксинами — иммуноглобулинами сыворотки иммунизированного животного — и тем самым обезвреживаются (нейтрализуются).

Формирование гуморального иммунитета в процессе эволюции оказалось сопряженным с явлениями дифференциации внутриклеточного и внеклеточного пищеварения. У низших многоклеточных животных, развитие которых относится к той ступени эволюции, когда нет еще внеклеточного пищеварения (например, у губок), одни и те же клетки совмещают в своей деятельности функции пищеварения и фагоцитоза. На следующих ступенях эволюции эта деятельность дифференцируется и у более высокоорганизованных животных клетки эндотермального происхождения (т. е. внутреннего зародышевого листка, из которого образуется эпителий пищеварительного участка кишечника тракта) начинают секретировать пищеварительные ферменты в полость кишечника и пищеварение становится внеклеточным — внутриполостным.

В противоположность пищеварительному процессу эволюция защитной функции мезодермального происхождения (среднего зародышевого листка, из которого образуются внутренние органы, в том числе кроветворные центры) прогрессирует значительно медленнее. У высших животных эти ткани, наряду с фагоцитозом, секреторируют



вещества, осуществляющие реакции гуморального иммунитета, в том числе лизины, которые, кроме внутриклеточного переваривания бактерий в фагоцитах, производят это внеклеточно. У них клетки мезенхимного происхождения, рассеянные в разных органах в качестве оседлых фагоцитов, образуют ретикулоэндотелиальную систему клеток (РЭС). В пределах РЭС обе функции — фагоцитоза и образования глобулина, участвующих в реакциях гуморального иммунитета, распределены между двумя типами клеток: между главными фагоцитами — макрофагами и лимфоидными клетками этой системы — плазмоцитами. Первые поглощают микробов или их токсины, переваривают их и передают фрагменты их структур плазмоцитам, которые синтезируют из них иммуноглобулины. Иммуноглобулины способны реагировать в форме агглютинации, преципитации и т. д. только с теми микробами или токсинами, в ответ на заражение которыми они были образованы в РЭС животного.

У насекомых эта функция тканей мезодермального происхождения развита еще очень слабо, хотя оседлые фагоциты у них имеются, и перикардальные, перитрахеальные и некоторые другие ткани напоминают своей деятельностью РЭС теплокровных животных. Лизис бактерий в гемолимфе гусениц озимой совки описан А. Пайо, а Е. С. Гернонимусом и Е. Н. Михайловым — у других насекомых. Описана также агглютинация; ее наблюдал Пайо у тутового шелкопряда по отношению к стрептококкам. Эти реакции происходили главным образом в непосредственной близости от перикардальных и перитрахеальных клеток и спинного сосуда. В отличие от способности высших животных осуществлять серологические реакции на любом участке кровеносной системы, у насекомых «дальнобойность» этих средств защиты весьма ограничена; количество секретируемых агглютининов и лизинов, видимо, недостаточно, чтобы по мере распространения в гемолимфе сохранить дееспособную концентрацию на дальних дистанциях.

Искусственно приобретенный активный иммунитет с помощью предупредительных (профилактических) прививок способен защитить насекомых даже против наиболее опасных бактерий. Прививки производятся вакцинами — культурами бактерий, прогретыми до 58 С или обработанными слабыми растворами дезинфицирующих веществ. Через три часа после вакцинации появляются первые признаки иммунитета. Исключение составляют только стрептококки, вакцинация которыми оказывается не только безрезультативной, но и вызывает анафилаксию (повышенную реактивность, как после повторной прививки) — состояние гусениц, напоминающее острое отравление. Приобретенный иммунитет после вакцинации можно наблюдать на всех стадиях жизни насекомого; у гусениц действие вакцинации исчезает после метаморфоза. Е. Нагути и К. Ямагути (1979) наблюдали проявление естественно приобретенного активного иммунитета у спонтанно исцелившихся гусениц американской белой бабочки от цитоплазматического полиэдроза в виде форсированного сбрасывания пораженного кишечного эпителия и его регенераций. Приобретенный иммунитет выразился в значительной устойчивости гусениц ко вторичному

заражению этим вирусом. В выработке приобретенного иммунитета у насекомых участвует нервная система: достаточно разрушить у гусениц третий грудной нервный узел, чтобы, как показал в свое время С. И. Метальников (1926), последующая прививка оказалась безрезультатной.

У насекомых может быть и приобретенный пассивный иммунитет, если им ввести сыворотку иммунизированного животного, т. е. готовые иммуноглобулины, в выработке которых их организм не участвовал. Гусеницы пчелиной моли, которым всprыскивали сыворотку крови лошади, иммунизированной против пневмококков, оказались невосприимчивыми к смертельным дозам этих бактерий. Впрыскивание дифтерийного анатоксина, т. е. токсина, потерявшего после особой обработки свои ядовитые свойства, вызывает образование в гемолимфе гусениц антитоксина (нейтрализующего иммуноглобулина), который делает их невосприимчивыми к смертельной дозе этого яда. Гемолимфа иммунизированных анатоксином гусениц, если ввести ее другим гусеницам или морским свинкам, сообщает им пассивный иммунитет против этого токсина. Точно также впрыскивание гусеницам антидифтерийной сыворотки теплокровных животных способно предохранить их от губительного действия дифтерийного токсина в дозе, в десять раз превышающей смертельную (Метальников, 1926).

Иммунизация насекомых через рот, вместе с пищей, не удается, и потому шелководство пока не располагает способами ее практического использования.

#### Вопросы для самопроверки

1. Какое место занимают инфекционные болезни тутового шелкопряда среди прочих причин, вызывающих потерю коконов, и какими цифрами выражаются эти потери?

2. Чем, в первую очередь, необходимо обеспечить систему шелководства в организационном отношении, чтобы поднять уровень борьбы с болезнями, и чем эта необходимость вызывается?

3. В чем состоит смысловое различие между понятиями *патогенез* и *этиология болезни*?

4. Какие биологические особенности микроорганизмов определяют облигатный и условный характер паразитизма как способа питания?

5. Охарактеризуйте основные факторы патогенности микробов.

6. Чем отличаются абсолютный и относительный, врожденный и приобретенный, искусственный и естественный иммунитеты и в чем различия между активной и пассивной иммунизациями?

7. Какими средствами обеспечивается у шелкопряда червя пассивная противоиnфекционная защита?

8. В чем проявляется клеточный иммунитет, помимо реакции фагоцитоза и другого участия гемоцитов?

9. Какие типы гемоцитов имеются у шелкопряда червя и каково их участие в противоиnфекционной защите?

10. Какими гуморальными средствами защиты обладает тутовый шелкопряда и каковы их филогенетические истоки?

## Глава 2. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ

### 2.1. Коротко о бактериях

**Морфология бактерий.** Бактерии — микроскопически малые одноклеточные организмы без оформленного ядра. По форме могут быть шаровидными (кокки), палочковидными (бактерии и бациллы) или извитыми (вибрионы и спириллы). Ядерное вещество обычно рассеяно в цитоплазме клетки. У части палочковидных бактерий образуются споры; такие бактерии называются *бациллами*. Споры образуются в средней части или на конце бактериальной клетки и имеют округлую или яйцевидную форму. После того как спора сформирована, оставшаяся часть клетки отмирает. В споре цитоплазма бактерии лучше переносит неблагоприятное воздействие среды. В благоприятных условиях спора прорастает и из нее выходит жизнедеятельная бактерия.

На всей поверхности клетки или только на ее конце встречаются реснички, при помощи которых бактерии движутся. У некоторых видов поверхность покрыта студнеобразной капсулой. Бактерии очень быстро размножаются, при этом каждая клетка делится на две. Разделившиеся клетки в некоторых случаях не расходятся и образуют пары или цепочки, например, стрептококки, или группы в виде гроздей, стафилококки (их называют также *микрোকками*, так как они мельче других кокков). Если размножение происходит не в жидкой среде (молоке, бактериологическом бульоне), а в плотной (на мясном агаризованном студне, на ломте картофеля), то по мере накопления разделившиеся клетки располагаются концентрически, образуя более или менее правильные скопления округлой формы — колонии бактерий; с увеличением количества бактерий колония достигает размеров, доступных для невооруженного глаза. Из каждой отдельно лежащей бактериальной клетки вырастает одна колония. В зависимости от вида бактерии колонии могут быть с цельным или извилистым краем, с гладкой или складчатой поверхностью, бесцветными или окрашенными, прозрачными или матовыми.

**Принципы систематики.** Бактериальные клетки или образованные ими колонии не отличаются большим разнообразием морфологических признаков. Распознавание и систематизация бактерий усложняется тем, что им свойственна изменчивость; при перемене условий питания, под влиянием новых особенностей среды обитания бактерии обнару-

живают склонность утрачивать некоторые признаки и приобретать новые. Это побудило микробиологов классифицировать и распознавать их не только по внешним, морфологическим, но и по физиологическим признакам.

Один из основных физиологических признаков в систематике бактерий — особенности питания. Они питаются осмотически, поглощая всей поверхностью клетки растворенные в окружающей среде вещества. Бактерии выделяют наружу ферменты, которые преобразуют сложные органические соединения в простые и растворимые. Способность бактерий расщеплять молекулы белка, углеводов и других соединений и при этом накапливать определенные продукты (спирты, молочную кислоту, двуокись углерода, пептоны и пептиды, аммиак) используется как систематический признак. Для точности определения необходимо, чтобы вся масса реагирующих таким образом бактерий принадлежала к одному виду; это достигается методом исследования чистых культур бактерий, т. е. размноженных из одной клетки или (что тоже самое) из одной колонии. Регистрация их роста на определенном наборе питательных сред, чтобы проследить за деятельностью их ферментов, называется *бактериологическим*, или *культуральным*, *методом исследования*, в отличие от бактериоскопического — исследования под микроскопом внешнего вида бактерий.

Бактериологи пользуются также серологическими методами исследования, иммунизируя мелких лабораторных животных (кроликов) интересующим их штаммом бактерии и получая сыворотку крови, способную в серологических реакциях отличить друг от друга очень узкие в систематическом отношении группы — разновидности (вариететы) и даже штаммы (культура одного и того же вида бактерии, выделенная из разных источников).

**Распространение в природе.** Бактерии чрезвычайно широко распространены в природе, они являются повсеместными обитателями почвы и водоемов, растений и животных. Среди них есть виды, существование которых тесно связано с определенными местами жизни, но есть и космополиты, распространенные всюду в различных биотопах (территория со своей растительной ассоциацией и связанными с ней животными). Бактерии — наиболее многочисленные и деятельные преобразователи органического и неорганического вещества, участники его круговорота в природе.

С растениями и животными они нередко связаны теснейшим образом в качестве временных или постоянных мирных сожителей или же паразитов, вызывающих заболевания. Эти формы взаимоотношения бактерий с населением биотопа распространяются и на вездесущих представителей класса насекомых, количество видов которого приближается к миллиону. Ученые встречались с бактериальными болезнями насекомых в самом начале возникновения бактериологии как науки; естественно, что главное внимание привлекали к себе бактерии, обнаруженные у полезных насекомых: медоносной пчелы и шелковичного червя.

**Бактериозы насекомых.** Бактериальные болезни насекомых обозначаются собирательным названием *бактериозы*, подобно тому как

это принято по отношению к бактериальным болезням растений; латинские окончания имен прилагательных -osus, -a, -um обозначают обилие чего-нибудь: так, бактериозы — болезнь, характеризующаяся обильным бактериальным заселением организма. Такая же грамматическая форма принята в отношении грибных — микозы, глистных — гельминтозы и других болезней. Как пояснил В. Д. Штибен (1934), болезни насекомых, так же как и растений, в отличие от болезней позвоночных животных, вызванных различными бактериями, «представляют так много общих черт, что говорить об отдельных болезнях часто невозможно, поэтому более правильно будет обозначать их общим именем (бактериозы)». Тем не менее в состав бактериозов насекомых, несмотря на большое сходство их внешнего проявления, в нозологическом отношении, т. е. с точки зрения принципов систематизации болезней, входят совершенно самостоятельные заболевания. Они отличаются друг от друга этиологически, видовой принадлежностью возбудителя, особенностями патогенеза.

Первые попытки изучения возбудителей этих болезней с помощью одного только микроскопа в первой половине XIX в. не могли быть успешными; понадобился значительный период для разработки специальных бактериологических методов исследования, принципов систематики бактерий и методики распознавания их систематической принадлежности. Даже на пороге XX в. изучение бактериальных болезней тутового шелкопряда не было свободно от существенных недостатков, породивших споры ученых; в особенности это касалось фляшерии.

## 2.2. Фляшерия (мертвенность)

**Признаки болезни.** *Фляшерия* (flacherie ou maladie mort flats, в переводе — болезнь, вызывающая смерть с явлениями [вспучивания кишечника) — название, заимствованное Л. Пастером у шелководов юга Франции и введенное им в научную литературу в 1870 г. В нашей литературе эту болезнь чаще всего обозначают словом *мертвенность*; возможно, что этим наименованием пытались отобразить характерный для финала этого заболевания процесс прижизненного омертвления и разрушения тканей.

Отличие фляшерии от пембрины стало очевидным для Пастера, когда он обнаружил умирающих гусениц, в теле которых не содержались тельца (корпускулы) пембрины, как он называл споры возбудителя этой болезни. Для него споры у пембринозных гусениц и бактерий у фляшерийных были, прежде всего, опознавательным, диагностическим признаком. Фляшерия характеризовалась отсутствием телец пембрины, обильным размножением бактерий в средней кишке, почернением и прижизненным разложением тела гусеницы. Кокконы, завитые фляшерийными гусеницами, обычно недовиты; гусеницы погибают в них, и темно-бурая или черная жидкость, истекающая из трупа, пачкает кокон (рис. 6). Такие коконы (карапачах) со сквозными черными пятнами и тонкой, смятой оболочкой — характерный коконный



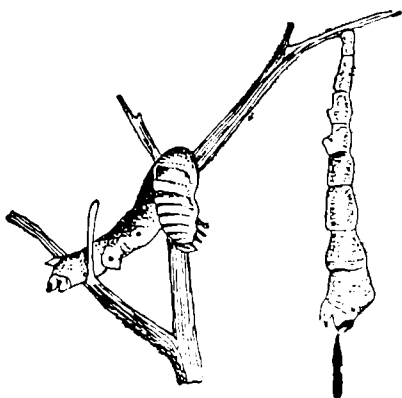
Л. П. Пастер (1822 — 1895)

брак при фляшерии (ГОСТ 3398—74). Кокон фляшерийных партий издают острый запах гнилых яблок.

**Поиски возбудителя фляшерии.** Пользуясь терминологией своего времени, Пастер различал среди обнаруженных при фляшерии бактерий «вибрионы с ядрами», «монады» (одиночные мелкие бактерии) и «ферменты в виде цепочки из зерен» (стрептококки). Судя по помещенному в его книге изображению, вибрионы представляли собой бацилл со спорами (рис. 7). Определенного мнения о конкретной роли этих бактерий в происхождении фляшерии у Пастера еще не было.

Первая попытка обнаружить возбудителя фляшерии среди бактерий, выделенных в чистые культуры из больных гусениц, принадлежит Маккиати (1886). Однако для отождествления их с вибрионами

Пастера было слишком мало данных. Все же Маккиати полагал, что выделенная им бактерия идентична той, которую описал Пастер. Он назвал ее, как тогда было принято, по месту обнаружения *бациллой шелкопряда* (*Bacillus bombycis*). Джорджи и Монако (1838) не считали ее самостоятельным видом, отождествляя с распространенным обитателем почвы *Bacillus megatherium* de Bar. В дальнейшем лишь не-



6. Фляшерийный тип гибели гусениц на ветках коконника.



7. Вибрионы фляшерии из кишечника гусеницы, увелич. x 600 (Из книги Л. Пастера, 1870)

многие авторы упоминали бациллу Маккиати как самостоятельный вид. Так, у Э. А. Штейнхауза (1950) и В. И. Полтева (1969) *B. bombucis* упоминается в перечне энтомопатогенных бактерий больше по традиции, чем из-за достаточной обоснованности ее существования.

В последней четверти прошлого столетия из различных насекомых было выделено большое количество разнообразных бактерий. В то время все открытия в области инфекционных заболеваний человека и животных проходили под знаком примитивно каузальных (причинных) представлений о безраздельной роли микроба как инициатора заболеваний. Для доказательства причастности бактерии к заболеванию требовалось выполнить так называемую «триаду Коха»: 1) выделить предполагаемого возбудителя в чистую культуру; 2) заразить им подопытный организм; 3) воспроизвести характерную для изучаемой болезни клиническую картину.

Заражения шелковичного червя выделенными у него бактериями естественным путем (через рот) не получилось. Впрыскивание или даже укол с использованием тех же бактерий в значительно меньшей дозе, которой пытались заразить через рот, вызвало поголовную гибель. Однако воспроизвести подлинную картину фляшерии не удалось. Эти опыты вызвали не фляшерии Пастера или истинную фляшерии (как ее называли), а общее заражение крови бактериями — септицемию; болезнетворная деятельность бактерий протекала в общей полости насекомого, а не в кишечнике. Общим же внешним признаком с фляшерией было посмертное разложение трупа, да и то только для части видов бактерий, вызвавших экспериментальный сепсис.

Следуя примеру европейских коллег, японские исследователи первоначально также направляли основное усилие на поиск возбудителя фляшерии, однако бактерий, действительно способных вызвать типичную картину этого заболевания, они не нашли. Вместо этого С. Ишивата (1905) обнаружил высокотоксичную для шелковичного червя сотто-бациллу, положив начало изучению еще одной бактериальной болезни — бациллярного кишечного токсикоза.

Складывалось впечатление, что в процессе развития фляшерии в кишечнике возникают экспериментально не воспроизводимые стойкие функциональные нарушения, которые создают условия для размножения транзитивной (проходящей через кишечник с пищей) микрофлоры. Активность ее проявляется в форме воздействия на эпителий средней кишки метаболитов и так называемых ферментов патогенности (главным образом протеолитических), которое приводит к нарушению барьерной функции стенки кишечника. Болезнь становится явной, когда гнилостные бактерии начинают разрушать отмирающие клетки эпителия, открывая себе путь в общую полость насекомого. Однако прямых наблюдений, подтверждающих эту гипотезу в ее основных деталях, сделать не удалось.

**Патофизиология фляшерии.** Еще Е. Версон (1906), а затем С. Акква (1918—1919) указали, что для фляшерии необязательно присутствие большого количества бактерий в кишечнике. Версон отверг бактериальную природу этой болезни и рассматривал ее как функциональное расстройство деятельности кишечника, вызванное условия-

ми жизни шелкопряда и наследственной предрасположенностью к ней. С. Акква и А. Пайо неинфекционную фляшерия наблюдали неоднократно; А. Пайо (1927) назвал псевдофляшерией те болезни, при которых в кишечнике не удавалось обнаружить бактерий. По мнению Акквы, патологические изменения в кишечнике, вызванные размножением бактерий, и сами бактерии в нем — вторичное явление. Заболевание же вызывается нарушением деятельности кишечника под влиянием аутоинтоксикации (самоотравления) продуктами азотистого обмена, которые своевременно не удалены из организма мальпигиевыми сосудами.

Как отмечает М. Мартиньони (1964), в процессе заболевания фляшерией у шелколичных червей наблюдается гипопротенемия (белковая недостаточность), уменьшается концентрация в крови соединений аминного азота. Установлено, что это непосредственно не связано с уменьшением количества поглощаемой пищи и всасыванием продуктов пищеварения, так как гемолимфа контрольных голодающих гусениц содержала более высокую концентрацию аминного азота, чем у больных фляшерией (Миоши, 1959). Аминокислоты играют большую роль в осморегуляции, поэтому изменение их концентрации в крови насекомого может в конце концов привести к гибели (Дриллон и др., 1951).

Нарушение механизма выделения и связанной с ним регуляции водного баланса играет важную роль в патогенезе фляшерии. Действительно, расстройством экскреторной функции было обнаружено при некоторых ее формах, однако эти сведения не содержали указания об изменении количества и состава аминокислот в гемолимфе (Федели, Венерозо, 1934). Пересмотр старых представлений относительно функции мальпигиевых сосудов (Рамзай, 1958) и новые сведения относительно диуретического (мочегонного) гормона у насекомых и его роли в регуляции водного баланса открыли, как полагают, путь к более глубокому патофизиологическому подходу к изучению фляшерии (Нунец, 1963).

Таковы доводы в пользу существования фляшерии как патофизиологического заболевания. Противопоставляемая этому утверждению ссылка на массовый характер проявления — единственный, но, видимо, не слишком сильный довод в пользу ее инфекционного характера, поскольку массовости заболевания может содействовать генетическая однородность выкармливаемых популяций и единообразие экологических условий их существования, включая качество корма.

Неясно только, во-первых, возможна ли такая ситуация, при которой возникновение этого патофизиологического заболевания не будет сопровождаться размножением в кишечнике транзитивной микрофлоры и ее дальнейшим участием в патогенезе патофизиологической фляшерии; во-вторых, по каким внешним проявлениям болезни, кроме размножения бактерий, станет возможным тогда ее распознавание.

**Кондиционализм и проблема происхождения фляшерии.** На рубеже XX в. в медико-ветеринарном учении о болезнях распространилось новое направление — *кондиционализм* (лат. *conditio* — условие), сменившее увлечение *каузализмом* (лат. *causa* — причина). Вместо поис-



ков причины возникновения болезни среди микробов стали исследовать условия, содействующие ее возникновению и развитию; кондиционализм был другой крайностью, односторонне трактовавшей природу возникновения болезней. И все же идеи кондиционализма привлекли к себе внимание ученых, изучавших болезни тутового шелкопряда.

Японские исследователи сосредоточили усилия на установлении зависимости частоты возникновения фляшерии от условий содержания гусениц и влияния факторов внешней среды. В 20-х годах в Японии на опытных станциях были построены червоводни с системами кондиционирования воздуха. Установлено (Мацумура, 1928), что гусеницы чаще заболевают фляшерией при выкормке в условиях высокой (около 28°С) температуры и относительной влажности воздуха 90%. Окава (1925—1926) доказал, что вредное влияние этих факторов можно уменьшить, повысив скорость движения воздуха на 0,2—0,3 м/с. Был экспериментально разработан оптимальный гигротермический режим выкормок (Кагуре, 1933).

Шелководы Узбекской ССР впервые ознакомились с экологическими исследованиями в Японии по публикациям Э. Ф. Пояркова (САНИИШ, 1940). Это послужило толчком к углубленному изучению влияния экологических факторов на результативность выкормок (Э. Ф. Поярков, А. Г. Степаньянц, Л. Ф. Рождественская и др.), что было особенно необходимо для агротехнического обеспечения успеха внедряемых в республиках Средней Азии повторных (поздних весенних и летне-осенних) выкормок, которые попадают в неблагоприятные условия высокой температуры и низкой влажности.

В Японии, после появления данных о том, что неблагоприятный гигротермический режим сам по себе не в состоянии вызвать фляшерии, стали искать причину заболевания в кормовом достоинстве листьев шелковицы. Опасения были, как будто бы, подтверждены исследованиями Т. Ватанабе (1944) на августовских выкормках, что послужило поводом для углубленного изучения биохимических особенностей шелковицы как кормового растения для тутового шелкопряда. Изучали отрицательное влияние кормления молодым (незрелым) листом на частоту возникновения фляшерии, значение содержания протеина и жира (Нокаяма, 1939), витаминов (Июсида, 1945) и микроэлементов (Леже, 1958). По заключению Июкоямы (1963), связь между химическим составом листьев и частотой проявления заболевания, в том числе на повторных выкормках, установить с полной очевидностью не удалось.

В Советском Союзе интерес к химической характеристике шелковицы получил наиболее полное выражение в работах биохимической лаборатории Московского государственного педагогического института им. Ленина под руководством проф. С. Я. Демяновского; исследования проводились им начиная с середины 30-х годов и продолжают его учениками по настоящее время; в этих работах принимали участие сотрудники САНИИШ и ЗакНИИШ. В отличие от японских ученых, исследования эти менее всего касались выяснения влияния химического состава листьев шелковицы на возникновение болезней.

**Кризис унитарной теории происхождения фляшерии.** В литературе первой половины прошлого столетия и среди практиков-шелководов, наряду с пембиной и мускардиной, упоминались и другие болезни тутового шелкопряда, которые характеризовались каким-нибудь внешним признаком: атрофия, апоплексия, дизентерия, гангрена, асфиксия, карликовость и фляшерия. Пастер скептически отнесся к этим определениям болезней. Исходя из собственных наблюдений, он писал: «Известны лишь четыре достаточно характерных заболевания тутового шелкопряда. Это желтуха, мускардина, фляшерия и пембина. Все остальные, как мне кажется, относятся к ним». Так, на заре микробиологических исследований в области болезней шелкопряда был заложен унитарный (обобщающий) взгляд на природу бактерий и их происхождение, а непререкаемый авторитет Пастера обеспечил этому взгляду длительное существование. Даже в Японии, где многовековой собственной опыт шелководов гарантировал известную самостоятельность критического восприятия достижений европейской науки, сказалось все же влияние унитаризма. По свидетельству Июкоямы (1963), в Японии под названием «фляшерия» долгое время объединяли заболевания с симптомами дизентерии, септицемии, синдрома гаттины и др. Однако ученые не могли не заметить в различных сочетаниях патологических явлений и признаков, что к бактериозам относят не одно, а несколько инфекционных заболеваний.

Даже для ранних исследователей, располагавших одним только световым микроскопом, была очевидна неидентичность фляшерии (мертвенности) и чахлости, и не только на основании сопоставления клинической картины, но и четких различий в составе бактерий у заболевших гусениц. В. Д. Штибен, Сато, Чигосаки установили возможность возникновения не только экспериментальной, но и естественной септицемии. Стал известен кишечный бациллярный токсикоз у шелколичного червя (Ишивата, Штейнхауз, Михайлов), а серологические методы исследования позволили выявить многочисленность вариантов возбудителя этой болезни.

Покушение на унитаризм фляшерии вышло даже за пределы ее бактериальной природы. Еще в 20-х годах А. Пайо после неудачных попыток вызвать фляшерью заражением гусениц бактериями, выделенными им из больных особей, высказал мысль, что эпизоотии мертвенности и чахлости становятся возможными благодаря ассоциации какого-то вируса в первом случае с бациллой шелкопряда, во втором — со стрептококками. После того как Ишимори открыл в 1934 г. цитоплазматический полиэдроз у гусениц тутового шелкопряда, основное усилие японских ученых было направлено на изучение патогенных для шелкопряда вирусов. В середине века в лабораториях стали появляться надежные помощники вирусологов — электронные микроскопы. В 1960 г. Ямазаки и др. сообщили о болезни, получившей название инфекционной фляшерии, вызываемой вирусом эф-типа, т. е. фляшерийного типа. Позже были обнаружены другие вирусы эф-типа.

**Что такое фляшерия (мертвенность)?** Старое представление о бактериальной природе фляшерии оказалось снесенным стремительным потоком исследований и было заменено новым: фляшерия — это вирус-

ное заболевание. Стало очевидным, что фляшерии скорее всего симптоматически, а не этиологически можно было бы отнести к бактериальным болезням шелколичных червей. Помимо бактерий в кишечнике, других отличительных признаков у фляшерии не было, и узнавали ее главным образом по изменениям внешнего вида гусениц после их смерти. Болезни, которые завершаются прижизненным некротическим распадом тканей к моменту гибели гусеницы, теперь нередко принято называть болезнями фляшерийного типа, хотя такой финал возможен для разных заболеваний. Так, в наши дни фляшерия из названия бактериоза превратилась в обобщенное обозначение картины гибели шелколичных червей, независимо от ее причины.

На эволюции этих представлений пришлось остановиться потому, что многообразии причин гибели гусениц на выкармках — от септицемии и бациллярных токсикозов до серии вирусных инфекций — наши шелководы за неимением лабораторных средств диагностики ошибочно считают вызванным одним и тем же заболеванием — мертвенностью.

### 2.3. Септицемия

**Симптомы.** Септицемия — гнилокровие, общее заражение гемолимфы, обусловленное размножением в ней бактерий. Заболевшие гусеницы перестают есть, становятся малоподвижными и иногда до самой смерти сохраняют нормальный внешний вид. В острых случаях наблюдается рвота и судороги, после которых трупы первое время сохраняют окоченелое состояние. При менее острых течениях возможно прижизненное омертвление отдельных участков тела гусеницы, распад тканей и потемнение до темного или черного цвета, начиная с грудных сегментов (рис. 8).

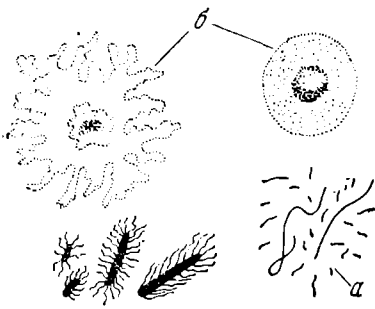


8. Гусеница, погибающая от септицемии.

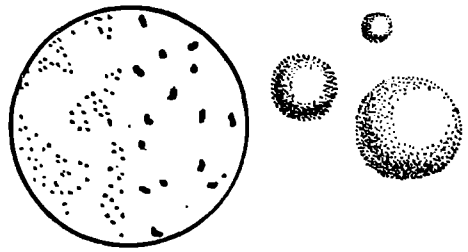
Известно, что для классической фляшерии характерен септический финал на заключительном этапе болезни. Поэтому многие авторы в прошлом (Поспелов, 1926 и др.) рассматривали септицемию как синоним фляшерии. История изучения септицемии по-настоящему началась с того момента, когда ученые научились отличать ее от фляшерии.

**Бактерии как этиологический фактор.** Исходные сведения для изучения септицемии дали многочисленные опыты непосредственного заражения общей полости насекомых различными видами бактерий; безрезультатными они оказывались только в редких случаях. Вместе с тем заражение теми же бактериями через рот чаще всего не удавалось или требовало во много раз большей дозы; не все испытанные бактерии обладали достаточной вирулентностью, чтобы вызвать естественным путем заражение и сепсис.

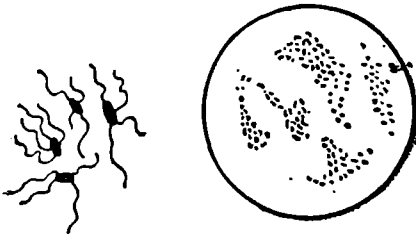
Чаще всего эпизоотии септицемии на выкармках тутового шелкопряда вызывают бактерии, не образующие спор, граммотрицательные из рода псевдомонас (*Bac. ruosuapeum*), эшерихия (*B. coli*), протеус,



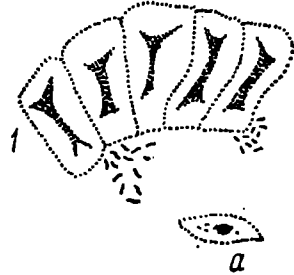
9. Морфологическая изменчивость *Bacillus proteus* (а) и ее колонии (б).



12. *Bacterium turkestanicum* St; в окрашенном мазке: *слева* — выросшая на агаре, *справа* — в гемолимфе гусеницы; колонии бактерии на агаре.

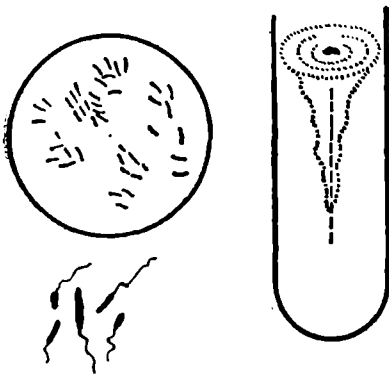


10. *Bacterium prodigiosum* — чудесная палочка, окрашивающая зараженный ею субстрат в красный цвет.



13. Туркестанская бактерия:

1 — скопление возле клеток жирового тела через сутки после заражения гусеницы уколком; а — одиночные гемоциты; 2 — начало омертвения клеток жирового тела и внедрения в них бактерий; а — гемоцит, пожирающий бактерий.



11. *Bac. pycnosaupeus* — синегнойная палочка; *справа*: рост на желатине в пробирке, разжиженной ею в виде воронки.

бактерии из рода сальмонелла (тифозная и паратифозная бактерии) и шигеллы (дизентерийная бактерия). Спорообразующие бактерии (сем. *Bacillaceae*) встречаются в этой роли значительно реже и почти исключительно из рода *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac.*

*serratia* (*B. prodigiosum*), в том числе штаммы этой последней, не образующие пигмента (рис. 9—11).

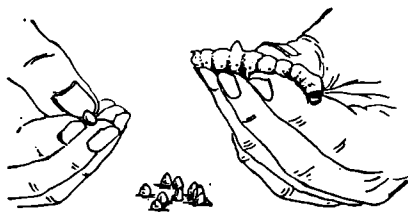
Значительно реже ими оказываются бактерии из рода сальмонелла (тифозная и паратифозная бактерии) и шигеллы (дизентерийная бактерия). Спорообразующие бактерии (сем. *Bacillaceae*) встречаются в этой роли значительно реже и почти исключительно из рода *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac.*

cereus,, *Vac. anthracoides* (Штейнхауз, 1952; Штибен, 1934; Михайлов, 1952).

В. Д. Штибен (1931) во время жестокой эпизоотии на выкормках в Туркмении выделил очень вирулентного возбудителя септицемии, названного им *Bacterium turkestanicum* Stieben (рис. 12—13); позже его причислили к бактериям рода псевдомонас (Полтев, 1969) или к группе *coli-aerogenes* (Африкян, 1973). Болезнетворная деятельность различных возбудителей септицемии характеризуется не только разницей в проявлении внешних признаков заболевания, но и в патологоанатомической картине. Так, туркестанская бактерия Штибена в основном сосредоточивается в жировом теле и эритроцитах; через некоторое время после заражения общей полости эти ткани оказывались сплошь заполненными бактериями. Скорее всего, так проявляется защитная клеточная (фагоцитарная) реакция этих органов, направленная на избавление гемолимфы от возбудителя. При заражении протидиозумом и протеусом клеточная защитная реакция проявлялась значительно слабее и агония наступала при менее заметном накоплении бактерий во внутренних органах гусеницы; создавалось впечатление, что гибель от септицемии, вызванная этими бактериями, ускоряется интоксикацией, в то время как для туркестанской бактерии Штибена характерна оккупационная деятельность (Яшковская, 1934).

**Противоинфекционная защита целомической полости.** При значительной уязвимости кровеносной полости наиболее эффективным средством защиты насекомого является механическая преграда кожного покрова. Заражение бактериями через неповрежденную кожу насекомого практически неосуществимо (Булла и др., 1975).

Для выяснения вопроса о возможности заражения через поврежденную в разной степени кожу, а также через дыхальца, использовался метод изоляции бактерий на теле гусениц в парафиновых капсулах (Михайлов, Котельникова, 1958). Оказалось, что бактерии могут заразить насекомое только через поврежденную кожу, главным образом через свежие ранки (рис. 14). Покровы гусениц повреждаются во время ухода за выкормкой, раскладки веточного



14. Заражение гусеницы через ранки на коже бактериями, заключенными в парафиновые капсулы.

корма, смены подстилки и разрежения; особенно легко травмировать кожные покровы после линьки, когда они еще не вполне окрепли. Инфекция может быть привита «коготками» (крючьями) ложных ножек гусениц, выполняющих в этом случае роль скарификатора (копыцецо для оспопрививания). Возможность травмирования с возрастом увеличивается; в младших возрастах, особенно в первом, поверхность тела гусеницы защищена щетинками, а в старших — размер и количество коготков увеличивается, так же как и масса самих гусе-

нид. Чем плотнее расположены гусеницы на выкормочной поверхности, тем больше вероятность травмирования и прививки инфекции. Довольно часто ворота инфекции в покровах насекомого создают укусы его врагов: муравьев, ос, сверчков и др. Целостность кожных покровов нарушают также паразиты. В литературе есть данные о нематодах — вероятных инокуляторах насекомых возбудителями септицемии (Вейзер, 1966; 1972). Инфекция может быть внесена ротовыми трубками энтомопатогенных грибов через кожу, несущую на своей поверхности возбудителей септицемии. Как уже отмечалось, после проникновения в гемолимфу бактериям предстоит преодолеть клеточные и гуморальные средства защиты.

Выяснено, что после заражения через рот бактерии спустя некоторое время не обнаруживаются в кишечнике. «Кишечный иммунитет» насекомых — фитофагов обязан своей результативностью не только высокой концентрации водородных ионов и низкому окислительно-восстановительному потенциалу, которые подавляют жизнедеятельность бактерий, но и перистальтике, обеспечивающей систематическую эвакуацию кишечного содержимого вместе с бактериями, занесенными сюда с листом шелковицы. Однако рост бактерий в кишечнике задерживается при меньшей щелочности, чем в пробирке, в искусственной щелочной среде. Предполагают, что в пищеварительном соке шелколичного червя содержится противобактериальная субстанция, аналогичная лизоциму. Имеются также указания на наличие антибактериальных веществ в пище насекомых растительного происхождения (Булла и др., 1975).

М. А. Хашимова и Г. Я. Ламм (1979) изучали состав и количество фенолкарбоновых кислот в листьях различных сортов шелковицы (Таджикская бессемянная, гибрид свободного опыления, Южный) в различные сезоны червокормления; с помощью бумажной хроматографии обнаружены кофейная, феруловая, хлорогеновая, неохлорогеновая и *n*-кумаровая кислоты. Наибольшее содержание этих кислот в листьях отмечено весной, меньше — летом, осенью количество их снова возрастает. Японские исследователи показали, что фенольные соединения — необходимый компонент корма для тутового шелкопряда и содержание их в известной мере определяет кормовое достоинство листьев; так, хлорогеновая кислота положительно влияет на рост гусениц. Вместе с тем, подобно тому как фенольные соединения в растениях играют большую роль в их сопротивляемости инфекциям, поступление ряда фенольных соединений с листом в кишечник положительно сказывается на защитной способности пищеварительного сока гусеницы.

Иizuка и др. (1975) выделили из экскрементов шелколичных червей протокатехиновую (3,4-диоксибензойную) и гидроксibenзойную кислоты, оказывавшие бактериостатическое действие на фекального стрептококка. Из фенольных производных листьев шелковицы эти свойства обнаружены только у скополина — глюкозида скополина (6-метокси-7-гидроксикумарина), но в несколько меньшей степени.

Иizuка с соавторами (1979), так же как ряд их предшественни-

ков, изучали антибактериальную активность некоторых низкомолекулярных веществ в пищеварительном соке гусениц тутового шелкопряда. Такой активностью обладают кофейная, протокатехиновая, хинная и хлорогеновая кислоты. Кофейная кислота сохраняет высокое бактерицидное действие даже при незначительном содержании (5 частей на 10 000 среды), хлорогеновая кислота оказывается активной только в сочетании с кофейной. Отмечается, что синергизм в антибактериальной активности различных компонентов пищеварительного сока играет существенную роль в регулировании состава и численности бактериальной флоры кишечника. Поэтому в пищеварительном тракте здорового шелкопряда червя микрофлора носит не постоянный, а транзитивный (проходящий) и случайный по своему составу характер. По заключению ряда исследователей, она состоит в основном из обитателей почвы, заражающих воздух, воду и поверхность листьев шелковицы, а также бактерий нормальной микрофлоры человека и животных.

**Условия возникновения септицемии.** Согласно медицинским представлениям источником септических инфекций служит местный инфекционный очаг в самом организме. У шелкопряда червя очагом могут служить поврежденные участки кишечника (токсического или механического происхождения), которые приводят к прижизненному проникновению бактерий в гемолимфу и вызывают так называемую *вторичную септицемию* (Штибен, 1934).

Возникновение септицемии возможно не только при предварительном образовании очагового плацдарма, но и при непосредственном заражении гемолимфы через кишечный тракт. Известно, что бактерии, прежде всего особовирулентные, способны проникать и размножаться в общей полости при ничтожной дозе инфекции, что является причиной массовой гибели насекомых в естественных условиях их обитания. Так, О. Лысенко (1962, 1963) утверждает, что ЛД<sub>50</sub> (50%-ная летальная, смертельная доза) для гусениц большой пчелиной моли при непосредственном заражении у них общей полости бактериями из рода псевдомонас составляет всего лишь три бактериальные клетки на одно насекомое. Это значит, что для возникновения септицемии достаточно преодолеть барьер перитрофической мембраны и кишечной стенки считанному количеству высоковирулентных бактерий.

Надежность кишечного иммунитета непостоянна. Даже при отсутствии патологических явлений в кишечнике функции защиты местных средств могут эпизодически ослабевать под влиянием различных факторов. Состав кишечного сока и его реакция зависят от возраста гусеницы, степени зрелости листьев шелковицы и содержания в них воды, от других причин, влияющих на состояние секреции эпителия средней кишки, а также на перистальтику кишечного тракта. Наиболее сильные отклонения от нормального состояния могут быть вызваны токсическими метаболитами бактериальной флоры кишечника, когда «численность бактерий достигает критического уровня» (Вейзер, 1966). Еще более опасны в качестве пособника заболевания токсины бактерий группы тюрингиензис, а также пестициды, остаточное количество которых может сохраниться на листьях шелковицы (Z. Kovčević, 1962).

## 2.4. Кишечный бациллярный токсикоз

**История открытия патогена.** В 1902 г. С. Ишивата сделал сообщение «относительно тяжелой формы фляшерии — обморочной болезни». Он наблюдал ее на выкормках шелкопряда, пораженных жестокой эпизоотией, выделил и описал возбудителя (1905—1906). Выросшие на агаризованной среде старые культуры этой бактерии в возрасте от одной недели и до девяти месяцев при скармливании гусеницам оказались смертельными. Ишивата назвал возбудителя *сотто-бациллой* (япон. *сотто* — обморок). Через несколько лет к находке Ишиваты обратились микробиологи медицинского факультета Токийского университета Аоки и Чигасаки (1915). Они подтвердили, что токсины так называемой сотто-бациллы Ишиваты содержатся только в старых культурах, а токсическое вещество ассоциируется со спорулирующими культурами в качестве бациллярного эндотоксина. При скармливании старых культур гибель гусениц наступает в течение трех часов, а при инъекции в гемолимфу — не только старых, но и молодых культур — неизбежно возникает острая септицемия. Патогенное действие не всегда связано с предварительным размножением бактерий в кишечнике. Однако, если доза токсина в результате скармливания бактерий оказалась не летальной, бактерии успевают размножиться в средней кишке; под влиянием их токсического воздействия стенка кишечника утрачивает барьерные свойства, бактерии начинают проникать в общую полость, возникает септицемия.

Эпизоотия, которую описал Ишивата, по мнению шелководов Японии не была исключительным явлением. В годы обильного размножения вредителей из отряда чешуекрылых среди них наблюдались эпизоотии, вызванные, как потом установили, сотто-бациллой. Гусеницы-вредители тутовых плантаций становились средством для накопления в природе этого патогена. Через несколько часов после дачи корма с зараженной плантации на выкормках начиналась массовая гибель шелколичных червей, вызванная бациллярной интоксикацией.

Оригинальные штаммы бациллы Ишиваты были сохранены и всесторонне изучены в самой Японии, а позже и за ее пределами, где ранние публикации долгое время оставались неизвестными. Даже после ознакомления со статьями Аоки и Чигасаки, вышедшими на немецком языке, находка Ишиваты не вызвала особого интереса. Предполагалось, что новое заболевание — лишь частный случай из сферы специфических особенностей японского шелководства.

Независимо от этого открытия, в 1911 г. Е. Берлинер опубликовал в Германии предварительное сообщение относительно болезни гусениц мельничной огневки (*Ephestia kühniella* Zell.), завезенной в Западную Европу из Северной Америки. Болезнь этого амбарного вредителя вызывалась спорообразующей бактерией, которую Берлинер позже назвал по имени быв. админ. области Германии Тюрингии, где она была открыта, *Bacillus thuringiensis* (1915). Штаммы Берлинера были утеряны, но в 1927 г. немецкий ученый О. Маттес вновь изолировал эту бактерию и безуспешно пытался использовать ее культуру в борьбе с амбарными вредителями.



В 50-х годах во Франции в департаменте Гар, колыбели французского шелководства, сотрудники парижского Института Пастера Туманов и Ваго (1951) выделили разновидности бактерии тюрингиензис «алес», а последующая экспедиция — штамм «андуз», названные так по наименованию близлежащих городов. Именно здесь, в районе Алеса, в местечке Понт-Жиск, в прошлом столетии Пастер проводил свои исследования и писал книгу о болезнях шелковичных червей. Сопоставление этих фактов побудило ученых заново изучить труды Пастера, так как возникло предположение, что изображенные в его книге «вибрионы с ядрами» из кишечника фляшерийных гусениц могли оказаться местной разновидностью тюрингиензиса. Вероятность такого предположения возрастала в связи с тем, что в трудах Пастера помещен цветной рисунок мертвой гусеницы, внешний вид которой типичен для острых токсикозов. По словам Пастера, такие гусеницы после гибели выглядели, как живые (рис. 15).

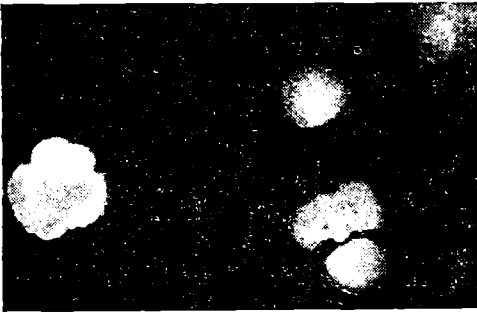


Э. Ф. Пялков (1886 — 1956)

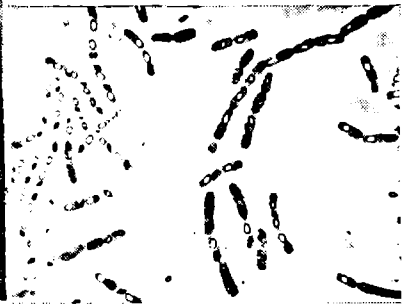
После того как в 20-х годах текущего столетия энизоотия «белых мертвецов» распространилась в Италии, Э. Ф. Поярков (САНИИШ) высказал мнение, что внешний вид трупов шелковичных червей, погибших в одном из районов Узбекской ССР, также имел много общего с признаками этой болезни. В 30-х годах в разных районах республики Е. Н. Михайлову приходилось наблюдать на выкормках признаки острого токсикоза и выделять из трупов гусениц споробразующих бактерий. За неимением в то время других прототипов он идентифицировал их то как *Vac. cereus*, то как *Vac. sotto*. Много позже Э. К. Африкян (1973) сообщил, что в трупах гусениц и коконах карапачах из Закавказья и Средней Азии нередко присутствуют бактерии из группы *цереус тюрингиензис*. К этому времени в УзССР была уже собрана большая коллекция разновидностей тюрингиензиса — несколько сот



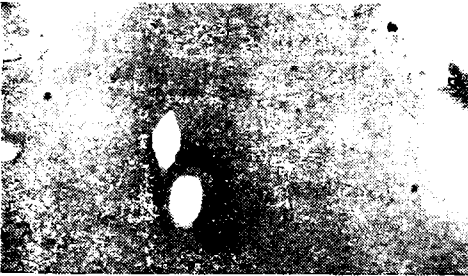
15. Разновидность фляшерии из книги Пастера; похожи на «белых мертвецов» в более поздних итальянских сообщениях.



16. Колонии бактерии тюрингиензис на мясо-пептонном агаре.



18. Бактерия тюрингиензис, завершающая споруляцию и освобождение кристаллов энндотоксина в постоянном окрашенном препарате под иммерсионным объективом (фото Института Пастера, Париж).



17. Электронная микрофотография кристалла бактерии тюрингиензис и споры с окружающим ее экзоспориумом (Штейнхауз, 1956).

штаммов, выделенных у тутового шелкопряда и полевых вредителей и предназначенных в качестве продуцентов для биоинсектицидов (Михайлов, Сухачева и др., 1971), выпускаемых отечественной промышленностью (Михайлов, Троицкая, Плужников, 1974).

#### Систематика энтомопатогенных кристаллофоров.

Исучая выделенную им бактерию, Берлинер обнаружил в клетках спорулирующей культуры своеобразные включения. Он назвал их *Restkörper* (остаточные тельца) предполагая, что они образуются из остаточной части протопласта бактериальной клетки, не вошедшей в состав споры. Спустя много лет Хенней (1953) вновь обратил внимание на ромбовидные кристаллоподобные включения, формирующиеся во время споруляции и появляющиеся затем в культуре бактерий в свободном состоянии, наряду со зрелыми спорами. Эги образования получили название *параспоральных* (греч. *para* — около) кристаллоподобных включений, а для краткости — просто кристаллов (рис. 16—18); бактерий же с подобными включениями стали называть *кристаллофорами* (греч. *phoris* — носитель, несущий).

В 50-х годах штаммы тюрингиензиса рассматривали как разновидность повсеместно распространенной, в том числе в поверхностном почвенном слое, *Bac. cereus* Frankland end Frankland. Э. А. Штейнхауз (1954) писал, что культурально тюрингиензис действительно идентичен цереусу, однако отличается от последнего параспоральными кристаллоподобными включениями и патогенностью для насекомых. Бактерию Берлинера все чаще стали рассматривать как самостоятель-

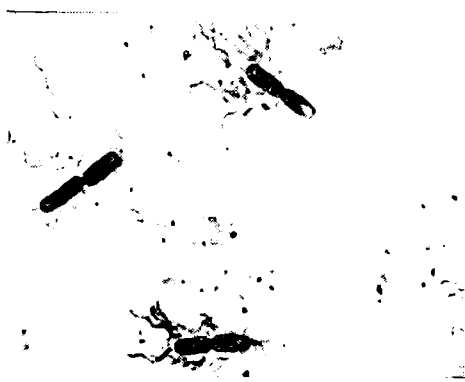
ный вид, а ее многочисленные изоляты с основными признаками *Bac. thuringiensis* Berliner—Mattes, выделенные из различных насекомых и на разных континентах, но отличающиеся некоторыми культуральными, биохимическими и серологическими особенностями, были признаны вариантами (разновидностями) тюрингиензиса: *Bac. thuringiensis* var. *alesti*, *Bac. thuringiensis* var. *Sotto*, *Bac. thuringiensis* var. *golleria* и т. д. (Криг, 1961). Вариант тюрингиензиса, выделенный и описанный Берлинером и Маттесом, стали именовать *Bac. thuringiensis* var. *berliner*, а еще чаще *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*, подчеркивая этим его положение как видового прототипа (оригинала, первоначального образца).



Э. А. Штейнхауз (1914 — 1969)

Для систематизации вариантов по их отличительным признакам был предложен ряд схем. Наиболее полно необходимые таксономические критерии учтены в систематике, разработанной в Институте Пастера в Париже А. Бонфуа и де Баржак (1963). Основу систематического распределения составили восемь главных групп тюрингиензиса, различающихся по серологическим признакам.

Бактерия тюрингиензис характеризуется наличием жгутиков с присущими им антигенными свойствами. Жгутиковый, или флагеллярный антиген бактериальных «ресничек», он же *H*-антиген (аш-антиген), отличен от *O*-антигена или соматического, который состоит из антигенов всей клетки. Кролик иммунизируется *H*-антигеном, и сыворотка его крови приобретает способность агглютинировать, склеивать бактерии в хлопья. Реакция эта может быть получена с тем большим разведением сыворотки, чем ближе в систематическом отношении исследуемый штамм к штамму, взятому для иммунизации кро-



19. Бактерия тюрингиензис, культура которой приготовлена отбором наиболее подвижных клеток) для иммунизации кролика флагеллярным (жгутиковым) антигеном,

лика (рис. 19). Реакция макроскопической агглютинации ставится в тонких, укороченных агглютинационных пробирках, содержащих в последовательном разведении сыворотку крови иммунизированного кролика; такую сыворотку называют *антисывороткой* к тому варианту, которым он иммунизирован. Степень родства (систематической близости) исследуемого штамма со штаммом, использованным для приготовления антисыворотки, устанавливают по титру наибольшего разведения последней, при котором сохраняется ее способность к агглютинации бактерий.

Реакция агглютинации с *H*-антигеном не дает возможности различать очень близкие в серологическом отношении варианты. Например, варианты сотто и дендролимус Бонфуа и де Баржак отнесли к одному и тому же серотипу, а несовпадение их характеристик по способности сбраживать сахарозу и целлобиозу (сотто  $\pm$ ; дендролимус  $\mp$ ) рассматривалось ими как биотипические различия в пределах серотипа; биотип—популяция, отличающаяся от остальных представителей вида отдельными физиологическими признаками. Они обозначили их символами биотипов: 4а и 4в. То же самое произошло с вариантами субтоксикус и энтомоцидус, отнесенными к одному и тому же шестому серотипу и помеченными как его биотипы.

Норрис (1964) исследовал с помощью электрофореза в геле вариативность структуры эстеразы («типы эстераз») у вариантов тюрингиензиса. Эта обширная группа ферментов в современной номенклатуре носит название гидролаз эфиров карбоновых кислот, которое характеризует сущность их катализирующей функции. Они широко распространены в мире животных существ, в том числе микроорганизмов. Норрис включил этот признак различия вариантов в схему Бонфуа и де Баржак. Наконец А. М. Хеймпель (1967) усложнил всю схему, введя в нее в качестве признака состав токсинов, образуемых вариантами, и их патогенность для типового подопытного насекомого тутового шелкопряда. Позже схему Бонфуа и де Баржак дополнили другие исследователи (Булл и др., 1975): варианты *kurstaki* (*H*-серотип 3а, 3в), *canadensis* (5а, 5с), *entomocidus* — *limassol* (6), *Darmstadicus* (10), *Tommanoffi* (11), *Thompsoni* (12).

Кроме того, зарегистрированы следующие варианты и штаммы тюрингиензиса: *amuscatotoxicus*, *apagastae*, *pacificus*, *shvetsova* и др. Ключ для определения вариантов тюрингиензиса приведен в табл. 2.

Г. А. Плужников (1975) разработал метод получения преципитирующих моносывороток на основе *O*-антигена, который в реакциях преципитации в геле реагирует только со специфическим компонентом в антигенном комплексе каждого из сопоставляемых вариантов. Полученные моносыворотки позволили серологически четко дифференцировать отдельные варианты, которые в схеме Бонфуа и де Баржак рассматривались как культуральные биотипы одного и того же серотипа. Этот метод помог показать серологическую обособленность нового варианта, выделенного в Узбекистане и описанного под названием *Vac. thuringiensis var. asiae—mediae*, nov. var. (Троицкая, Михайлов, Плужников, 1972).

Вейзер (1966) полагает, что у каждого варианта тюрингиензиса

Культурально-биохимические реакции		Тип по эстеразе	Серо-тип	Название сортов (var)	
		манноза + крахмал ++ манноза - крахмал -	берлинер финитимус	1 2	berliner finitimus
		сахароза + пленка + уреаза -	эскулин +		
	салицин + протеолиз + пигмент -	сахароза - пленка - уреаза ++	эскулин +		
		манноза - крахмал +		9	tolworthi
		манноза - крахмал -		7	ajzawai
		манноза - крахмал ±		4a, 4c	kenyae
	лецитиназа -	сахароза + манноза + крахмал +			
		целлобиоза -		4a, 4	sofто
		сахароза - манноза - крахмал +			
	салицин - протеолиз +++ пигмент -	пленка - уреаза -	эскулин +	4a, 4	dendrolimus
ацетилметилкарбинол +		сахароза - манноза - крахмал + манноза - крахмал + целлобиоза +			
	салицин + протеолиз + пигмент -	пленка - уреаза -	эскулин +	3	alesti
		сахароза - пленка - уреаза +	эскулин +++	5	galleriae
	лецитиназа -	сахароза + пленка + уреаза +	эскулин +	8	morrisoni
	салицин - протеолиз + пигмент -	сахароза + пленка + уреаза +	эскулин ++	6	subtoxicus
ацетилметилкарбинол -	лецитиназа - салицин - протеолиз +++ пигмент -	сахароза + пленка - уреаза -	эскулин +	6	entomocidus
		сахароза + пленка + уреаза +	эскулин +		
		манноза - крахмал +			

свой узкий ареал и они чаще всего поражают определенный видовой состав насекомых. Возможно, что такая приуроченность в свое время участвовала в формировании сортов, однако исходная локализация к настоящему времени оказалась в значительной степени стертой под влиянием товарного обмена и других средств переноса инфекции. Наш опыт показал, что в Узбекистане на выкормках тутового шелкопряда и у вредителей сельскохозяйственных культур — подгрызающих совок, капустной белянки, яблонной плодожорки и др. — встречаются различные сорта тюрингиензиса, в том числе галлерия, алевти, сотто и др. О космополитизме сортов свидетельствует также ряд японских публикаций (Оба, Аизава, 1978).

**Токсины как фактор патогенности.** Токсины бактерий — производные нормального обмена веществ, белки с высокой молекулярной массой и четко выраженными антигенными свойствами. Их принято делить на экзотоксины и эндотоксины.

Экзотоксины выделяются микробами во внешнюю среду. Как их получают? Продукты культивируют на жидких питательных средах, отделяют токсины от микробов: пропускают через бактериологические фильтры, освобождают фильтр от балластных веществ питательной среды, микробных метаболитов и т. п. Из фильтрата путем адсорбции или ультрафильтрации осаждают экзотоксины с последующим высушиванием в вакууме. Часто экзотоксин представляет собой смесь двух или нескольких модификаций (обычно обозначаемых буквами алфавита), которые дифференцируют с помощью ультрацентрифугирования, повышения скорости диффузии или электрофореза в соответствии с размерами молекул и их молекулярной массой.

Выделение экзотоксина сквозь неповрежденную оболочку жизнедеятельной клетки может происходить посредством диализа. Возникло сомнение: возможно ли, чтобы через клеточные мембраны проходили подобные крупномолекулярные вещества; выяснилось, однако, что в клетке микроба присутствует не токсин, а его предшественник — протоксин, с более мелкой молекулярной структурой. Оказываясь в организме насекомого или во внешней среде, протоксин под действием ферментов самого микроба или ферментов заражаемого организма превращается в токсин. При этом под влиянием ферментации у протоксина освобождаются заблокированные радикалы, которые представляют собой, по существу, инструмент токсического поражения.

У бактерии тюрингиензис выделение нативного токсина параспиральных включений не требует таких сложных операций, так как он освобождается спорообразующей клеткой вместе со сформированной спорой и оказывается в свободном состоянии в культуральной жидкости в виде кристаллоподобных тел.

Эндотоксины — структурный компонент микробной клетки, в окружающую среду поступают только после гибели и разрушения клеток. Получают их посредством экстрагирования. Эндотоксин состоит из белка, полисахаридной и липидной иракций (этот комплекс называют полным антигеном Буавена). Две первые фракции прочно связаны друг с другом и обнаруживаются только после гидролиза всего комплекса. Хотя этот комплекс обладает отчетливым антигенным свойством,

токсичность его преимущественно обусловлена участием в нем липида А. Полисахарид, сам по себе, нетоксичен, а белки и липид В менее токсичны, чем липид А.

Наличие экзо- и эндотоксинов и их особенности связаны с видовой принадлежностью микроба; количественное же выражение токсинообразовательной способности, вплоть до полной ее утраты, является особенностью штамма, и проявление ее зависит от условий жизнедеятельности микроба.

Экзо- и эндотоксины не равнозначны по токсическим свойствам и по ряду основных особенностей. Экзотоксины обладают значительно большей ядовитостью; смертельная доза их на несколько порядков больше, чем у эндотоксинов. Для проявления действия экзотоксинов необходим инкубационный период; эндотоксины же действуют сразу же после введения их в организм. Экзотоксинам присуща специфическая приуроченность к органам и тканям; некоторые избирательно поражают нервные клетки — нейротоксины; другие вызывают омертвление тканей — некротоксины, существуют токсины, растворяющие клетки — цитолизирующие, а также свертывающие белки физиологических жидкостей — коагулирующие и т. д. Эндотоксины, чаще всего, признаками специализации не обладают.

Экзотоксины термолабильны, разрушаются при 60—80°С в течение менее четверти часа. Эндотоксины разрушаются только при длительном кипячении или более высокой температуре. Такие же различия в степени стабильности тех и других токсинов наблюдаются и в отношении действия на них ультрафиолетовых лучей. Кислая и резкощелочная реакции разрушают те и другие токсины. Влияние на токсины попеременного замораживания и оттаивания незначительно, а высушивание и, особенно, лиофилизация (сушка при низкой температуре под вакуумом), позволяют длительно сохранять их исходную активность.

**Ферменты патогенности.** Токсины — не единственный фактор развития болезни. Размножаясь в теле насекомого, бактерии при участии своего интенсивно функционирующего ферментативного аппарата взаимодействуют с процессом обмена веществ в клетках инфицированного организма; при этом ферменты способны не только нарушать течение биохимических процессов в оккупированном организме, но и вызывать нарушение целостности клеточных структур, участвовать в их разрушении. Нередко их условно выделяют, называя ферментами патогенности.

Ферменты патогенности, так же как токсины, являются белками; те и другие способны проявлять свое действие в весьма малых дозах после сравнительно длительного бессимптомного периода. Действие ферментов, так же как токсинов, осуществляется при участии активных центров молекулы, которые представлены в ней особой конфигурацией пространственного расположения отдельных участков полипептидной цепи. И все-таки отождествлять оба этих фактора патогенности бактерий не следует. Прежде всего они отличаются рядом специфических черт участия в патогенезе инфекционных заболеваний. Так, токсины принято считать основным фактором патогенности, дейст-

вне их носит детерминирующий характер, определяющий главные черты проявления болезни. Ферменты же чаще всего служат сопутствующим фактором в патогенезе, они ответственны за проявление отдельных симптомов заболевания.

В развитии болезни участвует весь комплекс факторов патогенности: токсины, ферменты патогенности, а также некоторые продукты метаболизма патогена и продукты распада клеток самого пораженного организма. Доля участия этих факторов варьирует в зависимости от природы болезнетворного организма, но соотношение этих факторов может оказаться неравнозначным у разных штаммов одного и того же вида или разновидности возбудителя; у одних с большей определенностью в ходе инфекции проявит себя острый токсикоз, у других — ферменты патогенности или другие сопутствующие факторы патогенеза.

Возбудитель бациллярного токсикога тутового шелкопряда — *Bac. thuringiensis* обладает полным набором факторов патогенности: токсинами параспоральных кристаллов, ферментами патогенности (лецитиназой С и некоторыми другими), болезнетворными метаболитами в виде термостабильного токсина. По современным представлениям Хеймпель был не прав, когда факторы патогенности в предложенной им систематике бактерии тюрингиензис ошибочно назвал экзо- либо эндотоксинами, обозначив их буквами греческого алфавита: например,  $\delta$ -endotoxin (дельта-эндотоксин) — токсин параспоральных кристаллов;  $\alpha$ -exotoxin (альфа-экзотоксин) — фермент патогенности лецитиназа С;  $\beta$ -exotoxin (бета-экзотоксин) — фактор патогенности, термостабильный метаболит аденозинмонофосфат и т. д.; по существу называться токсином могут только параспоральные кристаллы.

**Параспоральные кристаллы и их образование.** По форме кристаллы представляют собой правильный тетрагональный октаэдр, пресекция которого на плоскость имеет очертание ромба; именно так выглядят эти кристаллы на окрашенных постоянных препаратах под световым микроскопом. Электронный микроскоп позволил получить их изображение, увеличенное в несколько десятков тысяч раз (Шивели, 1974). Они оказались бипирамидой на общем основании, с вершинами, обращенными в противоположные стороны. Поверхность кристалла покрыта рельефными бороздками, расположенными параллельно основа-



20. Электронномикроскопическая структура поверхности кристалла бактерии тюрингиензис, вариант алевти (Хольт, США, 1974).



нию бипирамиды, на одинаковом расстоянии друг от друга (рис. 20). Руководствуясь рентгеноструктурным анализом, Холмс и Монро (1965) построили модель молекулярного строения этого кристалла. Изучалась так же форма структурных субъединиц, из которых сложен кристалл, но выводы авторов здесь оказались противоречивыми.

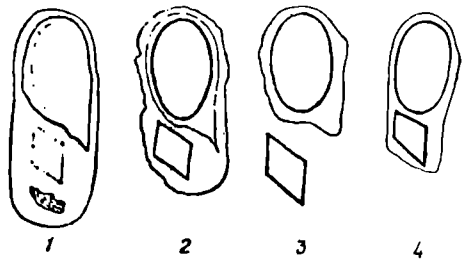
Образование кристалла непосредственно связано со спорообразованием. Электронная микроскопия позволила проследить за процессом споруляции, начиная с появления так называемой примордиальной (зачаточной) споры. Местом ее образования служит участок в цитоплазме бактериальной клетки, где концентрируется дезоксирибонуклеиновая кислота. Примордиальная спора путем инвагинации (впячивания вовнутрь) цитоплазматической мембраны бактерии образует внешнюю оболочку споры — экзоспорию. Затем из плазмы самой споры формируется наружная оболочка споры (экзина), а под ней — внутренняя оболочка (интина). Протоплазматическая сердцевина споры окружена корковым слоем — структурой, соответствующей цитоплазматической мембране бактериальной клетки и граничащей непосредственно с интиной.

После образования споры тело вегетативной клетки бактерии отмирает; остаток ядерного вещества, цитоплазмы и клеточной оболочки бактерии, от которой освобождается сформированная спора, становится отмершим спорангием, внутренняя поверхность которого граничит с экзоспорием — внешней оболочкой споры.

Образование кристалла начинается в начале споруляции с маленькой преломляющей свет гранулы, появляющейся в процессе образова-

ния экзоспория. У всех вариантов кристаллы формируются внутри спорангия на поверхности экзоспория (рис. 21). После завершения формирования споры и кристалла стенки спорангия разрушаются, а споры и кристаллы освобождаются и отдельно поступают в культуральную жидкость. Исключение составляет вариант финитимус, у которого споры и кристаллы после разрушения стенки спорангия не отделяются друг от друга; это связано с тем, что возникновение кристалла и его формирование происходит в отличие от других вариантов не на поверхности экзоспория, а внутри, в непосредственном соприкосновении со спорой.

Химическая природа белка кристалла очень похожа на белок экзоспория и имеет с ним общие антигенные детерминанты (молекулы антигена, соединяющиеся с активным центром гомологичного антитела). Серологические исследования антисывороток к антигену кри-



21. Бактерия тюрингиенсис, формирующая спору и кристалл эндотоксина:

1 — топография образования споры и кристалла в бактерии; 2 — спора и кристалл внутри спорангия — оболочек бактериальной клетки, протоплазма которой переместилась в спору; 3 — спора в оболочке экзоспория и свободный кристалл; 4 — вариант финитимус; в отличие от других вариантов тюрингиенсис у него кристалл и спора заключены в экзоспориум и, после избавления от спорангия, не отделяются друг от друга

сталлов показали, что белок кристаллов впервые обнаруживается этими реакциями одновременно с появлением экзоспория и, следовательно, начало образования кристаллов соответствует примордиальному этапу споруляции. Одним из самых первых явлений, предшествующих началу споруляции, является синтез бактериальной клеткой комплекса ферментов, с деятельностью которых происходит преобразование белка цитоплазмы, необходимое для построения споры; ферменты бактериальной клетки непосредственно участвуют в синтезе белка экзоспория. Предполагают, что параспоральные кристаллы сортов тюрингиензиса образуются в результате перепроизводства белка экзоспория, вследствие нарушения процессов, управляющих синтезом этих молекул во время спорообразования. Высказывалось также предположение, что кристаллообразование связано с присутствием в бактерии «умеренного» фага, удаление которого лишает тюрингиензис способности образовывать кристаллы. Последнее десятилетие у тюрингиензиса интенсивно изучаются плазмиды — внехромосомные двунитчатые кольцевидные молекулы ДНК, встречающиеся в цитоплазме бактерий, наряду с единственной у них хромосомой. Фрагменты хромосомной ДНК могут быть включены в плазмиду, а последняя — «инфицировать» ими другую бактерию, осуществив перенос связанного с ним признака. Роль плазмид в генной обусловленности кристаллообразования представляет большой интерес и широко исследуется у разных сортов тюрингиензиса (Иизуки и др., 1981, 1982).

Кристаллы не являются неотъемлемой частью спорообразования у бактерии тюрингиензис; связь эта может быть нарушена и в том числе — мутацией, в результате чего споры образуются без сопровождения кристаллов. По всей видимости, подобные случаи более вероятны для штаммов и сортов с менее стойким кристаллообразовательным шунтом (ветвью) белкового синтеза у спорулирующей клетки.

**Инсектицидные свойства параспоральных кристаллов.** Берлинер и Маттес не предполагали, что между параспоральными и энтомопатогенными свойствами изучаемых ими бактерий есть связь. Много лет спустя такое предположение было высказано Хеннеем (1953), а Анкус (1945) подтвердил его, показав зависимость между токсичностью спорующих культур этой бактерии и образованием кристаллов. Он сравнивал действие на шелкоичных червей смеси спор и кристаллов, спор, отделенных от кристаллов, щелочного экстракта, приготовленного из спор и кристаллов, и установил, что параспоральные включения — это в основном растворимое в щелочах белковое вещество, токсичное для гусениц некоторых чешуекрылых.

Анкус обнаружил, что отмытые кристаллы, введенные в кровь шелкоичных червей, не токсичны. Содержание же кишечника после кормления гусениц кристаллами, впрыснутое в гемолимфу, оказалось токсичным. Кроме того, автор растворял кристаллы в щелочи и осаждал белок из раствора нейтрализацией, пытаясь воспроизвести условия, которые действуют на кристаллы в кишечнике шелкоичных червей. Полученный токсин был сильно ядовит для восприимчивых

насекомых: ЛД<sub>50</sub> для шелковичного червя составляла 1 мкг/г массы гусеницы. Ангус обнаружил, что восприимчивость насекомого к токсину параспоральных включений зависит от концентрации щелочей в содержимом средней кишки. На влияние щелочности указывали и наблюдения Туманова и Ваго (1952). Они нашли, что голодавшие гусеницы (с повышенным рН кишечного сока) чувствительнее к токсину, чем те, которые поедали листья шелковицы. Чувствительность к токсину сильнее у насекомых с высоким уровнем щелочности кишечного сока — рН не ниже 9. По-видимому, сама по себе щелочная реакция кишечного сока — не единственное условие, необходимое для того, чтобы белок кристаллов стал токсичным. Ряд авторов стремились выяснить роль ферментативных процессов в средней кишке, при участии которых протоксин параспоральных включений превращается в активного агента кишечной интоксикации. Лекадэ и Мартуре (1962, 1965) выделили из рвотного содержания хилуса капустной белянки (из средней кишки) комплекс пищеварительных ферментов. Кристаллы были растворены этим препаратом и лизат очищен диализом. Токсичность диализата при скармливании и впрыскивании в кровь оказалась выше, чем у недиализованного материала или у кристаллов, растворенных в щелочи. Протеолитические ферменты капустной белянки и тутового шелкопряда состоят из двух протеаз с оптимумом действия рН 9,5—10,7; это соответствует реакции кишечного сока во время проявления гусеницами наибольшей чувствительности к токсину. Протеазы гусениц гидролизуют кристаллы и освобождают ряд растворимых белковых и пептидных соединений.

Интоксикация при естественной инфекции проявляется стремительно (Туманов, Ваго, Гладилин, 1954). Первый симптом поражения — прекращение питания, сопровождающееся затяжным или острым расстройством. При затяжном токсикозе, вслед за внезапным прекращением питания, повышается щелочность гемолимфы, понижается рН кишечного сока, возрастает проницаемость стенки средней кишки. Нарушение избирательной проницаемости неповрежденной стенки кишечника влечет за собой возникновение нейротропного поражения в форме приступа вялости, частичного, а затем и генерализованного паралича. Физиологические нарушения сопровождаются увеличением численности кишечных бактерий; в развитии болезни принимают участие вегетативные особи тюрингиензис после прорастания их спор в кишечнике. Клетки эпителия отмирают, бактерии проникают в кровь и течение болезни приобретает токсико-септический характер.

В острых случаях токсикоза гибель наступает раньше некротического разрушения стенки кишечника и проникновения бактерий в кровь. По наблюдениям Хеймпеля и Ангуса (1958), у шелковичного червя через 20—30 мин после заглатывания кристаллов варьета сотто наступает паралич средней кишки, а спустя 2 ч — общий паралич и гибель.

Развитие токсико-септических или остротоксических синдромов зависит от варьета бактерии тюрингиензис и от степени восприимчивости насекомого к факторам патогенности, обусловленной его

видовой принадлежностью. Так, при заражении вариантами сотто и алести гусениц капустной белянки, коконопряда и некоторых других бабочек, после начального симптома — прекращения питания последующие влияния — изменение реакции гемолимфы, частичный и общий паралич — не наблюдались; объясняли это более значительными буферными свойствами гемолимфы у этих насекомых. Эти варианты вызывают у них затяжной характер заболевания. Кристаллы не всех вариантов и не для всех видов насекомых одинаково токсичны. Основной продуцент ряда инсектицидных биопрепаратов — вариант тюрингиензис, для гусениц тутового шелкопряда мало токсичен или совсем непатогенен, в то время как варианты сотто и алести для них очень опасны.

Получение очищенного белка параспоральных включений — достаточно сложная и не всегда выполнимая задача. Анкус (1954) впервые выделил из спорующей культуры энтомоцидный белок кристаллов; болезнетворные свойства этого белка сохранялись в течение ряда лет. Хеймпель и Анкус (1958) убедились, что кристаллы варианта сотто, хранившиеся в темном месте при 3°С, оказались токсичными для шелковичных червей даже по истечении 10 лет. Белок кристаллов теряет токсичность в результате денатурации. Он термолabile и перестает быть токсичным при нагревании до 55°С в течение 15 минут. В то же время водная взвесь не обработанных щелочью интактных (не измененных) кристаллов способна сохранять токсичность после нагревания при 80°С в течение часа. Кристаллы не утрачивают инсектицидных свойств в результате облучения их ультрафиолетовыми лучами бактерицидной лампы в течение двухчасовой экспозиции (Кентвелл, 1967). Примерно такие же результаты получены при воздействии на кристаллы солнечных лучей (Африкян, 1973). Споры повреждаются от ультрафиолетового облучения легче, чем кристаллы. Последние менее стойки к воздействию химических веществ: для разрушения кристаллов щелочью нужно в несколько десятков раз меньшую концентрацию и во много раз меньшую экспозицию, чем для разрушения спор.

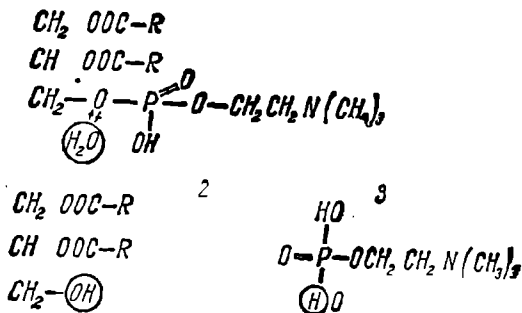
Среди интенсивно изучаемых энтомопатогенных организмов бактерия тюрингиензис привлекла к себе наибольшее внимание в качестве биологического инсектицида, высокая эффективность которого продемонстрирована на многих вредителях и в разных природных условиях. В промышленных препаратах чаще всего используют естественную смесь спор и кристаллов, значительно реже — препараты токсического белка. Каждой марке препарата соответствует в качестве продуцента определенный вариант бактерии тюрингиензис: энтобактерину (СССР) — вар. галлерия, турициду (США) — вар. берлинер и т. д. Широкое и не везде контролируемое с точки зрения интересов шелководства применение этих препаратов может представлять для выкормок шелкопряда достаточно серьезную опасность. Поэтому в Японии введены определенные ограничения на использование биопрепаратов в сельском хозяйстве.

Инсектицидное вещество параспоральных кристаллов чаще всего именуют эндотоксином (дельта-эндотоксин А. М. Хеймпеля, 1967).

Между тем, как уже отмечалось, кристаллы эти не являются таким компонентом цитоплазмы бактериальной клетки, который неразрывно связан с ней до момента ее разрушения. Они формируются в бактерии во время споруляции, прижизненно элиминируются (исключаются) из цитоплазмы, чтобы затем, вместе со спорами, оказаться во внешней среде. На этом основании параспоральные кристаллы следовало бы отнести не к эндо-, а к экзотоксинам.

**Лецитиназа бактерии тюрингиензис.** После того как в ряде исследований было показано, что токсин возбудителя газовой гангрены человека *Bac. perfringens* представляет собой лецитиназу С, этому ферменту было уделено особое внимание. Лецитиназа или фосфолипаза — фермент, катализирующий гидролитическое расщепление эфирных связей жирной и фосфорной кислот в лецитинах. В зависимости от того, на какую из четырех эфирных связей в молекуле лецитина направлено действие этого фермента, различают лецитиназы А, В, С, Д. Продукты, образующиеся при гидролизе лецитина — ди-глицериды и фосфохолин, не обладают токсическими свойствами. Болезнетворное свойство этого фермента патогенности связано с разрушением им незаменимых фосфолипидов в тканях поражаемого организма. Обеспечивая гидролитическое расщепление эфирных связей в молекулах фосфолипидов (лецитина) и высвобождая жирные кислоты, фермент лецитиназа С разрушает клеточные мембраны и нарушает связанные с ним процессы жизнедеятельности клеток.

Активность фермента устанавливают, высевая культуру исследуемой бактерии на мясо-пептонный агар, пропитанный эмульгированным желтком куриного яйца: под действием лецитиназы бактерий вокруг выросших колоний образуется просветленная зона с радужным ореолом. Лецитиназа С обнаружена во многих тканях животных, в змеином яде, в культурной жидкости многих бактерий, в том числе энтомопатогенных и не только спорообразующих (бацилл), но и таких известных возбудителей септицемии у насекомых, как чудесная (*B. prodigiosum*) и синегнойная (*B. aeruginosa*) бактерии. Туманов и Ваго (1951) выделили из гусениц тутового шелкопряда в качестве возбудителя фляшерии новый вариант бациллус тюрингиензис, которую в те годы еще не отличали от *Cereus* и потому они называли ее *Bac. cereus* var. *alesti*. Туманов (1955) показал, что фактором патогенности этой спорообразующей бактерии является фермент лецитиназа типа С (рис. 22); она оказалась очень токсичной при введении в гемолимфу шелковиных червей, но очень слабо токсичной при введении в кишечник. Затем Хеймпель и Ангус (1958) на основании результатов опытов пришли к выводу, что патогенность сотто-бациллы Ишиваты тоже связана с активностью этого фермента. Позже было установлено, что лецитиназа С, как любой другой метаболит, образуется в зависимости от индивидуальных особенностей штамма бактерии и, в известной степени, от условий его культивирования. Не все варианты тюрингиензиса характеризуются фосфолипазной активностью. Это послужило поводом к тому, что Хеймпель в классификации вариантов тюрингиензиса (1967) в качестве систематического признака учитывал токсинообразовательную способность. Он раз-



22. Фермент фосфолипаза С расщепляет в лецитине (1) эфирную связь жирной и фосфорной кислот: продукт гидролиза — диглицерид (2) и фосфорилхолин (3).

личал бактерии, образующие и необразующие альфа-экзотоксин (фосфолипазу С): к необразующим он отнес варианты галлериа, анагаста, энтомоцидус и субтоксикус (Хеймпель, 1965). По данным Э. Ф. Африкяна (1973), все штаммы кристаллофоров, отнесенных им к новому серотипу и варианту кавказикус, характеризуются четко выраженной фосфолипазной активностью. Выделенный в Узбекистане новый вариант тюрингиензиса — азиа-медиа слабо проявляет лецитиназную активность или вовсе ее не обнаруживает (Троицкая и др., 1972).

Лецитиназа С (фосфолипаза С) — термолabile фермент, с оптимальной для своего действия реакцией среды — рН 6,5—7,5. Хеймпель нашел, что фосфолипаза С, выделяемая бактериями — кристаллофорами губительна для многих насекомых, в частности для тех, у которых величина рН кишечного сока (7—8) близка к нейтральной. У шелкокрычных червей реакция содержимого средней кишки обычно более щелочная, однако фосфолипаза С может оказывать на них болезнетворное действие; при поступлении в кишечник в достаточном количестве она вызывает повреждение эпителиальных клеток и способствует проявлению некротической деятельности со стороны бактериальной флоры кишечника. Однако наибольшей результативности этот фермент патогенности достигает, по-видимому, в сочетании с токсином, вызванным кристаллами тюрингиензиса.

А. М. Хеймпель (1965) обнаружил в культуральной жидкости бактерии тюрингиензис шестого серотипа (субтоксикус и энтомоцидус) неидентифицированный фермент патогенности, вызывающий осветление желточного агара, который он обозначил как гамма-экзотоксин. Позже им был найден лабильный экзотоксин в образцах турицида — фирменного препарата, изготовленного на основе варианта берлинер (вар. тюрингиензис), производимого промышленностью США (1966). Экстрагированный водой, он был токсичен для личинок пилыщика. Анализ показал присутствие в его составе свободных амино-

кислот и гептидов; какие именно из них оказывали болезнетворное и летальное действие на подопытных насекомых, установить не удалось. Не выяснено также, не было ли артефактом экстрагированное вещество, оказавшееся губительным для насекомых, и не образовалось ли оно в процессе ферментации при производстве препарата турицида.

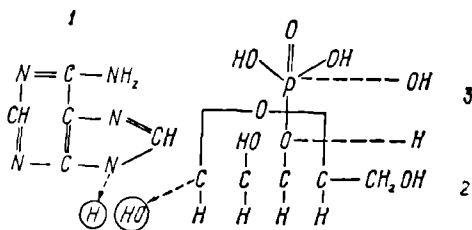
**Термостабильный токсин бактерии тюрингиензис.** Мак-Коффели и Ричардс (1959) установили, что фильтрат автоклавированной культуры сорта берлинер содержит устойчивый к нагреванию токсин, губительный не только для личинок мясной мухи, но и для других насекомых. Он получил название мушиного или термостабильного токсина. Бюржерон и де Баржак (1960) нашли, что для накопления термостабильного токсина пригодны обычные бактериологические среды; обнаруживается он начиная с восьмого часа культивирования бактерий при 30°С и количество его возрастает в течение логарифмической (наиболее активной) фазы роста бактерий, достигая максимальной концентрации в культуральной жидкости через сутки — перед началом образования спор и кристаллов. Этот экзотоксин растворим в воде и культуральной жидкости и выдерживает при автоклавировании температуру 120°С в течение 10 мин. Видовой спектр действия термостабильного токсина насекомых шире, чем токсина параспоральных кристаллов. Он патогенен для представителей отрядов двукрылых, чешуекрылых, перепончатокрылых, жуков, прыгающих прямокрылых и тараканов. Сведения о способности сортов бактерии тюрингиензис образовывать термостабильный токсин часто противоречивы; известно, что обнаружен он не у всех серотипов. Хеймгель, например, помимо сорта берлинер, у которого термостабильный токсин был выявлен рядом авторов, называет в качестве его продуцента сорт галлера и аицава; у шестого серотипа этого токсина нет, а сорта сотто и алести в этом плане им вообще не рассматриваются. В. Ф. Рудюк (1967) предполагал, что способность образовывать термостабильный токсин — признак, присущий не столько сорту, сколько штамму.

М. В. Мод-Соллех с соавторами (1980) поставили перед собой задачу внести ясность в разноречивые сведения относительно зависимости инсектицидных свойств экзотоксина бактерии тюрингиензис от сортовой принадлежности продуцента, и от субстрата для его размножения, а применительно к условиям культивирования — от состава среды ферментации. Сравнивались четыре штамма: сор. берлинер ХД-27, сор. берлинер ХД-41, сор. толворти ХД-125, сор. дармстадиензис ХД-199; бактерии культивировались на шести средах; для выявления термостабильного экзотоксина и отделения его от термостабильных факторов патогенности штаммов супернатант культуральной жидкости автоклавировали при 125°С в течение 15 или 30 мин. Инсектицидная активность экзотоксина испытывалась на классическом объекте для него — личинках домашней мухи и на гусеницах совки ипсилон. Оказалось, что экзотоксин разных сортов не равнозначен по своей активности для разных насекомых: экзотоксин сор. берлинер ХД-41 поражал личинок мух на 100%, а гусениц совки — на 51%;

на той же среде ферментации экзотоксин толворти поражал личинок мух на 63,7% и был полностью не активен в отношении совки. Все четыре штамма продуцировали экзотоксин, но его токсичность была различной и зависела от штамма бактерии. Автоклавировав супернатанты сортов в течение 15 и 30 мин и испытывая экзотоксин на менее стойких и более стойких совках, авторам, по их мнению, удалось показать наличие разных экзотоксинов. Под влиянием автоклавирования токсичность супернатанта некоторых сортов снижалась и только берлинер ХД-27, в отличие от других штаммов этого же сорта, продуцировал полноценный термостабильный экзотоксин, выдерживавший прогрев в течение 30 мин и высоко активный для мух и совки.

Де Баржак и Дедондер (1965) из супернатанта культуры сорта берлинер выделили нуклеотид, который воспроизводил у насекомых токсическое поражение, подобное действию автоклавированного супернатанта той же культуры. Спектрофотометрический анализ состава нуклеотида показал наличие у него аденина, рибозы и фосфорозы в соотношении, близком к 1:1:1, что соответствовало строению аденозинмонофосфата.

Мононуклеотид, или собственно нуклеотид (аденозин-3-монофосфат), — фосфорный эфир природных гликозидов; образован одной молекулой аденина — азотистого основания 6-амино-пурина, моносахарида альфа-рибозы и ортофосфорной кислоты. Аденин и сахар представлены в нуклеотиде в виде N-гликозида аденозина (рис. 23).



23. Аденозин-3-монофосфат образован одной молекулой аденина (1), моносахаридом альфа-рибозы (2) и ортофосфорной кислоты (3).

Несмотря на некоторое несовпадение собственных результатов анализа с данными, полученными другими исследователями, Хеймпель (1967) считал, что именно аденозинмонофосфат может оказаться термостабильным токсином бактерии тюрингиензис, так как действие его проявляется на более широком видовом составе насекомых, чем токсина параспоральных кристаллов, хотя токсичность его слабее, чем кристаллов в несколько десятков раз. В отличие от кристаллического токсина термостабильный действует медленно: он вызывает у гусениц капустной совки потерю аппетита только по истечении первых четырех суток после его заглатывания, а гибель — на десятый день. Гусеницы большой восковой моли погибают после инъекции в общую полость



на шестой день, а при скармливании токсина — на 14-й (Ванкова, 1966). В качестве нуклеотида термостабильный токсин способен, по видимому нарушать функции АТФ в дыхательном обмене поражаемого насекомого.

По мнению Лысенко и Кучера (1975), термостабильный токсин не является токсином в точном понимании природы этого фактора патогенеза. Термостабильный токсин не белок и его высокая термостабильность не соответствует свойствам протеинов. У него низкая молекулярная масса: по данным трех разных экспериментаторов — в пределах 707—805. Экзотоксин неспособен кристаллизоваться и это исключает возможность воспользоваться рентгеноструктурным анализом. Термостабильный экзотоксин, представляющий собой мелкие, воднорастворимые и легко диализируемые молекулы, выделяемые в окружающую среду бактерий, правильнее было бы считать метаболитом, встречающимся у тюрингиензиса с функцией фактора патогенности.

Токсин параспоральных включений и термостабильный токсин у тех штаммов, где последний обнаружен, способны проявлять синергизм. Присутствие термостабильного экзотоксина можно установить не только биологической пробой отфильтрованного и автоклавированного супернатанта (надосадочная часть жидкости) на чувствительном насекомом (обычно, на личинках мух), но и спектрофотометрически, как это было показано де Баржак и др., а позже — И. А. Строевой (1972).

Токсин вызывает к себе большой интерес как возможное биологическое средство борьбы с москитами, комарами, мухами; с последними прежде всего — на скотных дворах. Обширные данные свидетельствуют о том, что споры выдерживают пассаж через кишечник мелких млекопитающих, крупного рогатого скота и птиц. Бактерии из прошедших через кишечный тракт спор размножаются в навозе, в котором накапливается мушиный токсин. Эта особенность спор бактерий и ее токсина представляет собой эпизоотологическую опасность для выкормок тутового шелкопряда, размещенных вблизи от скотных дворов или в освобожденных под выкормку конюшнях, если они были загрязнены мушиным токсином.

## 2.5. Чахлость (стрептококковый энтерит шелковичных червей)

**Симптомы и течение болезни.** Болезнь шелковичных червей — чахлость была известна шелководам задолго до наступления эпохи микробиологических открытий. Ее внешнее проявление в основных чертах отражено в самом названии. Заболевание чаще всего обнаруживается в середине личиночного периода жизни шелкопряда. Для нее характерно медленное развитие и связанное с этим прогрессирующее истощение. Больные гусеницы мало едят, отстают в росте. Их кожа становится дряблой, покрывается морщинами, приобретает бурый оттенок (рис. 24).



А. А. Тихомиров (1850 — 1932); описание болезни шелкопряда в его капитальной «Основах практического шелководства» (1-е изд., 1894; последнее, 3-е — 1914) стало трафаретом для последующих авторов.

Ряд симптомов чахлости вызывается поражением кишечника. Вследствие расстройства секреторной деятельности кишечника во всех типичных случаях заболевания наблюдается понос. Ослабленные болезнью гусеницы не могут слить. В результате возникает ряд клинических форм чахлости, которые западноевропейские шелководы обозначали как люцет, клярет, гаттина, светлоголовость, светлая немочь и др. (Тихомиров, 1914).

Часть больных гусениц успевает завить коконы и даже превратиться в куколок и бабочек. Для выкормки, пораженной чахлостью, характерен брак—недовитые коконы с тонкой легко деформируемой оболочкой, чаще всего содержащие мертвую высохшую гусеницу, не успевшую разложиться и выпачкать стенку кокона. Подобное со-

стояние трупа может быть вызвано не только чахлостью, но и мускардиной в Средней Азии, где мускардина поражает единичных гусениц и встречается редко, по наличию таких коконов в партии можно с большой долей уверенности сказать, что выкормка болеет чахлостью. Встречаются также очень мелкие, карликовые коконы, из-за сокращения количества возрастных линек и длительности личиночного периода, поэтому гусеницы к началу завивки коконов оказываются значительно мельче нормальных. Происходит это в результате повреждения системы нейрогормональной регуляции развития тутового шелкопряда метаболитами стрептококков, размножившихся в кишечнике больной гусеницы.

**Стрептококки шелкопряда.** В числе бактерий, обнаруженных Л. Пастером в кишечнике больных шелковичных червей, а также у куколок и бабочек, были, по его словам, «ферменты в цепочке из зерен» (*ferment en chapelets de grain*), которых он видел прежде, изучая болезни вина (рис. 25). Впервые мелких сферических бактерий, образующих цепочки, наблюдал в инфицированных тканях человека Бильрот (1874). Ф. Кон (1872) предложил для сферических бактерий название микрококки, а у Розенбаха (1884) микрококки, образующие



24. Гусеница, пораженная стрептококковым энтеритом.

цепочки, образующие

цепочки, получили родовое название стрептококки. Стрептококков шелкопряда сначала называли *Micrococcus bombycis* Cohn (1872), а затем переименовали в *Streptococcus bombycis* [Pasteur] Flugge (1886).

Стрептококк шелкопряда не растворяет красных кровяных шариков; он близок к молочнокислым стрептококкам и отнесен к энтерококкам (Штейнхауз, 1946) — видам, объединенным по экологическому признаку в группу постоянных обитателей открытых полостей животных. От гемолитического, зеленеющего и молочнокислого стрептококков он дифференцируется по схеме Шермана: по результатам испытания на термостойкость, устойчивость к щелочной реакции, к присутствию желчи и др. Чтобы отличить от остальных негемолизирующих стрептококков, его высевают на желчь-лактоза-лакмусовый бульон; в отличие от них он не растворяется желчью и сбраживает лактозу с образованием кислоты. На основании антигенных различий все негемолитические стрептококки — сапрофиты кишечного тракта и верхних дыхательных путей теплокровных, а также стрептококки шелкопряда, относятся к серологической Д-группе.

Принято считать *Str. bombycis* синонимом *Str. faecalis* (Андревс и Хордер, 1906) — одного из четырех видов энтерококков, отличающегося от остальных способностью расти на глицерине. Выкормки тутового шелкопряда заражаются в основном этим стрептококком (Лисенко, 1958). Энтерококки шелкопряда образуют короткие цепи или представлены более характерными для них ланцетовидными (овальными) диплококками (рис. 26).

Постоянные носители энтерококка — человек и сельскохозяйственные животные. Помимо этих источников, бактерий на выкормку шелколичных червей переносят враги — птицы, насекомые, особенно часто — мухи. Наиболее часто энтерококков на выкормку заносят неопрятные люди, ухаживающие за гусеницами шелкопряда. Многократно установленная загрязненность рук червокормилщиц фекальными энтерококками свидетельствует о настоятельной необходимости тщательного мытья рук во время ухода за выкормкой



25. Стрептококки из кишечника шелколичных червей (из книги Л. Пастера, 1870).



26. Энтерококки шелкопряда.

(Саипов, 1973). Множество источников для заражения выкормок этими бактериями сказывается на разнообразии их культурально-физиологических характеристик, а также болезнетворности для тутового шелкопряда; даже достаточно типичные штаммы *Str. faecalis* варьируют по своей вирулентности и токсичности. Э. К. Африкян (1973) также отмечает, что у тутового шелкопряда наиболее широко и обильно распространены энтерококки и что стрептококки шелкопряда весьма разнообразны в систематическом отношении. Патогенными для шелкопряда оказываются также реже встречающиеся у гусениц пчелиные стрептококки *Str. apis* (Маассен, 1906); в отличие от *Str. bombycis* этот стрептококк разжижает желатину и потому его некоторые рассматривали как синоним *Str. liquefaciens* Sternberg (1893).

**Реакция организма гусениц на стрептококковую инфекцию.** А. Пастер не оставившись на роли стрептококков в возникновении фляшерии, а чахлость, по его мнению, была лишь одним из симптоматических проявлений фляшерии. Джиорджи и Фалерони (1904), преодолевая унитаризм в представлениях Пастера, одними из первых предположили, что фляшерия и чахлость имеют различное происхождение. Чахлость вызывается стрептококками шелкопряда, которые развиваются в кишечнике и вызывают понос, а фляшерия — бациллами, поражающими кровь и проникающими в нее, по их заключению, «неустановленным путем, но, видимо, не через кишечник». Аналогичную точку зрения на роль стрептококков высказал А. Пайо (1928): «Основным заболеванием является дизентерия стрептококкового происхождения, внешняя картина которого соответствует гаттине; фляшерия является лишь формой этого заболевания, осложненной размножением в кишечнике бацилл, вследствие чего гусеницы заживо разлагаются». Изучалась возможность фаготипирования штаммов стрептококков шелкопряда и результаты введения фага гусеницам (Хонда, 1932).

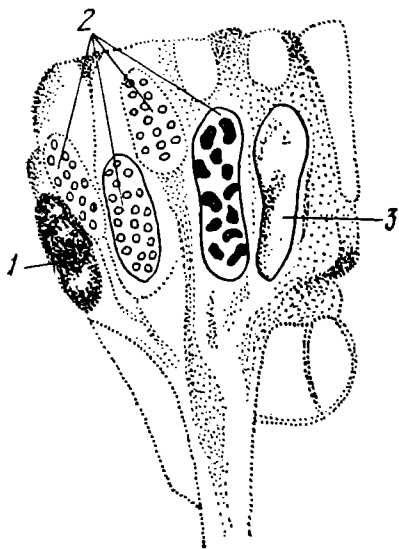
Предпочтительное отношение к стрептококкам в качестве предполагаемых возбудителей бактериозов объясняется отчасти тем, что при микроскопировании больных гусениц зачастую наблюдалась почти чистая культура стрептококков. Стрептококки более устойчивы к бактерицидному и бактериостатическому действию кишечного сока и способны переносить более высокую щелочность, чем многие другие бактерии. Этот признак соответствует одному из критериев Шермана, на основе которого энтерококки отличаются от остальных стрептококков — рост на питательной среде при pH 9,6 (Калина, 1964). По этой же причине в средней кишке голодающих гусениц, у которых щелочность кишечного сока повышена, энтерококки размножаются интенсивнее, чем остальные бактерии местной флоры (Курису, Матсумото, Иное, 1975).

Попытки экспериментально воспроизвести чахлость, заражая гусениц стрептококками с помощью укола или впрыскивания культуры в общую полость, продемонстрировали способность тканей шелкопряда к упорной защите. Через двое суток после заражения при микроскопировании окрашенных мазков гемолимфы наблюдается энергичный

фагоцитоз стрептококков гемоцитами. Через трое суток в гемолимфе число стрептококков резко уменьшается; вместе с тем в гемоцитах встречаются включения, представляющие собой внутриклеточное скопление полупереваренной массы стрептококков. Попадают также гемоциты на разных стадиях разрушения как неизбежный итог фагоцитарной деятельности. На третьи сутки после заражения гусениц стрептококки наблюдаются на поверхности перикардальных клеток в виде скоплений, напоминающих хлопья склеенных бактерий в реакциях агглютинации. Эта гуморальная защитная реакция отмечается только на поверхности этих клеток, так как насекомые находятся на том филогенетическом этапе развития, когда средства гуморального иммунитета (лизины, агглютенины) вырабатываются еще недостаточно обильно, чтобы защитить все пространство, омываемое кровяным током.

**Патогенез чахлости.** Опыты Сартирана и Пакканаро (1905) впервые выяснили степень доступности различных ворот инфекции у гусениц тутового шелкопряда для стрептококков; при спавании неразведенной бульонной культуры, из 50 зараженных гусениц погибло с признаками кишечного поражения только 10, а при инъекции той же культуры — 48 гусениц. Г. Чигасаки (1924) установил, что при впрыскивании в гемолимфу гусеницы бульонной культуры стрептококка, разведенной в 50 раз, присутствие стрептококка в гемолимфе не обнаруживается в течение первых суток не только микроскопически, но и культурально, после высева на питательные среды. Через двое суток их можно обнаружить, но на третий-четвертый день количество стрептококков внезапно начинает уменьшаться и гусеницы выздоравливают. По мнению А. Пайо (1926), заражение гусениц стрептококками, введенными непосредственно в гемолимфу, не вызывает септицемии. Этим они отличаются от подавляющего большинства патогенных для шелкопряда палочковидных бактерий.

Изучение экспериментальной чахлости позволило выявить избирательный характер поражения стрептококками клеток эпителия средней кишки. Это наиболее существенное явление в патогенезе чахлости. При искусственно вызванном заболевании в отличие от естественной чахлости болезнетворная деятельность бактерий начинается не в кишечном тракте, а со стороны общей полости, куда они были впрыснуты. По наблюдениям А. Пайо (1930), стрептококки, избежав фагоцитоза, мигрируют из общей полости и вначале появляются возле продольных мышечных волокон средней кишки. Сосредоточившись здесь, они затем проникают через внутренний слой кольцевых мышц кишечника и приходят в соприкосновение с эпителиальными клетками средней кишки. Пройдя по межклеточным пространствам эпителия, они оказываются в кишечном просвете и рассеиваются между эпителием и перитрофической мембраной. Размножаясь, стрептококки образуют здесь длинные цепочки, которые частично встречаются и в межклеточных пространствах. Одновременно в ядрах эпителиальных клеток заднего участка средней кишки возникают цитологические изменения, аналогичные тем, которые наблюдаются при естественной чахлости (рис. 27).



27. Эпителий средней кишки шелко-  
вичного червя, пораженного стрепто-  
кокковым энтеритом (по А. Пайо,  
1927):

1 — нормальное ядро клетки; 2 — цитопати-  
ческие изменения в ядре под влиянием ток-  
синов стрептококков; 3 — мертвое ядро.

В основе специфического по-  
ражения клеток эпителия стрепто-  
кокками лежит аффинитет, сред-  
ство, выражающееся в способности  
клеток и тканей избирательно  
поглощать продукты метаболизма  
определенного вида бактерий, в  
том числе токсины; последние яв-  
ляются у стрептококков эндоток-  
синами, освобождающимися при  
отмирании и разрушении бактерий.  
По полученным нами данным, куль-  
тура стрептококка шелкопряда,  
убитая нагреванием при  $65^{\circ}\text{C}$ ,  
спустя два часа после впрыскива-  
ния ее фильтрата здоровым гусени-  
цам вызывала понос и несколько  
позже — гибель.

Если гусениц заразить музей-  
ной культурой через рот, заболе-  
вание возникает в ничтожном числе  
случаев и только при больших  
дозах. Несколько легче заразить  
культурой, пассированной через  
восприимчивых гусениц. Если же  
накормить здоровых гусениц стреп-  
тококками, взятыми непосредст-  
венно из кишечника шелкопряда,

пораженного чахлостью, значительная часть их заболевает. А. Пайо  
приписал результаты этих опытов накоплению в кишечнике больных  
чахлостью гусениц токсического продукта; позже он высказал предпо-  
ложение, что при естественном заражении стрептококками, чахлость  
возникает в результате ассоциации их с неким патогенным вирусом.

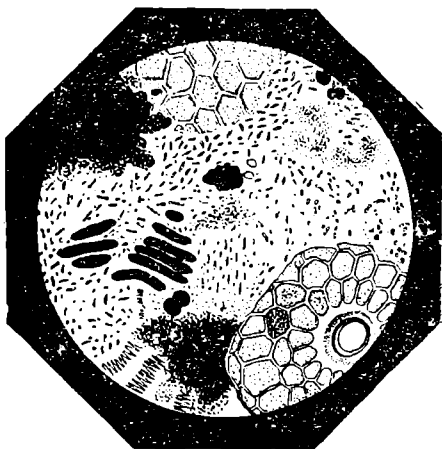
Явление интоксикации, вызванной стрептококком шелкопряда,  
не носит острого характера, на что указывает хроническое течение  
чахлости и способность больных гусениц дожить до метаморфоза.  
В процессе метаморфоза микроорганизмы разрушаются в лизируемых  
личиночных тканях, но возможны исключения. И. И. Мечников  
(1915) находил стрептококков в кишечнике бабочек, если смерть их  
была преждевременной и сопровождалась судорожными движениями  
конечностей. По его мнению, смерть инфицированных стрептококками  
бабочек была неестественной и наступала в результате бактериальной  
интоксикации. Кишечник же и ткани тех бабочек, жизнь которых  
угасала естественным порядком, были стерильными. Л. Пастер в ки-  
шечнике куколки наблюдал стрептококков, унаследованных от шел-  
ковичного червя, пораженного этими бактериями (рис. 28).

Шелководы давно заметили, что неравномерно развивающаяся  
выкормка шелколичных червей является подготовительным плацдар-  
мом для появления так называемых отсталых гусениц. Они оказы-

ваются в худших условиях питания, так как, замешкавшись в толще подстилки, не успевают при очередных дачах листа переходить на свежий корм вместе с нормально питающимися и развивающимися гусеницами. У оставших в развитии гусениц с ослабленными функциями организма в кишечнике значительно чаще обнаруживаются стрептококки. Поскольку размножение энтерококков не сдерживается щелочной реакцией в кишечнике гусениц, Утсуми и Нисимура (1982) приписали эту функцию «антистрептококковому протеину», выделенному ими из кишечного сока гусениц, активного только по отношению этой группе бактерий. Небольшое снижение активности этого протеина в неблагоприятных условиях содержания гусениц позволяет размножиться энтерококкам, снизить рН кишечного сока, создать условия для размножения остальных бактерий и вызвать заболевание.

Африкян (1973), наблюдал при обильном размножении в кишечнике гусениц скормленных им аукогетеротрофных бактерий (неспособных синтезировать нужные им вещества), значительное снижение в организме шелкопряда необходимых ему витаминов и аминокислот, которых он точно так же не в состоянии синтезировать самостоятельно. Трехкратное скармливание в трех последних возрастах гусениц тиаминзависимого штамма энтерококка снизило массу коконов до 0,5—0,7 г против 0,9—1,0 в контроле и увеличило смертность гусениц на 20%. Стрептококки не только отнимают у гусениц питательные вещества в пищеварительном тракте, но, как показали Нагае и Сузуки (1982), усиливают вирулентность. Слабопатогенный фекальный стрептококк стал более вирулентным при обогащении пищи гусениц витаминами группы В — никотиновой ( $B_{pp}$ ), фолиевой ( $B_c$ ) кислотами или биотином ( $B_w$ ). Наибольшую смертность вызвала добавка к корму никотиновой кислоты — 70% против 10% в контроле. Остальные витамины группы В не усилили вирулентность стрептококка.

Адаптированность энтерококков к условиям пищеварительного тракта высокая, поэтому для успешного размножения их достаточно незначительного отклонения у секреторной функции средней кишки, более вялая перистальтика, замедляющая эвакуационную деятельность кишечника. Скопление стрептококков подготавливает такую степень воздействия их метаболитов на эпителиальные клетки среднего отдела кишечника, что этого оказывается вполне достаточно для раз-



28. Стрептококки в кишечнике куколки (из книги Л. Пастера, 1870).

вития стойкого и необратимого патологического изменения в кишечнике, месте наименьшего сопротивления.

Воспалительное заболевание желудка и тонких кишок медики называют гастроэнтеритом, синдром которого формируется чаще всего в результате первичного поражения желудка бактериями и токсинами. У шелковичного червя чахлость, сопровождающаяся поражением эпителиа средней кишки (выполняющую пищеварительную функцию желудка, а анатомически являющуюся частью кишечного тракта), правильнее было бы назвать гастроэнтеритом тутового шелкопряда стрептококкового происхождения или просто стрептококковым энтеритом; это определение характеризует природу заболевания, название же чахлость указывает только на один из симптомов ее внешнего проявления.

## 2.6. Диагностика бактериозов

**Принципы дифференциальной диагностики.** Легче всего отличить по внешним признакам чахлость; значительно труднее это сделать относительно септицемии и кишечного бациллярного токсикоza, прежде всего потому, что септицемия может быть первичным явлением и представлять собой самостоятельное заболевание, но может оказаться и вторичным явлением — финалом в процессе развития кишечного бациллярного токсикоza, когда гусеницы в начале инфекции не были убиты токсином (Рогоф, Юстен, 1969).

Даже при большом опыте и знаниях визуальный диагноз всегда остается провизорным (предварительным). Окончательный и исчерпывающий ответ может дать только лабораторное исследование. Ему предшествует сбор и доставка свежего материала для исследования. Наиболее достоверный материал для диагноза бактериозов — гусеницы с четкими признаками болезни, но не агонизирующие. Исследование же трупов, даже с начальными признаками разложения, может ввести в заблуждение относительно вида заболевания и состава возбудителей.

Первый вопрос при дифференциальной диагностике бактериозов: где первоначально сосредоточились и стали размножаться бактерии — в средней кишке или гемолимфе? Ответ может быть получен микроскопированием с помощью иммерсионного объектива окрашенных мазков из содержимого кишечника и гемолимфы. Мазки целесообразно окрашивать по Граму, так как, помимо количества бактерий, степени однородности их состава, морфологической характеристики, станет известен еще один систематический признак; окраска по Граму основана на том, что в теле некоторых бактерий — стрептококков, стафилококков, бацилл — прочно удерживаются красители трифенилметановой группы: генцианвиолет, метилвиолет, кристаллвиолет. Окрашенные этими красителями микробы, после обработки йодом, не обесцвечиваются спиртом и при последующей окраске фуксином (красной краской) сохраняют фиолетовый цвет. Такие бактерии называют красящимися по Граму или грамположительными, в отличие от не красящихся по Граму или грамотрицательных, которые обесцвечи-



ваются спиртом, после чего окрашиваются фуксинсм в красный цвет (большинство палочковидных бактерий, не образующих споры).

В начальной стадии заболевания — а ранняя диагностика имеет ряд преимуществ — бактерий не всегда удастся выявить посредством микроскопического исследования; приходится высевать их на питательные среды непосредственно на агар в чашки Петри. Этот прием позволяет быстрее получить первичную информацию о численности и составе бактерий (особенно в гемолимфе, где их в начале заболевания — считанное количество).

Данные относительно внешней характеристики бактерий, их однородности и первичной локализации у заболевшей гусеницы могут быть основанием для предварительного диагноза бактериоза. Однако чтобы судить об источнике болезни, необходимо установить видовую принадлежность возбудителя. Для этого выделяют чистую культуру из изолированной колонии, выросшей на чашке Петри, и высевают на диагностические питательные среды. Ответ может быть более быстрым и точным, если идентифицировать (отождествить) выделенных бактерий с заведомо известными музейными культурами с помощью серологических реакций.

**Изучение состава возбудителей бактериозов в эндемических очагах.** Для чего необходимо определять вид или сорт (иногда — штамм) бактерий? В производственной практике, не говоря уже об исследовательской работе, очень часто возникает необходимость ответить на такие вопросы: являются ли сопоставляемые заболевания одинаковыми или разными по составу возбудителей, тождественны ли по своему происхождению эпизоотии бактериозов в соседствующих очагах? Можно ли предположить связь между заболеванием выкормков и эпизоотией, обнаруженной у насекомых в ближайших сельскохозяйственных угодьях? Сопоставляя видовой состав возбудителей заболеваний на выкормках прошлого и настоящего сезонов, можно судить об эффективности мер по ликвидации заразного начала, оставшегося после предыдущей эпизоотии.

Изучение состава возбудителей бактериозов необходимо для выявления местных эндемических (в отношении шелкопряда точнее — энзоотических) очагов в зонах традиционного червокормления.

Заслуживает внимания опыт Среднеазиатского научно-исследовательского института шелководства (САНИИШ) по изучению локализации бактериальных эпизоотий в республике, повторяемости их по годам, с использованием лабораторных методов дифференциальной диагностики и определения видового состава возбудителей. Работа проводилась в 30-е годы, в широких масштабах в течение ряда лет, в наиболее неблагоприятных в этом отношении районах. Перед началом выкормочного сезона сотрудники института направляли в отдаленные районы специальные посылки для сбора материала. В них был полный набор предметов и реактивов для приготовления и фиксации мазков из гемолимфы и содержимого средней кишки больных гусениц; чашки Петри с мясо-пептиным агаром, иллюстрированные инструкции о порядке и технике выполнения всех операций. Посылки предназначались агрономам для разового сбора материала и от-

правки его без задержки в институт. В свое время, благодаря этим посылкам, был собран достоверный и потому особо ценный материал, выявлены и охарактеризованы очаги поражения выкормок в различных районах республики, оказана существенная помощь производству в борьбе с болезнями. В наши дни, при более надежной телефонной связи и развитой сети авиалиний, такой способ сбора свежего инфекционного материала в отдаленных районах для лабораторных исследований стал более доступным.

Определение видового состава бактериальной флоры больных гусениц можно ускорить, сочетая сбор материала с начальной фазой подготовки его к анализу. Вместо выделения из гусениц чистых культур бактерий и определения их систематического положения высевом на диагностические питательные среды рекомендован следующий экспресс-метод: посев из больных гусениц (гемолимфа, кишечник) производят на агаризованную питательную среду, непосредственно в чашки Петри; одновременно исследуют под микроскопом окрашенные по Граму мазки из того же материала. По виду колоний на чашках и их микроскопическому исследованию намечают группу бактерий, представляющих интерес для диагноза заболевания, а видовую и вариететную их принадлежность определяют с помощью серологических реакций. Для этого запасаются видоспецифическими антисыворотками к наиболее распространенным возбудителям бактериозов, а для диагностики вариететов бактерии тюрингензис — преципитирующими моносыворотками к ним.

В особых случаях диагностики, когда приходится проверять предполагаемые возбудители эпизоотии на болезнетворную способность, ставят биологические пробы: гусениц искусственно заражают через рот и инъекцией в гемолимфу серией дозировок бактериальной суспензии и определяют для подопытной партии ЛД<sub>50</sub>, для каждого способа заражения в отдельности.

**Серологическая диагностика.** В перечне средств и методов выявления возбудителей болезней и определении их систематической принадлежности исключительное место занимает серодиагностика. Она позволяет установить присутствие тех или иных видов (вариететов, штаммов) в составе естественной микрофлоры, не выделяя их для этого в чистые культуры, и следовательно, гораздо быстрее и очень точно решать главный вопрос диагноза, минуя систему множества трафаретных операций, из которых состоят традиционные культурально-биохимические исследования бактерий. Кроме того, серологические методы исследования способны сообщать существенные дополнительные характеристики бактерий. В современной серодиагностике наиболее распространены следующие методы, основанные на реакциях агглютинации и преципитации.

*Реакция агглютинации бактерий на предметном стекле.* К капле суспензии бактерий добавляют каплю антисыворотки к какому-нибудь определенному виду бактерий; смешивают и устанавливают идентичность исследуемых бактерий с антисывороткой по наличию хлопьевидного осадка (рис. 29). Метод этот используют для ориентировочного исследования, он может быть применен для быстрого установле-

ния вида бактерий в изолированных колониях, выросших на чашках Петри или же выделенных в чистые культуры.

**Реакция агглютинации бактерий в пробирках.** В серию агглютинационных пробирок наливают антисыворотку (например, полученную к *H*-антигену, т. е. антигену жгутиков бактерий), разведенную в разной степени — от 1 : 10 до 1 : 10 000 (точнее, 1 : 10 240). Затем в эту

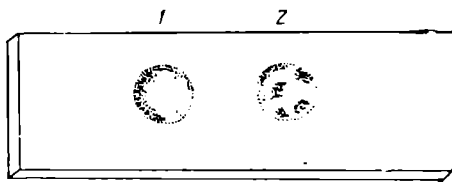
сыворотку прибавляют две-три капли бактериальной суспензии. Степень разведения, при которой еще происходит агглютинация, позволяет судить о степени гомологичности, соответствия друг другу антигена антителу, т. е. близости гамма-глобулинов бактерий, участвующих в реакции, и бактерий, использованных для приготовления сыворотки (рис. 30).

Еще более обильную информацию дают серологические методы, основанные на реакциях *преципитации*, в которой участвует масса антигена разрушенной бактериальной клетки (O — антиген или соматический антиген). Этот преципитиноген используют для получения преципитирующей антисыворотки, иммунизируя им животных; он же участвует в реакциях преципитации (образования осадка) в качестве антигена, точнее — преципитиногена бактерии, исследуемой на видовую принадлежность.

Реакция *кольцепреципитации* — высокочувствительный вариант использования в серодиагностике преципитиногена; сущность метода состоит в том, что антисыворотку помещают в узкую пробирку или капилляр и поверх нее осторожно наносят преципитиноген испытуемой бактерии; диффундируя навстречу друг другу антисыворотка и преципитиноген образуют на границе их встречи пристеночное кольцо преципитата в виде узкой опалесцирующей зоны помутнения.

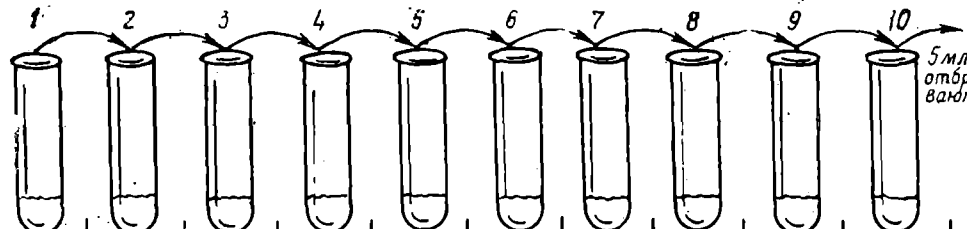
**Определение серотипа бактерии тюрингиенсис.** Наибольшее применение в подобном анализе нашли различные модификации реакции преципитации антигена в геле (Чарный, 1979). Шире других распространен метод двумерной (двойной) диффузии в геле по Оухтерлони (1948) и иммуноэлектрофорез. Представление об этих методах можно получить на примере диагностики вариантов бактерий тюрингиенсис в модификации, разработанной Г. А. Плужниковым (1974).

**Приготовление соматического O-антигена из вариантов бактерии тюрингиенсис для получения преципитирующих сывороток.** В жидкую питательную среду Акоевой (Акоева, 1967) засевают четырехсуточную культуру бактерий и выращивают их на круговой качалке при 30 °С в течение 16 ч. Суспензию бактерий центрифугируют, осадок суспензируют вновь в физиологическом растворе, бактериальные клетки разрушают на ультразвуковом дезинтеграторе (рис. 31) с частотой 18 кГц в течение 16 ч. Затем для завершения экстрагирования



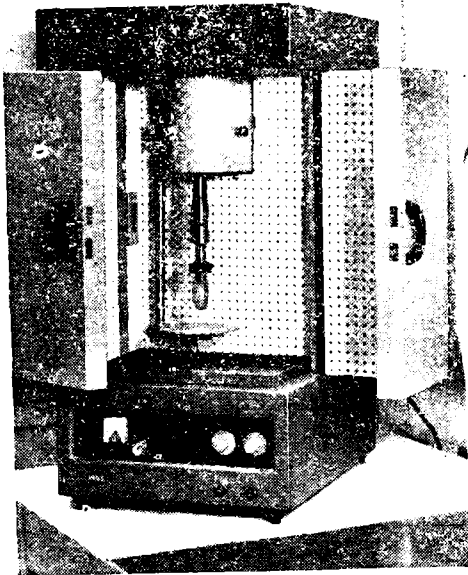
29. Агглютинация бактерий с сывороткой иммунизированного кролика на предметном стекле:

1 — реакции нет; 2 — хлопья склеенных бактерий.

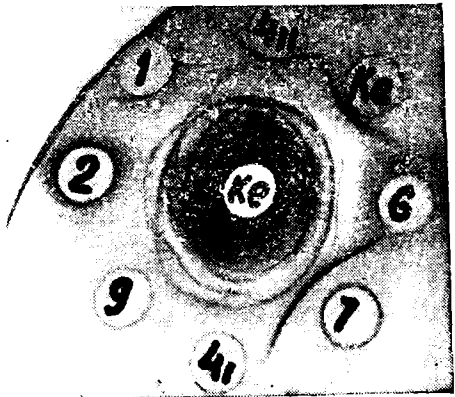


Физиологический раствор, мл	8	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Сыворотка, мл	2	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
Разведение после переноса сыворотки	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:280	1:2560
Суспензия клеток, мл	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Общий объем, мл	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Конечное разведение сыворотки, мл	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120

30. Последовательное разведение сыворотки для выяснения предельного титра, способного дать реакцию агглютинации.



31. Ультразвуковой дезинтегратор для приготовления преципитиногена (раздробленных ультразвуком бактерий).



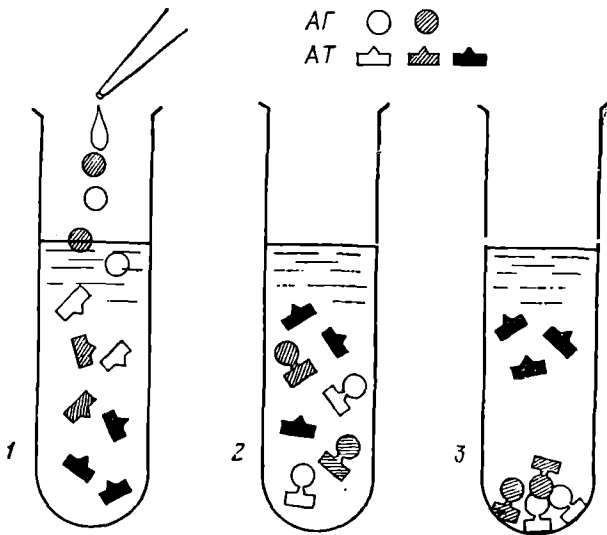
32. Реакция групповых антител в нативной антисыворотке к варианту кенна (в центре) с групповыми антигенами (по периферии) вариантов:

1 — берлинер; 2 — финитимус; 4<sub>1</sub> — дендролимус; 4<sub>11</sub> — согто; 6 — субтоксинус; 7 — аицава; 9 — толворти.

по ампулам и хранят при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

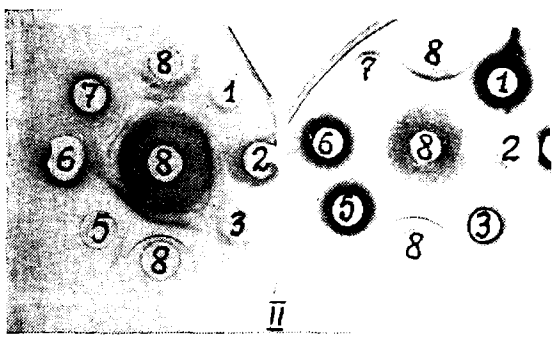
*Получение преципитирующей антисыворотки к бактерии тюрингиензис.* Цикл иммунизации кролика состоит из четырех инъекций по 0,5 мл антигена с интервалом в три дня; первая инъекция — под кожу, остальные — в ушную вену. После двухмесячного перерыва кроликов реиммунизируют: антиген вводят в ушную вену в возрастающих дозах от 0,1 до 0,5 мл, тремя инъекциями с интервалом в три дня. Через семь дней после последней инъекции у кролика берут кровь для приготовления антисыворотки, которую сцеживают с поверхности осевшего сгустка фибрина и форменных элементов крови. Так как для получения преципитиногена и иммунизации им кролика берут один из вариантов (чаще — берлинер), антисыворотка содержит, кроме специфических антител к этому варианту, весь состав антител к общевиновым антигенам бактерии тюрингиензис. Реакция групповых антител в нативной антисыворотке показана на рис. 32. На рисунке видны линии преципитации, окружающие лунку с нативной антисывороткой.

*Приготовление моносыворотки к отдельным вариантам бактерии тюрингиензис.* Антисыворотку, приготовленную, например, против варианта берлинер и содержащую антитела к общевиновым антигенам, освобождают от последних; для этого ее подвергают истощению,

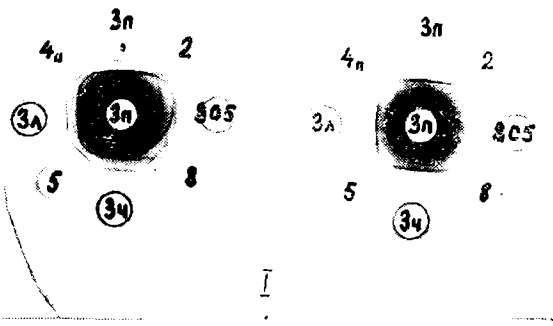


33. Схема получения моносыворотки методом истощения интактной антисыворотки:

1 — к антисыворотке прибавляют истощающий антиген; 2 — избавляют ее от групповых антител; 3 — моносыворотку декантируют (сцеживают) с осажденного преципитата.



34. Реакция с моносыворотками:



1 — слева в центре нативная антисыворотка к алести, по периферии — восемь антигенов; 3п — алести-Париж, 3л — алести-Ленинград, 3ч — алести-Прага; справа — в центральной лунке моносыворотка к алести, по периферии — антигены в том же расположении; моносыворотка реагирует только со своим антигеном, независимо от его географического происхождения; 11 — слева в центре нативная антисыворотка к кенна, по периферии — антиген восьми вариантов; справа — реакция моносыворотки только с комплементарным антигеном.

приливая к ней в эмпирически найденном соотношении преципитиногены подобранных для этого вариантов (двух-трех и более). Смесь оставляют на 1 ч при 37°C, затем выдерживают при 4°C в течение 15—20 ч; образовавшийся преципитат с захваченными им посторонними антителами удаляют на центрифуге при частоте вращения 3000 об/мин в течение 30 мин. Полученная моносыворотка будет образовывать преципитат только со специфическим антигеном данного варианта. Схема получения моносыворотки методом истощения и реакции с моносыворотками показаны на рис. 33—34.

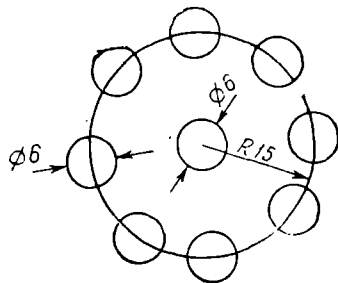
*Реакция двойной диффузии в геле по Оухтерлони (1962).* В чашки Петри наливают слой агара толщиной в 3—4 мм, в агаре проделывают пробойником лунки диаметром в 6 мм, одну в центре и восемь лунок на периферии чашки по окружности с равными друг от друга интервалами (рис. 35—36).

С помощью этой наглядной реакции можно получить ответы на ряд вопросов. Чтобы узнать, к какому варианту относится обнаруженная у больной гусеницы бактерия тюрингиензис, в центральную лунку вводят преципитиноген исследуемой бактерии, а в периферические — моносыворотки к восьми разным вариантам. В течение полутора-двух дней при температуре 37°C антиген и антитела диффундируют сквозь толщу агара навстречу друг другу и на линии их встречи происходит реакция преципитации в теле между гомологичными компонентами, образуя тонкие беловатые линии осадка в виде дуг (лиг), лежащих между центральной лункой и той периферической лункой, в которой находилась моносыворотка искомого варианта. На остальных участках лиги не появляются.

Чтобы уточнить, какие из выделенных во время эпизоотии бактерий относятся к одному из интересующих вариантов, в центральную лунку помещают антисыворотку к этому варианту, а в лунки по периферии — преципитиногены бактерий, среди которых хотят обнаружить искомым вариант.

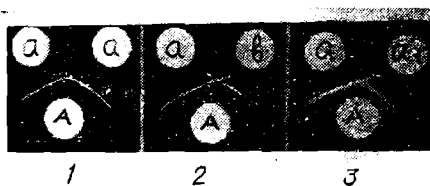


35. Шаблон-пробойник для нанесения лунок на агаре.



36. Размещение лунок на агаре в чашке Петри для реакции по Оухтерлони.

Можно получить ответ на вопрос, в какой мере идентичны два антигена по отношению к одной и той же сыворотке. В агаре проделывает три лунки, размещенные в вершинах равностороннего треугольника: в две из них вводят сопоставляемые антигены бактерий, в третью — антисыворотку к ним. Если антигены идентичны, дуги между каждым антигеном и сывороткой сольются своими сближенными концами. Если они не имеют общих детерминантов (реагирующих точек) и антисыворотка содержит к обоим антигенам неидентичные антитела, то полосы преципитации пересекут друг друга (реакция неидентичности антигенов). Если у антисыворотки есть антитела к общим детерминантам сравниваемых антигенов и к детерминантам, которые у одного антигена есть, а у другого — нет, то произойдет реакция частичной идентичности: линия преципитации между антисывороткой и гомологичным антигеном будет полной, а линия против гетерологичного антигена — неполной, и в виде упирающегося в полную линию преципитации отростка, шпоры (рис. 37).



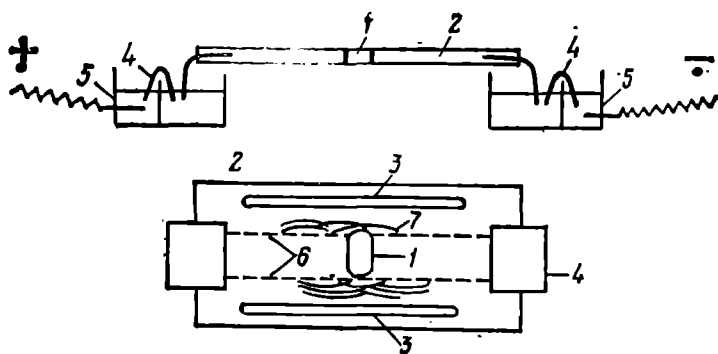
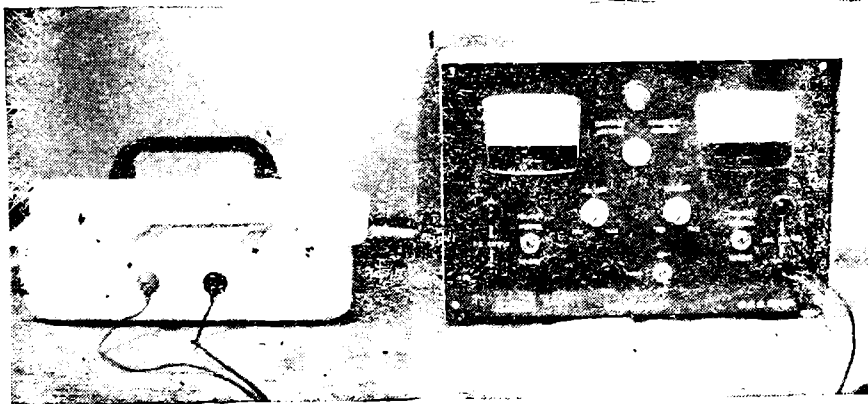
37. Три типа реакций между антисывороткой *A* и гомологичным (*a*), частично гомологичным (*a*<sub>1</sub>) и негомологичным (*a*<sub>2</sub>) антигеном:

1 — реакция идентичности; 2 — неидентичности; 3 — частичной идентичности.

*Метод иммуноэлектрофореза*, предложенный Грабаром и Вильямсом (1953), дает возможность разделить сложные белковые смеси (антигены и антитела не только по их электрофоретичной подвижности, но и по их иммунологической специфичности; последнее позволяет различать одинаковые фракции белка по их физико-химическим свойствам. Поэтому аналитические возможности этого метода шире обычного электрофореза или хроматографии. Метод незаменим при распознавании специфических структурных особенностей антигена (преципитиногена) у вариантов и штаммов бактерий одного и того же вида или при выявлении общих антигенных компонентов у белков различного происхождения. Схема процесса иммунофореза показана на рис. 38.

Имуноэлектрофоретический анализ проводят в два этапа. На первом этапе исследуемый антиген (например, преципитиноген одного из вариантов бактерии тюрингиензис) помещают в лунку, сделанную в тонком слое забуференного агарового геля, нанесенного на стеклянную пластинку (можно фотографическую 13 : 18) и пропускают через гель постоянный ток. В электрическом поле при слабощелочной среде молекулы белка с отрицательным зарядом движутся к положительному полюсу (аноду). Агаровый же гель, при контакте с раствором электролита тоже приобретает отрицательный заряд. На поверхности агара располагаются положительные ионы электролита, которые при пропускании электрического тока движутся к катоду. Наибольшей электрофоретической подвижностью в толще агара обладают фракции альбумина, хотя встречный электроосмотический поток



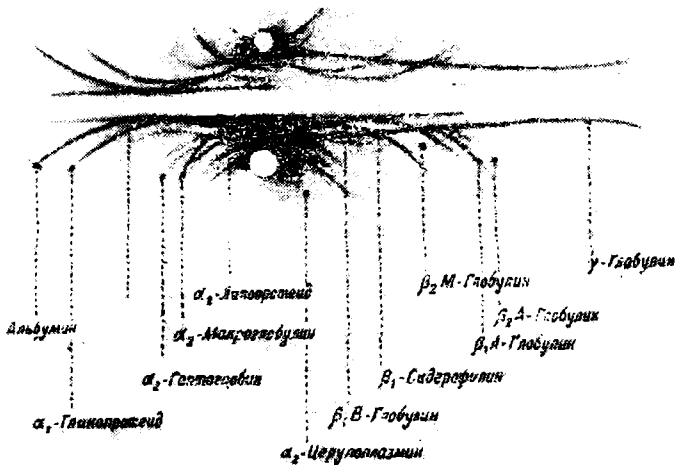


38. Внешний вид аппарата для электрофореза и иммуноэлектрофореза:

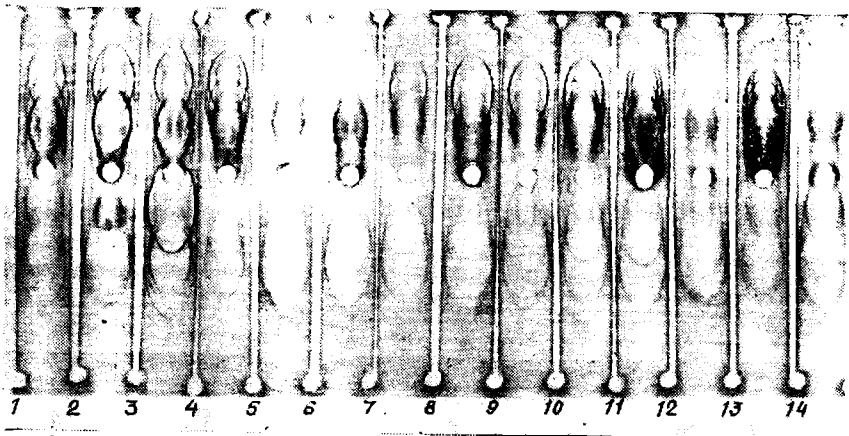
1 — антиген; 2 — агар; 3 — антисыворотка; 4 — фильтровальная бумага для подведения тока от электродов к агаровому гелю; 5 — электродные сосуды с анодом и катодом; 6 — фронт встречи в толще агара фракционированного электрофорезом антигена с преципитирующей сывороткой; 7 — иммуноэлектрофорограмма линий преципитации, демонстрирующая структуру изучаемого антигена.

притормаживает их движение. В то время как альбумины продвигаются все же к аноду, глобулины (вместе с антителами — гамма-глобулинами) током электролитов, преодолевая электрофоретическое продвижение белка, увлекаются в противоположную сторону — к катоду (рис. 39).

На втором этапе иммуноэлектрофоретического анализа после разделения компонентов белка на электрофоретические фракции в канавку, проделанную в геле вдоль электрофоретического поля, вносят антисыворотку к исследуемому белку или моносыворотку для обнаружения в антигене гомологичных фракций. Антисыворотка радиально диффундирует в гель, пересекая линию движения фракций белка, разделенных электрофорезом. На участках эквивалентных соотношений антигенов и антител каждым гомологичным антигеном образуются серповидные опалесцирующие преципитаты, положение



39. Принадлежность дуг преципитации к отдельным фракциям глобулинов и альбумину, определяемая их положением при строго определенных условиях электрофореза (состав буфера, pH среды и др.).



40. Иммуноэлектрофореграмма вариантов бактерии тюрингензис; разгоняются антигены вариантов (из центральных лунок):

1 — финитимус; 2 — алести; 3 — берлинер; 4 — кениа, 5 — дендролимус; 5 — энтомоцидус; 7 — галлерия; 8 — айцава; 9 — субтоксикус; 10 — сотто; 11 — моррисони; 12 — толворги; 13 — дармштадиензис, 14 — кауказикус; в траншеях антисыворотка варианта берлинер.

которых вдоль длинной оси стекла соответствует электрофоретической подвижности фракций.

По сравнению с другими иммунодиффузионными методами иммуноэлектрофорез обладает наибольшей разрешающей (разделяющей) способностью при определении числа антигенов. В отдельных электрофоретических фракциях, осажденных преципитирующими сыворотками, спектр антигенов в электрофоретической зоне представлен более или менее обособленными дугами преципитации, выявленными (осажденными) антисыворотками и идущими в одном и том же направлении. Иммуноэлектрофореграммы (рис. 40) могут быть использованы для определения также химической природы антигенов путем выявления в линиях преципитации методами гистохимического анализа белков, полисахаридов, липидов и отдельных ферментов (Грабар, Буртен, 1963).

### Вопросы для самопроверки

1. Какие заболевания обозначают теперь словом фляшерия?
2. Назовите отличительные особенности проявления различных бактериозов и характера их течения.
3. Какие условия нужны для возникновения септицемии?
4. Каковы отличительные особенности у возбудителя кишечного бациллярного токсикоза?
5. По каким признакам устанавливают варietetную принадлежность бактерии тюрингиензис?
6. Каковы характерные особенности факторов патогенеза, участвующих в развитии кишечного бациллярного токсикоза?
7. Почему и как возникает стрептококковый энтерит шелковичных червей?
8. Что представляют собой серологические методы исследования и как с их помощью устанавливают видовую (варietetную, штаммовую) принадлежность бактерий?
9. С какой практической целью необходимо определение видовой принадлежности бактерий и какова общая схема выполнения этих исследований?
10. Какова практическая ценность выявления энзоотических очагов бактериозов и какие методы рекомендованы для их обнаружения?

### 3.1. Коротко о вирусах

**Открытие вирусов.** Благодаря открытиям Л. Пастера, Р. Коха и их многочисленных последователей во второй половине прошлого столетия стало общеизвестным, что любая инфекционная болезнь имеет своего микроба-возбудителя. Причиной заразных заболеваний в то время чаще всего считали специфические для них виды болезнетворных бактерий. Однако к концу века накопилось много фактов, когда при самых тщательных обследованиях больного возбудителя обнаружить не удалось ни при помощи микроскопа, ни путем выделения и культивирования микробов на питательных средах.

Эту кризисную ситуацию в учении о природе заразных болезней удалось преодолеть на пороге XX в. после открытия вирусов русским ученым Д. И. Ивановским (1892), который исследовал мозаичную болезнь табака. Сок больного растения, профильтрованный через бактериологические фильтры Шамберлана, сохранял инфекционность, хотя самого возбудителя не было видно под микроскопом. Вопреки утверждению голландца М. В. Бейеринка, повторившего эти опыты в 1899 г., Ивановский доказал экспериментально, что патоген не может быть растворимым ферментом или токсином, что он имеет ультрамикроскопическую корпускулярную природу и не растет на питательных средах. Так были охарактеризованы основные особенности нового инфекционного агента и вместе с тем открыт универсальный метод обнаружения вирусов.

Слово вирус (от лат. *вирус* — яд) во времена Л. Пастера служило для обозначения болезнетворных продуктов бактерий или чаще всего самих возбудителей болезни. По мере того как выяснилось происхождение многих бактериальных болезней, это слово становилось собирательным наименованием любого инфекционного начала, природа которого не была выяснена. Бейеринк впервые применил его по отношению к возбудителю мозаичной болезни табака. Наука, изучающая эту группу возбудителей некоторых инфекционных заболеваний, стала называться вирусологией. Теперь только вирусы бактерий все еще сохраняют свое первоначальное название бактериофаги («пожиратели бактерий») или просто — *фаги*; и хотя этот терминологический сепаратизм (обособленность) бактериологов удерживается в обыден-

ной практике, он в значительной степени утратил прежнюю целесообразность после открытия вирусов у других микроорганизмов — одноклеточных водорослей, несовершенных грибов и актиномицетов.

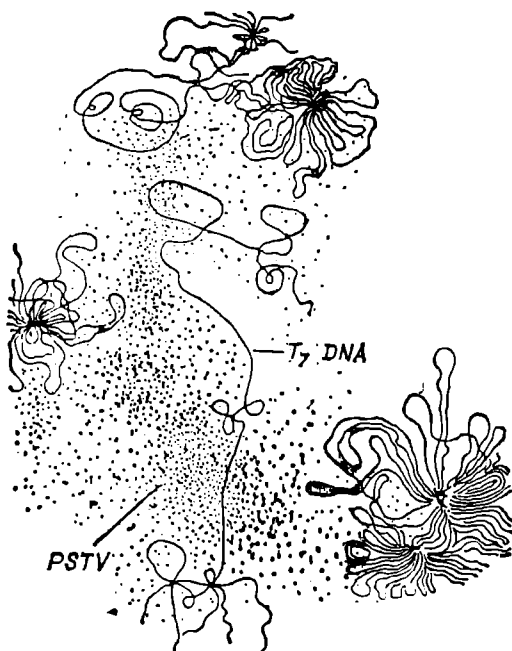
Долгое время фильтруемость вирусов через мелкопористые фильтры служила основным признаком, отличавшим их от других микроорганизмов. Наряду с отсутствием роста на искусственных средах и способностью размножаться только в жизнедеятельных тканях, критерий фильтруемости имел решающее значение для открытия в последующие годы многочисленных вирусов в растительном и животном мире. Много позже стало очевидным, что вирусы с их способностью проходить сквозь бактериальные фильтры, обусловленной сверхмалыми размерами, не одиноки; такая же особенность присуща *риккетсиям* и *микоплазме*. Помимо размеров, общим для них является более примитивная организация и большая или меньшая интеграция их жизнедеятельности с живой клеткой, в которой они паразитируют.

Недавно фитопатологи обнаружили самых маленьких возбудителей инфекционных заболеваний растений — *вириодов* (Динер, 1971). Вириоды представляют собой короткие цепи РНК с низкой молекулярной массой — 75 000—100 000; ни вирионподобной организации, ни капсидного белка у них не обнаружено (рис. 41). После заражения восприимчивого растения они, подобно вирусам, проявляют способность к репликации (воспроизведению) РНК, которая заканчивается разрушением оккупированной ею клетки. Предполагают, что такие разные болезни, как веретеновидность клубней картофеля и экзокортис цитрусовых (шелушение нижней части ствола), вызываются не вирусами, а вириодами. Предпринимаются поиски вириодных инфекций и у животных; так, выдвинута гипотеза о вириодной природе гепатита (Цукерман, 1973).

Болезни вирусного происхождения у человека, животных, растений известны по их внешнему проявлению с незапамятных времен; были найдены даже способы предупреждения (прививки оспы — Э. Дженнер, 1797), однако причины, их вызывающие, оставались неизвестными. Через шесть лет после открытия вируса мозаичной болезни табака была доказана фильтруемость возбудителя распространенной болезни рогатого скота — ящура (Леффлер, Фрош, 1898), а в 1901 г. — возбудителя тропической желтой лихорадки (Рид, Керрол и др.); с помощью световой оптики удалось обнаружить возбу-



Д. И. Иваповский (1864—1920)



41. Вириоды (PSTV) и их размеры по сравнению с ДНК бактериофага  $T_7$ ; здесь полинуклеотидная цепочка сердцевинки фага развернута или собрана в розетки.

ся — последовательно и повсеместно — только в 30-е годы. Установлено, что 12 видов растений, которые служат основным источником питания для большинства населения земного шара, поражаются 96-ю видами вирусных болезней. Тогда же стали поступать сведения относительно вирусной природы знакомых ранее и новых болезней насекомых. Вирусология стала подлинным детищем XX в. после изобретения электронного микроскопа и привлечения серологических и биохимических методов исследования. Вирусы стали опорным объектом молекулярной биологии и сыграли исключительную роль в становлении этого своеобразного комплекса наук, сфокусировавшего достижения современной физической химии, биохимии и биологии на решении наиболее глубоких проблем жизнедеятельности организмов; они были недоступны в прошлом, когда изучение живой материи ограничивалось клеточным уровнем, а основным инструментом для проникновения в ее тайны оставался световой микроскоп.

**Объект и методы его исследования.** При решении вопроса о природе вирусов приходилось пересматривать представление, предвосхищенное гениальной догадкой Джироламо Фракасторо (1478—1553) и окончательно сложившееся в середине прошлого столетия, что непосредственной причиной инфекционных заболеваний является микроскопическое живое заразное начало — *contagium vivum*. Так как единицей живого, по понятиям того времени, могла быть только

теля натуральной оспы (тельца Пашена, 1906) и бешенства (тельца Негри, 1903). В 1911 г. установлено участие вируса в образовании злокачественных опухолей (саркомы Роуса). В 1915 г. открыты вирусы бактерий — бактериофаги, в 1933 г. — вирус гриппа, в 1937 г. — клещевого энцефалита. В 1948 г. насчитывалось около 80 видов вирусов, найденных у человека, а спустя еще 13 лет — свыше 400. По сравнению с другими инфекционными заболеваниями вирусные болезни оказались наиболее многочисленными. И вирусы слабее других патогенов поддаются воздействию лекарственных средств.

Вирусами растений, положившими начало вирусологии, стали занимать-

клетка, а размер большинства вирусов был слишком мал для клетки — от 20 нм<sup>1</sup> (вирус ящура) и до 455 нм (вирус пситтакоза — болезни попугаев) — было непонятно, как может осуществляться многообразие жизненных процессов в частице, вмещающей в себе считанное количество молекул белка. Вторая особенность вирусов, вызывавшая сомнение в принадлежности их к миру живых существ, — неспособность к жизнедеятельности и размножению на мертвой питательной среде. Деятельность вируса всецело зависит от обмена веществ у его носителя. Размножение фага в культуре бактерий тесно связано с состоянием обмена веществ у самих бактерий. У высших растений размножение вируса обычно связано с фотосинтезом. Репродукция вирусов может идти лишь в пораженной ими клетке и на основании обмена веществ в этих клетках, той энергии, которая в них возникает, и тех ферментов, которые в этих процессах участвуют. Во всяком случае, вирусы-сапрофиты пока неизвестны.

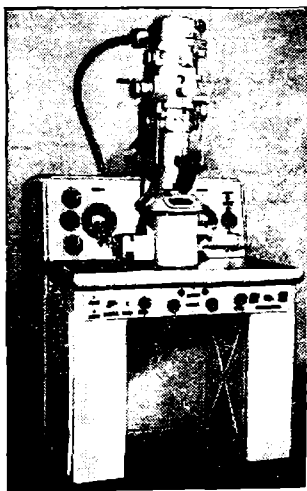
Необходимо отметить, что взаимоотношения вирусов с живыми организмами не ограничиваются только явным паразитизмом. Существуют и другие формы использования ими своего носителя. Патогенные для растений и животных вирусы могут находиться в организме насекомого-переносчика и даже размножаться в нем, не причиняя своему хозяину видимого вреда. Известно также, что вирусы могут присутствовать в растениях и вызывать в них морфологические изменения, которые прежде принимались за мутации (вирус пестролепестности тюльпана).

Вследствие недоступных для световой оптики размеров и строго облигатного типа паразитизма для диагностики болезней и изучения самих вирусов (с самого начала рождения вирусологии) применялись и применяются методы их обнаружения, сочетающие фильтрацию исследуемого материала через мелкопористые фильтры с биологической пробой, т.е. с заражением восприимчивого организма этим фильтратом. Познавательная возможность этого метода ограничена и сводится к констатации присутствия вируса в исследуемом объекте. Между тем в свете достижений молекулярной биологии, благодаря электронной микроскопии, привлечения методов и технических средств физической химии и биохимии, стало очевидно, что вирусы, как все живое, располагают закодированной программой жизнедеятельности, что сверхмалые размеры этих существ стали возможными в результате использования вирусом цитоплазмы оккупированной ими живой клетки и прежде всего ее ферментов. Вместе с тем такая миниатюризация живого организма стоила ему утраты собственной независимости при осуществлении своего воспроизводства.

В отличие от других микроорганизмов вирусы не могут быть обнаружены с помощью светового микроскопа и тем более изучены при его участии. Исключение составляют только некоторые вирусы, способные образовывать в тканях зараженного организма особые, относительно крупные включения, содержащие в себе вирус: к ним

---

<sup>1</sup> Нанометр (нм) — миллионная доля миллиметра, одна тысячная доля микрометра (мкм).



42. Электронный микроскоп.

ных телец вируса табачной мозаики ( $300 \times 15$  нм). Поток электронов в микроскопе, столкнувшись с ними как с препятствием, образовал на фотопластинке их теневое изображение. В последние годы разрешающая способность электронного микроскопа доведена до 0,8 нм, что позволило получать полезное увеличение в 250 тыс. и более раз и фотографировать не только вирусы, но и отдельные крупные молекулы вещества. Сейчас разрешающая способность микроскопов экстракласса достигла 0,2 нм (рис. 42).

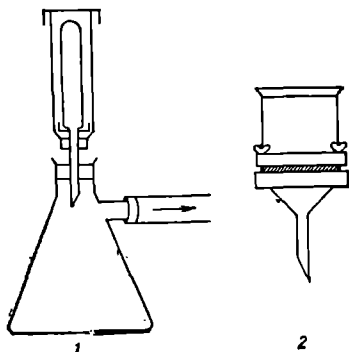
Благодаря специальным методам приготовления препаратов, усиливающих рельефность изображения, удалось выявить тонкую структуру отдельных компонентов вирусов. На полученных с помощью ультрамикротомы ультратонких срезах (15—20 нм) тканей насекомого, содержащих вирус, или на срезах через вирусные включения (полиэдры, овоиды) можно было проследить за отдельными этапами формирования вирусов. Стало возможным использовать морфологические особенности вируса в качестве систематического признака. Электронная микроскопия помогла получить сведения о размерах вирусов более точные, чем ультрафильтрацией через мембранные фильтры или на основании скорости седиментации при центрифугировании. Микроскопирование при больших увеличениях позволяет судить о степени однородности корпускулярных элементов в поле зрения и о степени очистки вирусного препарата от сопутствующих компонентов клетки. Дальнейшее совершенствование электронного микроскопа на основе сочетания его со сканирующим (обегающим, развертывающим) устройством, обеспечивающим стереоскопичность изображения, еще более повысила возможности визуального анализа микроскопических объектов.



В отличие от бактерий и микроскопических грибов вирусы не могут быть выделены из зараженного субстрата в чистые культуры и размножены на искусственных средах. Однако многих из них оказалось возможным сохранить или размножить вне организма на *культуре тканей или клеток*. Для этого подбирают ткани, особенно чувствительные к вирусу, обычно — эмбриональные. Последние, как менее дифференцированные, с менее выраженными видовыми свойствами, могут быть использованы для культивирования вирусов более широкого систематического состава. Так, для культивирования вируса ядерного полиэдроза используют личиночные ткани тутового шелкопряда — гемоциты, клетки жирового тела и ткани оболочек гонад. В отличие от культурального метода изучения бактерий с целью их видовой идентификации, назначение культивирования вирусов, помимо возможности их накопления этим методом, состоит в том, чтобы поэтапно проследить за процессом их развития в живом организме.

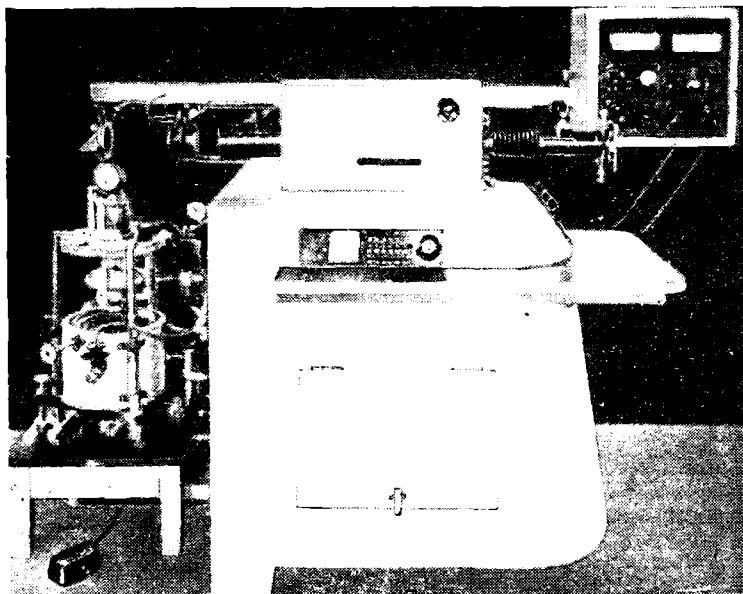
Хотя открытия вирусологов шли в ногу со стремительным развитием науки XX в., ученые получили возможность вплотную приблизиться к более полному знанию физико-химической природы вирусов только в последние десятилетия, когда были разработаны способы очистки вирусов от чужеродных белков. Для этого используют богатейший современный арсенал лабораторно-технических средств и методов физической и биологической химии, разработанных для получения чистых препаратов биогенных молекулярных соединений, в частности ферментов. Они подбираются в зависимости от строения вирусов, степени их инфекционной стабильности, других особенностей, конкретной задачи, преследуемой очисткой, а также сообразно объекту, из которого предстоит выделить вирус.

Наиболее универсальный способ очистки вирусов — *дифференциальное центрифугирование*. Для этого используют препаративные ультрацентрифуги с частотой вращения ротора до 60 тыс. об/мин, с устройством для контроля за температурой в камере с исследуемым материалом. Источником вируса служат ткани или гемолимфа большого насекомого. Ткани тщательно растирают, фильтруют через многослойный бумажный фильтр или центрифугируют при малой частоте вращения (3—5 тыс. об/мин). Чтобы освободить фильтрат (или центрифугат) от микроорганизмов, сопутствующих вирусной инфекции, его снова фильтруют через бактериальные фильтры, например, через фильтр Зейца (рис. 43). Полученный фильтрат используют далее для детальной очистки путем дифференциального центрифуги-



43. Бактериологические фильтры:

1 — один из способов монтажа фильтра из пеглазурованного фарфора (свеча Шамберлана), соединенного с водоструйным насосом (стрелка); 2 — фильтр Зейца, металлическая разъемная воронка, между причинником и сливом которой вставлен кружок асбестового фильтра



44. Ультрацентрифуга (Фиве, ФРГ).

рования. Сначала его освобождают от наиболее значительных по размерам ингредиентов (составных частей) центрифугированием па препаративной ультрацентрифуге при частоте вращения 20—30 тыс. об/мин (рис. 44). Мелкие частицы тканей оседают скорее, чем вирусы, но последние переводятся из осадка во взвешенное состояние (ресуспензируются) легче, чем тканевые частицы. При повторных операциях центрифугирования и ресуспензирования чередуют интенсивность осаждения в центробежном поле при больших и малых скоростях. Весь режим дифференциального центрифугирования подбирают таким образом, чтобы длительность этого процесса обеспечила наименьшие потери не севших частиц вируса при удалении их с надосадочной жидкостью перед ресуспензированием. В итоге может быть получен препарат вируса, очищенный в значительной степени и содержащий не более 10% примесей. Дифференциальное центрифугирование часто сочетают с другими способами очистки вирусов: с осаждением сульфатом аммония или с осаждением в изоэлектрической точке, а также с адсорбцией в *ионнообменной хроматографии*, которая более пригодна для вирусов насекомых.

Очистка с помощью хроматографической адсорбции выполняется на ионнообменных колонках, которые наполняют ионнообменными смолами, производными целлюлозы и другими адсорбентами, способными избирательно сорбировать (поглощать) вирусы, а затем достаточно полно элюировать (вымывать) их. В этих колонках вирусы и сопровождающие их чужеродные компоненты адсорбируются на разных уровнях колонки и могут быть извлечены отдельно друг от друга.

Широкое распространение получило *равновесное центрифугирование*. Центрифужную пробирку заполняют химически инертным веществом с достаточной степенью вязкости так, чтобы плотность его уменьшалась в направлении от дна к мениску. Чаще всего для этого используют растворы сахарозы или цитрат и тартрат калия, реже — глицерин и др. Роль градиента плотности<sup>1</sup>, образованного этими веществами, заключается в том, чтобы при скоростном центрифугировании препятствовать конвекции и фиксировать разные по своим физическим свойствам молекулы в определенных зонах. Материал, который подвергают осаждению, настилают перед центрифугированием на мениск сахарозы, на вершине ее градиента. При кратковременном центрифугировании (0,5—3 ч) компоненты смеси оседают со скоростями, определяемыми их относительными коэффициентами седиментации; во время центрифугирования они распределяются по фракциям в виде характерных опалесцирующих поясов — зон, отличающихся по скорости осаждения: это так называемое зональное разделение в перформированном, заранее образованном зональном градиенте. При длительном центрифугировании (6—12 ч), если плотность зон достаточно велика, процесс осаждения продолжается до тех пор, пока все частицы не достигнут уровня в градиенте, где плотность среды равна их собственной плотности. Фракционирование в этом случае происходит в соответствии с разницей их плотности: это равновесное, или изопикническое, зональное разделение.

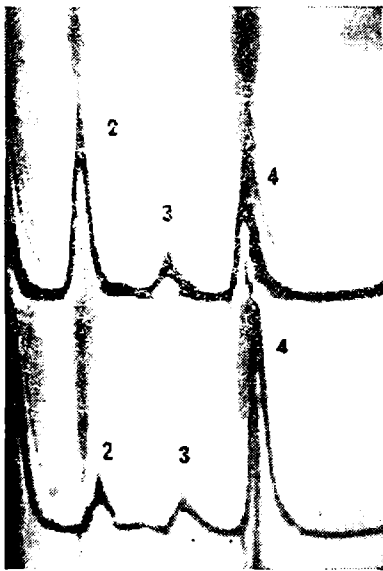
После того, как фракции градиента собраны, для идентификации (распознавания) вируса можно использовать различные методы: испытание инфекционности, исследование спектров поглощения в спектрофотометре, анализ с помощью электронного микроскопа или серологических методов. Обычно идентифицируют не одним, а несколькими методами.

Из других методов очистки вирусов применяют электрофорез в агаровых, агарозных и полиакриламидных гелях, а также *гель-фильтрацию*. Распространена гель-фильтрация с использованием сефадекса — производного полисахарида декстрана. Гранулы его, набухая в воде, образуют гели, поры которого представляют собой сито, способное пропускать глобулярные частицы с молекулярной массой от 50 тыс. до 200 тыс., что показано маркировкой сефадекса (тонкий G — 50, сверхтонкий G — 200). После введения в сефадекс ионнообменных функциональных групп он приобретает способность, помимо гелевой фильтрации, участвовать в очистке материала с помощью ионного обмена, значительно облегчая этим разделение фильтруемых веществ.

Эффективность очистки вирусов можно оценить несколькими методами, в частности, с помощью *спектрофотометра* или *аналитической центрифуги* со шлирен-оптикой, позволяющей получать *седиментограммы* (запись осаждаемости), на которых видна степень чистоты

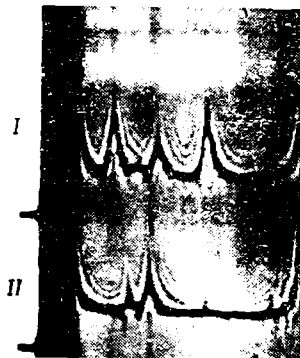
---

<sup>1</sup> *Градиент плотности* — постепенное увеличение плотности раствора в центрифужной пробирке от верхних слоёв к нижним.



45. Седиментограмма, полученная с помощью шлирен-оптики ультрацентрифуги при анализе сока растения, пораженного вирусом: (Мэтьюз, 1970):

лик 1 — растительный белок; 2 — пустые белковые оболочки; 3 — рибосомы растительной клетки; 4 — вирусный нуклеопротеид.



46. Анализ состава седиментируемой смеси в ультрацентрифуге с использованием специфической антисыворотки (Мэтьюз, 1970):

I — седиментограмма сока пораженного вирусом растения, смешанного с нормальной сывороткой кролика; II — то же, но смешанного со специфической сывороткой иммунизированного вирусом кролика. Реакция с антителами гомологичной сыворотки привела к преципитации нуклеопротеида вируса и исчезновению четвертого пика.

и однородности по этому признаку анализируемого материала (рис. 45—46). С помощью этих методов получают информацию о составе вещества без предварительного разделения средствами аналитической химии на его компоненты.

Для идентификации вирусов, обнаружения их различий в пределах узких в таксономическом отношении групп (разновидностей и штаммов), установления их индивидуальных особенностей широко применяются серологические методы анализа. В серологическом отношении вирусы автономны и совершенно отличны от белков организма, в котором они размножаются. Вирусы могут быть обнаружены, а их систематическое положение может быть определено с помощью различных модификаций реакции преципитации, в том числе в геле, а также с помощью иммуноэлектрофореза.

Для решения топографических вопросов накопления вирусов в клетках и тканях, динамики и путей распространения в организме, для определения количества пораженных клеток и других аналогичных исследований применяют *маркировку антител* (сывороток): это могут быть антитела, несущие радиоактивную метку, ферритин — конъюгированные антитела (антитела, комплексированные ферритином — железосодержащим белком с небольшими молекулами, кото-

рые легко выявляются при электронном микрокопировании) и, наконец, антитела, меченые флюоресцирующими красителями. Меченые антитела в сыворотках иммунизированного вирусом животного реагируют в исследуемой ткани прижизненно с этим же вирусом и безошибочно указывают на его присутствие по метке у антител.

Для наблюдения за синтезом вирусных белков и нуклеиновых кислот используют цитохимические методы исследования, *авторадиографию* с применением в качестве метки радиоактивных изотопов; используют также блокировку отдельных этапов обмена веществ и биосинтеза с помощью антимаболитов.

**Вирионы и их строение.** Единичная зрелая особь вируса («вирусная частица», «инфекционная единица вируса») — вирион приспособлен к жизни вне клетки в покоем состоянии и располагает морфолого-биохимическими средствами для последующего проникновения в зараженную клетку. Вирион состоит из одиночной или двойной нити ДНК или РНК, окруженной белковой оболочкой, строение которой обуславливает его форму. Морфологические субъединицы, из которых сложена белковая оболочка, под электронным микроскопом имеют форму шаровидных или яйцевидных тел и называются капсомерами. Они образованы одной или несколькими белковыми молекулами, состоящими из большого количества аминокислотных остатков. Уложенные определенным образом капсомеры образуют белковый футляр — капсид, форма которого образована укладкой капсомер и соответствует одному из двух типов симметрии: спиральной (геликоидной) или кубической. Первый тип — у палочковидных вирусов; их капсид представляет собой цилиндр со стенкой, состоящей из спирально расположенных капсомер и своим видом несколько напоминающей кукурузный початок. Второй тип свойствен шаровидным, сферическим вирусам и относится к одному из трех форм кубической симметрии, встречающейся в природе — к икосаэдру (двадцатиграннику). Капсид представляет собой однослойное белковое образование, уложенное из радиально ориентированных капсомер; поверхность такого многогранного сферического тела похожа на фасетчатую структуру сложных глаз насекомого.

**Систематика вирусов.** В 40-х годах нашего столетия появились попытки классифицировать вирусы растений и животных. В итоге электронномикроскопического и биохимического изучения вирусов были установлены основные особенности, отличающие их от остальных организмов: наличие только одной из двух нуклеиновых кислот в составе вириона, отсутствие клеточной структуры и независимого (автономного) обмена веществ.

Все вирусы разделили на два подтипа по наличию одной из двух нуклеиновых кислот (ДНК или РНК); на основе симметрии нуклеокапсида: спиральной — у палочковидных вирусов или кубической — у сферических — вирусы разделены на классы. Затем классификацию вирусов дополнили еще одним показателем — числом нитей нуклеиновой кислоты (одно- или двунитчатая) и некоторыми другими характеристиками: молекулярная масса, процентное содержание нуклеиновой кислоты в вирионе, заражаемые вирусом организмы (позвоночные,

беспозвоночные, бактерии). Было предложено, для краткости и большей наглядности, зашифровать основные показатели, характеризующие каждую систематическую группу вирусов, в форме криптограммы (Гиббс, Харисон, 1968). Например, для ядерного полиэдроза она имеет следующий вид (Тарасевич, 1975): [D/2; 80—100/8—15; U/E; I/O], где первая пара — тип нуклеиновой кислоты (D — ДНК, R — РНК) и число нитей в молекуле (2 — двунитчатая, 1 — однонитчатая); вторая пара — молекулярная масса нуклеиновой кислоты в миллионах дальтон<sup>1</sup> и содержание нуклеиновой кислоты в вирионе в процентах; третья пара — форма вириона и форма нуклеокапсида; в данном случае U — обозначает удлинненную, с параллельными сторонами и округленными концами, а E — удлинненную, с параллельными сторонами, с незакругленными концами; четвертая пара — тип инфицируемого организма (I — Invertebrate, беспозвоночные) и тип переносчиков; в нашем случае — O, т. е. вирус распространяется без помощи переносчика. Несмотря на некоторые удобства, трудно ожидать широкого распространения криптограммирования признаков, характеризующих вирусы, так как подавляющее количество их, в том числе вирусов насекомых, далеко не сразу после их обнаружения и предварительного описания получают всю необходимую для этого характеристику. Так, криптограмма рабдовирусов, у которых известен только внешний вид вирионов и то, что он обнаружен у насекомых (дрозофилы), будет выглядеть так: ?/?; ?/?; U/?; I/O.

**Избирательный характер вирусного поражения.** Придя в соприкосновение с клеткой восприимчивого организма, вирус выходит из покоящегося состояния; его морфолого-биохимический аппарат для проникновения в инфицируемую клетку начинает функционировать, обеспечивая осуществление двух последовательных операций — контакт и проникновение.

Гистотропизм, предполагающий способность инфекционного агента к активному перемещению в направлении к восприимчивой ткани, относительно вирусов экспериментально не подтвержден. Контакт вириона с клеткой оказывается возможным в результате случайного сближения его с клеточной поверхностью. Создается впечатление, что на очередность поражения тканей в организме насекомого решающее влияние оказывает степень накопления вируса в гемолимфе и интенсивность доставки инфекционного начала циркулирующей полостной жидкостью к отдельным органам. Если роль гистотропической ориентации в пространственном распределении вирусной инфекции неясна, то избирательный характер внедрения вируса в клетку не вызывает сомнений. Специфичность вируса проявляется в способности внедрения в клетку на определенном ее участке. Она объясняется сродством (аффинитетом) белковой оболочки вириона и инфицируемой клетки, наличием у вируса и заражаемой клетки структурных особенностей, которые, выражаясь обобщенно, носят комплементарный (взаимодополняющий) характер. Участки с такими структурными особенностями на поверхности клетки называются рецепторами и представляют

<sup>1</sup> *Дальтон* — единица массы, равная  $1/12$  массы изотопа углерода  $C^{12}$ .

собой определенную группировку белковых, липидных и углеводных компонентов, с которыми реагируют соответствующие участки капсида вириона.

У вируса инфекционная специфичность определяется белком капсида. Насекомое, невосприимчивое к данному вирусу вследствие того, что клетки его тканей не имеют комплементарных с вирусом рецепторов, могут быть заражены искусственным путем нуклеиновой кислотой вируса, предварительно освобожденной от капсида. Вирионы, образовавшиеся в клетках после заражения их «раздетой» нуклеиновой кислотой, будут иметь нормальное строение капсида, свойственное этому вирусу, что обусловлено генетическим кодом нуклеиновой кислоты, использованной для заражения. Поэтому капсидный белок вирионов нового поколения не будет иметь с клеткой, в которой он был сформирован, комплементарных рецепторов, и не сможет участвовать в процессе дальнейшего перезаражения подобных клеток.

Рецепторы вирионов могут утратить способность взаимодействовать с рецепторами клетки после изменения структуры белка капсида под влиянием мутации вируса или химического воздействия. Мутационная изменчивость рецепторов способна, вероятно, вызвать среди вирусов насекомых появление новых инфекционных агентов, опасных для тутового шелкопряда. Какова доля вероятности появления такой мутации, способной пополнить ряды патогенов шелковицных червей, предвидеть трудно.

Вначале контакты вируса и клетки носят обратимый характер. Между их рецепторами устанавливаются, по-видимому, электростатические взаимодействия различного типа, можно нарушить различными средствами, способными вызвать потерю электрического заряда ионными группами, например, в присутствии сильных кислот и оснований. Затем вследствие глубоких структурных преобразований, происходящих с вирионом и клеткой, возникают между ними необратимые связи.

**Процесс проникновения вируса в клетку.** Эти необратимые изменения во взаимодействии вируса и клетки намечаются при проникновении его в клетку и сопровождаются перестройкой конфигурации протеинов капсомер, изменяющей третичную структуру их белка; вирус становится податливым к воздействию на него протеолитических ферментов клетки, к которым он в своем интактном (не нарушенном) состоянии полностью устойчив.

Вирус проникает в клетку посредством акта, представляющего собой частный случай пиноцитоза: на участке соприкосновения его с клеткой образуется впячивание клеточной мембраны, которая превращается в вакуоль, так называемую пиносому или пиноцитозный пузырек. При своем образовании она захватывает вирион и погружается вместе с ним в цитоплазму клетки, становясь ее вакуолью. По отношению к вирусам этот механизм инфицирования клетки назван *виropексисом* (Фазекас де Ст. Грот, 1948). После прикрепления вириона к поверхности клетки и одновременно с ходом виropексиса вирион расщепляется на отдельные структурные компоненты. Еще до погруже-

ния вириона в клетку контуры его утрачивают первоначальную четкость, расплываются, исчезают характерные черты его архитектоники, растворяются липидные компоненты оболочки, капсид разрушается и элюируется во внешнюю среду. Эта дезинтеграция (распад на составные части) осуществляется при участии протеолитических ферментов клеточной оболочки и цитоплазмы клетки. Заключительная стадия взаимодействия рецепторов клетки и вириона — протеолиз белка капсида завершается внутри клетки, в периферической зоне ее протопласта, где вирусная ДНК окончательно освобождается от оболочки вириона.

**Оккупационная и репродукционная деятельность вируса.** Появлению нового поколения вирионов в оккупированной вирусом клетке предшествует подавление деятельности клеточного генома, вплоть до его разрушения; генетическим аппаратом клетки становится вирусная нуклеиновая кислота, а соматическим — вся клетка. Нуклеиновая кислота вируса взаимодействует с клеткой, синтезирующий ферментативный аппарат которой воспроизводит основные структурные системы вируса — нуклеиновую кислоту и белки, но уже по программе, заложенной в генетическом коде вируса (Бергольд, 1956; Товарницкий, 1966).

Непосредственно после проникновения вируса в клетку и до возникновения в ней нового поколения вирионов вирус в клетке не обнаруживается ни визуально, с помощью электронного микроскопа, ни серологически, вследствие дезинтеграции (распада) его антигенной структуры, ни биологической пробой (путем заражения восприимчивого насекомого или культуры его клеток) из-за утраты вирусом инфекционной способности. Индивидуальность вируса как бы растворяется в оккупированной им клетке. Эта начальная фаза преобразования вируса в клетке называется эклипс-фазой. Основное в ней — подавление информационной деятельности генома клетки и переключение ее на новый источник информации, закодированной в геноме вируса. Поэтому получившее распространение английское название этой фазы (англ. eclipse — затемнение) уместно было бы заменить наименованием фаза смены информации или сокращенно — СИ-фаза (Соловьев, Баландин, 1969). За СИ-фазой идут интенсивные процессы синтеза и воспроизведения нового поколения инфекционных единиц вируса — вирионов. Механизм возникновения нового поколения вируса совершенно отличен от размножения клеток путем их деления на дочерние особи, поэтому вирусологи вместо слова размножение предпочитают понятие репродукции вирусов, т. е. воспроизведение копии по ее оригиналу.

Макромолекула ДНК вируса воспроизводится посредством репликации, копирования. Родительская двойная спираль полинуклеотидной цепи ДНК расходится и каждая из цепей служит матрицей (шаблоном) для сборки дочерней цепи путем достройки этих продолженных половинок ДНК за счет присоединения к ним недостающих комплементарных свободных нуклеотидов. Старая материнская половинка вместе с новой образует двухцепочечную ДНК; синтезом этих половинок молекулы нуклеиновой кислоты производится геном для новой генерации вируса.



Как показали опыты, при наличии в бесклеточных, искусственно подобранных системах ДНК-матрицы, фермента ДНК-полимеразы и четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов можно получить ДНК, тождественную или весьма близкую к матричной по составу и нуклеозидной компоновке нуклеотидов. Синтез вирусной двухцепочечной РНК имеет общие черты с репликацией ДНК, но у одноцепочечных геномных вирусных РНК она протекает иначе: одноцепочечный полинуклеотид может в начале заражения им клетки служить информационной РНК, непосредственно выполняющей роль матрицы при синтезе белков, часть которых используется для репликации вирусной РНК.

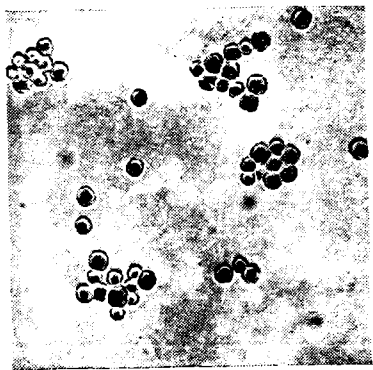
У вирусов синтеза нуклеиновых кислот и структурных белков капсида разобщены территориально и во времени. Они начинаются после перестройки метаболизма клетки, протекают на разных ее структурах и накапливаются в определенном месте. Этот так называемый дизъюнктивный, или разобщенный, способ производства потомства совершенно отличен от механизма размножения клеточных организмов. Затем обе составные части — макромолекула нуклеиновой кислоты и белок капсида — осуществляют самосборку вириона. В подтверждение сказанному удалось продемонстрировать получение восстановленной структуры вириона простым смешением вирусного белка и ДНК у разных вирусов, в том числе у вируса ядерного полиэдроза дубового шелкопряда (Гершензон, 1956).

Развитие вируса в клетке сопровождается заметными морфологически выраженными повреждениями клетки, биохимическими и функциональными нарушениями. Заключительная стадия репродукции вируса — формирование зрелых вирионов. Клетка заполняется ими, разрушается, содержимое ее, вместе с вирионами или вирусными включениями, оказывается во внутренних полостях насекомого.

### 3.2. Вирусы насекомых

Что привело к открытию вирусных болезней насекомых? Одним из самых изученных вирусных заболеваний насекомых оказалась желтуха — ядерный полиэдроз тутового шелкопряда. В середине прошлого века при желтухе, помимо своеобразных внешних признаков, были открыты хорошо различимые под микроскопом кристаллоподобные многогранные тельца — полиэдры. Е. Корналлиа и А. Маэстри (1856) обнаружили в тканях и жидкостях заболевших гусениц множество телец, постоянно сопровождавших желтуху. Эти включения в качестве симптома помогли обнаружить полиэдроз у других насекомых, до открытия Д. И. Ивановским вирусов и задолго до установления вирусной природы самого полиэдроза (рис. 47).

Один из таких ядерных полиэдрозов — верхушечная болезнь гусениц монашенки (*Lymantia popascha* L.) в 1889 и 1892 гг. впервые привлек внимание энтомологов Центральной Европы в период обильного размножения этого вредителя. В 1898 г. С. Форбс описал ядерный полиэдроз североамериканской совки (*Pseudaletia unipuncta* Haw.), опустошительное нашествие которой наносило огромный ущерб посевам пшеницы и полевым травам; когда все оказывалось съеденным,



47. Полиэдры желтухи шелковичных червей в нативном препарате, увелич. x 900,

гусеницы собирались многочисленными полчищами (американское название вредителя—*агтувогт*, что значит походный червь), перемещались на значительные расстояния в поисках пищи, уничтожая все съедобное на своем пути.

**Вклад биометода в изучение энтомопатогенных вирусов.** По наблюдениям энтомологов, вспышки полиэдроза ограничивали дальнейшее увеличение размеров популяций и сулили стать эффективным средством регулирования численности вредителей в лесных и сельскохозяйственных угодьях. Идея И. И. Мечникова (1879) о целесообразности использования паразитарных болезней для

борьбы с вредными насекомыми получала наглядное подтверждение. Меры, направленные на ограничение численности вредных видов организмов с помощью искусственно расселяемых в природе хищников, паразитов, патогенных микроорганизмов или использование их болезнетворных продуктов, легли в основу современных биологических методов борьбы с вредителями. Первоначально это были энтомопатогенные грибы, успешно применявшиеся энтомологом И. М. Красильщиком по совету Мечникова на первой в мире станции биометода на Украине в 80-х годах прошлого столетия. Интерес к новому методу все более возрастал, и к концу первой четверти текущего столетия поиски в природе эффективных инфекционных агентов среди энтомопатогенных бактерий и грибов велись уже в международных масштабах. Дальнейшему расширению этих исследований содействовало отрицательное последствие интенсивного применения химических средств защиты растений, особенно возросшего в послевоенные годы. Использование пестицидов повлекло за собой нарушение экологического равновесия в природе, накопление в почве, в водоемах, в растениях и животных кумулятивных (способных накапливаться) ядохимикатов. В итоге формирования устойчивых к пестицидам поколений вредителей результативность их применения снизилась.

Два десятилетия позже исследователи СССР, Франции и Канады заинтересовались вирусами как одним из наиболее перспективных средств борьбы с вредителями леса (Стаирс, 1972). По сравнению с другими инфекционными агентами вирусы оказались более стойкими к неблагоприятным воздействиям внешней среды, могли противостоять почвенным микроорганизмам, отличались высокой инфекционностью и способностью сравнительно легко преодолевать у насекомых их иммунологические средства защиты. Высокая специфичность вирусов ограничивала видовой спектр поражаемых насекомых и позволяла сохранять в биоценозах полезные формы. Зараженная вирусом популяция становилась не только источником контактного распростране-

ния вируса, но и нередко трансвариального. Кроме того, в составе зараженной популяции в течение последующих поколений в качестве регулятора численности сохранялась спящая, латентная инфекция вируса, способная пробуждаться и вызывать заболевание. Наконец, возможность наработки вирусов в промышленных масштабах для производства вирусных инсектицидных препаратов значительно облегчалась успешной разработкой методов воспитания насекомых на искусственном корме.

Биологическому методу борьбы суждено было внести значительный вклад в изучение вирусов насекомых. Широкий поиск новых вирусов, изучение их эпизоотологических особенностей содействовали обогащению знаний в этой области. Вирусные болезни обнаружены у 700 видов насекомых и клещей, более 320 вирусов изолировано и изучено у 250 видов членистоногих. Выделенные у 38 видов насекомых вирусы испытаны в качестве биологического средства борьбы (Фалкон, 1976).

**Значимость энтомовирусологических открытий для шелководства.** Результаты изучения энтомопатогенных вирусов должны быть постоянно в поле зрения шелководов. Во-первых, потому, что фронт работ в этой области превышает все то, что делают для изучения вирусных болезней сами шелководы, позволяя тем самым расширять и углублять их знания. Во-вторых, в планах этих исследований заметное место занимают гусеницы тутового шелкопряда, которые используются в качестве лабораторного подопытного насекомого, даже в тех странах, где совсем не занимаются шелководством (например, в Канаде). В третьих, обнаруживая новые вирусы, уточняя их ареалы и границы видовой специализации, эти исследования могут служить предупреждением относительно потенциальной опасности для шелководства многого из того, что выявлено этими открытиями. В-четвертых, изучение различных аспектов самой эпизоотологии вирусных инфекций у насекомых не может не представлять особого интереса для шелководов, которые все еще очень далеки в своих научных поисках от возможности результативного преодоления массовых заболеваний выкормок шелкопряда. Распределение систематических групп вирусов между отдельными семействами насекомых показано в табл. 3. Обращает на себя внимание подавляющее количество вирусов, найденных у бабочек. Не исключено, что именно среди них, с наибольшей вероятностью, могут оказаться и те вирусы, которые патогенны для тутового шелкопряда, но до сего времени не попадали в поле зрения шелководов. Приведенные в этой таблице сведения могут быть неполными, о чем свидетельствуют новые данные, продолжающие интенсивно поступать. Часть вирусов, отнесенных в две последние графы таблицы («другие» и «неклассифицированные») теперь достаточно хорошо известны, как, например, усиленно изучаемая японскими исследователями группа вирусов инфекционной фляшерии. Не все вирусы, приведенные в этой таблице, обнаружены у тутового шелкопряда; некоторые из них оказались патогенными для шелкового червя в условиях эксперимента. За последние годы обнаружен ряд вирусных болезней, о существовании которых прежде не подозревали.

Количество видов насекомых и клещей, у которых обнаружены вирусные болезни  
(Debug, 1975)

Отряды членистоногих	Вирусы, содержащие ДНК					Вирусы, содержащие РНК					
	Baculovirus		Poxvirus			Parvovirus		Rhabdovirus	Enterovirus	Другие РНК-содержащие вирусы	Неклассифицированные вирусы
	Вирус ядерного полиэдроза	Вирус гранулезая	Iridovirus	Энтомопокс-вирус	Денсоподобный вирус	Вирус цитоплазматического полиэдроза					
Прямокрылые (тараканы, саранчовые)	4			1					9	4	
Равнокрылые (термиты)										3	
Полужесткокрылые (клопы)			8							1	
Сетчатокрылые (алатоглазки)	2									1	
Волосистокрылые (ручейники)	1										
Чешуекрылые (бабочки)	243	65	12	7	6	141			1	69	
Жесткокрылые (жуки)	4		4	9	1				5	3	
Двукрылые (мухи, комары)	9		28	2		5	8			2	
Перепончатокрылые (пилыльщики, наездники, пчелы, муравьи)					1						
Клещи (паутиновые)	21		2			1		6	2	12	
										5	

ДНК-и РНК-содержащие вирусы—подтип вирусов; далее—семейство (лат.) и род (рус.)

Расширение и углубление познавательных возможностей в области болезней тутового шелкопряда стало возможным благодаря новым техническим средствам исследования, разработанным за последнюю четверть века. Однако не менее существенным фактором прогресса в этой области оказались, во-первых, возросшая осведомленность шелководов-производственников относительно современных знаний болезней шелкопряда; во-вторых, понимание необходимости более пристального наблюдения за проявлением не только массовых, но и единичных признаков неблагополучия на выкормке; в-третьих, отчетливое представление относительно несостоятельности одной только визуальной, зрительной диагностики болезней у шелковичных червей; в-четвертых, осознана необходимость квалифицированного исследования болезней на выкормках с использованием современных лабораторных методов.

### 3.3. Ядерный полиэдроз

Из истории изучения болезни. Вирус ядерного полиэдроза относится к группе вирусов, содержащих ДНК, к роду *Baculovirus*, т. е. палочковидные (лат. *baculum* — палка). Своеобразное кристалло-

графическое наименование (полиэдры — многогранники) эта группа болезней получила по характерным включениям, образующимся в пораженных клетках в итоге формирования нового поколения вирусов (рис. 48). Способность образовывать полиэдры присуща не только этому вирусу; однако для ядерного полиэдроза характерно образование их именно в ядрах клеток. Этой болезнью поражаются чаще всего насекомые из отряда чешуекрылых; быть может, объясняется это не только распространенностью вируса, но и возможностью без особого труда обнаружить полиэдры под микроскопом.



48. Палочковидные вирионы вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда под электронным микроскопом, увелич. x 50 000.

Типичным представителем вирусов ядерного полиэдроза является возбудитель желтухи тутового шелкопряда — болезни, поражающей главным образом личиночную и куколочную стадии насекомого и хорошо известную шелководам. Одно из наиболее ранних и подробных описаний желтухи шелковичных червей было дано французским ученым П. Нистеном (1808) в обширном труде о болезнях насекомых. Желтуха характеризуется заразительностью, широким распространением на выкормках, большой вредоносностью, а ее возбудитель — стойкостью к воздействию внешних факторов. Ряд нерешенных эпизоотологических проблем — условия передачи вируса следующему поколению, распознавание и предупреждение латентной формы инфекции и др. — продолжают представлять особый интерес вследствие большого ущерба, наносимого этим заболеванием.

Поиски возбудителя желтухи шелковичных червей в прошлом столетии сопровождались возникновением разных гипотез, очень далеких от его истинной природы. Судя по ранним литературным источникам, полиэдроз насекомых не всегда удавалось отличить от других заболеваний. В 1856 г. Е. Корналлиа и А. Маэстри независимо друг от друга описали кристаллоподобные включения в клетках желтушных шелковичных червей; они считали их признаком, но не причиной болезни. Несколько позже причину возникновения болезни стали приписывать бактериям, так как она очень часто сопровождалась обильным размножением стрептококков в теле насекомого. Н. М. Красильщик (1896) приписал роль возбудителя желтухи бактерии, найденной им в кишечнике и в общей полости тела больных гусениц, и назвал ее *Micrococcus lardarius* («личиночный микрококк»). Г. Болле (1894) первоначально считал полиэдры кристаллами, как это установил Версон, а затем подтвердил Ф. Габерландт (1871, 1872). Однако, несмотря на то, что Р. Панебианко (1895) уточнил даже принадлежность их к кристаллографической группе ромбодекаэдров, Болле (1898) считал полиэдры ооцистой, спорулирующей стадией некоего паразитического протозоа, подобного кокцидиям. Он наблюдал, как

из полиэдра («ооцисты»), растворяющегося под действием кишечного сока гусениц или раствора щелочи, выходит заключенная в нем зернистая масса — «протоплазматическое содержимое, для которого полиэдр служит оболочкой». Несмотря на несостоятельность представления о протозойном происхождении желтухи, описанная им картина выхода из разрушенного полиэдра мелкозернистой массы соответствует позднейшим наблюдениям относительно присутствия в них вирионов. Таким образом, Болле оказался первым, кто рассматривал полиэдры как этиологическое начало болезни.

Одним из первых, использовавших метод фильтрации тканевой эмульсии желтушных гусениц, был С. Провацек (1907). Он установил, что этот материал, пропущенный через несколько слоев фильтровальной бумаги, после полного удаления таким способом полиэдров сохраняет заразные свойства. Поэтому он смотрел на полиэдры как на реактивные продукты пораженной клетки. Он применил технику фиксации и окрашивания тканей больного насекомого, разработанную к тому времени при изучении оспенной вакцины, эпителиумы птиц, а также трахомы, в исследовании возбудителя которой он участвовал. Он обнаружил в ядрах клеток и в гемоцитах желтушного шелковичного червя мелкие, похожие на кокков тельца, окруженные капсулоподобным веществом. Они напоминали возбудителей трахомы, которых он отнес к протозоа и назвал хламидозоа. Возбудитель трахомы — «тельца Провацека» в дальнейшем стали известны как *Chlamydozoon trachomatis* Prowazek (1907), затем — как риккетсии (1935) и, наконец, в наше время — как вирус трахомы. В то время хламидозойная теория происхождения желтухи имела своих последователей. Вольф (1910), изучая полиэдрос сосновой пяденицы, подтвердил описание микроскопической картины, данное Провацеком, и состоятельность его выводов; он считал болезнь сосновой пяденицы хламидозоонозом и назвал предполагаемого им возбудителя *Chlamydozoa prowazeki*. Вольф считал, что бактерии, в частности стрептококки — обычные спутники заболевания, которые играют косвенную роль в патогенезе, ускоряя его течение, а полиэдры являются продуктом реакции клетки.

В 1913 г. Провацек сообщил о результатах своих дальнейших опытов фильтрации заразного материала, техника которой была значительно усовершенствована. Приготовленная им из трупов желтушных гусениц эмульсия пропусклась через свечи Беркефельда, покрытые агаром. При таком методе гель-фильтрации фильтрат не содержал ни полиэдров, ни бактерий, но зараженные этим фильтратом гусеницы погибали от желтухи. В некоторых случаях личинки могут заражаться материалом, свободным от полиэдров; этим он как бы опровергал причастность полиэдров к этиологии, но и дальнейших доказательств существования хламидозоа тоже не привел. В этих опытах Провацек вплотную подошел к решению вопроса о вирусной природе возбудителя желтухи, но признание этого положения с его стороны не последовало.

Выяснение этиологической роли полиэдров продолжалось. Р. Глезер (1918) пытался рассматривать их как носителей фильтрующегося вир уса. Аоки и Чигасаки (1921), проводившие опыты по иммунизации

шелковичных червей против желтухи, отметили, что полиэдры после встряхивания в физиологическом солевом растворе и более чем десятикратного центрифугирования оставались столь же заразными для шелкопряда, как и не отмытые тельца. Высказывались предположения, что заразное начало желтухи адсорбируется поверхностью полиэдров и чрезвычайно прочно ими удерживается. Глезер с сотрудниками (1934) не могли отделить полиэдры от инфекционного начала ни после 23-х последовательных промывок физиологическим раствором, ни с помощью некоторых детергентов. У. Комарек и В. Брейндель (1924) считали, что инфекция гнездится внутри этих телец и что сама поверхность их в качестве оболочки заразного начала не инфекционна. Чтобы освободить инфекционное начало, экспериментаторы старались по возможности раздробить полиэдры, однако в те времена попытка решить вопрос о пребывании вируса в полиэдре в значительной мере носила умозрительный характер. Только много позже благодаря сверхтонким срезам и электронному микроскопу с увеличением в десятки тысяч раз стали доступны наблюдению вирионы, погруженные в белковый матрикс полиэдра.

А. Пайо (1924, 1926) находил, что кровь больного желтухой шелкопряда, освобожденная от клеточных элементов и полиэдров центрифугированием и фильтрованием через тройной слой бумаги, все еще заразна. Он установил, что желтуху можно вызвать, инокулируя гемолимфой, взятой у гусениц через два дня после их заражения, т. е. до появления полиэдров. Пайо считал, что болезнь вызывается ультрамикроскопическим внутриклеточным паразитом, разрушающим ядра некоторых клеток. Паразитов, по его мнению, он смог наблюдать с помощью ультрамикроскопа<sup>1</sup> сначала в цитоплазме, затем в ядрах где они активно размножались, а впоследствии разрушали клетку и переходили в гемолимфу. Паразиты были невидимы в световой микроскоп при обычной системе освещения, но при ультрамикроскопировании они представлялись в виде мелких подвижных зерен диаметром меньше 0,1 мкм. Эти зерна были видны только в свежих препаратах; в крови здоровых гусениц он их не видел. Они задерживались фарфоровыми фильтрами с мелкими порами, и фильтраты, полученные при таких условиях, были незаразны. Пайо был уверен, что зерна должны были иметь этнологическое значение, так как заразительность фильтра была связана с их присутствием. Эти мелкие частицы, встречающиеся при полиэдрных болезнях чешуекрылых, он рассматривал как особую группу вирусов и назвал их бореллинами по имени Борелля, профессора Пастеровского института в Париже.

Представление о том, что желтуха вызывается ультрамикроскопическими паразитами, похожими на кокков, близких риккетсиям и названных в одном случае — хламидоза, в другом — бореллинами, не получило всеобщего признания. С наступлением в вирусологии фазы

<sup>1</sup> Ультрамикроскоп впервые сконструирован в 1902 г.; благодаря сильному боковому освещению частицы, не видимые в оптический микроскоп (меньше 0,15 мкм), взвешенные в жидкости, рассеивают свет и светятся на черном фоне. С изобретением электронного микроскопа область использования ультрамикроскопов значительно сузилась.

электронномикроскопических исследований оно стало достоянием истории.

Ранние вирусологические исследования в начале XX в. не могли пройти бесследно для тех, кто стремился выяснить этиологию желтухи. Мысль о вирусной природе болезни появилась в специальной литературе еще в начале второго десятилетия. Одними из первых, высказавших это предположение, были Хаяши и Сако (1913). Этому мнения придерживались Глезер (1915), Акква (1918), Комарек и Брейндель (1924). Упоминание о вирусе в качестве возбудителя желтухи постепенно приближалось к истинному пониманию природы этого патогена (Сузуки, 1929; Китажима, 1932; Исимори, 1934; Пайо, 1936, 1939; Летье, 1939). Первые электронномикроскопические исследования вируса ядерного полиэдроза, выполненные Г. Бергольдом (1947), не оставили места для дальнейшего разноречивого описания возбудителя этой болезни.

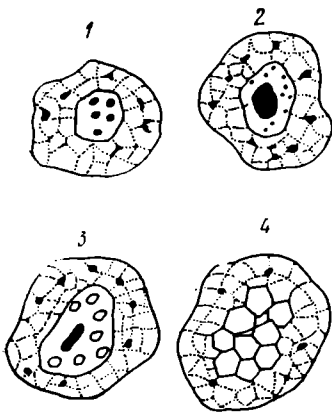
Обзор основных направлений в истории выяснения этиологии желтухи был бы не полным, если не упомянуть теорию спонтанного возникновения желтухи, которая противопоставлялась представлению о паразитарном ее происхождении. Успех в области экспериментального воспроизведения злокачественных опухолей, возникновение которых приписывалось деятельности особых вирусов, и сведения о так называемых канцерогенных (вызывающих рак) веществах побудили исследователей желтухи создать подобные же гипотезы. Сасаки (1910) утверждал, что желтуха может быть вызвана разными причинами: впрыскиванием в общую полость гусениц бактериальных продуктов, формалина, камфоры, или дачей им какого-нибудь другого корма, кроме листьев шелковицы. Указание на то, что кормление гусениц маклюрой, скорцонерой и одуванчиком провоцирует возникновение желтухи, можно было встретить у некоторых отечественных авторов (Дитрихс, 1925 и др.). Итальянские исследователи (Венерозо, 1934) отмечали, что таким же провокационным действием обладает фтористый водород. По данным Сузуки, этим же действием обладает физиологический раствор поваренной соли при впрыскивании его в общую полость гусеницы. Акква (1918—1935) склонен был сочетать ультравирусную и провокационную гипотезы возникновения спонтанной желтухи. В 1928 г. он высказал предположение, что возбудителем желтухи является болезнетворное начало, образующееся в организме в результате функционального расстройства неустановленного характера. Появлению функционального расстройства способствуют внешние причины, в частности низкая температура и высокая влажность во время выкормки. Возникшее вследствие этого болезнетворное начало способно проходить через мелкопористые фильтры (свечи Беркефельда), не теряя инфекционности. Возникнув и вызвав заболевание, оно способно накапливаться в пораженном организме; заболевшие клетки принимают, по его мнению, непосредственное участие в «автоскопическом» воспроизводстве «ультравируса» желтухи. Гипотеза спонтанного происхождения вируса не пользовалась широкой популярностью, так как она слишком явно предполагала возможность возникновения одной формы жизни (вируса) из другой (насекомого),



природа которой ничего общего с ней не имела. Между тем от этих надуманных гипотез не так уж далеко было до представления о существовании латентного вируса и роли внешних факторов в его активации (пробуждении).

**Вирионы вируса ядерного полиэдроза и их морфогенез.** Зрелые единичные особи вируса — вирионы находятся внутри полиэдра. Чтобы извлечь их, белковый матрикс полиэдра растворяют одним из разработанных для этого способов. Вирионы можно также увидеть на ультратонких срезах через полиэдры под электронным микроскопом. Вирион состоит из белкового футляра — капсида, покрытого тонкой мембраной. Внутри капсида находится двойная полинуклеотидная нить дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Предполагают, что эта весьма длинная спираль вирусов, содержащих ДНК, состоит из более коротких нитей, связанных между собой оксиаминокислотами. Благодаря этим аминокислотным эфирным связям обеспечивается необходимая гибкость гигантской молекулы ДНК при укладке ее в футляр капсида. Это умозрительное предположение подтверждается тем, что в препаратах ДНК после их тщательной очистки от белка всегда обнаруживается небольшое количество аминокислот, которые, по всей видимости, структурно связаны с полинуклеотидной нитью ДНК. В палочковидном вирионе вируса желтухи длиной около 300 нм нить ДНК сложена в форме укороченного жгута. В модели, которую предложили Н. Г. Шведчикова, Б. П. Уланов и Л. М. Тарасевич (1969), после скручивания кольцевидной (циклической) нити ДНК образовавшийся жгут складывается пополам и, в свою очередь, скручивается вторично, чередуя при этом направление скручивания. В итоге нить вируса, содержащего ДНК, гранулеза оказывается свернутой в последовательные суперспирали первого, второго, третьего и т. д. порядка. Этот жгут составляет сердцевину вириона (нуклеоид).

Наблюдения с помощью светового микроскопа за цитопатическими изменениями в пораженных вирусом клетках пытались наладить многие исследователи. Клеточные ядра тканей здорового шелковичного червя содержат зернышки и глыбки хроматина; по Пайо, в клетках жирового тела они особенно велики и их всегда более десятка. Первый признак поражения клетки вирусом — слияние хроматиновых зерен в крупные, интенсивно красящиеся глыбки. Внутри осветленных пространств, возникших после агрегации ядерного хроматина, на препаратах, окрашенных по Гимзе, обнаруживаются мелкие розовые включения, лежащие поодиночке или небольшими группами. При внимательном исследовании ничем не обработанных нативных препаратов гемоцитов в тождественных участках ядра обнаруживались оживленно пляшущие частицы с большой вибрационной амплитудой. Затем остатки хроматиновой массы в ядрах больных клеток постепенно исчезают и в светлых зонах, где наблюдались на окрашенных препаратах мелкие розовые включения, возникают полиэдры (рис. 49). Вначале края их еще слабо окрашиваются красками, контуры многогранника хорошо видны, но вскоре они совершенно перестают окрашиваться и начинают сильнее преломлять свет. Ядра клеток, в которых появились полиэдры, набухают до размеров, значительно превы-



49. Образование полиэдров в гемоците тутового шелкопряда (по А. Паёо, 1927):

1 и 2 — различные этапы преобразования фрагментов хроматина в ядре гемоцита; 3 — возникновение полиэдров; 4 — гипертрофия клеточного ядра, заполненного полиэдрами, перед его разрушением.

шающих диаметр нормального ядра: в ядре ничего не остается, кроме следов хроматина и его оболочки с заключенными в ней полиэдрами; иногда хроматиновая масса сохраняется до разрушения ядра, но чаще исчезает до наступления этого момента.

Появление в лабораториях вирусологов электронного микроскопа позволило проследить за морфогенезом вируса ядерного полиэдроза на протяжении всех его этапов — с момента возникновения вирионов и до заключения их в полиэдры. Вирионы возникают в так называемой вироплазме (участок виrogenной стромы — каркас кариоплазмы из фибриллярного белка), различимой под электронным микроскопом в виде электронно-плотных участков ядра. Вирогенная строма занимает незначительное место в клеточном ядре; в ней беспорядочно расположены образующиеся вирионы.

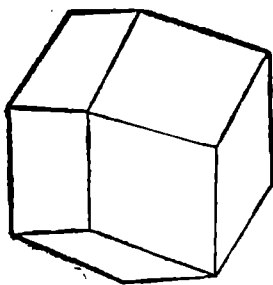
По мере формирования вирионов сетевидное строение стромы становится более четким, потом она начинает истощаться и постепенно исчезает. В стороне от вирионов появляется двойная мембрана, обладающая родством с их поверхностной структурой; отдельные вирионы или пучки их прикрепляются к ней и окружаются ею в виде сплошной оболочки.

На другом участке ядра начинает формироваться матрикс полиэдров; он тоже обладает родством с мембраной, окружающей вирионы. В белок матрикса погружаются одетые в оболочку вирионы. Заключительная стадия репродукции вируса ядерного полиэдроза завершается формированием зрелых вирионов, помещенных внутрь полиэдра. Заполнив ядро, полиэдры разрывают его оболочку, клетка перестает существовать, и мириады полиэдерных телец вместе со всем ее содержимым оказываются в гемолимфе.

С. М. Гершензон полагает, что во всех случаях, когда в ядрах клеток имеются полиэдры одинакового размера, они возникли в итоге одного репродукционного цикла. Если же встречаются полиэдры разного размера, то это результат двух различных циклов размножения вируса. С момента заражения клеток и до заключения большинства вирионов в полиэдры проходит около двух суток.

**Характеристика полиэдров.** Размеры полиэдров 3—5 мкм в поперечнике, хотя встречаются более мелкие — 0,5 и крупные экземпляры — до 15 мкм. Согласно С. М. Гершензону, по форме полиэдры принадлежат к одному из 32 возможных видов кристаллографической симметрии — к гексатетраэдрической, относящейся к высшей категории системы кристаллов, к кубической сингонии. Из возможных

семи форм этих кристаллов среди полиэдров обнаружено пять. Каждая форма приурочена к определенным видам бабочек: тетраэдры — у вируса монашенки и др., гексаэдры — у пчелиной моли и др., тетрагональные три-тетраэдры — у дубового шелкопряда, тетрагексаэдр — у непарного шелкопряда, ромбический додекаэдр — у тутового шелкопряда (рис. 50). Полиэдры ядерного полиэдроза шелковичных червей представляют собой двенадцатигранник, у которого каждая плоскость — ромб. Появление у насекомого полиэдров несвойственной им формы объясняется мутацией вируса.



50. Ромбический додекаэдр, которому соответствует форма полиэдра (по Акква, 1931).

Гершензон (1960) наблюдал у тутового шелкопряда мутанта с тетраэдрическими полиэдрами, свойственными вирусу монашенки или совки, а К. Аидзава (1958) — мутанта с гексаэдрическими полиэдрами, свойственными вирусу пчелиной моли. Извлекая такие полиэдры микроманипулятором и заражая ими гусениц шелкопряда, Гершензону удалось получить мутантные штаммы, стойко воспроизводящие в пассажах способность к формированию полиэдров не типичных для зараженного ими вида насекомого. Изменение формы полиэдров не вызвано условиями их образования при заражении вирусом не свойственных ему видов насекомых, а обусловлено мутацией вируса, приводящей к изменению структурных особенностей его вещества. При смешанной инфекции в ядре одной и той же клетки, т. е. при одних и тех же условиях кристаллизации, встречались вместе обычные и мутантные формы полиэдров. Поэтому, по мнению Гершензона, форма их может служить надежным диагностическим признаком для определения видовой принадлежности вируса ядерного полиэдроза. Если насекомое заражено чужеродным для него вирусом, у заболевшей особи, независимо от вида заражаемого насекомого, образуются полиэдры, форма которых присуща именно этому вирусу. По другим данным, форма полиэдра контролируется генами не вируса, а насекомого (Аидзава, 1962).

Полиэдры сильно преломляют свет, но без двойного преломления в поляриметре. При тщательном исследовании видно, что у полиэдров периферия светлее и с менее плотной, чем в центре, консистенцией. От надавливания иглой микроманипулятора они трескаются и распадаются на мелкие кусочки неправильной формы; при этом освобождается множество мелких зерен, содержавшихся внутри полиэдра. Двигая покровное стекло нативного препарата, можно поворачивать полиэдры и рассматривать их форму со всех сторон; изредка встречаются полиэдры, испещренные трещинами. Полиэдры тяжелее воды, поэтому водная взвесь их сравнительно быстро отстаивается; центрифугируя эмульсированные в водной среде ткани больных гусениц, можно за короткий отрезок времени собрать любое количество полиэдров. Ряд последовательных повторных промываний и центрифугирования удаляют обломки клеток, жировые капли, другие посторонние

сопутствующие компоненты и получают полиэдры в довольно чистом состоянии.

Полиэдры не растворяются в холодной и горячей воде, в сероуглероде, спирте, эфире, ацетоне и других органических растворителях, но растворяются в подогретых концентрированных растворах кислот и в разведенных растворах щелочей (Бергольд, 1947). Растворяются они также в солянокислом пепсине и в натуральном желудочном соке. Растворив полиэдры в слабой щелочи и удалив щелочь диализом, можно получить три фракции преципитатов с сернокислой магнезией и хлористым натрием. В отличие от многочисленных жировых шариков в поле зрения микроскопа полиэдры не чернеют от осмиевой кислоты, не окрашиваются суданом, т. е. не содержат жира. Полиэдры дают все цветные реакции на белок и потому хорошо окрашиваются пикриновой кислотой; на таком препарате, особенно с дополнительной фонирующей окраской, отчетливо видна форма многогранника. Эта окраска рекомендуется при наличии в поле зрения телец, похожих на полиэдры.

Полиэдры не окрашиваются обычными микробиологическими и гистологическими красками — кислыми и основными — или окрашиваются очень слабо по периферии, контурируя их и окрашивая фон вокруг многогранников. Хорошую выраженную окраску такими красителями можно получить только после протравливания полиэдров кислотами или щелочами и при значительной длительности действия красителей. Препараты, обработанные натронной щелочью, содой или слабым раствором соляной кислоты и промытые водой, хорошо окрашиваются азур-зоином по Романовскому—Гимзе. Можно также окрасить подкисленные и подогретые препараты полиэдров триацетидом Эрлиха. Для более четкой окраски углов и граней полиэдров при кристаллографическом исследовании Гершензон обрабатывал их 6%-ной карболовой кислотой с последующей окраской карболфуксином.

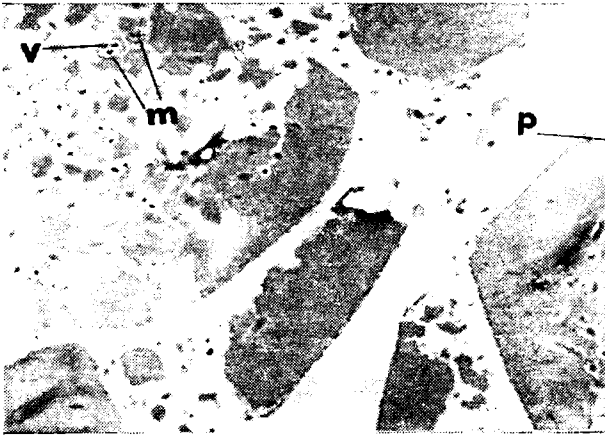
По данным Бергольда (1968), белок полиэдров характеризуется следующими показателями: константа седиментации  $S_{23}$  12,85; диффузия  $D, 10^{-7}$  см<sup>2</sup> сек<sup>-1</sup> — 3,12; молекулярная масса 378 000; изоэлектрическая точка при рН 5,3—5,6. Этот белок содержит 17 аминокислот, преобладают аспарагиновая кислота, аргинин, лейцин, серин и глицин. Серологическая вариабельность этих белков недостаточно изучена; реакция двойной диффузии в агаре показала, что белок, помимо групповых антигенов, общих для различных полиэдров, содержит также специфические, присущие полиэдрам каждого из вирусов. Белки гемолимфы и полиэдров у одного и того же насекомого серологически не идентичны.

Белковые субъединицы в полиэдрах расположены в виде правильной кристаллической решетки. По мнению Р. Фауста и Ю. Адамса (1966), структурные особенности и механические свойства полиэдров различного происхождения, как ядерного, так и цитоплазматического, обусловлены найденным в них кремнием. Начало распада белкового матрикса при слабощелочном воздействии кишечного сока гусениц вызвано растворением кремния и, вследствие этого, исчезновением связи между отдельными субъединицами белка в кристаллической решетке полиэдра. Кремний участвует в построении кристаллов био-

генного происхождения не только в полиэдрах, но и в параспоральных кристаллах бактерии тюрингиензис и в кристаллических включениях белковой природы у растений, пораженных некоторыми вирусами. Белок полиэдров устойчив к протеолитическим ферментам и не подвержен гниению, что обуславливает длительную сохраняемость вируса желтухи в почве. Для его переваривания протеолитическими ферментами животного и растительного происхождения необходима предварительная денатурация белка полиэдра в кислой или щелочной среде. Щелочная реакция кишечного сока, денатурируя белок в периферическом слое полиэдра, создает возможность для гидролитической деятельности пищеварительных ферментов гусеницы. Р. Фауст и Ю. Адамс показали, что прогревание кишечного сока при  $100^{\circ}\text{C}$  в течение получаса или извлечение пищеварительных ферментов путем диализа сока лишает его способности растворять полиэдры и освобождать заключенные в них вирионы. Недализируванный, но прогретый кишечный сок гусениц тутового шелкопряда сохраняет способность растворять  $1/3$  белка полиэдра, тогда как интактный (недализируванный и непрогретый) кишечный сок с рН 8,6 растворял  $3/4$  белка в полиэдрах.

Отношение полиэдров к растворителям, красителям, устойчивость к действию протеолитических ферментов и отчасти их механические особенности связаны с наличием серосодержащих аминокислот, сближающих белок полиэдров с каротинами и каротиноидами животного происхождения и обуславливающих проявление этих свойств. По данным Л. М. Тарасевич (1975), при длительном хранении полиэдров свободные сульфгидрильные группы окисляются до дисульфидных, цистеин переходит в цистин — соединение с более прочными связями; вследствие этого длительно хранившиеся полиэдры обладают всеми этими свойствами в большей степени, чем недавно образованные в тканях больного насекомого.

**Процесс заражения шелковичных червей желтухой.** Основными естественными воротами для заражения тутового шелкопряда вирусом желтухи является пищеварительный тракт. Считается также, что вирус может инфицировать через ранки на коже и даже через дыхальца. Однако наиболее уязвим средний отдел кишечника. Под воздействием кишечного сока полиэдры в средней кишке разрушаются и находящиеся в них вирионы освобождаются. Процесс этот осуществляется за сравнительно короткий промежуток времени, в течение которого полиэдры находятся в средней кишке, куда они попадают вместе с пищей; через 50 мин после поглощения гусеницей корма его неассимилированная доля вместе с частью полиэдров начинает эвакуироваться из кишечника в виде экскрементов. Известно, что полиэдры очень стойки к разрушительному действию пищеварительной протеазы и кишечного сока с рН близким к нейтральному. Кишечный сок с рН выше 9—9,5 растворяет их и освобождает находящиеся в них вирионы, которые тоже могут быть повреждены в разной степени щелочной средой. Однако это происходит не всегда, поэтому интересно решить, с чем связано сохранение в этих условиях инфекционной способности вируса — с видовыми особенностями поражаемого насекомого или же



51. Разрушение полиэдров (р) под действием кишечного сока гусеницы и выход содержащихся в них вирионов (v), заключенных в мембрану развития (m). Ультратонкий срез, электронный микроскоп, увелич. х 23 300 (Лаборатория цитопатологии в Сант-Кристолез-Алес. Национальный институт агрономических исследований, Франция).

с его возрастным состоянием. В. Стилз и Я. Д. Пасчке (1980) исследовали рН в средней кишке в различном возрасте личинок трех видов комаров из рода аэдес, стремясь обнаружить связь между реакцией кишечного сока и восприимчивостью личинок к вирусу ядерного полиэдроза. Они не обнаружили значительной разницы рН у личинок разных видов одного возраста. Однако концентрация водородных ионов на всем протяжении средней кишки изменялась от значительно большей величины в передней его части к низкой — в задней. Графически топография этого градиента имела вид клина, широкая часть которого расположена у границы с грудным отделом. С возрастом кишечник удлиняется, протяженность зоны с высоким рН увеличивается и опасность повреждения вирионов возрастает в связи с их более длительным прохождением зоны с высокой щелочностью. Так, у всех трех видов в третьем возрасте протяженность участка средней кишки с высоким рН (9—10) стала гораздо значительнее и заметно снизилась восприимчивость к вирусу: у личинок в возрасте 12 ч она выразилась в гибели 56% особей, а в возрасте 74 ч — только 8%. У молодых личинок щелочность кишечного сока на всем протяжении кишечника была достаточной для растворения полиэдров и освобождения вирионов и тем самым для заражения. По мере роста задняя треть средней кишки, в которой могли бы выжить вирионы, начиная с третьего возраста отдалялась на малодоступную для них дистанцию. К сожалению, аналогичные исследования применительно к гусеницам тутового шелкопряда ждут еще своих исполнителей.

Проникновению вируса в клетки заражаемого насекомого предшествует освобождение вириона от оболочек. Протеиновый футляр — капсид, внутри которого расположен носитель генетического кода — ДНК вируса, окружен тонкой оболочкой — мембраной развития и заключен в полиэдр (рис. 51). Сначала белковый матрикс полиэдра гидролизуются в средней кишке гусеницы, при участии протеолитических ферментов кишечного сока в условиях повышенной щелочности, а освободившиеся от него вирионы проникают в гемолимфу по меж-



52. Вирионы ядерного полиэдроза между ворсинок кишечного эпителия прилипают к полисахаридному покрытию ворсинок (стрелки), увелич. x 123 900 (Ишихара, 1975).

53. Лизис оболочки вириона на участке соприкосновения с ворсинками, увелич. x 280 000



54. Вирионы, лишенные оболочки (нуклеокапсиды вируса), вовлечены в канал микроворсинков и продвигаются по направлению к эпителиальной клетке; увелич. x 91 000.

клеточникам эпителия кишечника. Способ перемещения вирионов к основной зоне их воспроизводства — к тканям общей полости — не совсем ясен; некоторую роль в этом играет механический перенос вирионов вместе с продуктами пищеварения, всасываемыми эпителием кишечника. Методом радиоавтографии установлено, что после скармливания гусеницам шелкопряда полиэдров, меченых радиоактивным фосфором, метка обнаруживалась через двое суток в межклеточном пространстве средней кишки (Гладышева, Мамедниязова, 1968). Имеются также электронные фотографии, свидетельствующие, что вирионы палочковидных вирусов проникают сквозь ряды рабдориума эпителия и даже внедряются в канал этих плазматических образований, сходных с ресничками и ограждающих фронт всасывающих и секретирующих клеток (рис. 52—54). Ранее были обнаружены хроматографические различия между свободными вирионами из гемолимфы и вирионами из полиэдров (Ваан, 1965). Затем методом микрофилтрации вируса ядерного полиэдроза большой пчелиной моли удалось установить, что свободные вирионы, не заключенные в полиэдры, не имеют мембраны развития (Стэрс и Эллис, 1971). Т. Каварабата (1974) с помощью центрифугирования в градиенте плотности и изучения под электронным микроскопом свободных вирионов из гемолимфы зараженных гусениц тутового шелкопряда отметил, что эти вирионы лишены оболочки. Каварабата и Аратаке (1978) установили, что инфекционность оголенных и неоголенных вирионов при пероральном и интрацеломальном заражении неравнозначна. Хотя вирионы без оболочки встречались также в щелочном кишечном соке среди освободившихся от матриц полиэдров (Бергольд, 1958), они в

этих условиях редко теряют мембрану развития, так как оголение нуклеокапсида приводит к агглютинации (слипанию) вирионов и полной инактивации вируса. Где именно вирион освобождается от оболочки — на пути в общую полость или в ней самой, остается не выясненным.

Т. Каварабата с соавторами (1980) испытывали методы очистки и изучали свойства вируса ядерного полиэдруса тутового шелкопряда, освобожденного из полиэдров, растворенных в кишечном соке гусениц. Для растворения полиэдров вне организма гусениц последних в пятом возрасте заставляли голодать некоторое время, затем подвергали воздействию электрического шока, чтобы рвотой вызвать выделение кишечного сока. Количество выделенного сока колебалось от 0,04 мл у гусениц, голодавших 6 ч, до 0,5 мл — у голодавших 36 ч. Сок профильтровывали через многослойный бумажный фильтр и центрифугировали 20 мин при 10 000 G и 4°C. Полиэдры суспензировали в этом соке и инкубировали при 27°C 30 мин. Суспензию в соке с растворенными полиэдрами центрифугировали при 2 000 G 10 мин для освобождения вирионов от примесей; очищали вирионы из супернатанта в градиенте плотности сахарозы. Полученный препарат содержал покрытые оболочкой вирионы, оголенных же вирионов (нуклеокапсид) среди них не было. Этим вирусом заражали куколок инъекцией в гемоцель, а гусениц слинявших на третий возраст — спайванием суспензии с вирионами. Существенной разницы в результатах заражения, зависящей от его способа, авторы не обнаружили.

Берд (1959) наблюдал присутствие множества вирионов без оболочки, прикрепленных к ядерной мембране инфицированных клеток. По-видимому, проникновению вируса, содержащего ДНК, в ядро предшествует депротенинизация вирионов или же оно сопровождается этим актом. Когда пораженные вирусом клетки погибают и разрушаются, размножившийся в них вирус, включая свободные вирионы, и полиэдры, поступает в гемолимфу. Каварабата установил, что в течение всего периода размножения вируса из тканей гемоцеля в гемолимфу поступает множество вирионов, в том числе без оболочки развития.

Экспериментаторы обычно используют в качестве инокулюма отмытые полиэдры или гемолимфу желтушных гусениц. Сравнительная эффективность применения тех и других зависит от выбора ворот инфекции. В гемолимфе нет тех условий, которые в средней кишке гусеницы приводят к растворению полиэдров и выходу из них вирионов. Поэтому при инокуляции гусениц через рот вирионы с оболочкой развития из полиэдров оказываются более инфекционными, чем введенные в кишечник вирионы из гемолимфы желтушной гусеницы, лишенные оболочки. В гемолимфу вместе с полиэдрами из разрушенных клеток попадает какое-то количество свободных вирионов без оболочки. Введенные непосредственно в общую полость, они оказываются в тысячу раз инфекционнее, чем вирионы с оболочкой из полиэдров: ЛД<sub>50</sub> при количественном учете инфекционного начала в единицах оптической плотности для фракции свободных вирионов без оболочки составляет

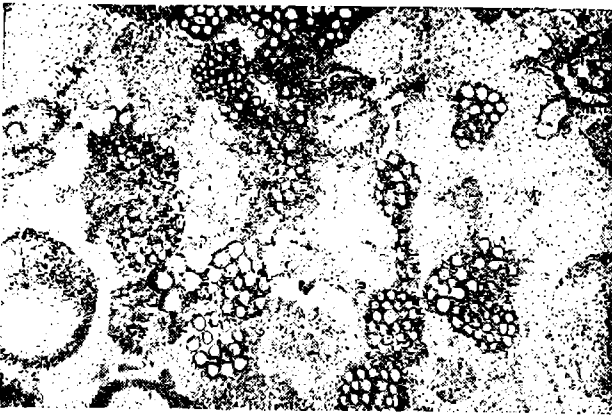


$10^{10}$ , а для фракции вирионов с оболочкой развития, освобожденных из полиэдров, —  $10^7$ . Высокоинфекционные фракции гемолимфы зараженного насекомого, по свидетельству Каварабаты, всегда содержат нуклеокапсиды (вирионы без мембраны развития). Установлено, что более 80% инфекционности гемолимфы желтушного насекомого определяется присутствием вируса именно в этой форме. Высокую инфекционность гемолимфы желтушных гусениц, в которой еще отсутствовали полиэдры, наблюдал Аидзава (1967) при впрыскивании ее в общую полость насекомого, но он пояснил это обстоятельство менее убедительно, чем Каварабата.

**Трансовариальная инфекция вируса.** Установлено, что энтомопатогенные вирусы могут оставаться в организме насекомого на протяжении всего онтогенеза, преодолевая при этом метаморфоз и передаваясь трансфазно — от личиночной до имагинальной стадии. Энтомологи отмечали, что у свободноживущих насекомых в естественных условиях заболеваемость полиэдрной болезнью в первый год своего возникновения обычно не принимает эпизоотического характера; массовая гибель наблюдается только после второго или третьего года появления больных гусениц. Одно из приемлемых объяснений сводится к тому, что зараженная бабочка способна передавать инфекцию части своего потомства и это приводит к накоплению вируса в популяции (Глезер).

Желтуха тутового шелкопряда не исключение в этом отношении: известны многочисленные данные относительно обнаружения полиэдров в теле бабочек и в отложенных ими яйцах. Еще Болле находил полиэдры у бабочек тутового шелкопряда. Много позже Ребуйон и Пайо обнаружили признаки присутствия вируса желтухи у бабочек, а Пайо — присутствие вируса внутри яйца. По данным Л. М. Тарасевич (1953), заражение вирусом поверхности грены — основной источник возникновения желтухи на выкормке; дезинфекция грены значительно сокращает заболеваемость гусениц. Э. А. Штейнхауз указал на существование двух способов передачи зараженной самкой вирусной инфекции следующему поколению. Во-первых, с помощью контаминации, т. е. загрязнения вирусом поверхности яйца (лат. *contaminatio* — пачкаю). Вылупляясь, гусеницы прогрызают скорлупу и заглатывают находящиеся на ней полиэдры. Во-вторых, когда вирус оказывается внутри яйца, то возможны два пути заражения зародыша: непосредственное заражение зародышевого диска или клеток питательного желтка; последние заглатываются на поздних стадиях эмбриогенеза вместе с вирусом, и гусеницы оказываются заражены перед их вылуплением через кишечник.

Так как вирус проникает в грену на начальных стадиях овогенеза — до образования хориона (скорлупки), не исключена возможность более раннего заражения ооцита с последующим вовлечением вируса в клетки зародышевого диска, т. е. герминативным путем. Г. И. Ермакова и Л. М. Тарасевич (1968) провели исследование с помощью иммунофлюоресцирующих антител (сывороток) по методу Уоллера и Кунса для выявления вирусного антигена в грене тутового шелкопряда, зараженного желтухой на стадии гусеницы. Присутствие вирусного



55. Семенные шары желтушных гусениц пятого возраста, заполненные полиэдрами; окраска по Романовскому, увелич. х 1200 (Алимухамедов, 1959).

антигена определяли у извлеченных из грены зародышей и в околоплодной жидкости яйца. Флюоресцирующая серологическая метка обнаружила наличие подавляющей части вируса в виде полиэдров и дисперсного вирусного антигена в околоплодной жидкости, а не в зародыше.

Возможно, что в передаче вируса ядерного полиэдроза следующему поколению участвуют самцы. С. Н. Алимухамедов (1959) сфотографировал полиэдры в сперматофоре и в копулятивной сумке самки среди выходящих из сперматофора сперматозоидов (рис. 55). Их проникновение удалось проследить до сперматеки (семяприемника). Можно предположить, что, хотя поступательное движение сперматозоидов по направлению к микропиле по спиральному каналу сперматеки в состоянии увлечь за собой отдельные полиэдры, последние из-за своих размеров не могут пройти по каналам микропилярных трубок внутри оплодотворяемого яйца. Однако, поскольку стало известно, что вместе с полиэдрами могут оказаться свободные вирионы и даже нуклеокапсиды, не исключена возможность, что этот либерализованный (освобожденный от белковой оболочки) вирус из разрушенных клеток в состоянии попасть в извергаемую в половые пути самки сперму желтушного самца.

Гусеницы, вылупившиеся из грены, среди которой выборочным микроскопированием установлен высокий процент зараженных яиц, частично погибают от желтухи в первые дни после вылупления (Дикасова, 1948; Ганиева, 1949). При слабом заражении и небольшом проценте инфицированных особей можно не заметить появления желтушных гусениц в младших возрастах; такая выкормка — скрытый очаг вирусной инфекции, способный проявить себя в форме эпизоотии с наступлением старших возрастов.

**Латентный вирус ядерного полиэдроза.** Внезапное возникновение эпизоотии желтухи среди совершенно благополучной выкормки, в условиях, исключающих возможность заноса вируса извне, длительное время привлекало к себе внимание исследователей. Стремление предотвратить прижизненное заражение побудило их поставить опыты

с воспитанием гусениц из дезинфицированных с поверхности яиц поодиночке в стерильных сосудах, на стерильном корме. Еще более надежными казались эксперименты с культурой клеток от внешне здоровых гусениц в условиях, полностью исключавших экзогенное заражение; и при всем том в этой культуре клеток спустя 10 дней развился спонтанный полиэдроз. Понадобилось время и значительные усилия экспериментаторов, чтобы доказать несостоятельность предположений о возникновении в этих случаях вируса «из ничего» — спонтанным самозарождением и найти более приемлемое решение.

С. М. Гершензон различал у тутового шелкопряда две категории бессимптомного, инаппаратного (не проявляющего себя) носительства вируса желтухи; во-первых, это может быть состояние инфекции при заражении малыми дозами немногих клеток тканей и затянувшегося по этой причине инкубационного периода болезни; в том же направлении может действовать комплекс внешних условий, неблагоприятных для обеспечения обычного темпа развития заболевания. Во-вторых, существует другая категория бессимптомного носительства вируса — латентная (скрытая) инфекция; она проявляется в том, что вирус, вместо активного размножения в клетках и разрушения их, переходит в особое неболезнетворное состояние, включается в ядерный аппарат клетки и вместе с этим аппаратом при делении клеток передается следующему поколению. Гершензон (1956—1958) сравнил латентное вирусно-носительство у насекомых с лизогенией бактерий — стабильной ассоциацией бактериофага с клеткой. Это полезное сравнение помогает лучше понять латентное вирусноносительство, так как сущность взаимоотношения геномов клетки бактерий и фага изучена гораздо полнее, чем аналогичные отношения при латентной инфекции. Фаг находится внутри бактерии в форме профага; ДНК его и бактерии ассоциируют друг с другом, а при размножении бактерий эта система передается потомству вместе с потенциальной способностью ее к лизису и к продуцированию нового поколения фагов. Фаги из лизогенных культур, способные вызывать лизогению, называются умеренными: при заражении ими чувствительных (восприимчивых) культур бактерий часть клеток лизируется, как при поражении их вирулентным фагом, но какое-то количество клеток выживает и дает начало лизогенной культуре. Иначе говоря, в зараженной бактериофагом бактериальной клетке происходит одна из двух реакций: лизис или лизогенизация. В первом случае умеренный бактериофаг, подобно вирулентному фагу, растворяет клетку, освобождая образовавшееся в ней новое поколение фагов. Во втором — геном фага интегрирует с геномом бактерии и превращается в профага, сохраняя при этом фаговую ДНК. Мирное равновесие ассоциации профаг-клетка обеспечивается синтезом специального фактора иммунитета — репрессора, подавляющего способность фагового генома начать литическую реакцию. Нарушение этого равновесия называется индукцией; индуцирующими факторами могут быть ионизирующее облучение, ультрафиолетовые лучи, органические перекиси, некоторые антибиотики и т. д. Часто появление в клетке профага сопровождается наследуемыми изменениями каких-либо свойств бактерии. Отличие латентного вируса (провируса) от профага,

по заключению Гершензона, состояло в том, что провирус не предохраняет насекомое от заражения его активным вирусом этого же происхождения, тогда как присутствие профага избавляет бактерию от нового заражения бактериофагом. Л. М. Тарасевич однако считает, что различий этих нет, поскольку болезнь может возникнуть не за счет экзогенного вирусного инокулюма, а в результате активирования последним существовавшей латентной инфекции.

Причину вспышек спонтанного заболевания шелководы видели в провокационных (индуцирующих) факторах — неблагоприятных для шелкопряда условиях, влияющих на эмбриональном и постэмбриональном этапах его онтогенеза. В перечне этих факторов, провоцирующих пробуждение спящего вируса, были названы все без исключения элементы среды обитания (Ганиева и др., 1967): качество корма и его химический состав, несвойственные шелкопряду виды корма (заменители шелковицы — одуванчик, маклюра и т. д.); гидротермический режим и освещенность в червоводне, лучевые воздействия на гусениц, скорость тока воздуха, породные особенности шелкопряда. Наконец, отчетливое провокационное действие на латентный вирус оказывает заражение гусениц болезнетворными организмами (Троицкая, 1979). Несмотря на их исключительную разнохарактерность, все они однозначно проявили себя как провокационный фактор (Ганиева и др., 1970). Экспериментируя столь широким и потому явно не специфическим списком провокационных условий, пытались выяснить прежде всего возможность предотвращения их провокационного влияния. Надеялись также добиться избавления популяции от латентной инфекции в результате систематического отсева вирусоносителей под воздействием индуцирующего фактора.

Были сделаны попытки объяснить механизм действия индукторов. Так, А. Е. Карпов и др. (1968), а затем Л. Г. Кишко и др. (1972) показали, что щелочная и панкреатическая ДНК-аза вызывает активизацию латентного вируса ядерного полиэдроза у куколок тутового шелкопряда; было высказано предположение, что действие щелочной ДНК-азы состоит в нарушении хромосомной структуры ядерного аппарата насекомого, способствующего либерализации провируса и началу его болезнетворной деятельности.

Штейнхауз (1936) предложил рассматривать индукторы как стрессоры — факторы, способные вызывать у организмов стресс, изменения в организме, которые, по учению Г. Селье (1936), призваны противостоять нарушению гомеостаза; гомеостазис — это относительное динамическое постоянство, устойчивость состава физико-химических и биологических свойств внутренней среды которой организм способен сохранять, несмотря на неблагоприятные изменения в среде обитания. Когда регуляторный механизм обеспечения нормальных колебаний физиологических и биохимических констант в относительно узких гомеостатических границах не справляется со своей задачей, ему на помощь приходит комплекс физиологических мер неспецифического характера, мобилизующих ряд систем организма — нейрогуморальных, эндокринных, цитологических, ферментативных — в реакции состояния напряжения организма, имеющего адаптивную (приспособи-

тельную) направленность, применительно к сложившейся ситуации. Состояние стресса создает условия для перехода латентного провируса в деятельную форму вируса.

**Иммунитет к вирусу желтухи.** Гусеница тутового шелкопряда является единственной первично инфицируемой экзогенным вирусом стадией развития насекомого. Изучая возрастные различия проявления относительного иммунитета к вирусу желтухи у шелковичных червей, необходимо иметь в виду, что масса растущей гусеницы за личиночный период увеличивается в 10 тыс. раз, и, следовательно, соответственно нарушается сопоставимость доз инокулюма.

Отмечена некоторая разница в степени восприимчивости куколок при искусственном заражении на разных этапах метаморфоза: молодые куколки более восприимчивы, чем те, которые завершают куколочный период развития. Вирус ядерного полиэдроза в имагинальной ткани не встречает необходимых условий для активной деятельности. Несмотря на то, что имаго — стадия развития, далекая от первичного экзогенного заражения насекомого, полиэдры все же встречаются в теле бабочки. Наиболее вероятно, что они наследуются бабочкой от слабозараженной куколки, которая успела преодолеть метаморфоз, несмотря на зараженность вирусом желтухи, и превратиться в бабочку.

Вирус, присутствующий в грене, также лишен условий для своего развития, во всяком случае до какого-то финального этапа эмбриогенеза. Японские ученые обнаружили в организме тутового шелкопряда биогенные противовирусные ингибиторы. Отмечено, что гусеницы, воспитанные на искусственном корме без примеси порошка из высушенных листьев шелковицы, более восприимчивы к вирусу желтухи из-за отсутствия антивирусного вещества в их кишечном соке (Матсубара, Хаяшия, 1968).

Об участии противовирусного иммунитета на этапе инфицирования тутового шелкопряда мы пока ничего не знаем. Неизвестно, какие факторы активного противодействия насекомого могут встретиться на пути перемещения вирионов из полости средней кишки к общей полости. Электронный микроскоп позволил проследить основные этапы следования вирионов, но признаков активного противодействия продвижению вируса по этому пути обнаружить не удалось. Об этом же, быть может, свидетельствуют хорошо известные факты, что малые дозы вируса, введенные естественным путем восприимчивому насекомому, достигают инфицируемых клеток без особых, видимо, потерь, по пути своего следования и обеспечивают развитие заболевания.

Решающая роль, определяющая возможность заражения вирусом клетки, принадлежит комплементарности ее рецепторов и капсида вириона. Вероятнее всего, что это главное условие, определяющее результативность инфицирования вирусом ядерного полиэдроза, и основной фактор восприимчивости. Роль дозы в проявлении относительного иммунитета вероятно определяется, в конечном счете, большей или меньшей возможностью взаимных контактов рецепторов вируса и клетки. Вместе с тем специфические способности рецепторов, так же как количественное их присутствие по всему фронту инфицируемой поверхности, определяется наследственной структурой вируса и на-

секомого. Исходя из этого, нет ничего невероятного в том очевидном факте, что между породами тутового шелкопряда наблюдаются значительные различия в проявлении восприимчивости при искусственном дозированном инфицировании.

Еще у авторов прошлого столетия можно найти указания на то, что желтококонные породы более подвержены заболеванию желтухой, чем бекококонные. Моновольтинные, бивольтинные и поливольтинные группы пород в этом отношении также заметно отличаются друг от друга. По данным П. Ф. Белова (Росшелкстанция), у трех комбинаций гибридов— $ПС \times С$ ,  $К \times К$ ,  $Д \times К$ —с разной степенью восприимчивости к вирусу желтухи дозы полиэдров, способные вызывать гибель 50% гусениц, соотносятся примерно как 1 : 18 : 68 ( $ПС_5 \times С$  скороспелая<sub>2</sub> — 1; Кавказ<sub>1</sub>  $\times$  Кавказ<sub>2</sub> — 18; Дайзо  $\times$  Кавказ<sub>2</sub> — 68). При этом видно, что исключительно устойчивая к вирусу японская порода Дайзо в состоянии проявить свои качества и в гибридной комбинации. Гусеницы ряда гибридов тутового шелкопряда различаются также по устойчивости к абитическим факторам. С. И. Черныш и В. А. Лухтанов (1979) обнаружили четкую корреляционную зависимость между устойчивостью к ВЯП и токсичностью для гусениц формалина. Гусениц четвертого возраста погружали в неразведенный 40%-ный формалин на различные сроки — от 5 до 80 мин, затем тщательно отмывали водой; критерием устойчивости служило количество гусениц, выживших через сутки после обработки или перелинявших на пятый возраст. Наибольшие различия по устойчивости к формалину обнаруживаются через сутки; раннее проявление повышенной устойчивости, по мнению авторов, не позволяет объяснить наблюдаемые различия неодинаковой чувствительностью гибридов к индуцирующему влиянию формалина, провоцирующего латентную инфекцию вируса. Метод позволяет отбирать гибридов с повышенной неспецифической устойчивостью к другим повреждающим или заражающим агентам. Предпринимались попытки различных исследователей селекционировать шелкопряда по признаку устойчивости к желтухе (Мадрахимов, 1969; Белов, 1972).

Наследственно обусловленная устойчивость или восприимчивость к желтухе находится в тесной зависимости от ухода за выкормкой и экологических условий, в которых развиваются гусеницы; одно из главных условий — оптимизация гигротермического режима. Гусеницы, выкармливаемые продолжительное время при повышенной температуре 28—30°С, заболевают желтухой значительно легче, чем при оптимальной температуре. Инкубационный период болезни значительно сокращается, когда гусениц содержат при высоких температурах. При низкой температуре он может затянуться до 13 дней, тогда как при высокой желтуха появляется через двое-трое суток. Известно, что восприимчивость шелкопряда к желтухе резко возрастает в летний период, когда ничтожно малые дозы вируса неизменно вызывают заболевание. При этом инкубационный период летом оказывается на два-три дня короче, чем весной, что существенно в эпизоотологическом отношении. Повышенной заболеваемости выкормок способствует не только высокая температура, но и вся совокупность условий, которые

ослабляют гусениц летом, включая ухудшение качества корма. Развитию заболевания способствует высокая влажность воздуха. По мнению Акквы, желтуха предпочтительно возникает в тех местах, где высокая влажность сочетается с пониженной температурой.

Из всего того, что вызывает отступление от оптимальных условий для жизнедеятельности тутового шелкопряда и в состоянии вызвать длительное ослабление его жизненного тонуса, существуют, видимо, детерминирующие (определяющие) факторы, непосредственно влияющие на состояние восприимчивости гусениц к вирусу, но пока доподлинно они неизвестны (Михайлов, Ковалев, 1955).

**Признаки и течение желтухи.** Заболеванию подвержены личиночная и куколочная стадии тутового шелкопряда. У гусениц желтуха чаще наблюдается в старших возрастах. Однако встречаются заболевшие насекомые и в младших возрастах, особенно в третьем.

Инкубационный период заболевания включает в себя два этапа: первый — инвазионный, в течение которого вирионы выходят из полиэдров, первоначально рассеиваются и внедряются в первично поражаемые клетки. Второй этап — просимптомный, непосредственно предшествующий возникновению внешних клинических признаков желтухи; последние вызываются цепью последовательных явлений: с размножением вируса часть клеток погибает, деятельность органов нарушается, изменяется нормальное состояние организма гусеницы, ее поведение и затем внешний вид.

При одномоментном заражении клеток достаточным количеством вируса кривая появления нового поколения зрелого вируса за короткий отрезок круто поднимается вверх. При слабом заражении необходимо накопление вируса в тканях в результате его размножения и последующего повторного самозаражения клеток. Этот же процесс может иметь место не только при инфицировании гусениц полиэдрами из окружающей среды, но и по мере активации в организме латентного вируса (Гершензон, 1956).

Судя по результатам экспериментального заражения, инкубационный период при нормальной выкормочной температуре (22—24°C), в старших возрастах варьирует от двух до пяти суток, в младших — несколько короче. При более низких температурах сроки проявления признаков заболевания удлиняются. Заболевшие гусеницы становятся бесспокойными, перестают есть, начинают расползаться и часто падают на пол с выкормочных стеллажей. В начальный период болезни внешние признаки отсутствуют и дальнейшее их появление связано с поражением клеток кожных покровов гусеницы.

Межсегментарные участки кожных покровов (интерсегментарная мембрана) набухают в виде кольцевых перехватов (рис. 56). Японские шелководы считают этот признак наиболее характерным для ядерного полиэдроза тутового шелкопряда и называют его фусидака, что означает «сильно сегментированные черви». Кожа напрягается, становится блестящей, напоминая промасленную бумагу. Желтушным гусеницам в последнем возрасте свойствен также признак ожирения: тело их сильно утолщается и несколько укорачивается, границы сегментов сглаживаются. Ожиревшие гусеницы лежат неподвижно, они



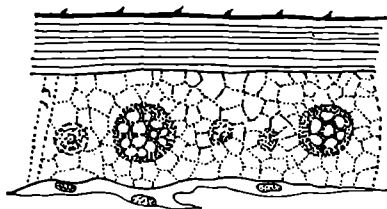
56. Желтушные гусеницы с набухшими межсегментарными участками кожных покровов.



57. «Ожиревшие» гусеницы при желтухе.

немного похожи на окукливающихся гусениц перед нимфальной линькой (рис. 57). Молочно-белый (фарфоровый) или соломенно-желтый, шафрановый цвет их обусловлены окраской гемолимфы.

Абэ и Хигути (1979) проследили на гистологических срезах за процессом образования пятен на коже гусениц при ядерном полиэдрозе. Пораженные вирусом гиподермальные клетки дегенерируют; между ними и экзокутикулой, в толще эндокутикулы, образуется пространство, в котором сосредоточиваются полиэдры и остатки погибших клеток, а в самой эндокутикуле откладывается коричневый пигмент. Гемоциты скапливаются под базальной мембраной в той части, где произошло отторжение пораженных вирусом клеток гиподермы и как бы подстраховывают процессы восстановления этого участка кожного эпителия. Накопление полиэдров в гипертрофированных ядрах клеток гиподермы показано на рис. 58.



58. Полиэдры в двух гипертрофированных ядрах клеток гиподермы; между ними нормальные ядра.

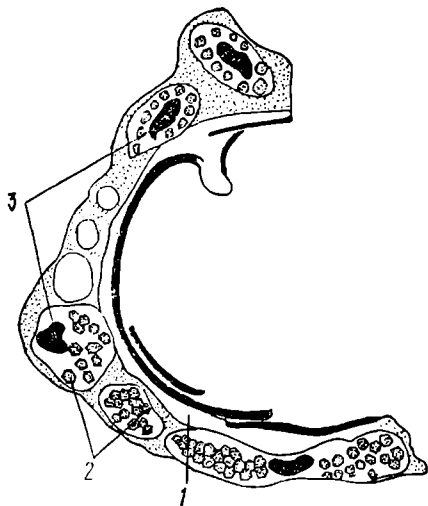
Во время линьки пятна удаляются вместе со сброшенной шкуркой. Покровы желтушных гусениц, клеточный слой которых в значительной степени разрушен, легко рвутся и из тела обильно вытекает мутная гемолимфа, молочно-белая или желтая, в зависимости от наследственно обусловленной пигментации крови. Изменение цвета больных гусениц, опухание их менее заметно в младших возрастах, но в старших они достаточно хорошо отличаются от здоровых блестящей, как бы промасленной кожей.

Ожиревшие гусеницы могут выделять шелк, но не завивают коконы, так как тело их лишено необходимой для этого гибкости. Если же у зрелой гусеницы болезнь не успеет развиться и она завьет кокон, гибель наступает позже в процессе завивки, а иногда после нее. Труп распадается, истекающая из него желтая или серо-бурая жидкость пачкает оболочку кокона. У довитых коконов эта жидкость обычно не выступает наружу и не образует пятен на их поверхности. Остатки трупа с помощью этой жидкости прилипают к внутренней поверхности стенки кокона и высыхают. При встряхивании глухари не издают характерного для нормальных коконов стука.

С момента появления у желтушных гусениц признаков заболевания проходит несколько дней, затем они становятся неподвижными и спустя один-два дня погибают.

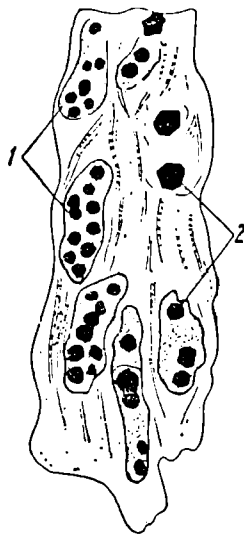
С момента появления у желтушных гусениц признаков заболевания проходит несколько дней, затем они становятся неподвижными и спустя один-два дня погибают.





59. Часть поперечного разреза через трахею желтушной гусеницы (по Богоявленскому, 1932):

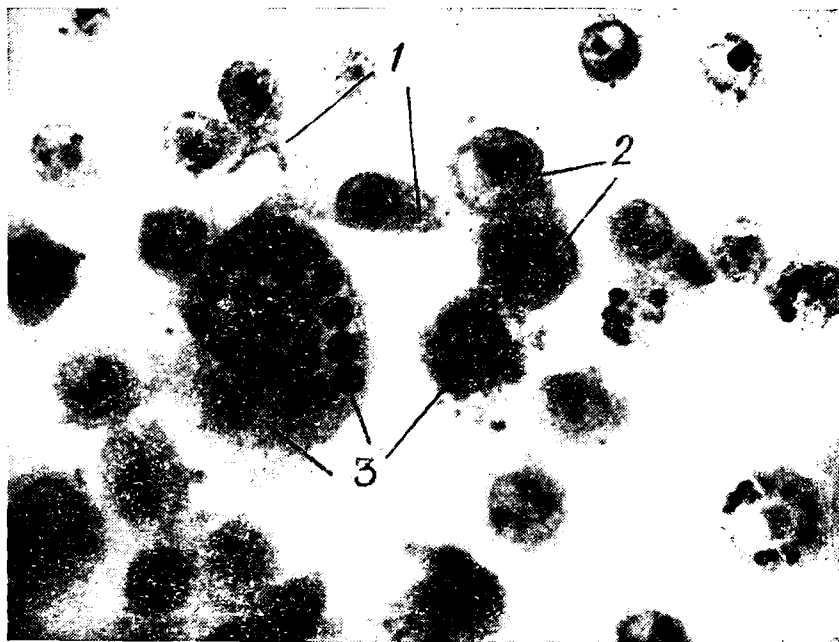
1 — тенидии, 2 — полиэдры, 3 — мертвые ядра клеток трахейного матрикса.



60. Участок внутренней части соединительнотканной оболочки семенника желтушной гусеницы (по Богоявленскому, 1932):

1 — ядра пораженных клеток; 2 — полиэдры.

**Очередность поражения вирусом органов и тканей.** Еще до того, как кровяные клетки и ткани начнут разрушаться, а мириады полиэдров попадут в гемолимфу и вместе с каплями жира из распадающегося жирового тела придадут ей мутный вид, гистологическая картина может продемонстрировать наличие очередности поражения органов и тканей гусениц вирусом желтухи. Сначала полиэдры появляются в гемсцитах, исключая одну категорию этих клеток — сферулоциты, которые, видимо, не поражаются вирусом; затем они обнаруживаются в клетках гиподермы, трахейного матрикса и наружных лопастях жирового тела. Когда клетки первой группы почти разрушены, полиэдры можно увидеть во внутренних лопастях жирового тела, в соединительнотканной оболочке мышц, аналогичной ткани половых желез (рис. 59—60). Как исключение их обнаруживали в стенках мальпигиевых сосудов и в энцитах. В ядрах клеток мышечной ткани, слюнных и шелкоотделительных желез они встречаются крайне редко, а в нервных и половых клетках не были найдены вовсе. Правда, иногда в стенках шелкоотделительных желез и в брюшных нервных ганглиях наблюдаются единичные ядра, наполненные полиэдрами, но, по мнению Богоявленского (1932), эти ядра принадлежат заползшим сюда гемоцитам. Полагают, что ядерный полиэдроз чешуекрылых не поражает клетки эпителия средней кишки.



61. Полиэдры в зараженной вирусом культуре клеток оболочки яичника гусеницы: характерные для культивируемых клеток псевдоподии исчезают, клетки округляются, возникают полиэдры, по мере их увеличения размеры ядер сильно возрастают. Окраска по Ваго-Амаржье, увелич. х 1060. Лаборатория цитопатологии в Сант-Кристоль-дез-Алес;

1 — здоровые клетки с псевдоподиями; 2 — зараженные, округлые, начало гипертрофии ядра; 3 — полиэдры.

Вирус ядерного полиэдроза является высокоспециализированным кариотрофом (греч. *карион* — ядро, *трофе* — питание). В разгар заболевания, когда клетки тканей первой очереди поражения оказываются совершенно разрушенными в тканях и органах последующей очереди полиэдры только еще начинают образовываться (рис. 61). Внутри отдельного ядра все полиэдры находятся в одинаковой стадии развития, но при исследовании нескольких ядер одного и того же участка ткани наблюдается разновозрастность их состояния.

Отмечена повышенная чувствительность тканей гусениц тутового шелкопряда к присутствию вируса ядерного полиэдроза; она выражается в нарушениях физиолого-функционального характера у тканей, среди которых встречаются клетки с явными цитопатическими изменениями, вызванными вирусом. По данным Абэ (1977), у здоровых гусениц во время линьки базальная мембрана клеток жирового тела исчезает, клетки эти приобретают автономию на весь период личиночной линьки, после чего структура жирового тела восстанавливается; у желтушных гусениц подобная регенерация распавшегося жирового тела не наблюдается. Это относится даже к тем случаям, когда по состоянию заразившихся гусениц линька их оказывается еще возможной,

Исследуя влияние вирусной инфекции на формирование кутикулы у шелковичных червей, Абэ (1978) установил, что заражение непосредственно после линьки вызвало в эпидермальных клетках через двое суток цитопатические явления, обычно наблюдаемые у здоровых гусениц в промежутках между линьками; отложения в эпидермальных клетках гликогена не происходит и развитие клеточного слоя в этот период — его утолщение за счет удлинения клеток — задерживается. Если же инфицированных клеток немного, отложение гликогена в эпидермисе протекает нормально и новая кутикула заканчивает формирование как обычно, спустя некоторое время после линьки.

**Диагностика желтухи.** Болезнь проявляется настолько характерно, что внешние признаки чаще всего служат достаточным основанием для бесспорного, казалось бы, диагноза. Менее отчетливо выражена желтуха в младших возрастах. Известны случаи, когда линяющих шелковичных червей принимали за желтушных, так как между ними в младших возрастах действительно есть некоторое сходство. Неопытный наблюдатель может принять наследственно окрашенных в желтый цвет гусениц, встречающихся в третьем возрасте, за желтушных. В сомнительных случаях следует помнить, что гемолимфа желтушных гусениц не прозрачная, а мутная и окрашена в желтый или молочно-белый цвет.

Вместе с тем у других вирусных болезней отмечены сходные внешние признаки. Поэтому при диагностировании инфекционных заболеваний чаще всего стремятся установить присутствие возбудителя. Возбудителя желтухи, в отличие от ряда других вирусных болезней, можно обнаружить в обычном световом микроскопе, увеличение  $\times 600$  (объектив  $\times 40$ , окуляр  $\times 15$ ), по наличию полиэдров. Если же в зараженном шелкопряде, грене и других объектах полиэдров нет, вирус может быть обнаружен при электронномикроскопическом исследовании или еще быстрее и легче — серологически. Прослежена особенность хемилюминесценции кожи и гемолимфы тутового шелкопряда при заражении вирусом ядерного полиэдроза (Прилуцкий, Кириченко, 1979). Однако эти и некоторые другие методы исследования (например, радиографический) не всегда доступны даже для научного учреждения, не говоря уже о производственной обстановке.

В неокрашенных препаратах из растертых гусениц, заболевших желтухой, видны полиэдры, жировые капли, ураты и другие кристаллы, фрагменты клеток, частицы пищи. Только что погибшие гусеницы могут быть почти свободны от бактерий. Если же они есть, то это означает, что после гибели гусениц прошло некоторое время и бактерии в ее открытых полостях успели размножиться, или же, что не является редкостью для желтухи, отмечена смешанная инфекция, особенно часто встречающаяся на поздневесенних и летних лабораторных выкормках.

В конце заболевания, когда гемолимфа превратится в мутную жидкость, содержащую множество полиэдров, их не трудно определить по форме и по преломляющей способности. В нативном препарате они несколько напоминают капельки жира и, при отсутствии опыта, их не всегда обнаруживают среди массы жировых шариков или кри

сталлов урата. Между тем полиэдры отличаются от этих своих более или менее постоянных спутников в препарате наличием граней, которые видны при соответствующей освещенности поля зрения и при возвратно-поступательном вращении микрометрического винта микроскопа. Наконец, жировые тельца, в отличие от полиэдров, окрашиваются суданом и растворимы в эфире. Особенно полезны специальные методы обработки препарата в начальной стадии заболевания, когда в гемолимфе присутствует еще небольшое количество свободно плавающих полиэдров, а также во всех сомнительных случаях и при желании получить демонстрационный препарат.

Комарек и Брейндель препарат, обработанный содой, окрашивали слабым раствором Гимза с дополнительной окраской эозином. Швецова предложила красить эозином после обработки 1%-ной NaOH. Акква красил подкисленные и подогреваемые препараты триацидом Эрлиха. Полиэдры хорошо окрашиваются пикриновой кислотой; окраска может производиться не только в мазках и гистологических срезах, где ее дополняют фонирующие красители, но и в раздавленной капле жидкости под покровным стеклом. Особенно эффективна окраска полиэдров пикриновой кислотой с фонированием препарата малахитовой зеленью (метод А. И. Пахила). Полиэдры вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда окрашиваются равномерно, но иногда обнаруживается исчерченность и образования, расположенные в центральной части тельца, которые похожи на мелкие, преломляющие свет зернышки.

В гистологических исследованиях чаще всего в качестве краски используют прописи гематоксилина. Еще С. Провацек, изучая желтуху тутового шелкопряда, фиксировал гистологический материал смесью раствора сулемы и 90%-ного спирта (2 : 1), затем — после промывки 60%-ным спиртом с йодом (для удаления сулемы) — окрашивал срезы разведенным гематоксилином Гранакера. Сейчас пользуются многими другими методами фиксации и окраски для патогистологических исследований насекомых.

Существует ряд лабораторных приемов исследования гусениц, которыми, в известных случаях, также можно воспользоваться для ранней диагностики желтухи на выкормках. Один из этих методов Эшерих и Мигаюма (1911) впервые применили при отборе для опытов здоровых личинок бабочки монашенки. Кровь каждой личинки исследовали два-три раза с промежутком в несколько дней. Если при последнем обследовании полиэдерные тельца не были найдены ни в плазме гемолимфы, ни в гемоцитах, гусениц признавали здоровыми и пригодными для опыта. Глезер и Чепман (1913) применили эту, так называемую кровяную пробу при исследовании вилта непарного шелкопряда. Авторы подтвердили, что такое исследование служит достаточно верным указанием на отсутствие у насекомого полиэдроза: двукратного исследования с промежутком в несколько дней оказывается достаточным, чтобы установить отсутствие у насекомого полиэдерной болезни.

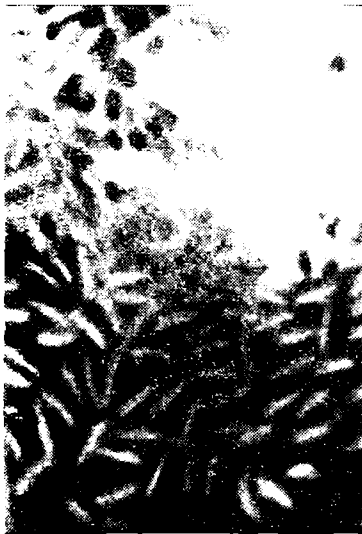
Биологические пробы (обнаружение патогена путем заражения исследуемым материалом восприимчивого организма) в отношении

этого вируса не являются в полной мере убедительными, так как подопытное насекомое, используемое для обнаружения вируса, может оказаться носителем латентной инфекции.

Надежными, быстрыми и удобными для производственных условий являются серологические реакции. Впервые у нас в отношении вируса желтухи они испытаны Лягиным (САНИИШ, 1938), но их более широкое использование станет возможным только после того, как будет налажено в научно-исследовательских институтах производство диагностической антисыворотки.

**Эпизоотология желтухи.** Основной первоисточник распространения желтухи — тутовый шелкопряд; помимо больных гусениц, носителем вируса может быть грена. Насколько опасен в эпизоотологическом отношении этот источник, как часто он дает о себе знать и каков характер эпизоотий, вызванных при его участии, данных слишком мало, чтобы иметь об этом достаточно надежные суждения. Опасным способом распространения желтухи является латентная инфекция; размеры участия этого источника зависят от степени распространенности латентного вируса среди гусениц выкармливаемых популяций, интенсивности их зараженности, степени устойчивости латентного состояния и наличия пусковых факторов, активирующих провирус. К сожалению, шелководы пока слабо вооружены методически, чтобы уверенно отвечать на эти вопросы. Основным и, видимо, единственным инфекционным началом для первичного заражения гусениц из экзогенных источников, являются полиэдры; участие в заражении посредством внешней среды вирионов и нуклеокапсидов вируса, как экзогенных агентов, исключено. Воратами инфекции, помимо кишечника, называют кожные покровы и дыхальца. По данным японских ученых, естественными воротами инфекции может стать только поврежденная кожа; такой путь инфицирования возможен в результате скарпификации (панесения царапин) кожных покровов крючьями ложных ножек, загрязненных вирусом. Поэтому один из решающих факторов, способствующих распространению вируса желтухи, — чрезмерная плотность размещения гусениц на выкормочной площади, а наиболее, опасный срок, во время которого легче повреждаются покровы — линька и первые часы послелинчного периода.

Гусеница — основная стадия развития шелкопряда, воспроизводящая вирус желтухи в отличие от бабочки, грены и, быть может, куколки. Вне жизнедеятельной растущей клетки вирус не размножится; в растущей ткани его численность возрастает очень быстро (рис. 62). В культуре клеток из соединительной оболочки женских гонад количество вируса желтухи увеличилось через четыре дня в 1000 раз, а через девять дней — в 10 000 раз по сравнению с первоначальным числом (Треджер, 1935). В результате девяти пассажей, проведенных Треджером, примерно, в течение трех месяцев, количество вируса в культурах клеток увеличилось в 156 250 000 000 раз. По данным Л. М. Тарасевич (1975), в теле больших насекомых накапливаются полиэдры, масса которых составляет 10—20% от массы гусеницы. В 10 мг воздушно-сухой навески из тканей насекомого содержится 5 млн. полиэдров. По данным Г. Бергольда, ЛД<sub>50</sub> для



62. Вирионы, освобождающиеся при растворении слабей щелочью полиэдров ядерного полиэдроза непарного шелкопряда — демонстрация интенсивности заражения инфицированного насекомого (Эндрюс, 1967).

вируса ядерного полиэдроза составляет  $2,5 \times 10^{-6}$  г, или 0,6—1,2 млн. полиэдрных телец. Следовательно, одна погибшая от желтухи гусеница тутового шелкопряда в пятом возрасте способна стать источником заражения от 500 до 1000 гусениц.

Вирус выделяется из организма желтушных гусениц с линочной жидкостью и шкуркой (экзuviем), а также через ранки на коже, из которых выходят наружу в капле мутной гемолимфы мириады полиэдров и вирионов. По данным японских авторов, вирус желтухи с экскрементами не выделяется, так как в эпителии средней кишки полиэдров он не образует. Обильным источником вируса являются трупы желтушных гусениц, которые очень легко подвергаются механическому повреждению, загрязняют выкормочную поверхность, помещенные выкормки и прилегающие к нему участки.

Через сколько дней с момента заражения в условиях нормального гигротермического режима выкормки гусеницы становятся источником заразы? Инкубационный период болезни в этих условиях продолжается 4—7 дней. За этот срок полиэдры, попавшие в среднюю кишку с листом шелковицы, растворяются (через полтора-два часа с момента заглатывания), вирус попадает в общую полость тела и внедряется в клетки тканей (через 6—12 ч с момента заглатывания полиэдров). Через два-три дня в пораженных клетках гусеницы происходят цитопатические изменения и набухание ядер, еще через два-четыре дня в ядрах появляются мелкие полиэдры, гусеницы приобретают первые внешние признаки заболевания и инкубационный период можно считать законченным. В течение последующих одного-трех дней внешнее проявление заболевания усиливается; возникает возможность загрязнения окружающей среды вирусом, которая возрастает до предела на 7—8-й день с момента заражения, но особенно после гибели и разрушения трупов. Эти сроки могут несколько сокращаться или значительно увеличиваться; кроме того, заражение гусениц в инфицируемой обстановке вряд ли носит одномоментный характер.

В эпизоотологическом отношении наиболее вероятный источник желтухи — расположенные по соседству больные выкормки. Переносчиком инфекции может оказаться обслуживающий персонал выкормок, если в ответ на возникшую эпизоотическую ситуацию не будут приняты карантинные меры предосторожности.

В условиях эксперимента установлена возможность заражения шелковичных червей ядерным полиэдрозом от других видов чешуекрылых, в том числе распространенных вредителей хлопчатника; среди них чаще других встречаются совки — подлинны очаги многих вирусных инфекций. Средством доставки вируса на выкормки могут быть пыльные листья шелковицы с тутовых насаждений по обочинам полей, загрязненные большими насекомыми.

Вирус в полиэдрах хорошо сохраняется во внешней среде, так как он достаточно устойчив против действия на него физических факторов. Поэтому внешним источником для заражения, помимо больных выкормок, может оказаться вирус, сохранившийся в червоводне или на прилегающей территории после заболевшей выкормки прошлого года.

Х. Ф. Эванс с соавторами (1980) предложили метод количественного определения вируса ядерного полиэдроза в почве. Ранее Томас и др. (1972) и Нукухара (1973) разработали методы определения содержания полиэдров в почве по результатам скармливания гусеницам искусственного корма, зараженного суспензией анализируемого почвенного образца. Этот полуколичественный метод не позволяет получать абсолютные величины содержания полиэдров в почве с высокой степенью точности. Процедура экстрагирования по методу Эванса и др. состоит из двух этапов. Сначала суспензированный образец почвы подвергается ультразвуковой дезинтеграции с последующим отстаиванием с десорбентом. Полученный осадок ресуспензируют и вторично подвергают первоначальным операциям. Слив супернатанта центрифугируется с умеренной скоростью, декантированный супернатант вновь центрифугируется, но с большей скоростью, осадок ресуспензируется в воде и подвергается вторично такому же скоростному центрифугированию. Из полученного осадка готовят препарат для микроскопического анализа на присутствие полиэдров. От внесенного количества полиэдров в концентрации от  $6 \cdot 10^6$  до  $1 \cdot 10^8$  единиц на 25 г почвы, в препаратах при микроскопировании обнаруживается в среднем 46% полиэдров.

Доставка вируса экзогенного происхождения осуществляется различными переносчиками, посещающими выкормку: мухами, муравьями, осами, сверчками, мышами, лягушками. Эффективно распространяют вирус насекомоядные птицы, как это показали И. А. Кириченко и А. И. Рыхлицкая (1977). Наблюдения проводились ими в течение двух лет на зараженных партиях воробьев и скворцов. Для выяснения степени выживаемости вируса, прошедшего через пищеварительный тракт, птицам спаивали 2 мл суспензии полиэдров с титром 10 тыс. мм<sup>3</sup>. Суспензию полиэдров наносили на оперение, лапки и клюв. Собранный материал — экскременты, смывы с оперения и лапок — использовали для выделения полиэдров. Затем суспензию их скармливали с листом шелковицы в течение суток гусеницам третьего и пятого возрастов. В партиях, зараженных в третьем возрасте, оказалось 20% желтушных гусениц и 7,7% коконов-глухарей, а зараженных в пятом возрасте — 56% заболевших гусениц и 11,4% коконов-глухарей. Выяснилось, что только при однократном поедании птицами заразного мате-

риала они могут выделять его с экскрементами в течение 12 ч или переносить на лапках и оперении в течение пяти суток. Авторы напоминают при этом, что, по литературным источникам, вирус ящура воробьи способны переносить на расстояние 40 км, а скворцы — до 80 км. Следовательно, выбрасывание с подстилкой больных и мертвых гусениц, где они могут быть съедены птицами, недопустимо. Не только свободноживущие пернатые, но и домашние птицы в состоянии распространять инфекцию из отходов выкормки.

### 3.4. Цитоплазматический полиэдроз

**Открытие нового вируса.** Болезнь, которая вызывает фляшериеподобную гибель выкормок тутового шелкопряда, названа цитоплазматическим полиэдрозом, открыта в 1934 г. японским ученым Ишимори. Первостепенное значение это заболевание не считалось заслуживающим внимания, пока не было установлено, что оно широко распространено в Японии (Оба с соавторами, 1955; Куриму, 1955).

Вирус поражает клетки эпителия средней кишки гусеницы, где образует полиэдры (рис. 63). От вируса ядерного полиэдроза он отличается содержанием РНК, а не ДНК, сферической, а не палочковидной формой вириона и формированием полиэдров не в ядре клетки, а в цитоплазме.



63. Ультрамикротомированный срез через среднюю кишку гусеницы пихтовой хвоевлетки, зараженной вирусом цитоплазматического полиэдроза с молодыми (мелкими) и зрелыми (крупными) полиэдрами: в глубокой складке эпителия видны многочисленные ворсинки (показано стрелкой). Фиксация осмиевой кислотой, окраска урсил ацетатом, электронный микроскоп, увелич.  $\times 800$  (Брэд, 1966).

**Систематическая характеристика.** Систематическая принадлежность вируса цитоплазматического полиэдроза (ВЦП) пока носит предположительный характер: его рассматривают как самостоятельную группу вирусов насекомых, наиболее сходную с семейством реовирусов. Название это образовано первыми буквами трех слов: respiratory—enteric—orphans («дыхательный орган-кишечник-лишающий», в смысле «поражающий»). Реовирусы — семейство голых вирусов с вирионами кубической симметрии, содержащими двуничатую РНК; впервые описаны Сейбиным (1959). Все три серотипа этого вируса широко распространены, являются общими для человека и животных, связаны с дыхательными органами и кишечным трактом и вызывают у млекопитающих энтероколиты и катары верхних дыхательных путей.



Вирус образует цитоплазматические включения, состоящие из массы вирионов, и чрезвычайно легко адаптируется к культивированию на тканях различного происхождения. Реовирусы отличаются от энтеровирусов (в том числе поражающих насекомых) двунитчатой РНК (а не одностичатой, как у энтеровирусов), в два-три раза более крупными вирионами (60—90 нм), устойчивостью к эфиру и хлороформу, к повышенной температуре (сохраняет жизнеспособность при 56° С в течение 2 ч) и обильным выделением вируса из пораженного кишечного канала.

**Распространенность среди насекомых.** Типовым видом является вирус цитоплазматического полиэдроза тутового шелкопряда. Среди свободноживущих представителей энтомофауны ВЦП впервые обнаружен у гусениц медведицы обыкновенной и медведицы деревенской (Смит, Вичоф, 1950). Аруга и Танада (1971) составили список 168 видов бабочек, гусеницы которых поражаются ВЦП, а также два вида сетчатокрылых, три — двукрылых и один — перепончатокрылых. Эти сведения не совпадают с теми, которые приведены в обзоре Дэвида (1975) — 141 вид чешуекрылых, но все эти и им подобные данные однозначно свидетельствуют о неизмеримо большей поражаемости этого отряда насекомых. Позже ВЦП был найден у комара анофелеса, у личинок хирономид — длинноусых двукрылых и у ряда других. Впрочем, как отмечается в обзорах, нет еще достаточной уверенности — все ли виды в упомянутых случаях поражились именно этим, точно идентифицированным вирусом.

Широкому распространению ВЦП в природе содействует относительно низкая степень его видовой специализации. Результаты многочисленных опытов перекрестного заражения насекомых, в том числе гусениц и куколок тутового шелкопряда, говорят о широком видовом спектре поражаемых насекомых отдельными штаммами вируса. Так, Нейлсон (1964) испытал инфекционность ВЦП зимней пяденицы на 18 видах бабочек и двух видах перепончатокрылых и на 11 видах получил положительные результаты, в том числе на гусеницах тутового шелкопряда.

**Полиэдры ВЦП.** Отличительная особенность ВЦП, так же как вируса ядерного полиэдроза — полиэдры-многогранники, выполняющие по отношению к вирионам защитную функцию; вирус в полиэдрах стойко выдерживает внешние воздействия, изолированные же из них вирионы более чувствительны. Это в особенности относится к спирту, хлороформу, дезоксихолевой (желчной) кислоте, но не к эфиру и не к щелочи (рН 11) или к комнатной температуре, действие которых они сравнительно хорошо переносят. Вирионы, заключенные в полиэдры, длительное время сохраняют инфекционную способность в естественных условиях, если защищены от прямых солнечных, главным образом ультрафиолетовых лучей.

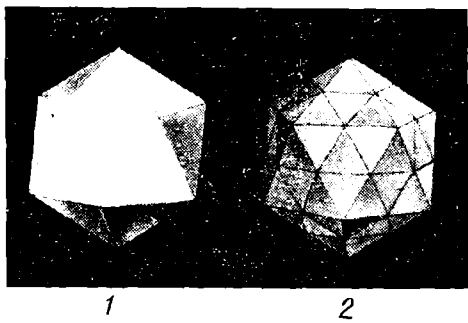
Очертания полиэдров ВЦП у тутового шелкопряда варьируют; с помощью сканирующего электронного микроскопа установлены четыре формы: ромбический додекаэдр, тетрагональный тритетраэдр, куб и почти глобулярная (шаровидная) форма. Наиболее распространен ромбический додекаэдр, который в поле зрения светового микроскопа (в проекции его на плоскость) имеет вид шестигранника (гек-

саэдра). Размеры полиэдров у тутового шелкопряда (0,5—15 мкм) зависят от участка средней кишки, где они образованы, от возраста (размера) гусениц и величины клетки, наконец, от их возраста: молодые полиэдры мельче. Есть ссылки на зависимость размера и формы от принадлежности к штамму и вирулентности вируса.

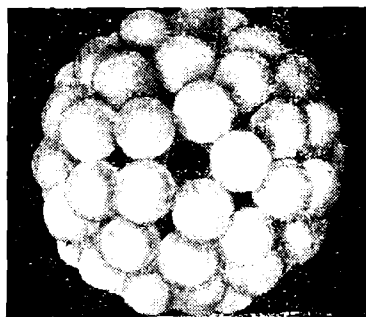
Более очевидна связь формы полиэдров с видом насекомого, в котором они образованы, а не только с генетической обусловленностью, вызванной особенностью штамма или варианта вируса. Е. Абэ (1977) изучал кристаллографические формы полиэдров ВЦП клещевинного шелкопряда, японского представителя семейства коконопрядов и непарного шелкопряда. Полиэдрами, образованными в эпителиальных клетках гусениц этих трех семейств чешуекрылых, были заражены только что вылупившиеся гусеницы и гусеницы второго возраста тутового шелкопряда. Полиэдры, образованные собственными вирусами, у гусениц коконопряда и непарника имели форму ромбического додекаэдра или додекаэдра, ограниченного 12 шестиугольниками, у которых шесть вершин были усечены маленькими квадратами. У тутового шелкопряда, зараженного этими вирусами, через 48 ч появились полиэдры с тетрагональными плоскостями, а через 96 ч после заражения — пента-, гекса- и октагональными плоскостями. Квадратные поверхности кубического додекаэдра у тутового шелкопряда становились прямоугольными, а некоторые поверхности ромбического додекаэдра — пяти- и шестиугольными. Полиэдры ВЦП клещевинного шелкопряда не меняли обычной формы, когда образовывались в эпителии средней кишки тутового шелкопряда, зараженного этим вирусом.

**Характеристика вирионов.** Вирионы ВЦП тутового шелкопряда, содержащиеся в полиэдрах, по форме относятся к икосаэдрам (двадцатигранникам) кубического типа симметрии, т. е. к глобулярным вирусам, лишенным оболочки развития (голым), и имеют удвоенную нить РНК. Футляр вириона, его капсид, состоит из двух concentрических белковых оболочек с диаметрами соответственно 45 и 69 нм. Наружная оболочка состоит из 12 капсомер, связанных с внутренней оболочкой 12 трубчатых образованиями. Выступающие из капсомер полые трубочки заканчиваются на вершинах икосаэдра сферическими тельцами (рис. 64—65). Полагают, что эти тельца выполняют функцию рецепторов во время контакта вируса с инфицируемой им клеткой. Морфологические особенности строения ВЦП тутового шелкопряда относятся также и к ВЦП других насекомых.

Как показали опыты с полиэдрами ВЦП американского кольчатого коконопряда, содержимое сердцевинки вириона может быть освобождено обработкой ацетоном от протеинового футляра (капсида) с высоким выходом РНК; этот метод может быть использован и для ВЦП других насекомых (Дэвид, 1975). РНК ВЦП тутового шелкопряда состоит из нескольких сегментов разной длины, молекулярная масса 13—18 млн. дальтон. Соединены ли эти сегменты внутри вириона и как именно — не установлено. У ВЦП тутового шелкопряда все 10 сегментов имеют идентичное концевое строение, содержащее у одной полинуклеотидной цепочки цитозин, а у другой — урацил. РНК ВЦП



64. 1 — 20-гранник; 2 — 60-гранник.



65. Макет симметричной упаковки 60 белковых молекул на поверхности икосаэдра — формы сферических вирионов.

кольчатого коконопряда и тутового шелкопряда могут быть разделены на две разные по численности компонентов электрофоретические фракции: у коконопряда выявилось шесть компонентов, а у тутового — девять (по другим данным — 10). Следовательно, РНК этих двух цитоплазматических вирусов отличаются друг от друга в структурном отношении. Результаты серологического анализа показали, что вирионы кистехвоста и американского кольчатого коконопряда совершенно отличны от вирионов тутового шелкопряда; в то время как антигены вируса кистехвоста и коконопряда почти идентичны и антигенный состав их различается только количественно, с вирусом тутового шелкопряда у них только часть общих для всех ВЦП антигенов. По составу аминокислот в протеине, экстрагированном из свободных вирионов, кистехвост и кольчатый коконопряд были подобны, тогда как тутовый шелкопряд существенно отличался.

**Пероральное заражение вирусом.** Полиэдры, проглоченные с листьями шелковицы, под действием кишечного сока в средней кишке и пищеварительных ферментов растворяются и находящиеся в них вирионы освобождаются. Сходные результаты получают вне организма насекомого, помещая полиэдры в слабый водный раствор соды. Полиэдры ВЦП растворяются в щелочи несколько труднее, чем у ядерного полиэдроза. Кроме того, голые вирионы цитоплазматического полиэдроза более прочно связаны с белковым матриксом полиэдра, чем вирионы вируса желтухи. Хотя свободные вирионы спустя некоторое время разрушаются в содовом растворе, по данным Хаяши и Каварабаты (1970), более половины находящихся в средней кишке вирионов (от их общей численности, включая тех, что в полиэдрах) оказались в свободном состоянии; часть из них попадает в просвет кишечника вместе с содержимым полуразрушенных и отторгнутых клеток эпителия.

Ватанабе (1968) проследил за судьбой проглоченных шелковичным червем полиэдров и временем их появления в экскрементах. Нормальный вид экскрементов изменяется спустя некоторое время после

скармливания гусеницам наиболее типичных для ВЦП гексагональных (шестигранных) полиэдров. Экскременты, собранные в день скармливания гусеницам полиэдров, содержали инфекционноспособный вирус, но спустя три-пять дней после заражения экскременты — по результатам скармливания их — оказались незаразными. После пяти дней полиэдры несколько измененной неправильной формы вновь появились в экскрементах. По мере развития болезни количество нормальных гексагональных полиэдров в экскрементах начинало возрастать; особенно многочисленными они становились в последней стадии болезни, когда в результате их скопления экскременты становились белыми.

По мнению Ватанабе, в первый день исследования экскременты содержали только те полиэдры, которые были проглочены гусеницами. Полиэдры же, появившиеся в экскрементах через несколько дней, были сформированы в зараженном вирусом эпителии; после разрушения эпителиальных клеток они были выделены вместе с экскрементами. В начале заражения, когда функция секретирующих клеток эпителия не была еще нарушена и кишечный сок был в норме, полиэдры испытали на себе его действие и оказались несколько деформированными. По мере развития болезни щелочность кишечного сока постепенно снижалась, а количество правильно оформленных, шестигранных полиэдров возрастало. У гусениц пятого возраста рН кишечного сока 10,5—10,7; повышенный уровень щелочности способствует наиболее полному растворению полиэдров и освобождению вирионов. Но когда эпителий кишечника сильно поражен вирусом, рН снижается до 9,5 и менее, полиэдры частично не растворяются или растворяются неполностью, основная масса их выделяется с экскрементами и количество их продолжает возрастать.

**Проникновение вируса в клетку и его репродукция в ней.** Дальнейший процесс миграции вируса на пути к поражаемой им клетке не ясен. По-видимому, чтобы достичь эпителиальных клеток средней кишки, он должен пройти сквозь перитрофическую мембрану. О процессе заражения самих клеток судят главным образом по наблюдениям над проникновением вируса, помещенного в культуру клеток (Кобаяши, 1971). Вирион одним из выступов, закрепляющихся сферическими тельцами, прикрепляется к поверхности клетки. Затем содержимое сердцевинки вириона по полюму выступу капсида проникает в ее цитоплазму. Структура, окружающая сердцевину вириона, остается на поверхности атакованной вирусом клетки. Репликация вирусной РНК происходит внутри клеточного ядра, после чего она перемещается в цитоплазму. К этому времени в цитоплазме инфицированной клетки отмечается появление двух неправильных по форме, более плотных участков, которые предшествуют возникновению сердцевинной структуры будущих вирионов. В них выявляются мелкие, электронно-плотные зерна, диффундирующие по направлению к виrogenной строме, где формируется капсид — белковая оболочка вириона. Обособление вироплазмы в цитоплазме клетки наблюдается на пятый день после заражения гусеницы. Полиэдры формируются на поверхности виrogenной стромы, куда диффундируют нити поли-

эдренного белка, располагаясь среди вирусных частиц и окружая их; одновременно с этим белок подвергается процессу кристаллизации.

Ватанабе (1966, 1967) изучал синтез РНК в пораженных вирусом клетках с помощью радиоавтографии и использования меченого триптом (Н<sup>3</sup>) уридина — предшественника РНК. В инфицированной вирусом клетке через два-пять дней после заражения большая часть меченого уридина появляется в ядерной РНК и некотором количестве — в цитоплазматической. В ядрах зараженных клеток метка появляется в больших количествах на поверхности нуклеолей — месте, где сосредоточена рибосомальная РНК. Сравнивая картину осаждения метки у здорового и зараженного шелкопряда, Ватанабе смог подтвердить, что именно нуклеоли являются местом синтеза вирусной РНК. Радиоавтографирование зараженных клеток на протяжении 24 ч показало, что масса радиоактивных зерен густо покрывает поверхность ядра и сосредоточивается в цитоплазме апикального (верхушечного) участка эпителиальных клеток. Вирогенная строма образуется в этом же районе клеток, точно так же как при цитоплазматическом полиэдросе у других насекомых. С помощью электронного микроскопа им было прослежено, как вирусная РНК, образованная в ядре клетки и переместившаяся в ее цитоплазму, участвует в сборке вирионов, а последние заключаются в полиэдры.

**Симптомы цитоплазматического полиэдроса.** Вирус заражает цилиндрические клетки средней кишки и значительно реже — бокаловидные. По мере развития вируса клеточные компоненты — митохондрии, рибосомы и др. разрушаются, исчезают или располагаются по периферии клетки. Ядра клеток в процессе развития цитопатических явлений почти не изменяются, если не считать небольшого смещения их в цитоплазме, незначительной складчатости и некоторых других, не всегда заметных признаков деформации. В результате заполнения вирионами и полиэдрами клетка увеличивается в размерах, оболочка ее разрывается, а она сама вытесняется из эпителия регенеративными клетками, отторгается и оказывается в просвете кишечника. Хотя цитоплазматический полиэдрос достаточно жестко приурочен к узкой зоне поражения, частичный или полный вывод из строя функции средней кишки у личинки влечет за собой нарушение питания всего организма со всеми вытекающими отсюда последствиями, затрагивающими как энергетический, так и пластический обмен веществ организма. Первоначально внешние признаки заболевания проступают не очень отчетливо. По мере развития болезни гусеницы теряют аппетит, перестают реагировать на свежие листья шелковицы. Утрата пищевого рефлекса сопряжена с сокращением секреторной деятельности эпителия средней кишки, которое постепенно распространяется и на не оккупированную вирусом соковыделительную зону. Количество экскрементов сокращается, они становятся мягкими, плохо отпрессованными, сырыми; к концу болезни экскременты приобретают тускло-беловатый, белесый вид, вызванный присутствием большой массы полиэдров.

**Диагностика.** Симптомы этого полиэдроса, по наблюдению япон-

ских исследователей, присущи и болезням фляшериеподобного типа. Поэтому по одним только внешним признакам различить эти болезни очень трудно.

Заподозрить заражение этим полиэдрозом можно на основании того, что гусеницы выделяют мягкие («сырые») экскременты беловатого оттенка, подстилка под ними часто оказывается выпачканной. Проще всего и надежнее вскрыть гусениц: при цитоплазматическом полиэдрозе средний отдел кишечника окажется мутно-белым; однако следует быть осторожным с окончательным суждением, так как и этот признак может быть вызван другими причинами. Побеление и помутнение, как правило, распространяется от заднего конца средней кишки к переднему, но при сильном развитии болезни может выйти за пределы этого участка, когда пораженными вирусом окажутся клетки переднего и заднего отделов кишечника. Если часть средней кишки заболевшей гусеницы поместить на предметное стекло, то при 600-кратном увеличении микроскопа в нативном препарате (в капле воды под покровным стеклом) можно увидеть полиэдры в цитоплазме цилиндрических всасывающих клеток, которые ссодоточены в задней трети этого отдела; в бокаловидных (секретирующих) они встречаются значительно реже.

**Эпизоотологические особенности заболевания.** В отличие от ядерного полиэдроза, при котором зараженные гусеницы не выделяют с экскрементами полиэдров, при цитоплазматическом полиэдрозе по мере того, как пораженные вирусом клетки кишечника разрушаются, образовавшиеся в них полиэдры попадают в пищеварительный канал и выделяются с экскрементами. В результате они становятся главным источником перезаражения гусениц, прежде всего на участках инфицированной таким путем выкормочной поверхности. Продолжительность инкубационного периода болезни зависит от возраста гусениц, температуры воздуха и дозы вируса, попавшего в организм шелкопряда. Если гусениц инокулировать достаточно вирулентным вирусом, способным вызвать их гибель, а температура в выкормочном помещении не ниже 25°С, большинство из них умирает на 8—10-й день. В отличие от эпизоотии, вызванной ядерным полиэдрозом, который характеризуется широкими распространенными участками сплошного поражения поголовья гусениц, распространение цитоплазматического полиэдроза носит разреженный, диффузный характер, даже если численность заболевших высокая.

Некоторые гусеницы пятого возраста, зараженные ВЦП, могут выжить и превратиться в куколок и даже бабочек. По размерам такие бабочки обычно меньше здоровых; иногда крылья у них недоразвиты или полностью редуцированы. Под влиянием ВЦП у самок оказываются менее развиты яичники и ооциты, что приводит к снижению плодовитости. Ватанабе и Намура (1971) впрыскивали в гемоцель (общую полость) молодых куколок шелкопряда ВЦП и вели наблюдение за плодовитостью и оплодотворяемостью бабочек от инфицированных куколок; плодовитость бабочек-вирусоносительниц и оплодотворенность кладок несколько снижались даже в тех случаях, когда только одна из спаренных бабочек была заражена на стадии куколки. Возможность

трансовариальной передачи ВЦП у тутового шелкопряда неоднократно отмечалась в более ранних работах, посвященных этому заболеванию (Аруга, Нагашима, 1962; Хукухара, 1962). Имеются наблюдения, касающиеся латентного состояния ВЦП у тутового шелкопряда.

### 3.5. Ядерный полиэдроз кишечника

Ядерный полиэдроз кишечника насекомых впервые замечен К. Эшерихом (1913), обратившим внимание на включения белковой природы в эпителиальных клетках ложногусеницы соснового пилильщика (*Neodiprion sertifer* Geoffr.). В 30-е годы болезнь многократно отмечалась в лесах Канады среди перепончатокрылых вредителей, где они в то время получили значительное распространение. Затем болезнь и ее возбудитель были подробно изучены Бэрдом и Уэленом (1953) и рядом других исследователей. Вирус ядерного полиэдроза кишечника (ВЯПК) был выделен Вейзером (1958) в самостоятельный род *Begdiavirus*.

**Полиэдроз, вызываемый ВЯПК, содержащим ДНК.** Один из двух вирусов ядерного полиэдроза кишечника (ВЯПК) относится к группе вирусов, содержащих ДНК. Диаметр полиэдров 0,5—15 мкм, вирионы имеют палочковидную форму и геликоидную (спиральную) симметрию строения размером 20—30 × 200—400 нм; полиэдры содержат обычно по одному вириону. От вируса ядерного полиэдроза вирионы ВЯПК, так же как матрикс их полиэдров, существенно отличаются по биохимическим и серологическим характеристикам.

Было принято считать, что ВЯПК поражает представителей отряда перепончатокрылых, преимущественно пилильщиков. В конце 60-х годов и позже стала появляться информация о случаях заболевания чешуекрылых — капустной и других совок, крапивницы, пядениц — с одновременным поражением вирусом, кроме других органов и тканей, ядер эпителиальных клеток кишечника. Так, Канинхем (1971) обнаружил появление вируса ядерного полиэдроза раньше, чем в других легко поражаемых тканях, в эпителиальных клетках средней кишки у одного из видов пядениц и проследил за всеми этапами развития этого вируса. Инфекция вызвала ряд цитопатических явлений, связанных с развитием вируса. В ядрах пораженных клеток наблюдалось появление виrogenной стромы, образование вирионов, которые окружались субстанцией, предположительно принимаемой за белок полиэдров; вирионы однако не заключаются в него, а белковый матрикс не кристаллизуется и не превращается в полиэдры. Факты эти рассматриваются как случаи инфицирования, при которых вирус оказался в условиях, не отвечающих требованиям, необходимым для нормального завершения его развития, ВЯПК паразитирует только в тканях энтодермального происхождения узкой систематической группы насекомых. ВЯП же в состоянии развиваться в тканях экто- и мезодермального происхождения и в более обширной группе поражаемых им насекомых, но не в тканях энтодермального происхождения, в ядрах которых он лишен возможности завершить свое развитие.

**Полиэдроз, вызываемый ВЯПК, содержащим РНК.** Между тем нормально развивающийся вирус ядерного полиэдроза средней кишки у тутового шелкопряда существует. Первое сообщение об этом вирусе было сделано Танакой и др. (1967). Ямагуши (1968) подтвердил это сообщение. Дальнейшее изучение вируса и вызываемого им заболевания продолжалось. Установлено морфологическое сходство нового вируса с вирусом цитоплазматического полиэдроза (ВЦП), который в течение многих лет усиленно изучался в Японии.

Вирионы ВЯПК, подобно вирусам ВЦП, имеют глобулярную (сферическую) форму, являются икосаэдрами и относятся к кубическому типу симметрии; диаметр 62 нм. У обоих вирусов (ВЦП и ВЯПК) нуклеиновая кислота представлена двунитчатой РНК; у ВЯПК она оказалась очень устойчивой по отношению к рибонуклеазе и не реагирует с формальдегидом. Химическая характеристика РНК обоих вирусов тождественная; ВЯПК тутового шелкопряда при электрофорезе в полиакриламидном геле образовывал от 9 до 10 линий преципитаций — примерно столько же, что и у ВЦП. Аминокислотный состав вирионов и полиэдрного матрикса у обоих вирусов оказался близким и вместе с тем похожим на аминокислотный состав других полиэдрных вирусов насекомых. Хотя по химическому составу и электрофоретическим характеристикам у сопоставляемых вирусов не было обнаружено заметных различий, у ВЯПК отмечена четко выраженная меньшая стабильность структурной связи между протеиновой оболочкой (капсидом) и заключенной в ней РНК, содержащейся в сердцевине вириона. Вследствие этого пустую скорлупу вирионов можно было часто наблюдать в препаратах вируса (Кавасае и др., 1973).

По симптомам болезнь сходна с цитоплазматическим полиэдрозом. Вирус образует крупные, отчетливо квадратные полиэдры, реже — гексаэдрические, размером около 20 мкм, но в отличие от ВЦП — не в цитоплазме, а ядрах эпителиальных клеток средней кишки. Пораженный отдел пищеварительного тракта становится мутным и коричневым, а не грязно-белым, как при цитоплазматическом полиэдрозе. По данным Танаки (1967), вирус строго локализован в пораженном организме, его болезнетворное действие, по-видимому, слабо проявляется симптоматически и не слишком явно выходит за пределы пораженного органа. Плодовитость бабочек, происходящих от зараженных вирусом гусениц, не снижается. В Японии эту болезнь не причисляют к группе наносящих значительный ущерб урожаю коконов.

Кавасае и Ямагуши (1974) считают, что наименование «вирус ядерного полиэдроза средней кишки», получившее распространение в Японии, неудачно, так как оно звучит однозначно с ничего общего не имеющим с ним ДНК-содержащим палочковидным вирусом (ВЯП). Этот вирус они считают особым штаммом, относящимся к группе ВЦП, и потому предлагают назвать его «вирус цитоплазматического полиэдроза, штамм N», где N обозначает «ядерный» (nucleus). Штаммом обычно называют культуру микроорганизма, отличающуюся источником своего происхождения и некоторыми самостоятельными признаками, чаще всего количественного характера; штаммовые



отличия не нарушают основную характеристику, которая определяет видовую принадлежность микроорганизма. Поэтому снижение таксономической самостоятельности вируса ядерного полиэдрома средней кишки до уровня штамма нельзя считать достаточно обоснованным. Нам представляется, что между ВЯПК и ВЦП существует более широкая в систематическом отношении дистанция, не меньше, чем у разновидностей одного и того же вида.

### 3.6. Фляшерия, вызываемая вирусами

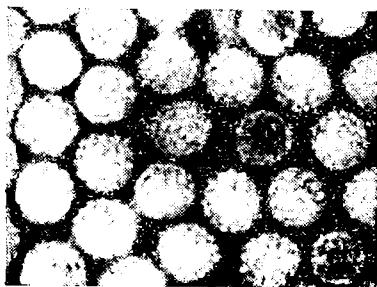
**Характеристика фляшерии вирусного происхождения.** Еще А. Пайо в конце 20-х годов предположил, что способность бактерий участвовать в развитии заболевания тутового шелкопряда фляшерией обусловлена особым вирусом. В 1960 г. Ямадзак с сотрудниками тщательно исследовали больных гусениц в одном из старых эндемических очагов фляшерии в Японии, в крестьянских хозяйствах префектуры Нагано. Здоровым гусеницам через рот вводили фильтрат растертых в порошок трупов, возникала фляшерия, что, по их мнению, свидетельствовало о существовании особого фляшерийного вируса, вызывающего инфекционную форму этого заболевания. Затем К. Аидзава и др. (1964) с помощью ряда вирусологических методов исследования подтвердили, что инфекционная фляшерия шелкопряда вызывается особым вирусом IFV.

Первоначальный способ диагностики посредством заражения гусениц супернатантом водной эмульсии из растертых трупов оказался трудоемким и недостаточно точным. Но он позволил решить многие, чисто практические вопросы в первом приближении. За последующие полтора десятка лет на базе современных методов исследования удалось многое узнать как о самом вирусе, так и о вызываемом им заболевании. Было обнаружено, что изучаемый вирус инфекционной фляшерии IFV Аидзавы (1964), который является синонимом фляшерийного вируса FV Ямадзак (1960), не одинок, что существует ряд других вирусов, вызывающих гибель гусениц тутового шелкопряда фляшерийного типа (так называемый F-тип заболевания), в том числе более мелкие вирусы, отличающиеся болезнетворными свойствами, — малые вирусы фляшерии SFV (Химео, 1974). Тщательный учет заболеваемости гусениц шелкопряда на выкормках в Японии позволил установить, что за десятилетие (1958—1965 гг.) на долю фляшерии приходилось от 65 до 78% гибели гусениц от инфекционных заболеваний. Не мудрено, что через 10 лет после публикации Аидзавы, в 1976 г. Ватанабе в обзоре, посвященном этой болезни, привел список 199 цитируемых им работ о вирусной фляшерии; некоторые из них упоминаются нами.

Симптомы заболевания вирусной инфекционной фляшерии повторяют классическое описание мертвенности и могут широко варьировать: от торможения развития до острых кишечных явлений и шокового состояния. Разнообразие признаков болезни и картины гибели гусениц определяются видовым составом сопутствующих бактерий и интенсивностью их соучастия в патогенезе заболевания. Все это до-

казано экспериментально с применением стерильных условий воспитания гусениц на искусственном корме и заражением их в различных вариантах вирусом фляшерии и бактериями из набора видов, участвующих в натуральных эпизоотиях. Бактерии способствуют возникновению фляшерии, реализуя заболевание даже при субинфекционных дозах вируса. Самые активные помощники, помимо высокотоксичной для насекомых группы бактерии тюрингиенсис, — энтерококки шелкопряда. Длительность инкубационного периода (5—12 дней) зависит от возраста гусениц, количества вируса, участия бактерий и других условий. Гусеницы младших возрастов одинаково восприимчивы и легко заболевают вирусной фляшерией, в четвертом возрасте восприимчивость снижается, в пятом они заметно устойчивее к заболеванию, но даже куколка при ее инокуляции не защищена в полной мере от заражения вирусом. Зараженные в пятом возрасте гусеницы не успевают заболеть, нормально окукливаются, превращаются в бабочку. Вышедшие из отложенной такой бабочкой грены гусеницы в большинстве своем, будучи внешне здоровыми, являются вирусоносителями: видимо, фляшерийный вирус от куколок и бабочек может передаваться следующему поколению в форме латентной инфекции. Возможность экзогенного заражения вирусной фляшерией приурочена к личиночной стадии шелкопряда.

Вирус инфекционной фляшерии IFV. Аидзава (1972) получил препарат вируса высокой степени очистки в результате ультрацентрифугирования в градиенте хлористого цезия. Позже исследователи использовали ультрацентрифугирование в градиенте плотностью 10—40% сахарозы с последующим применением ряда методов очистки вируса. Диаметр вирионов 25—30 нм, форма сферическая (рис. 66), константа седиментации 183 S. Нуклеиновая кислота вируса — однонитчатая РНК. Согласно сообщению Кавасе и др. (1980), молекулярная масса РНК вируса фляшерии  $2,4 \cdot 10^6$  дальтон и содержание ее в вирионах составляет 28,5%. Размеры вирионов от 24 до 30 нм, при значительном преобладании количества их с величиной 26—28 нм.



66. Вирионы вируса инфекционной фляшерии тутового шелкопряда.

В вирионах содержится 4 структурных протеина, с молекулярной массой у протеина  $VP_1 = 31-32 \cdot 10^3$ , у  $VP_2 = 41-42 \cdot 10^3$ , у  $VP_3 = 49 \cdot 10^3$  и у  $VP_4 = 68-69 \cdot 10^3$ . Протеин  $VP_1$  — основной протеин капсида и составляет 70% от массы вириона.

Инактивация вируса при комнатной температуре наступает через 450 дней; при хранении в холодильнике ( $-18^\circ\text{C}$ ) патогенность сохраняется и по истечении 500 дней. В процессе термической обработки инактивация достигается при  $90-100^\circ\text{C}$  через 5—10 мин, при  $70^\circ\text{C}$  — через 20 мин, при  $60^\circ\text{C}$  — через несколько часов, а при  $50^\circ\text{C}$  — полностью не обеспечивается даже 30-часовым прогревани-

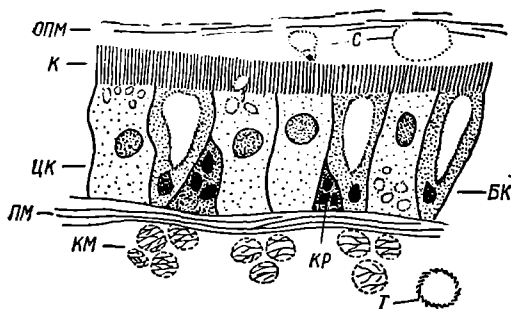
ем. Экспозиция для инактивации ультрафиолетовыми лучами колеблется в пределах от 10 мин до 10 ч и зависит от мощности источника излучения, расстояния от него, консистенции жидкости, в которой взвешен вирус, и др. Гамма-лучи ( $Co^{60}$ ) практически не влияют на инфекционность вируса. Действие радиации в течение 20 ч при pH среды от 3 до 12 не изменяет инфекционности, но при дальнейшем увеличении кислотности (pH 2) вирус в значительной степени инактивируется.

Фляшерийный вирус тутового шелкопряда непатогенен для шелкопрядов ямамай, индийского дикого (дубового), айлантового, клещевинного и кольчатого. Инфекционность вируса оценивали обычно с помощью биологической пробы на тутовом шелкопряде заражением через рот или инъекцией в общую полость. Затем о патогенности стали судить по картине размножения вируса в клетках кишечного эпителия, которая изучалась с помощью электронного микроскопа или флюоресцирующих антител. Выделенные из больных гусениц тутового шелкопряда в ряде префектур Японии семь штаммов вируса фляшерии оказались по результатам реакции нейтрализации серологически близкими или идентичными. Тем не менее исследователям представляется вероятной вариабельность фляшерийного вируса, в том числе тех его линий, которые, быть может, ведут свое начало от диких насекомых.

Вирус инфекционной фляшерии Аидзавы, он же фляшерийный вирус Ямадзакки FV, отличается высокой термостойкостью: он выдерживает нагревание при  $60^{\circ}C$  в течение нескольких часов. Этот признак характерен для реовирусов, но фляшерийный вирус не может быть причислен к ним из-за более крупных размеров вирионов у реовирусов (60 нм) и, что более существенно, из-за наличия у них двунитчатой, а не однонитчатой, как у FV, РНК. Энтеровирусы, к которым еще недавно причисляли (в качестве особого серотипа) реовирусы, имеют однонитчатую РНК и вирионы меньшего размера.

Кавасае и др. (1980) относят вирус фляшерии к группе пикорнавирусов — более широкой систематической категории, включающей в свой состав и энтеровирусы. Название «пикорна» образовано сочетанием итальянского слова «пикколо» — малый и аббревиатуры RNA — рибонуклеиновая кислота (РНК). Это самые малые РНК-вирусы (до 32 нм), в число которых входят и энтеровирусы (греч. *энтерон* — кишечник), поражающие пищеварительный тракт многих животных, в том числе насекомых. В качестве энтомопатогенов они вызывают цитопатические изменения клеток кишечника.

**Патология вирусной фляшерии.** Вирус фляшерии обнаружен не только в эпителии средней кишки, но и в гемолимфе, шелкоотделительных железах, жировом теле и клетках кожных покровов. Методом флюоресцирующих антител установлено, что сначала поражается эпителий кишечника, а затем гуморальная среда организма (тканевая жидкость, гемолимфа) разносит вирус по другим органам и тканям. Сначала поражаются бокаловидные клетки переднего участка средней кишки (рис. 67). Затем постепенно заражается задний участок, где преимущественно расположены цилиндрические клетки. Специфи-



67. Эпителиальные клетки средней кишки гусеницы тутового шелкопряда:

КМ — кольцевые и ЛМ — продольные мышцы; Т — поперечный срез через трахею; КР — регенеративные клетки эпителия; ЦК — цилиндрические и БК — бокаловидные клетки эпителия; через рабдорיום этих клеток (К) выступают капельки пищеварительного сока (С); ОПМ — перитрофическая мембрана.

ческая флюоресценция, указывающая на присутствие вируса, сильно заметна в цитоплазме бокаловидных клеток и очень слабо в цитоплазме цилиндрических клеток и притом только некоторых. У пораженной бокаловидной клетки изменяется внешний вид цитоплазмы, уменьшается количество митохондрий, клетка сокращается, дегенерирует, приобретает шаровидную форму и выталкивается в сифоноглифе средней кишки (пространство между эпителием и перитрофической мембраной). У ци-

линдрических клеток в последней стадии поражения наблюдается гипертрофия ядра и грануляция карิโอплазмы, а в цитоплазме часто образуются базофильные тельца. Радиоавтографирование эпителия средней кишки с помощью тимидина и уридина, меченых изотопом водорода ( $H^3$ ), показало, что по мере прогрессирования заболевания синтез РНК в ядрах бокаловидных клеток усиливается, а затем РНК начинает накапливаться в их цитоплазме. Синтез РНК наблюдается также в ядрах цилиндрических клеток, где в отличие от бокаловидных синтезируется и ДНК. З начальной стадии заражения в цитоплазме бокаловидных клеток под электронным микроскопом обнаружено множество сферических полых телец с однослойной оболочкой диаметром 100—400 нм, вокруг которых располагаются вирионы. По мере их накопления органеллы в цитоплазме видоизменяются и исчезают. Эти сферические тельца представляют собой продукт дегенеративных изменений в бокаловидных клетках. Если зараженная вирусом гусеница окукливается, эпителий средней кишки обновляется, личиночные клетки накапливаются в сифоноглифе, а эпителий кишечника куколки проявляет высокую степень невосприимчивости к вирусу и потому ни она, ни бабочка, как правило, не заболевают. Отмечены редкие случаи заражения кишечного эпителия куколки вирусом и образование в цитоплазме клеток специфических для этой инфекции шаровидных телец; случаи эти приписываются вторичному заражению вирусом, находящимся в сифоноглифе.

Из патфизиологических явлений упоминается низкий показатель преломления гуморальной жидкости у больных гусениц и снижение содержания в ней протеина по мере прогрессирования болезни. Изучалась кривая размножения вируса в организме гусеницы на основании изменения ЛД<sub>50</sub> и в биологических пробах на здоровых насекомых; установлено, как у других вирусов, четыре фазы его жизнедеятельности: сокращение количества первоначально циркулирующего ин

Тактного вируса, эклипс-фаза, репликация, рециркуляция размножившегося вируса. Скорость размножения вируса максимальна при температуре 25—30°C; при 16°C она замедлена и составляет 1/5 от наибольшей величины.

Известны случаи естественной и экспериментальной смешанной инфекции вирусной фляшерии и цитоплазматического полиэдроza, а также тройной — с участием ядерного полиэдроza. Фляшерийный вирус размножается в бокаловидных клетках, а вирус цитоплазматического полиэдроza — в цилиндрических. Смешанная инфекция ускоряет развитие болезни и гибель гусениц.

**Диагностика.** У вирусной инфекционной фляшерии нет внешних признаков, позволяющих отличить ее от других заболеваний, приводящих к фляшерийному виду больных и умирающих гусениц. Предложен метод биологической пробы (Аидзава и др., 1964). Отстоявшийся супернатант водной взвеси из растертой средней кишки больного насекомого вводят через рот гусеницам младшего возраста, чтобы определить его инфекционность. Эта проба не всегда дает удовлетворительные результаты из-за ряда условий, от которых зависит ее достоверность. При гистохимической диагностике (Ивасита, Кудайэ, 1967) на мазках из эпителия средней кишки устанавливают присутствие в цилиндрических клетках сферических тел, которые хорошо окрашиваются метилгрюн-пиронином по Унна-Папенгейму. Метод не пригоден для ранней диагностики, так как упомянутые образования появляются в последней стадии болезни и к тому же не всегда обнаруживаются. Наиболее надежный результат дают серологические реакции, в том числе двойная диффузия в агаре по Оухтерлони и иммуноэлектрофорез с противоящериной антисывороткой. Использование антител с флюоресцирующими красителями позволило проводить диагностирование через 48—96 ч после заражения при минимальных дозах вируса, а также по гниющим трупам гусениц. Методы серологической преципитации в геле и мечение вируса флюоресцирующими антителами наиболее пригодны для ранней диагностики фляшерии и отличаются высокой точностью (Нинахара и др., 1973, 1975).

**Эпизоотология вирусной фляшерии.** Когда гусеницы, зараженные вирусом фляшерии, попадают в партию здоровых, среди них появляются заболевающие, число которых быстро возрастает, и они становятся источником так называемой вторичной инфекции. Один из основных источников распространения вируса — экскременты больных гусениц. Фляшерийный вирус можно обнаружить в экскрементах через несколько часов после искусственного заражения гусениц. Поэтому с эпизоотологической точки зрения зараженная подстилка на выкормочной поверхности заслуживает повышенного внимания, особенно если на ней содержится восприимчивые гусеницы младших возрастов. Листья шелковицы перед раздачей моют или опрыскивают водой, чтобы они быстро не увядали. Редкая смена подстилки повышает опасность со стороны выкормочной поверхности.

На темпе развития эпизоотии и на накоплении источника вторичной инфекции в подстилке сказываются сезонные особенности. Ослабление роли этого источника инфекции, который пополняется на протя-

жении всей выкормки,— достаточно трудная задача. Целесообразна текущая дезинфекция подстилки, а также поверхности тела самой гусеницы; при смене подстилки необходима дезинфекция выкормочных стеллажей и помещения. Выбор обеззараживающих средств, традиционно используемых шелководами, не велик и не очень эффективен. Фляшерийный вирус, содержащийся в экскрементах, трудно инактивировать даже такими средствами, как прямое солнечное облучение или сухая термообработка при 100°С в течение 30 мин.

Остатки листьев и веток шелковицы, подстилка, экскременты, упавшие на пол в выкормочном помещении, трупы гусениц,— все эти зараженные за время выкормки отходы могут стать источником инфицирования гусениц, а использование их для кормления домашнего скота или птиц представляет особую опасность, так как в кишечном тракте животных вирус не инактивируется и выводится наружу. По данным японских исследователей, инфекция распространяется также при использовании отходов выкормки для удобрения тутовых плантаций. Рассеиваясь при обработке почвы, вирус поднимается ветром вместе с пылью и загрязняет поверхность листьев. Для самообеззараживания такого листа в естественной обстановке требуется 30 дней. Если же экскременты остаются в поле не на солнце, инфекционность вируса сохраняется даже по истечении этого срока. В экскрементах, зарытых в землю, вирус инактивируется примерно через год, а в компосте—через восемь месяцев. Если зараженные экскременты попали в навоз или компост, вирус инактивируется во время разогревания навоза, особенно при обработке известью, цианамидом кальция, формалином и т. д. Известкование кислых почв, внесение золы и цианамиды кальция, повышающие плодородие почв, заметно ускоряют инактивацию патогена.

Известна роль вредителей тутовых плантаций в переносе ими вируса и загрязнении листьев шелковицы. Отмечена возможность распространения вируса фляшерии вокруг гренажных предприятий с чешуйками бабочек, а также комнатными мухами, сидевшими на трупах шелкопряда, погибшего от этой болезни. Накоплению инфекции способствуют позднеесенние выкормки шелколичных червей, после которых вирус сохраняется до следующей весны в пыли червоводен, в листвохранилищах, в помещении для завивки коконов.

Представляет значительный интерес эндемический характер эпизоотий вирусной фляшерии — повторяемость в течение ряда лет, обусловленная благоприятными эпизоотическими факторами, в том числе природными. Обследование систематической заболеваемости выкормок в префектуре Нагано (Япония), проводимое в течение ряда лет, показало, что основными причинами гибели шелколичных червей, которая сопровождалась типичными признаками смертности, оказались вирусная фляшерия и цитоплазматический полиэдроз.

Формированию эндемической очаговости этих заболеваний способствовал занос инфекции в период младших возрастов. Поэтому, по мнению Ямадзаки и др. (1966), результаты проверки наличия возбудителя в червоводнях в младших возрастах должны быть обязательно учтены при прогнозировании урожая коконов. Танасу и Такахаси

(1963) предложили метод обнаружения вируса фляшерии, основанный, на добавлении к корму подопытных гусениц младших возрастов пыли собранной в помещении выкормки с тем, чтобы установить степень инфицированности отдельных хозяйств в эндемическом очаге. Полученные таким образом результаты оказались достаточно сопоставимыми со статистическими сведениями о степени поражаемости фляшерией отдельных хозяйств и с очаговым характером появления заболеваемости.

Формированию эндемической очаговости, помимо наличия зараженного начала, благоприятствуют экологические факторы и их влияние на уровень восприимчивости шелкопряда к заболеванию. В одних районах встречаются обе вирусные инфекции, в других — вирусная фляшерия обнаруживалась реже или отсутствовала совсем. Так, в зонах повышенных температур воздуха в период выкормки чаще наблюдались цитоплазматический и ядерный полнедрозы, а не фляшерия. Приторможенная инкубация грены при 5°C в течение одного-десяти дней повышает восприимчивость к инфекции вышедших гусениц, и тем сильнее, чем дольше это воздействие. Охлаждение же новорожденных гусениц, вышедших из нормально инкубированной грены в течение 11 дней при 5°C, не влияет на состояние их восприимчивости к этому вирусу. Заболеваемости способствует кормление гусениц первого-третьего возрастов жесткими листьями, росшими в условиях недостаточной освещенности солнцем, или значительное сокращение нормы кормления; особенно такое влияние заметно на осенних выкормках. Отрицательное действие условий питания в третьем-пятом возрастах усиливается с повышением температуры (30°C) и влажности воздуха (95%). Усиливают восприимчивость также экстремальные температуры (2,5 или 50°C), недостаточная площадь выкормки, толстый слой подстилки, плохая вентиляция, загрязнение корма ядохимикатами, а воздуха — вредными газообразными и пылевыми частицами. Наблюдались случаи возникновения фляшерии при контакте гусениц с пропионовой кислотой, выделяемой из трупов гусениц тутового шелкопряда.

**Селекция шелкопряда на устойчивость к фляшерии.** Наиболее радикальное средство в борьбе с вирусной фляшерией — селекция шелкопряда на устойчивость к этому заболеванию. Устойчивость к фляшерийному вирусу передается по наследству как рецессивный признак; доминантным оказывается признак восприимчивости. Как правило, китайские породы устойчивее японских.

Испытан провокационный метод отбора линий, устойчивых к фляшерийному вирусу: в условиях, благоприятствующих заболеванию, гусениц заражают вирусом и отбирают особей, оставшихся в живых; отбор в течение пяти поколений позволил получить линию, устойчивую к фляшерийному вирусу.

У устойчивых пород размножение вируса не приводит к появлению заболевания. Иначе говоря, устойчивость проявляется не в предотвращении заражения, а в повышенной выживаемости зараженных гусениц. По мнению Иноуэ (1974), эта разница в значительной степени зависит от того, насколько быстро образуются бокаловидные клетки

и регенерирует пораженный эпителий. Исследовались процессы регенерации эпителия кишечника, пораженного вирусом цитоплазматического полиэдроза, фляшерии и малого вируса, содержащего РНК, а также последствия термотерапии вирусной инфекции (Иноуэ, Миногава, 1978). По-видимому, возможность регенерации выявляется более четко, если в патогенезе вирусной фляшерии не принимают участия бактерии, попадающие с кормом в кишечник. Установлено, что гибель зараженных гусениц, воспитываемых на искусственном корме в стерильных условиях, наступает значительно позже, что, по мнению исследователей, объясняется сохраняющимся в этих условиях равновесием между разрушением бокаловидных клеток и регенеративными процессами (Курусу, Мацумото, 1974).

**Малые фляшерийные вирусы.** Вначале полагали, что возбудитель вирусной фляшерии одноклеточен, представляет собой вирионы сферической формы диаметром 26—28 нм, содержит рибонуклеиновую кислоту, размножается в бокаловидных клетках эпителия средней кишки и образует шаровидные тельца в цилиндрических клетках. С того времени, когда Ямазаки с соавторами (1960) впервые установили вирусную природу инфекционной фляшерии — возбудитель этой болезни FV стал привлекать к себе постоянное внимание.

Вскоре Аидзава (1964) сообщил, что состав патогена неоднороден и образует две зоны в равновесном градиенте плотности хлористого цезия. Химено и др. (1974), заразив гусениц тутового шелкопряда фляшерийным вирусом коллекционного происхождения, известного как штамм Сакаки, выделили помимо известного фляшерийного вируса FV более мелкий. Диаметр его 22 нм, константа седиментации S 134 (вместо S 180 у FV, содержащего РНК). Авторы пришли к заключению, что штамм этого вируса можно разделить центрифугированием в градиенте плотности 10—40%-ной сахарозы на два типа инфекционных частиц, различающихся по своим размерам: на фляшерийный вирус шелкопряда SFV<sub>1</sub> и SFV<sub>2</sub>. Под электронным микроскопом видны их сферические вирионы, т. е. их капсиды построены по одному из типов кубической симметрии.

Эти авторы исследовали на однородность также штамм Вадаемы, который был в свое время признан идентичным со штаммом Сакаки (Фунада и др., 1969), и убедились, что и в этом штамме содержатся два описанных типа вирионов. При заражении гусениц второго возраста (более восприимчивых) и гусениц четвертого (менее восприимчивых), воспитанных на искусственном корме и в стерильных условиях, оба эти типа вирусов оказались инфекционными; в обоих случаях развитие зараженных гусениц задерживалось, заболевание фляшерией прогрессировало и гибель наступала на 7—14-й день. Инфекционность SFV<sub>1</sub> — основного, более крупного вируса, была более сильной; в младших возрастах эта разница выражалась значительно слабее, но в четвертом возрасте более мелкий SFV<sub>2</sub> не смог преодолеть возрастной иммунитет шелковичных червей. Если во втором возрасте от SFV<sub>1</sub> из 15 зараженных гусениц погибли 14, а от SFV<sub>2</sub> из 19 погибли 18, то в четвертом возрасте от SFV<sub>1</sub> в двух зараженных партиях из 20



и 30 погибли соответственно одна и восемь гусениц, а от SFV<sub>2</sub> не погибло ни одной.

Исследование окрашенных гистологических препаратов (Иноуэ и Аидзава, 1972) с использованием флюоресцирующих антисывороток к фляшерийному вирусу показало, что патоген предпочитает бокаловидные клетки эпителия средней кишки. Седиментационный анализ экстракта из средней кишки и всего тела гусеницы выявил, что оба вируса размножаются в эпителиальных клетках примерно одинаково и только в последней стадии развития болезни более мелкий и менее вирулентный накапливается в них в большем количестве. Ватанабе (1967), исследуя синтез нуклеиновых кислот в эпителии гусениц с помощью радиографического метода, отметил, что меченый изотопом предшественник РНК включается в ядра обоих типов эпителиальных клеток; хотя SFV<sub>2</sub> интенсивно синтезируется в эпителии, окончательно не установлено, размножается ли он помимо бокаловидных в цилиндрических клетках. По данным серологических реакций нейтрализации и двойной диффузии в геле, оба типа вирусных частиц, выделенных Химено и др. (1974) из штамма Сакаки, имеют общие антигены и серологически очень близки и потому степень их таксономической самостоятельности неясна (Курусу и др., 1975).

Ватанабе (1976) в обзоре вирусов фляшерийных заболеваний обозначил SFV<sub>2</sub> как штамм Химено. Высказаны также предположения, что оба вируса являются штаммами одного вида, но различного происхождения, быть может, от разных видов насекомых, и в разной степени адаптированы (приспособлены) к тутовому шелкопряду. Совместное участие в смешанной инфекции и присутствие их в штаммах Сакаки и Вадаями послужило основанием для другого предположения о том, что SFV<sub>2</sub> «не вполне зрелая в инфекционном отношении, недоразвитая форма SFV<sub>1</sub>».

Мацуи (1973) из гусениц тутового шелкопряда, зараженных штаммом Сакаки в лабораторных условиях, выделил вирус со сферическими вирионами, меньше обычного фляшерийного вируса FV, размножающегося в ядрах цилиндрических клеток, а не бокаловидных, как вирус Ямазаки FV. Клетки эти становятся «тучными», в ядрах возникают участки, густо окрашивающиеся по Фельгену и при исследовании под электронным микроскопом здесь видно образование вирионов. Ватанабе обозначил этот вирус как штамм Мацуи.

Фурута (1973) заразил шелколичных червей вирусом ядерного полиэдроа капустной и других совек и у заблелвших выделил вирус со сферическими вирионами (ВЯП — палочковидный), несколько мельче (17—23 нм) фляшерийных, выделенных Химено и Мацуи, поражающих цилиндрические клетки эпителия, но не образующих в них шаровидных телец, в отличие от фляшерийного вируса Ямазаки FV. Штамм Фуруты резко различается по устойчивости к нему пород шелкопряда: он не поражает китайскую 124 и Дайзо, но весьма инфекционен для японской 124 и китайской 4. Серологически он отличается от вируса инфекционной фляшерии FV. В составе коллекционных штаммов Сакаки, видимо, содержится вирус штамма Фуруты.

Штамм Химено SFV<sub>2</sub>, в отличие от вируса инфекционной фля-

шерии FV, был назван малым вирусом фляшерии SFV. Установлено, что последний, так же как FV, относится к вирусам, содержащим РНК, поскольку поглощает урацил, меченый радиоактивным водородом. Фурута (1977) сравнивал SFV с FV, особенно их инфекционность, устойчивость к формальдегиду и повышенной температуре. Породы тутового шелкопряда в разной степени восприимчивы к малому вирусу фляшерии. Заразность самих гусениц, инфицированных одновременно обоими вирусами, существенно зависит от титра размножившегося в них SFV (Фурута, Аидзава, 1973, 1974); когда гусеницы породы японская 124 заражали только FV, их инфекционность была ниже, чем при смешанном заражении и по мере увеличения в инокулюме титра SFV, ЛД<sub>50</sub> снизилась, тогда как с увеличением участия в смешанной инфекции FV заметного влияния на смертность гусениц не отмечалось.

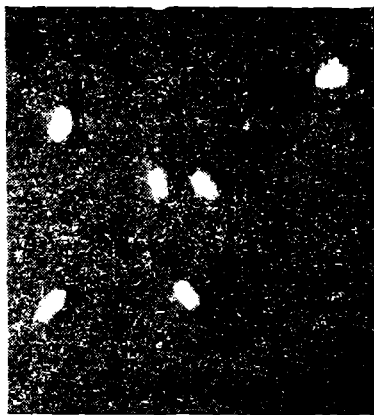
К формалину и повышенной температуре малый вирус фляшерии проявляет устойчивость большую, чем вирус инфекционной фляшерии; это позволяет разделить эти вирусы в случаях смешанной инфекции, если с помощью антисыворотки к SFV будет установлено его соучастие. Тепловая обработка вируса при 65°C в течение 30 мин инактивирует FV и не снижает активности SFV. Термотерапия при 37°C ингибирует размножение SFV. Методом радиальной иммунодиффузии в полиакриламидном геле установлено, что у гусениц при 27°C содержание антигена SFV в эпителии кишечника в течение каждого возраста повышается и снижается во время линьки; если после линьки повысить температуру в помещении до 37°C, то количество вирусного антигена в течение наступившего возраста будет падать.

Штаммы Мацуи и Фуруты, обнаруженные в качестве участников смешанных вирусных инфекций, такие, как штамм Химено, являются малыми вирусами фляшерии SFV, с кубической симметрией строения вирионов и наличием одонитчатой РНК. Они, так же как и фляшерийный вирус FV, наиболее близки к энтеровирусам, которые входят в группу вирусов, объединенных под общим названием пикорнавирусов. Помимо вируса фляшерии, к ним относятся возбудители заболеваний различных представителей членистоногих, от пчел до растительноядных клещей. Это мелкие вирусы (21—32 нм), содержащие одонитчатую РНК, в отличие от других вирусов с мелкими вирионами — парвовирусов (лат. *parvus* — малый), у которых геном состоит из одонитчатой ДНК.

### 3.7. Другие вирусы, представляющие интерес для шелководства

Среди энтомопатогенных вирусов есть такие, которые пока еще не причастны к возникновению массовой гибели шелковичных червей, но по отношению к которым шелководам следует проявлять интерес. У одних способность инфицировать тутового шелкопряда все еще нуждается в достоверных данных, у других эти улики — результат всего лишь лабораторных опытов, но есть и такие, которые заявили о своей потенциальной вредоносности непосредственно в производственной обстановке.

**Вирус гранулеза.** К роду *Baculovirus*, к его В-подгруппе относится вирус гранулеза (ВГ) насекомых. Начало исследованиям этих вирусов положил А. Пайо (1926), который обнаружил заболевание гусениц капустной белянки с признаками, похожими на желтуху шелковичных червей, с белой, как молоко, мутной гемолимфой, в которой, однако, отсутствовали полиэдры. Пайо назвал эту болезнь ложной желтухой. В поле зрения светового микроскопа с фазовым контрастом можно различить множество мельчайших блестящих зернышек (гранул). В дальнейшем подобное заболевание обнаружили у других видов гусениц. Штейнхауз (1947) внес ясность относительно его принадлежности к вирусным болезням, а самих гранул — к включениям аналогичным полиэдрам (рис. 68). Бергольд (1948) исследовал гранулы и находящиеся в них вирионы под электронным микроскопом.



68. Вирус гранулеза гусеницы бабочки-мелмедницы, увелич.  $\times 12\,500$  (Штейнхауз, 1949).

Вирионы этой подгруппы палочковидных спиральных вирусов содержат ДНК с удвоенной нитью, но в отличие от вируса ядерного полиэдроза вирионы заключены в протениновую гранулу более или менее правильной овальной формы. Они значительно меньше полиэдров, гранулы по большой оси эллипса имеют всего 0,2—0,4 мкм (диаметр полиэдров 3—4 мкм). Размеры же самих вирионов в обеих подгруппах довольно близки. Обе подгруппы палочковидных вирусов поражают главным образом личиночную стадию некоторых бабочек; пути заражения и состав преимущественно поражаемых тканей такой же, как и при ядерном полиэдрозе. В обоих случаях возможна трансвариальная инфекция. Гранулы образуются в ядрах клеток, после разрушения ядра они оказываются в цитоплазме. Гибели предшествуют интенсивные гистологические процессы, в ходе которых в гемолимфе оказывается огромное количество гранул из разрушенных клеток.

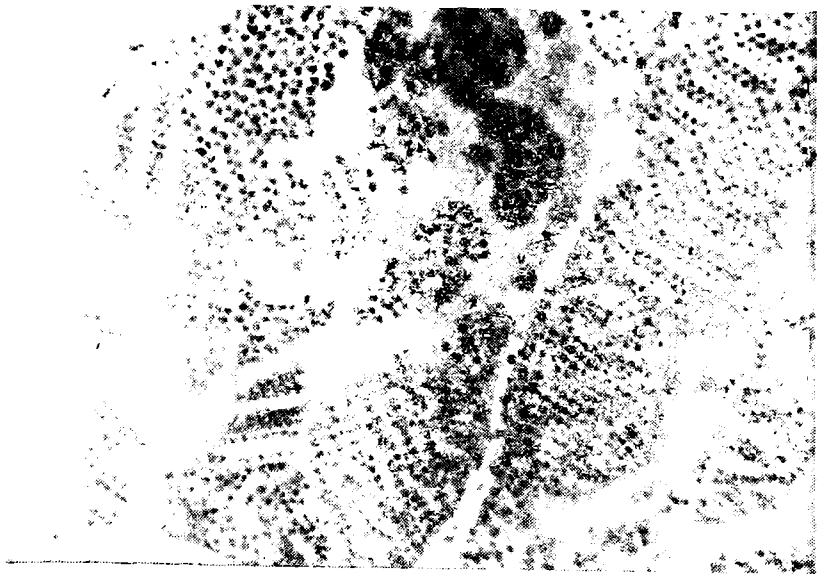
Типовой вид в подгруппе В — вирус гранулеза еловой листовертки-почкоеда (*Choristoneura fumiferana*) из семейства листоверток (*Tortricidae*) — опасного вредителя лесов Канады. Это насекомое хорошо изучено, размножается в лабораториях на искусственном корме, состоящем из измельченной бальзамической пихты, агара и дрожжевого автолизата. Оно одинаково успешно заражается вирусами гранулеза и полиэдроза, как впрочем, и многие другие виды гусениц. В отличие от ВЯП, которому свойственна большая или меньшая степень групповой специфичности, ВГ относится, по-видимому, к более узко специализированным вирусам. ВЯП найден у представителей семи отрядов насекомых, в том числе у 243 видов бабочек, ВГ обнаружен пока только у 65 видов бабочек, принадлежащих к различным се-

мействам, но не найден ни в каких других отрядах насекомых. Вероятно, объяснением этому может служить не только особенность специализации ВГ, но и разная возможность его обнаружения, так как, в отличие от полиэдроза, уверенный диагноз гранулеза с помощью сухих объективов в нативном препарате из-за их малых размеров значительно менее доступен.

Гранулез не обнаружен у гусениц тутового шелкопряда, и попытки заразить их этим вирусом, взятым у разных видов бабочек, оказались безрезультатными. Все же эту подгруппу палочковидных вирусов шелководам упускать из вида не следует. Гранулез широко распространен среди хлопковой и озимой совок, карадрины — обычных вредителей хлопчатника, посевы которых непосредственно соседствуют с насаждениями шелковицы. При всей своей жесткой приуроченности к определенным видам насекомых, ВГ, как всякий иной вирус, не застрахован от мутационной изменчивости, в том числе такой, которая делает возможным поражение несвойственных ему видов гусениц. Результативность химического мутагенеза в отношении ВГ описана в литературе; вряд ли существует полная гарантия от мутагенного воздействия со стороны средств химизации, которые в возрастающем темпе и широком ассортименте поступают на вооружение сельского хозяйства. Эти предостережения нелишни еще и потому, что ВГ передается трансвариально. Вероятность обнаружения у гусениц гранулеза мутагенного происхождения скорее всего можно было бы ждать от работников гребных заводов, которые ежегодно выполняют огромный объем микрокопирования. Однако разрешающая способность заводских микроскопов недостаточна и признаков ложной желтухи Пайо гренеры не знают.

**Радужный вирус.** Свое название *Iridovirus* (греч. *iris* — радуга) он получил благодаря приобретаемой пораженным насекомым особенности — радужному свечению голубого, сине-зеленого, фиолетового и оранжевого цвета. Оно обусловлено кристаллической структурой этих вирусов и характером укладки его вирионов. Радужный вирус (РВ) впервые обнаружен у болотной долгоножки *Tipula paludosa* Meig., насекомого семейства комаровидных *Tipulidea* (Ксерос, 1954). Спустя два десятилетия число видов насекомых, у которых он обнаружен, достигло 49 и принадлежат они к пяти отрядам; чаще всего его находят у комаров и бабочек.

Типовым видом РВ является вирус болотной долгоножки. Он относится к группе сферических вирусов, вирионы которого изометричны, диаметр 0,13—0,24 мкм; в проекции они имеют гексагональный (шестиугольный) контур, икосаэдрическую (20-гранную) симметрию. Внутри структурной оболочки из вирусного белка, образующего капсид, находится двойная полинуклеотидная нить ДНК. На ультратонких срезах под электронным микроскопом скопление радужного вируса в пораженной им ткани напоминает ломоть пчелиных сотов, в котором каждая ячейка представлена отдельным вирионом (рис. 69). Правильная упаковка этих однородных структурных единиц похожа на регулярное строение кристаллов, но в отличие от истинных трехмерных кристаллов она у РВ характеризуется рыхлой укладкой с влаж-



69. Радужный вирус; ультрамикроструктурные ткани комара, увелич.  $\times 6400$  (Холл и Энтона, 1971)

ными промежутками между ними. В таком кристалле гидратированные частицы не контактируют друг с другом и разделены слоем растворителя толщиной около 0,5 нм; кристалл связан силами, действующими на расстояние  $1/3$ — $1/5$  размера самих вирионов. Концентрация вируса в таком влажном кристалле составляет только 17% от массы кристалла.

Ворота инфекции для РВ недостаточно ясны. Скармливание вируса его естественному хозяину или какому-либо иному восприимчивому насекомому приводит к весьма незначительному проценту заражения. Тот же вирус оказывается гораздо более инфекционен при его впрыскивании в общую полость насекомого. При попытке объяснить низкую инфекционность радужного вируса личинки комара *Aedes taeniorhynchus* при заражении через кишечник было установлено, что вирионы разрушаются в переднем отделе средней кишки (Штолц и Саммерс, 1972). Отмечена также эффективность преграждающей функции перитрофической мембраны, строение которой в отличие от структуры ее у личинок чешуекрылых не имеет зазоров, допускающих проникновение вируса. Предположительно РВ может оказаться возле эпителия кишечника, проникнув через редкие разрывы в перитрофической мембране или же пройдя сквозь нее в виде каких-то особо мелких инфекционных единиц, быть может, вирусного ДНК.

Если для личинки болотной долгоножки кишечник является единственно доступными воротами инфекции для РВ, то для комара заражение возможно не только через кишечник, но и трансвариально. Органами личинки, преимущественно заражаемыми РВ, являются

жировое тело, клетки кожных покровов и имагинальные диски. По мере распространения вируса в организме больного насекомого явление радужности можно наблюдать во многих других тканях, в том числе в шелксоотделительной железе.

Вирионы формируются в цитоплазме, на участке виrogenной стромы (в вироплазме). Заражение впрыскиванием РВ комара в общую полость гусеницы большой вошинной моли показало, что возникновение вироплазмы, наблюдаемое через день после инъекции, вызывается присутствием введенного вируса. В то время, как вирусный структурный белок формируется возле вироплазмы, ДНК вируса располагается в ней целиком. Неясным остается вопрос, что образуется первым: нуклеоиды или капсиды, и в каком порядке происходит сборка вирионов. В отношении РВ москита Дэвид (1975) предполагает, что капсид вириона образуется раньше, а сердцевинная структура — нуклеонд вводится в него позже.

В серологическом отношении РВ характеризуется значительным содержанием постоянно обнаруживаемых групповых, общих для этого вируса, антигенов. Наряду с этим, вирусы различных насекомых не строго идентичны и их антигены содержат видоспецифические детерминанты, которыми отмечена их видовая индивидуальность.

Низкий уровень инфекционности РВ при заражении им насекомых естественным путем — через рот, резко контрастирует не только с высокой восприимчивостью при непосредственном заражении гемолимфы, но и проявляющейся при этом в широких границах специализации. Многочисленные опыты с перекрестным заражением различных отрядов, семейств и видов насекомых этим способом в полной мере показали отсутствие строгой специфичности у этого вируса. К РВ болотной долгоножки оказались восприимчивы гусеницы непарного шелкопряда, большой вошинной моли, капустной белянки, личинки восточного майского жука, представители класса клещей (в частности, паутиных) и т. д. К этому виду РВ оказались восприимчивы куколки и гусеницы тутового шелкопряда. РВ австралийского жука *Sericesthis pruinosa* Dalman также способен вызывать заболевание при инфицировании общей полости у насекомых, принадлежащих к различным систематическим группам, в том числе и гусениц тутового шелкопряда.

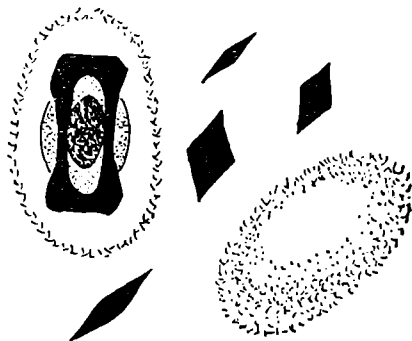
**Энтомопоксвирус — вирус оспы насекомых.** Оспа — собирательное название обширной группы вирусных болезней человека и животных. Вирус натуральной оспы человека стал едва ли не первым вирусом, который удалось увидеть людям; благодаря относительно крупным размерам его можно обнаружить с помощью обычного светового микроскопа, в окрашенных препаратах из срезов пораженных тканей, где он представлен кокковидными включениями, получившими название телец Пашена. Для вирусов семейства оспы было установлено наименование *Poxviruses*.

В начале 60-х годов Б. Юрпэн в Бретани (Франция) обнаружил болезнь личинок майского хруща, в жировом теле которого наблюдались своеобразные включения. К. Ваго (1963) на станции цитопато-

логии беспозвоночных в департаменте Гар (Франция) исследовал ультратонкие срезы из жирового тела больных личинок хруща под электронным микроскопом и отметил сходство этих включений с оспенным вирусом. Во второй половине 60-х годов было установлено, что подобный вирус встречается у зимней пяденицы (*Operophtera brumata* L.), у комара-дергуна (*Cainptochironomus tentans* Fabr.). К середине 70-х годов вирус оспы насекомых был описан у 17 видов, принадлежащих к четырём отрядам, весьма отдаленным друг от друга в систематическом отношении: жесткокрылым, чешуекрылым, двукрылым и прямокрылым. В отряде чешуекрылых вирус оспы поражал широкий спектр семейств: пядениц, медведиц, совок, менючниц, листовёрток, древооточцев. Оспенный вирус насекомых получил родовое наименование энтомопоксвируса.

Энтомопоксвирус поражает личиночную стадию насекомых, но при заражении сублетальными дозами они успевают превратиться в куколку, после чего погибают. Внешне больные личинки характеризуются потерей нормальной упругости тела, побелением, разжижением тканей — признаками, похожими на заболванение гусениц шелкопряда желтухой. Вирус локализуется в цитоплазме клеток жирового тела, а у некоторых видов насекомых — в гемоцитах. В световом микроскопе на окрашенных гистологических срезах через пораженные участки тканей видны два типа включений. Веретеновидные или ромбовидные включения имеют вид оптически плотной гомогенной массы; они постепенно увеличиваются в размерах. Яйцевидные или овальные образования — овоиды варьируют по величине от нескольких микрометров до 20 и более. Веретеновидные включения являются их предшественниками, они значительно мельче и окрашиваются обычными анилиновыми красками, состоят из белка и имеют паракристаллическую структуру; по этим особенностям они более похожи на полиэдры, чем на включения оспенного вируса позвоночных.

В овоиде на ультратонких срезах через эти включения под электронным микроскопом можно видеть вирионов. По своему виду и строению они похожи на вирионы вируса осповакцины и натуральной оспы человека. В центральной части яйцевидных телец расположена плотная сердцевина в форме параллелепипеда с закругленными краями (рис. 70); это нуклеонд вириона, содержащий макромолекулу двунитчатой ДНК. У разных видов насекомых размеры вириона варьируют от 0,15 до 0,4 мкм в длину и от 0,16 до 0,25 мкм в ширину; более



70. Энтомопоксвирус: вирионы овальной формы с шероховатой поверхностью; на ультратонком срезе в центре вириона содержится плотная сердцевина в форме параллелепипеда с слегка выпуклыми сторонами, в сердцевине заключен нуклеотид, у части насекомых обнаружено, что эти вирионы сопровождаются веретеновидными и ромбовидными включениями однородной структуры.

крупные встречаются у жуков, более мелкие — у комаров. У полностью сформированного, зрелого вириона сердцевина, содержащая нуклеиновую кислоту, заключена в многослойную липопротеиновую капсулу, окруженную волнистой шероховатой мембраной. В отличие от размножения в культуре клеток вируса оспы позвоночных репродукция энтомопоксвируса в теле искусственно зараженного насекомого протекает не синхронно, и в клетках одновременно наблюдаются все стадии формирования нового поколения.

В зараженных клетках тканей зимней пяденицы в начальной стадии репликации вируса в виrogenной области цитоплазмы появляются отдельные группы мелких зерен. Эти частицы собираются в плотные массы, которые делятся потом на пучки мелких игл. Из них разрастаются веретеновидные и ромбовидные включения. По мере роста они постепенно принимают овальную форму и утрачивают способность окрашиваться гистологическими красками. Овальные тела представляют собой конечную стадию развития вируса. Обычно в клетке образуется один крупный овоид, но в клетках тканей комара-долгунца таких включений может образоваться несколько и в каждом крупном овиде содержится много вирионов.

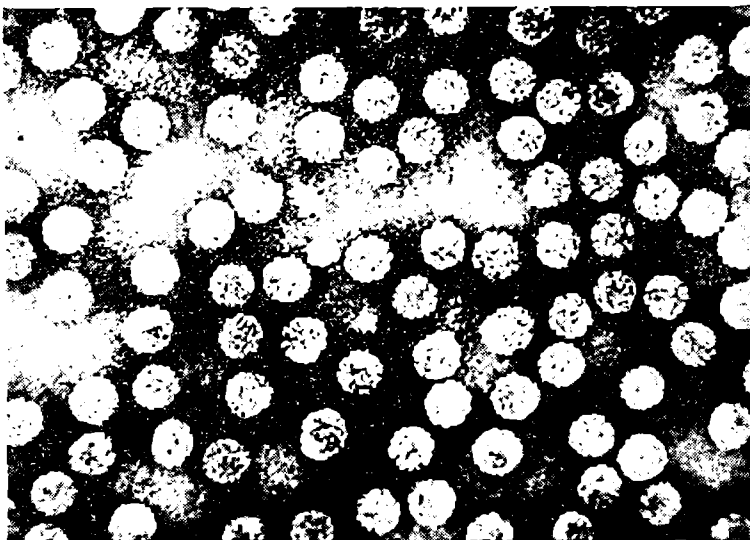
Цитопатическое действие вируса оспы насекомых в основном характеризуется исчезновением в цитоплазме клеток жирового тела капель жира и приобретением ею в конце концов пенистой структуры; патологических изменений ядра клеток не отмечается. После завершения формирования овидов оккупированная вирусом клетка погибает. Жировое тело и общая полость заполняются мириадами овидных включений, которые у части насекомых слишком малы, чтобы рассмотреть их в световом микроскопе.

Список поражаемых этим вирусом семейств насекомых невелик, но он характеризуется достаточно широким в систематическом отношении составом, что позволяет предполагать возможность дальнейших встреч с ним, в том числе среди чешуекрылых. Его специфичность носит довольно широкий групповой характер, проявляющийся вне всякой связи с филогенетической близостью поражаемых видов. Тутовый шелкопряд удавалось заразить некоторыми из них. Имеется ли у него собственный вид энтомопоксвируса — достоверных сведений пока нет. Однако у шелководов нет оснований не проявлять к нему интереса, так как со дня открытия этого вируса у насекомых прошло не много времени и изучение его продолжается.

**Вирус денсонуклеоза.** Возбудитель этого заболевания насекомых относится к парвовирусам. Парвовирусы достоверно известны у млекопитающих, где их типовым видом является *Parvovirus ratti* Kilham — латентный крысиный вирус. У насекомых парвовирус представлен вирусом денсонуклеоза (ВДН), который вызывает болезнь «плотных ядер» (лат. *densum* — густой, плотный).

Первое упоминание о подобных цитопатических признаках у насекомых относилось к болезни гусениц большой воцинной моли (Мейнадье, 1964). Затем этот вирус у большой пчелиной моли (*Galleria mellonella*) подробно описал Е. Курстак (1972). Оказалось, что большое количество денсонуклеозного вируса легко может быть





71. Вирионы вируса денсонуклеоза тутового шелкопряда (Иша-изолят), размеры икосаэдрических телец 21 — 25 нм.

экстрагировано из этих больных гусениц. Рекомендованный им метод выделения состоит из двух циклов дифференциального центрифугирования, с промежуточной обработкой ферментами для удаления клеточных нуклеиновых кислот и последующим зональным центрифугированием в градиенте сахарозы, диализом и фильтрацией через мелкопористые фильтры.

ВДН — голый вирус без оболочки, сферический (изометрической формы), весьма малых размеров (18—22 нм), икосаэдрической симметрии (рис. 71). Содержит однопитчатую макромолекулу ДНК с молекулярной массой около 5 млн. Вследствие очень мелких размеров вирионов, описание их тонкой структуры трудно с уверенностью детализировать. Вирионы некоторых парвовирусов млекопитающих имеют 32 капсомера, а денсонуклеозный вирус большой вошпиной моли предположительно содержит 42 капсомера, что указывает на известные различия в строении обеих групп вирусов.

ВДН устойчив к действию эфира и хлороформа, сохраняет инфекционность при температуре 80°C в течение 10 мин, а при низких температурах (—70°C) — в течение нескольких лет. В высушенном состоянии менее стоек. ВДН вызывает заболевание также гусениц бабочки нимфалиды *Junonia coenia* Нп. (Тинслей, Лонгворт, 1973). Обнаружен он и у лабораторной популяции комара *Aedes aegypti* (Лебедева с соавторами, 1972). Ядра клеток жирового тела у пораженного вирусом насекомого увеличены и содержат плотные образования с положительной реакцией Фельгена. Вирус поражает также жуков и перепончатокрылых насекомых.

Вирусы большой пчелиной моли и нимфалиды, по результатам электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле, характеризуются наличием в вирусном белке четырех полос, из которых две оказались идентичными. Серологически оба вируса оказались близкими, но отличными от парвовируса млекопитающих. Переход ВДН из кишечника в гемолимфу не прослежен. С помощью иммунофлюоресценции и иммунопероксидазной техники показано, что через 4—7 ч после заражения антиген вируса может быть обнаружен в цитоплазме. Через 8—13 ч при температуре 32°C вирусный антиген появляется в ядрах. При электронном микрокопировании обнаружено, что к этому времени в плотной хроматиновой зоне ядра возникают первые вирионы. Они продолжают размножаться, разрушая ядерную оболочку. Под конец вирионы заполняют всю клетку.

ВДН очень контагиозен и убивает гусениц большой пчелиной моли при 28°C через 4—6 дней. В зараженной гусенице запас гликогена истощается, заметно увеличивается содержание в жировом теле мочевой кислоты, особенно если инфекция случилась в раннем возрасте. Если гусеницу во время интенсивного роста заразить высокой концентрацией вируса, ее развитие останавливается. Если же заразить ее слабой дозой вируса, окукливание может наступить, и инфекция распространится из личиночных тканей на развивающиеся имагинальные органы, включая половые железы самца и самки.

Сами половые клетки (гаметы) не проявляют каких-либо признаков заражения. Только в редких случаях гусеницы и куколки с внешними признаками поражения ВДН могут превратиться в имаго и потому передача инфекции трансвариально оказывается маловероятной. Некоторые авторы (Бётэр, 1973) допускают, что отдельные особи, у которых отсутствуют цитопатические изменения, в состоянии оказаться носителем вируса и передать его следующему потомству.

ВДН большой пчелиной моли высоко специализирован и не поражает даже близкородственные виды насекомых. Если вирус, поражающий бабочек, впрыснуть личинке майского жука, он сохранится в ней до 30 дней, но при этом с восьмого дня после заражения наступает прогрессирующая убыль его в теле этого насекомого. Вместе с тем ВДН бабочки-юнонии значительно менее специфичен. В опытах скармливания этот вирус легко заражал гусениц крапивницы (*Aglais urticae* L.). Размножившись в этих гусеницах, вирус оказался заразительным для капустной совки (*Mamestra brassicae* L.), непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) и тутового шелкопряда (*Bombyx mori* L.); но он не инфекционен для капустницы (*Pieris brassicae* L.) и сатурнид (*Philosamia* Spp.). Он не заражает также гусениц большой пчелиной моли, видимо, потому, что относится к другому виду или разновидности вируса, в отличие от ВДН, поражающего большую пчелиную моль.

Симидзу в 1968 г. выделил из гусениц тутового шелкопряда, пораженных типичной фляшерией в крестьянских хозяйствах г. Ина (профектура Нагано, Япония) вирус, который он назвал *Ина-изолят* (1974). Кавасе и Сеок Куон Канг (1976) получили электронные микрофотографии этого сферического вируса с диаметром вирионов 25 нм

(по другим данным — 21 нм). В отличие от вируса инфекционной фляшерии, содержащего одонитчатую РНК (Кавасе и др., 1974), у вируса Ина-изолят оказалась одонитчатая ДНК (Кавасе и Кё, 1976). Исследования нуклеиновых кислот этого вируса и сопоставление полученных результатов показали, что молярные соотношения пуриновых и пиримидиновых оснований в нуклеотидах у Ина-изолята и вируса денсонуклеоза близки или даже тождественны.

Ватанабе и др. (1976) описали гистологическую картину этого фляшериеподобного заболевания у тутового шелкопряда, которая оказалась тождественной той, которую вызывает у большой пчелиной моли вирус денсонуклеоза. Для радиографии пораженной вирусом ткани использовали уридин и тимин, которые были мечены радиоактивным изотопом водорода ( $H^3$ ). Установлено, что вирус размножается в эпителии средней кишки шелковичных червей, что синтез ДНК во время размножения вируса наблюдается преимущественно в ядрах пораженных вирусом цилиндрических, а не бокаловидных клеток. В начале поражения эпителиальных клеток признаки денсонуклеоза только частично различимы в клеточных ядрах. В последующей стадии болезни пораженные клетки отторгаются и вытесняются в просвет кишечника. Одновременно с этим наблюдается увеличение количества бокаловидных клеток. В этом процессе освобождения инфицированного эпителия от клеток-вирусоносительниц усматривают проявление защитной реакции организма насекомого. Вирус не образует включений в пораженных клетках, которые можно было бы различить с помощью светового микроскопа.

Маэда, Ватанабе и др. (1977) осуществили тщательную очистку вируса Ина-изолят. Среднюю кишку зараженной гусеницы гомогенизировали в буфере и гомогенат центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 10 мин. Затем дважды проводилась обработка фторуглеродом с последующим центрифугированием. В заключение центрифугирование проводилось в 50%-ном растворе сахарозы при 65 тыс. об/мин, в течение 3 ч, центрифугат суспензировали в буфере и фракционировали в градиенте плотности растворов 10—40%-ной сахарозы. В реакции с диффузией в геле по Оухлерлоии антисыворотка к очищенному антигену Ина-изолята реагировала, кроме собственного антигена, с антигеном малого вируса фляшерии SFV штамма Мацуи, что говорит о наличии у них каких-то общих детерминантов, но не реагировала с антигеном вируса инфекционной фляшерии FV. Ватанабе считает, что Ина-изолят по болезнетворным свойствам и химическим характеристикам очень похож на денсонуклеозный вирус гусениц большой пчелиной моли.

Каиг и Кавасе (1978) исследовали некоторые свойства белка капсида «фляшерийного вируса Ина». Протеин очищенного вируса фракционировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле; аминокислотный состав определяли на аминокислотном анализаторе. Выявлено два полипептидных компонента в белке капсида этого вируса, условно обозначенных как первый и второй полипептиды. Молекулярная масса первого 55 500, второго — 45 500. Первый полипептид является основной частью бел-

ка капсида этого вируса и составляет 80% от всей массы вирусного протеина. Гидролиз белка капсида позволил установить наличие 17 аминокислот, состав которых оказался аналогичным найденному у ряда других вирусов насекомых.

С. К. Канг с соавторами (1978) изучили у предварительно тщательно очищенного вируса Ина-изолят некоторые свойства его нуклеиновой кислоты. С помощью электронного микроскопа установлено, что вирионы представляют собой сферические тела диаметром около 20 нм (близко к предыдущим цифрам), капсомер кубического типа, симметрия икосаэдрического строения. Седиментационный коэффициент 100. Из очищенных вирионов экстрагировали нуклеиновые кислоты в виде порошка и фиброзной массы; тот и другой дали положительную реакцию с дифениламином. На основании формальдегидной реакции и окраски препарата акридиноранжем выяснено, что вирусный геном у интактного вируса представлен однострочной ДНК, что делает его похожим на денсонуклеозный или на адено-ассоциированный вирус.

Ватанабе и Маэда (1978), руководствуясь тем, что Ина-изолят отличается от фляшерийных вирусов наличием ДНК, а не РНК, серологическими и цитопатическими особенностями — уплотненностью ядер клеток, а также сходством с денсонуклеозом гусениц большой пчелиной моли и других насекомых, сочли вызываемые им поражения за самостоятельный вид инфекции. В соответствии с международной классификацией вирус Ина-изолят был отнесен к семейству парвовирусов, к роду денсонуклеозных вирусов. Так как он серологически отличается от вирусов денсонуклеоза других насекомых, было предложено обозначать его как денсонуклеозный вирус тутового шелкопряда, а вызываемую им болезнь — денсонуклеозом этого насекомого.

В шелководческих хозяйствах префектуры Нагано (Япония) Ватанабе и Симизу (1980) обнаружили постоянное, умеренное очаговое, энзоотическое поражение выкормок денсонуклеозом. Первоисточником этих энзоотий оказалась тутовая огневка (*Glyphodes pyloalis*). В годы обильного заселения плантаций огневкой она поражается денсонуклеозом, вирус заносится с листьями шелковицы на выкормки, заражает гусениц и сохраняется в пыли червоводен. Развитие энзоотического поражения выкормок в эпизоотию денсонуклеоза сдерживается распространением в префектуре слабовосприимчивых пород к этому вирусу. В префектуре Сайтама, расположенной несколько юго-восточнее от Нагано, вирус денсонуклеоза не был обнаружен у огневки на тутовых плантациях, на выкормках шелковичных червей и в пыли червоводен.

Ватанабе и Маэда сопоставили генетически обусловленную устойчивость двух пород тутового шелкопряда к вирусу денсонуклеоза при заражении гусениц через кишечник. Сам по себе смертельный исход экспериментального заражения не раскрывает характера противовирусной защиты насекомого. Они различают рефракторный (фр. отклоняющий) тип устойчивости, когда организм защищен от вторжения вируса, и устойчивость типа резистентности (сопротивляемости), когда организм тутового шелкопряда не может избежать заражения,

но способен выжить, борясь с проникшим в него вирусом. Так, иммунитет к фляшерийному вирусу — следствие резистентности, достигаемой заменой пораженных клеток кишечного эпителия здоровыми, а к ядерному и цитоплазматическому полиэдрозам проявляется рефракторность, в отличие от вируса фляшерии, который способен заражать даже относительно иммунные породы. Но они оказывают сопротивление развитию болезни и при достаточной силе механизма иммунитета могут добиваться самоизлечения. Наконец, самоизлечение североамериканской совки от цитоплазматического полиэдроза обеспечивается двумя механизмами: интенсивная регенерация эпителия (резистентность) и появление рефракторности, устойчивости его к повторному инфицированию (Ямагути, 1976).

В основе иммунитета тутового шелкопряда к денсонуклеозу лежит рефракторность, в большей или меньшей степени препятствующая заражению гусеницы вирусом. Стойкость в недопущении инвазии (вторжения) определяется наследственно обусловленным отсутствием у атакованных вирусом клеток шелкопряда рецепторов, обеспечивающих проникновение вирионов в клетку, и, быть может, отсутствие необходимого обеспечения последующей деятельности вируса со стороны ферментативного аппарата заражаемой клетки.

Одну из наиболее устойчивых пород шелкопряда, относящихся к китайской группе С-124, Ватанабе и Маэда сравнивали с наиболее восприимчивой к вирусу денсонуклеоза породой, принадлежащей к японской группе N-124. Иммунитет первой был столь силен, что гусеницы почти поголовно избежали заражения через кишечник. Авторы провели скрещивание той и другой породы в разных комбинациях, в том числе с получением тригибридов. В итоге выяснилось, что устойчивость С-124 не наследуется при гибридизации, так как этот признак контролируется рецессивным главным геном (олигогеном), который действует самостоятельно и легко выявляется при скрещивании; это позволяет использовать племенную работу как область наиболее эффективных методов борьбы с этим заболеванием.

#### Вопросы для самопроверки

1. Какие используются методы для выявления и идентификации вирусов?
2. Какие признаки используют для систематизации вирусов?
3. Как протекает процесс заражения шелковичных червей вирусом желтухи?
4. К чему сводится взаимоотношение вируса с поражаемой им клеткой и из каких этапов складывается процесс воспроизводства (размножения) вируса в клетке?
5. Каковы структурно-морфологические особенности вириона и полиэдров вируса ядерного полиэдроза?
6. Каковы особенности латентного (скрытого) вирусоносительства у насекомых?
7. Каковы отличительные особенности внешнего проявления и течения желтухи у шелковичных червей?
8. В чем характерные особенности вируса цитоплазматического полиэдроза и вызываемого им заболевания, его сходство и различия с ядерным полиэдрозом кишечника, вызванного вирусом, содержащим РНК?
9. Чем характеризуется группа фляшерийных вирусов и что представляют собой вызываемые ими заболевания?
10. Чем характеризуется вирус денсонуклеоза и вызываемое им поражение гусениц тутового шелкопряда?

### 4.1. Краткая характеристика грибов

**Грибы** (Fungi или Mycetes) — самый обширный тип или отдел среди низших слоевищных (талломных) растений, не содержащих хлорофилла. Грибы делятся на истинные и ложные. К ложным относятся бактерии и слизистые грибы. Истинные, или настоящие, грибы, в отличие от бактерий, имеют оформленное клеточное ядро, а в отличие от слизистых — клеточную оболочку.

**Строение и образ жизни грибов.** Вегетативное тело большинства грибов — грибница (мицелий) состоит из разветвленных тончайших нитей — гиф, чаще всего бесцветных. Благодаря микроскопической тонине гиф и столь же малым размерам органов плодоношения обширную группу этих организмов называют микроскопическими грибами, в отличие от шляпочных грибов, образующих крупные плодовые тела. Гифы септированы — разделены перегородками на обособленные клетки; у низших грибов грибница — единое цитоплазматическое тело со множеством ядер. Цитоплазма мицелия более или менее гомогенна, но содержит вакуоли и зерна, количество которых возрастает по мере старения гиф. Метахроматическая зернистость цитоплазмы содержит нуклеиновые кислоты, белки, метафосфаты, а в качестве запасных веществ — мелкие капельки жира и гликоген. У гиф акропитальный (верхушечный) рост и клетки тем старше, чем дальше расположены от верхушки; разрастаясь, мицелий пронизывает субстрат, на котором развивается гриб.

Грибы — бесхлорофилльные растения и могут питаться только готовым органическим веществом, как сапрофиты или паразиты. Паразитируют они чаще всего на растениях, но встречаются и у животных, в том числе у насекомых. Большинство паразитических грибов в состоянии питаться также сапрофитно и только немногие известны как строго облигатные (обязательные) паразиты. Среди грибов распространен симбиоз (сожительство): многие живут на корнях высших растений, образуя так называемую микоризу (например, лесные шляпочные грибы). Комплексным организмом являются лишайники, состоящие из сожительствающих вместе грибов и водорослей. Описаны различные виды симбиоза грибов с членистоногими. Питаются грибы осмотически, обычно через значительную часть поверхности гифы,

за исключением очень старых или отмирающих участков. Гифы выделяют в оккупированную ими среду внеклеточные (экстрацеллюлярные) ферменты, расщепляют макромолекулярные вещества субстрата, поглощают их путем диффузии. Большая их часть используется в качестве пластического и энергетического материала. Потребность в азоте они обеспечивают за счет белков, пептонов, аминокислот (аспарагина, аргинина, тирозина, лейцина и др.), а в углероде — за счет различных углеводов. Большинство грибов способны разлагать жиры на жирные кислоты и глицерин. Кроме органических, необходимыми элементами минерального питания являются: калий, натрий, фосфор, кальций, железо и ряд микроэлементов.

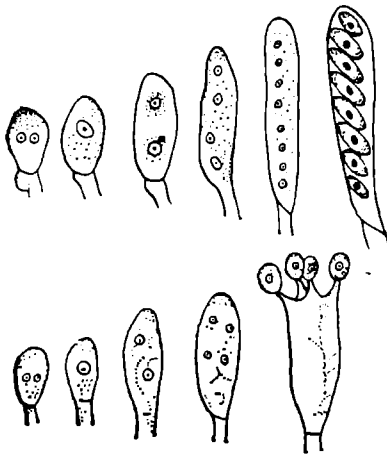
**Систематика.** Тип настоящих грибов (*Еnmycetes*) разделяется на высшие и низшие: у низших мицелий может быть слабо развит или отсутствовать совсем, или же гифы мицелия не разделены на отдельные клетки. У высших грибов гифы состоят из отдельных, относительно обособленных клеток. Основным признаком для последующего определения систематической принадлежности грибов служит способ их размножения. Грибы размножаются половым и бесполовым путем. Простейшим видом бесполого размножения является вегетативное, которое может происходить отдельными кусочками грибницы или ее специализированными и несколько видоизмененными одиночными клетками, способными прорасти и дать начало новому мицелию. Грибы размножаются также спорами. Споры—это чаще одноклеточные образования, рассеивание которых служит способом распространения грибов. Спорообразование происходит на специализированных гифах мицелия и может иметь эндогенный и экзогенный тип плодоношения. Эндогенные споры образуются в особых вместилищах — спорангиях на концах особых гиф — спорангиеносцах. Эндогенное спорообразование имеется у низших грибов и у некоторых высших. Всем же высшим и немногим низшим свойственно экзогенное спорообразование. Такие споры называются *конидиями* или *конидиоспорами*. Они развиваются на возвышающихся над субстратом воздушных гифах, на отходящих от них ответвлениях — конидиеносцах. В зависимости от вида гриба конидиеносцы могут быть одиночными или с ветвлениями различного типа, могут объединяться в сросшиеся группы — коремии и т. д. Форма конидии чаще всего сферическая или эллипсоидальная. В процессе созревания конидии верхушка конидиеносца отшнуровывает ее; у многих грибов под первой конидией возникает ряд следующих в так называемом *базипетальном порядке* (от вершины к основанию), когда самая молодая конидия находится у основания, а самая старая — на верхушке этой цепочки.

Споры могут образовываться не только бесполом, но и половым путем. При половом способе размножения споры развиваются в специальных органах плодоношения. Строение этих органов разнообразно и является важным систематическим признаком в микологии. У низших грибов зигота, образующаяся после слияния гамет, одевается толстой оболочкой, превращается в спору и переходит в состояние покоя. С наступлением условий для прорастания из споры развивается специальный орган — спорангий, в котором формируются спорангио-

споры. У высших грибов оплодотворенная женская клетка растет и развивается в новое поколение гриба, на мицелии которого в дальнейшем формируются спорообразующие органы, а в них (если это аски) или на них (если это базидии) появляются споры, которыми завершается половой цикл размножения гриба. Споры приспособлены к сохранению вида в неблагоприятных внешних условиях. Споры бактерий и некоторых одноклеточных простейших животных также являются средством сохранения жизни отдельных особей, но не средством их размножения, как у грибов.

Класс низших грибов *Phycomycetes* (грибы-водоросли) — обитатели водной среды и суши, сапрофиты или паразиты — делятся на три класса: от самых примитивных представителей до обширной группы форм с хорошо развитым, обычно не членистым мицелием; к последним относится зигомицеты. Зигомицеты — обширный подкласс, включает в себя 400 видов, больше всего сапрофитов, значительно меньше — паразитов животных. Состоит из порядка мукоровых грибов, главным образом из широко распространенных разрушителей в природе мертвых органических субстратов, и порядка энтомофгоровых — наиболее высокоорганизованных среди низших грибов, гифы которых в зрелом состоянии септированы, разделены на клетки. В порядок входит только одно семейство *Entomophthoraceae*. Название семейства показывает, что эти грибы большей частью являются паразитами насекомых. От других представителей класса грибы этого семейства отличаются преимущественно размножением бесполом путем; половой способ известен только для некоторых видов семейства.

Высшие грибы, в зависимости от того, образуют ли они, помимо конидиального плодоношения, аски или базидии, относятся к одному из двух классов — к сумчатым (*Ascomycetes*) или базидиальным (*Basidiomycetes*). Аски, или сумки, образуются на концах аскогенных гиф непосредственно на мицелии или группируются в особых плодовых телах. Базидии развиваются на дикариотическом мицелии из конечной клетки гифы и состоят из основания и вертикальных выростов (стеригм), чаще — четырех; последние на своих вершинах образуют базидиоспоры (рис. 72).



72. Схема развития сумки (верхний ряд) и базидии (нижний ряд).

Существует обширная группа грибов, у которых способ полового размножения неизвестен. Особенно многочисленны они среди тех, которые должны быть отнесены по своему происхождению к высшим — сумчатым, реже — к базидиальным и еще реже — к фиккомицетам. Это большая группа, объединяющая около 25 000 видов, относящихся к отделу высших грибов, к классу дейтеромицетов или, иначе, к так назы-



ваемым несовершенным грибам (лат. *Fungi imperfecti*). Такое название дано потому, что отсутствие сведений о способах полового размножения не позволяет отнести эти грибы, в соответствии с принципами микологической систематики, к той или иной группе «совершенных» грибов. Классификация их строится по морфологическим особенностям конидиального плодоношения и носит временный характер, так как после обнаружения у этих грибов асков или базидий их относят к соответствующему классу. Вместе с тем к классу сумчатых грибов, к порядку *Plactascales* принадлежит семейство *Aspergillaceae* и род *Aspergillus*. Однако только у немногих видов грибов этого рода известно сумчатое спороношение, так как оно, по-видимому, утрачено ими в процессе эволюции и потому они отнесены к классу несовершенных.

Наличие у несовершенных грибов гетерокариоза—нескольких разнокачественных ядер в одной клетке мицелия -- и способность к анастомозированию гиф (греч. *anastomosis* — сообщающиеся сосуды) создает широкую возможность для рекомбинации наследственных свойств и обуславливает их большую внутривидовую изменчивость (Захаров и др., 1972). Микологическая систематика осложняется также тем, что один и тот же гриб может иметь несколько типов бесполого размножения. Морфология его настолько меняется, что отдельные стадии развития могут быть приняты за различные организмы и нередко описаны под разным видовым названием. В итоге виды грибов приобретают многочисленные синонимы.

#### 4.2. Грибы — паразиты насекомых

Грибы — паразиты насекомых относятся к классу низших грибов фикомицетов и к классу высших грибов, главным образом к сумчатым, а чаще всего к несовершенным (Евлахова, 1974). Систематическое положение энтомопатогенных грибов показано в табл. 4.

**Фикомицеты.** Класс фикомицетов обычно делят на три подкласса: архимицетов, оомицетов и зигомицетов. В подклассе оомицетов энтомопатогенные грибы найдены в порядке хитридиевых, а у зигомицетов наибольшее количество их содержится у порядка энтомофторовых и, отчасти, у мукоровых; у последних известны некоторые возбудители раневых грибных инфекций насекомых. Порядок *Entomophthorales* включает в свой состав только одно семейство — *Entomophthoraceae*, которое прежде делилось на два рода: *Entomophthora* и *Empusa*. Их различали по наличию или отсутствию ветвления у конидиеносцев и по количеству ядер в конидиях. Теперь их объединили в один род *Entomophthora*, без достаточной впрочем уверенности в подлинной однородности всего его состава, а название рода *Empusa* стало его синонимом.

Один из наиболее известных представителей рода энтомофторовых — *Entomophthora musca* (Cohn) Fresenius, 1855; синоним *Empusa musca* Cohn, 1855. Гриб вызывает ежегодно, в конце лета, массовую гибель комнатных мух. Мертвые мухи оказываются прикреплены к стене или оконному стеклу; вокруг мухи на расстоянии 1—2 см об-

Тип	Entomycetes		
Отдел	Низшие грибы		Высшие
Класс	Phycomycetes		Ascomycetes
Подкласс	Zygomycetes		Euascomycetes
Порядок	Entomophthorales		Hypocreales
Семейство	Entomophthoraceae		Clavicipitaceae
Род	Entomophthora	Tarichium	Cordyceps
Вид	<i>E. muscae</i> и др.	<i>T. megaspermum</i> и др.	<i>C. militaris</i> и др.

разуется ореол из белого порошка; такой же налет покрывает ее брюшко. Порошок этот состоит из множества конидий, которые, созревая, с силой отбрасываются в стороны. Попав на муху, конидия прилипает к ней, при прорастании ее ростковая трубка внедряется в тело насекомого. Распадаясь в гемолимфе на отдельные клетки, гриб разносится по всему телу, размножается и вызывает гибель. На брюшке трупа вырастают пробившиеся через кутикулу конидиеносцы, на которых образуются одиночные шаровидные конидии.

Представители семейства энтомофторозых часто вызывают массовую гибель насекомых, в том числе вредителей сельскохозяйственных культур. Это послужило поводом для изучения роли этих грибов в регулировании численности вредных насекомых в местах их обитания. У шелковичного червя энтомофторозые грибы встречаются редко, хотя случаи поражения ими описаны в литературе. Несмотря на солидный срок изучения энтомофторозых грибов, рациональный в практическом отношении и надежный критерий классификации этого весьма обширного семейства все еще не найден, о чем свидетельствуют многочисленные синонимы в названиях этих грибов, попытки упорядочения классификации на основе разбивки их на группы по типам конидий (Хатчисон, 1963), выделение новых самостоятельных систематических групп (например, род *Conidiobolus*, по предложению Срайнивесен и др. 1964); наконец, выяснение возможности перехода от морфолого-филогенетических к биохимическим принципам систематизации. Существующая неопределенность в этой области может быть иллюстрирована следующими примерами.

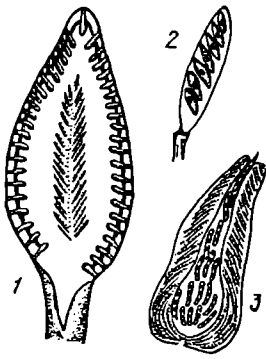
В состав семейства *Entomophthoraceae* входит род *Tarichium* (Cohn, 1870). Представители его вызывают у гусениц совок и у ряда

## энтомопатогенных грибов

грибы			
Deuteromycetes			
Moniliales			
Moniliaceae			
Soraspora	Aspergillus	Beauveria	Metarrhizium
S. uvella	A. flavus и др.	B. bassiana и др.	M. anisopliae

других насекомых черную мускардину. У этого рода известны только покоящиеся хламидоспоры, покрытые толстой оболочкой. Они заполняют труп гусениц в виде черной трупоподобной массы. А. А. Ячевский (1917) предполагал, что грибы из рода *Tarichium* могут оказаться в действительности видами из рода *Empusa*, *Entomophthora* или *Lamia*, у которых конидиальная стадия не была обнаружена. Вероятность такого заключения вытекает из высказываний ряда микологов, наиболее осведомленных относительно особенностей этой группы грибов (Текстер, 1888; Мак Леод, 1963; Хатчисон, 1963). Так, в частности, возбудитель зеленой мускардины *Entomophthora virescens* Thaxt., американской озимой совки (*Agrotis fennica* Tausch) является конидиальной стадией *Tarichium rufegaspergum*. Разница во внешнем виде и окраске трупов, послужившая основанием для различного наименования болезней, обусловлена тем, что при черной мускардине конидиальный налет не образуется, а черный цвет трупа — результат скопления в нем темноокрашенных хламидоспор. При зеленой же мускардине развивающееся на поверхности трупа конидиальное спороношение покрывает его зеленым налетом.

В качестве возбудителя красной мускардины И. М. Красильщик (1886) описал гриб, который он ошибочно отнес к роду *Tarichium* (*T. uvella*). Грибница этого гриба распадается в теле пораженного насекомого на коричнево-красные бугорчатые оидии, отличающиеся от хламидоспор энтомофторовых, и в том числе от *Tarichium* окраской и размерами. Красная мускардина описана у сьекловичного долгоносика, гусениц озимой совки, акациевой огневки и др. Гриб, выделенный Красильщиком, вместе с другими, подобными ему возбудителями красной мускардины, при которой трупы не покрываются ко-



73. Строение плодового тела у гриба из рода кордицепс:

1 — продольный разрез через строму (плодовое тело); по периферии видны многочисленные перитеции; ? — отдельная сумка со спорами; 3 — перитеции; с сумками (асками).

нидиальными налетом, был выделен в особый род *Sorospora*. Удалось установить, что при развитии в определенных условиях у этого гриба образуется конидиальное спорообразование, что в сочетании с другими признаками позволило отнести его к несовершенным грибам, а не к энтомофторовым.

**Аскомицеты.** Ряд представителей класса сумчатых грибов также тесно связан с насекомыми. Чрезвычайно характерны поражения насекомых, вызываемые некоторыми сумчатыми грибами из рода *Cordyceps*, семейства *Clavicipitaceae*, порядка *Hypocreales*, относящихся к группе пиреномицетов; они объединяют несколько порядков грибов класса *Ascomycetes*. Их характерная особенность — кувшинообразное плодовое тело — перитеций, с узким отверстием на вершине, через которое выбрасываются созревшие споры (рис. 73). У высших представителей этих грибов перитеции заключены в особые плотные сплетения

мицелия склероциального характера — стромы, которые состоят из пожжи и расширенной плодущей части; плодущая часть *Cordyceps* вырастает на поверхности труп насекомого, а сам мумифицированный труп представляет как бы склероций гриба, образовавшийся под покровом насекомого. Гриб этот встречается на различных насекомых, в разных стадиях их развития, но особенно часто — на гусеницах. Грибы из рода *Cordyceps* образуют также стадии конидиального плодоношения, описанные в различных случаях, как самостоятельные виды несовершенных грибов; конидиеносцы чаще всего ветвятся по типу, свойственному роду *Verticillum*, или соединены в коремии, как у рода *Usaria*.

К сумчатым грибам, поражающим насекомых, относится конидиальная стадия одного из часто встречающихся несовершенных грибов — *Aspergillus*. В конидиальной стадии эти грибы вызывают заболевание, относящееся к мускардинам, и характеризуются тем, что мумифицированный труп гусеницы покрывается зеленоватым порошкообразным или войлочным налетом.

Среди сумчатых грибов встречаются так называемые *вторичные паразиты*, которые поражают энтомопатогенные грибы. К ним относится, в частности, гриб *Melanospora parasitica* Tulasne, 1865, из семейства *Melanosporaceae*, который паразитирует на *Cordyceps militaris*, на возбудителе белой мускардины шелкопряда — *Beauveria bassiana* и *Beauveria tenella* (Шехурина, 1960). Он поражает энтомопатогенов, развивающихся на насекомых, или же развивается на этих же грибах в культурах на питательных средах.

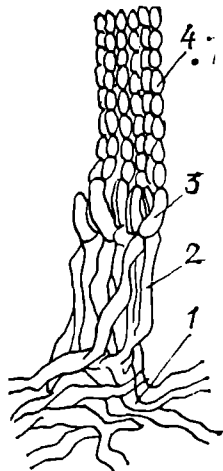
Особое место среди найденных у насекомых аскомицетов занимают единичные виды дрожжевых грибов, которые вызывают у них септицемию (*Nemiascomycetes*); их отличают от других дрожжеподобных

организмов, обнаруживаемых у насекомых, патогенность которых чаще всего сомнительна и отношение их с насекомыми носит скорее всего симбиотический характер.

**Несовершенные грибы** (*Fungi imperfecti*). Эта условная в систематическом смысле группа (класс *Deuteromycetes*) составлена по признаку отсутствия полового способа воспроизводства, вследствие того, что оно утрачено в ходе их филогенеза или не было обнаружено исследователями. Для этих грибов характерны морфологические особенности конидиального спороношения. Среди несовершенных энтомопатогенных грибов одним из первых, по времени его открытия, оказался гриб, привлекавший к себе внимание И. И. Мечникова в свете его идеи об использовании микробов для борьбы с вредителями растений (рис. 74). Был он обнаружен на хлебном жуке-кузьке (*Anisoplia austriaca* Herbst) и описан им под названием *Entomophthora anisopliae* (1879), а позже — *Isaria destructor* (1888). После неоднократных переименований Н. Сорокин назвал его *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (1883), а Делакруа — *Oospora destructor* (Metsch.) Delacroix (1893); последним названием пользуются изредка и в настоящее время.

Этот энтомопатогенный космополит поражает широкий видовой спектр насекомых, в том числе личинок чешуекрылых, но его преимущественной жертвой оказываются обитающие в почве личинки жуков. Его зеленовато-серые конидии сообщают конидиальному налету на покровах пораженного насекомого оливковый цвет. Для шелкоичных червей он тоже патогенен. Каваками с сотрудниками (1979) установили, что источником этой инфекции для шелкопряда являются не только свободно живущие насекомые на плантациях шелкоицы, но и почва под этими насаждениями. Гриб легко выделяется из почвы на среду Чапека с некоторыми добавками, придающими ей избирательные свойства. Японские авторы обнаружили также присутствие гриба с помощью прикопанных в образцы почвы живых куколок, выполнявших по отношению к этому грибу функцию ловчих приманок. Гриб зимует в почве, живет и размножается в ней. Среди многочисленных штаммов, выделенных в ряде префектур Японии, обнаружены три варианта этого гриба, отличающиеся пигментацией колоний, формой и размерами конидий. За небольшим исключением инокулирование шелкоичных червей выделенными штаммами показало их высокую инфекционность.

И. М. Красильщик на организованной по совету И. И. Мечникова в 80-х годах прошлого столетия биоэнтомологической станции в течение четверти века (1883—1908) продолжал работы по применению энтомопатогенных грибов в качестве биоинсектицидов. К началу 30-х годов нашего века биологический метод борьбы вновь привлек к себе внима-



74. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff):

1 — мицелий (грибница); 2 — конидиеносцы, образующие паисадный слой; 3 — стеригмы (фиаиды) в виде канделябров; 4 — конидии

ние. К этому времени проходило испытание многих видов энтомопатогенных грибов с конидиальным спорообразованием, среди которых наибольший интерес был проявлен по отношению к возбудителю белой мускардины и который стал известен благодаря изучению этой болезни у шелковичных червей. Существенным этапом в разработке биологического метода защиты растений стали исследования Н. А. Теленги и его сотрудников, предложивших способы культивирования гриба *V. bassiana* для массовой наработки; ему принадлежит также идея применения этого биопрепарата совместно с сублетальными дозами химических инсектицидов, что резко повысило эффективность борьбы с колорадским жуком и свекловичным долгоносиком.

**Два типа поражения насекомых микозами.** Путь проникновения энтомопатогенных грибов в поражаемые ими организмы, в основном, перкутанный (через кожу), независимо от их систематической принадлежности, а местом первоначального размножения оказывается обычно гемолимфа. Однако дальнейшая деятельность грибов и их участие в развитии болезни имеют отличительные черты, определяемые облигатным или условным характером их паразитической способности.

Облигатный характер паразитизма последовательнее и сильнее всего выражен у грибов порядка *Entomophthorales* класса *Phycomycetes*, а условный — у высших грибов, главным образом сумчатых и несовершенных. Энтотофторовые грибы — высокоспециализированные болезнетворные агенты, неспособные к сапротитным условиям питания, к культивированию на искусственных средах: они развиваются только в живой ткани и прекращают свое развитие, если оккупированное ими насекомое раньше времени погибает. Так, при искусственном умерщвлении тлей в начальном этапе развития микоза, вызванного энтотофторовым грибом, жизнедеятельность патогена во внутренних органах насекомого прекращалась.

У высших, условно патогенных грибов возможность проявления паразитизма обусловлена состоянием организма насекомого и рядом внешних факторов, способствующих преодолению сопротивляемости пораженного организма. Кроме того, паразитарная деятельность условно патогенных грибов ограничена зоной наиболее слабого сопротивления — гемолимфой, где они размножаются в течение почти всего периода жизни инфицированного насекомого. После гибели насекомого жизнедеятельность этих грибов в трупe не прекращается, но паразитарный способ питания заменяется сапротитным и теперь уже гриб беспрепятственно проникает во все органы и ткани.

В том и другом случаях инфекционный процесс завершается заполнением тела насекомого грибами, продуктами жизнедеятельности гриба и образованием в общей полости насекомого покоящихся спор, либо наружного конидиального плодоншения, которые и определяют различия внешнего вида трупов насекомых. Наиболее известным возбудителем микозов являются грибы из рода *Tarichium*, семейства энтотофторовых, которые за редким исключением не образуют конидий. Они вызывают гибель гусениц озимой совки, совки-гаммы, капустной совки и некоторых других насекомых. Заболевшие гусеницы опухают, меняют окраску, гифальные тела заполняют гемолим-

фу, затем они разрастаются в гифы, которые дают начало покоящимся спорам. Все ткани тела лизируются, насекомое чернеет, превращается в мешочек, наполненный пластическим содержимым из покоящихся спор, которое по мере высыхания трупа превращается в поршковидную массу зелено-бурого, оранжевого и другого цвета в зависимости от вида *Tarichium*.



75. Озимый червь, погибший от хламидоспороза (красная мускардина), вызванная мутовчатым гифомицетом Сороспорела увела. Из разрыва в коже высыпается трутоподобная масса покоящихся спор. (Спиру, 1920).

Гриб — *Sorosporella uvella* (Krass.) Gird., который в отличие от грибов из рода *Tarichium* (класс фикомицетов) относится к классу несовершенных, тоже образует покоящиеся споры в теле насекомого. Он поражает гусениц различных совок, срезковичного долгоносика, личинок пластинчатых жуков и др. У инфицированного насекомого из бесцветных дрожжеподобных почкующихся клеток эндогенно образуются покоящиеся споры. После обильного скопления споры разрывают покровы мертвой гусеницы и выходят наружу в виде трутоподобной массы красно-кирпичного цвета, которая заполняет всю внутреннюю полость (рис. 75). При этом, в отличие от мускардины, труп не покрывается мицелиальным налетом с конидиями, несмотря на то, что *Sorosporella*, в отличие от *Tarichium*, имеет конидиальное спороношение.

Хотя эти болезни насекомых называют «черной мускардиной озимой совки» (*Tarichium*), «красной мускардиной свекловичного [долгоносика]» (*Sorosporella*), их не следует объединять с мускардинами, игнорируя тем самым определенные нозологические сущности последних, отличные от указанной группы микозов насекомых, которые в свое время предложено было назвать «хламидоспорозами». При мускардинозах тело насекомого вскоре после наступления смерти превращается в склероций, и поверхность трупа покрывается конидиеносцами. Относящаяся к мускардинам группа болезней насекомых, вызывается грибами, принадлежащими к классу несовершенных, к порядку *Moniliales*, к семейству *Moniliaceae*. В зависимости от вида гриба и цвета конидиального налета различают белую мускардину, вызываемую грибом из рода *Beauveria*, кремовую — из рода *Sporotrichum*, зеленую — из *Metarrhizium*, желтую — *Uvaria* и т. д.

К патогенам, причастным к этому типу поражения насекомых, должны быть отнесены также кордицепсмикозы, вызываемые грибами из рода *Cordyceps*; они принадлежат к классу сумчатых и насчитывают большое число видов, многие из которых — паразиты насекомых, в том числе бабочек. Картина поражения похожа на начальную стадию патогенеза мускардин, вызываемых представителями класса несовершенных грибов: паразитарная деятельность их ограничена зоной гемолимфы и проникновение в ткани за пределы общей полости становится возможным незадолго до наступления гибели насекомого или



76. Стромы гриба из рода кордицепс на трупке гусеницы (по Лохде, 1872).

вслед за ней. Грибы из рода *Cordyceps* образуют в мертвом насекомом плотное сплетение гиф склероциального характера — строму с выходящим из трупа наружу плодовым телом — перитецием, содержащим сумки со спорами; они напоминают шляпочные грибы и часто ярко окрашены (рис. 76).

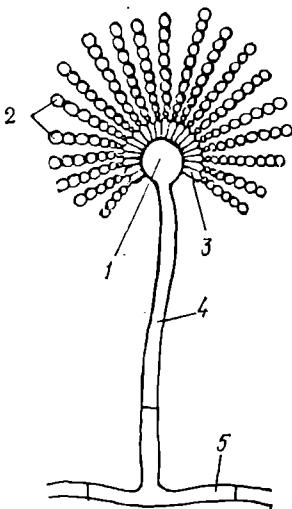
Паразитизм «свободных клеток» фрагментированного мицелия, ограниченный гемолимфой, и последующий переход разросшейся в трупке грибницы к сапротифизму рассматривается как признак филогенетической общности классов сумчатых и несовершенных грибов (Маделин, 1966).

### 4.3. Аспергиллезы

Род *Aspergillus* относится к семейству *Moniliales*, к классу несовершенных грибов. Существует также таксономическая схема, относящая эти грибы к сумчатым, к порядку *Plectascales*, в составе которого род *Aspergillus* вместе с родом *Penicillium* образует семейство *Aspergillaceae*.

У *Aspergillus* верхушка плодоносящего ветвления воздушного мицелия расширена (везикула); от нее отходят многочисленные споросные стебли (фиалиды), кверху они утончены на манер горлышка бутылки и у части видов несут второй ярус стеблей. На вершине стебля расположены вертикальной цепочкой, одна над другой сферические конидии (рис. 77). Мицелий и конидиеносцы у большинства видов бесцветные. Зрелые конидии у разных видов этого гриба отличаются по форме, величине и цвету: зеленые, синевато-сизые, в одном случае — черные; у старых культур мицелиальный налет с конидиями приобретает буроватую и темно-коричневую окраску.

Гриб растет на обычных питательных средах, при большом температурном диапазоне и в широком интервале между крайними показателями реакции среды, в кислой и слабощелочной зоне. Аэроб, с богатым набором ферментов, разлагающих сахара и другие углеводы с интенсивным образованием кислоты; быстро разжижает желатину, свертывает и пептонизирует молоко. Грибы рода *Aspergillus* широко распространены в природе не только как сапротифы, но и в качестве возбудителей



77. Конидиальное плодоншение гриба из рода аспергиллус:

1 — булавовидное расширение конидиеносца; 2 — конидий; 3 — стеригмы; 4 — конидиофор; 5 — вегетативная гифа.



заболеваний среди свободно живущих насекомых, млекопитающих, птиц и даже человека. Эти энтомопатогенные агенты обнаружены у саранчовых, растительноядных клопов, у гусениц многих видов бабочек и у других насекомых. Хорошо известен аспергиллез пчел (каменный расплод), который вызывает гибель и высыхание расплода (Полтев, Нешатаева, 1977); появлению его способствует повышенная влажность воздуха и нарушение гигротермического режима в улье. Его возбудителем является *A. flavus*, реже — *A. niger*.

**Аспергиллез тутового шелкопряда.** Из двух десятков видов *Aspergillus*, выделенных из пораженных насекомых, значительная часть является высокопатогенными для тутового шелкопряда. В. Е. Хохлачева (1980) по итогам обследования выкормок и коконоприемочных баз (Ташкентская область, 1976—1977 гг.) пришла к выводу, что случаи поражения тутового шелкопряда этими грибами на всех стадиях его развития не столь уж редки. Чаше всего возбудителями аспергиллезов шелковичных червей оказываются виды *A. flavus* Link и *A. oryzae* (Ahlburg) Cohn, но встречаются и *A. melleus* Iwakawa, *A. niger* von Tieghem, *A. tamaris* Kita и др. По результатам искусственного заражения гусениц четвертого возраста выяснилось, что наиболее вирулентными являются виды *A. flavus*, *A. oryzae* и *A. niger*, которые способны вызывать заболевание у половины особей, в то время как другие виды, выделенные у шелковичных червей и куколок, представляют меньшую опасность: *A. melleus* — 20% заразившихся гусениц и *A. tamaris* — 8%.

Заболевшие гусеницы теряют аппетит, становятся малоподвижными, через 3—5 суток после заражения заметно отстают в росте, длина тела их оказывается меньше нормальной: 2,7—5,9 вместо 8,3—9 см. Продолжительность линек увеличивается и на долю этого периода приходится наибольшая гибель гусениц. Кожные покровы больных гусениц, как при белой мускардине, становятся матовыми, но без мускардинных темных пятен, типичных для бовериоза тутового шелкопряда. Посмертное или частичное отверждение наступает быстро. В условиях повышенной влажности поверхность мумифицированного трупа покрывается мицелиальным налетом; белый вначале, он спустя три-пять дней (при 25—27°C), по мере развития на нем спорообразования, окрашивается в цвет, зависящий от вида гриба. Отмечены возрастные различия в восприимчивости гусениц к этой инфекции. У зараженных гусениц выкормочный период укорачивается на шесть-девять суток. Зараженные зрелые гусеницы вяло идут на завяку, период которой удлиняется на двое-трое суток.

Кокон у зараженных гусениц почти вдвое легче нормальных, оболочка их тонкая; в зависимости от срока заражения оболочка весит 0,19—0,29 г вместо 0,52 г у контроля. Среди коконного брака на коконоприемочных базах обнаружены коконы с пораженными этим грибом куколками, количество которых достигало 17,8%. На поверхности тела куколок появляется мицелий, который прорастает на менее твердых межсегментарных участках кожи.

В. Е. Хохлачева (1979) исследовала губительное для грены (овоцидное) действие *Aspergillus*; она заражала грену 24 видами грибов,

выделенных с ее поверхности. Наиболее патогенными оказались *A. versicolor* (Vuill.) Tirab. и *A. niger* von Tiegh.; вышедшие из зараженной грены гусеницы погибали на 3—5-й день. Отмечалось, что гусеницы, вылупившиеся из грены, инфицированной грибами *Aspergillus*, *Penicillium* и некоторыми другими, оказываются вялыми, отстают в росте, заметны по сморщенному кожному покрову; на теле погибших, помещенных во влажную камеру, прорастает мицелий тех грибов, которыми была заражена гrena.

**Факторы патогенности аспергиллуса.** Течение и признаки аспергиллеза в основном повторяют картину поражения насекомых мускардиной, однако его патогенезу присущи некоторые существенные особенности. Принято думать, что этот гриб в массе своей характеризуется довольно ограниченной инфекционной способностью (вирулентностью) и для успешного заражения организм насекомого должен быть ослаблен. Тем не менее, в отличие от бовериозов, возбудитель аспергиллеза при жизни инфицированного насекомого успешно проникает в его мускульную ткань; отмечено разрастание грибницы в мышцах грудной области живой шистоцерки. Обильное прижизненное разрастание мицелия при аспергиллезе в тканях зараженного грибом насекомого создает впечатление, что в отличие от типичной мускардины возбудитель аспергиллеза способен преодолевать сопротивление жизнедеятельной ткани насекомого.

Проще всего представить себе причину этого явления как результат токсического воздействия на ткани паразитирующим в них грибом. Локи (1960), изучая характер болезнетворного действия гриба *A. flavus-sryzae* на шелкоVICных червей, отмечал у них более интенсивное снижение массы тела, чем при бовериозах. Наступление частичного, а затем полного паралича как симптом токсикоза — обычное явление при аспергиллезах; его наблюдали при поражении аспергиллезом мучнистого червеца и разных видов саранчовых. Установлено, что возбудители аспергиллезов выделяют в питательную среду термостабильный токсин, поражающий нервную и мускульную ткани. Кроме того, у этого гриба среди метаболитов обнаружены органические кислоты, способные нарушать гормональную деятельность насекомого.

Сравнительно более изучены афлатоксины, выделяемые грибами из рода *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasitens*). Они смертельны не только для насекомых, но и для некоторых теплокровных животных, у которых эти токсины были найдены впервые (при токсикозе у индюшек, 1960). Они представлены серией соединений, состоящих из четырех афлатоксинов, близких по своей природе, но с разной степенью токсичности. Их пагубное действие не приурочено к каким-либо избирательно поражаемым видам насекомых. В механизме действия токсина центральное место принадлежит подавлению активности РНК-полимеразы и ингибированию синтеза ДНК, ингибированию митозов и снижению активности ферментативного аппарата митохондрий.

У возбудителя зеленой мускардины *Metarrhizium anisopliae* из фильтра культуральной среды и мицелия Кодайра (1962) выделил токсин, который стал известен в двух модификациях: деструкцин А и деструкцин Б. Впрыскивание этих токсинов в кровь шелкоVIC-

ных червей в минимальной дозе — 0,3 мкг/г массы тела гусеницы (т. е. 3 десятитысячных миллиграмма) вызывали мгновенный паралич и смерть; через кишечник этот токсин не действовал. Удалось установить химическую структуру деструкцина А (Сузуки и др., 1966) и деструкцина Б (Тamura и др., 1965); последний оказался циклическим депсипептидом. Напомним, что пептидами (полипептидами) называют соединения, состоящие из двух или более остатков аминокислот, соединенных друг с другом амидными (пептидными) связями. Депсипептидами или О-пептидами называются полипептиды, в которых имеются сложноэфирные связи с оксигруппами аминокислот или оксикислот.

Способность продуцировать токсины, губительные для тутового шелкопряда, показал Кодайра (1961) у *A. ochraceus* Wilhelm, *A. oguzae* (Ahlburg) Cohn, *A. flavus* Link и *Sterigmatocystis japonica* Aoki (*Sterigmatocystis-Aspergillus*).

Все эти грибы образуют в питательных средах вещества, которые токсичны при впрыскивании их гусеницам. Эти токсины обнаруживаются также в гемолимфе шелколичных червей, зараженных этими грибами, если ввести такую гемолимфу здоровым насекомым. Токсин, выделенный в культуральную жидкость *A. ochraceus*, содержит оба депсипептида (деструкцин А и Б), тождественные вырабатываемому возбудителем зеленой мускардины.

Х. Агзамова (1978), изучавшая грибные заболевания озимой совки в Ташкентской области, выявила 54 вида энтомопатогенных грибов, в том числе 10 видов *Aspergillus*, обнаруженных главным образом в кишечнике и экскрементах здоровых, больных и мертвых насекомых. Испытание на патогенность производилось парэнтеральным (в кровь) и пероральным (в кишечник) заражением. Одним из наиболее токсичных оказался *A. flavus* Link. Испытывались экзотоксины, выделенные грибом в картофельную среду и в среду Чапека. При этом гибель насекомых от экзотоксина с картофельной среды была более значительной. Эндотоксины оказались наиболее активными при извлечении из мицелия 30-дневной культуры гриба.

Токсины *Aspergillus*, особенно *A. flavus*, привлекают внимание не только энтомологов; с ними знакомы медики и ветеринары, поскольку они способны вызывать болезненную реакцию у теплокровных организмов септико-пиемического (воспалительно-гноеродного) или аллергического характера.

#### 4.4. Белая мускардина, или бовериоз, тутового шелкопряда

Происхождение названия этой болезни не ясно; по Штейнхаузу, труп насекомого, покрытого белым налетом, напоминает мятную конфету — по-французски *muscardin*. Существует другая ссылка на происхождение этого названия от *muscade*, по-французски — мускатный орешек, на который несколько похожи сморщенные, бурые, с белым налетом трупы погибших от этой болезни куколок тутового шелкопряда. Итальянские шелководы называют мускардину *calcinaccia* «юбизвествление» или просто *calcino* — «известь», что, впрочем, не соответ-



Августино Басси  
(1773—1856)

ствует действительной причине побеления трупа и его окаменения. На Востоке, в том числе в Средней Азии, мускардину тоже называют «окаменением» или «каменной болезнью». В качестве группового наименования этих заболеваний создано производное от слова мускардина — «мускардиозы», где окончание образовано от греч. *posos* — болезнь.

Первоначальное название «мускардина» относилось только к бовериозу тутового шелкопряда, но потом оно было распространено на разные другие грибные инфекции насекомых. Поэтому представляется необходимым руководствоваться особенностями, лежащими в основе нозологической классификации микозов, которые рассмотрены выше.

**История открытия инфекционной природы мускардины.** Первые указания на характерные внешние признаки мускардины встречаются в европейской ли-

тературе XVI в. Позже это заболевание было подробно описано итальянскими и французскими учеными, в частности Буасье де Соважем в XVII в. Честь открытия возбудителя белой мускардины тутового шелкопряда принадлежит Августино Басси (1773—1856) из города Лоди в Ломбардии (Северная Италия). Это было первое в истории науки заболевание, инфекционную природу которого удалось доказать. В проблеме происхождения мускардины Басси свел, как в фокусе, предположение о существовании микробов-паразитов и давно зреющую у врачей-естествоиспытателей идею о невидимом заразном начале. Опыты и наблюдения Басси длились четверть века, итогом многолетнего труда явилась монография об этой болезни шелкопряда, изданная в его родном городе Лоди в 1835 г.

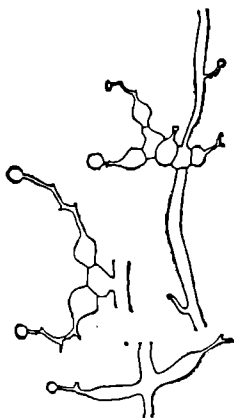
Выводы Басси некоторое время оспаривались. Его современники утверждали, что первопричиной болезни является «дурной воздух», а не «плесень». Они ссылались на то, что появление мускардины у шелковичных червей сопряжено главным образом с избыточной влажностью воздуха. Профессор кафедры естествознания Миланского университета Джузеппе Бальзамо Кривелли, которому Басси прислал возбудителя мускардины для установления его систематического положения в мире микробов, не разделял — по крайней мере, вначале — мнения Басси о том, что причиной болезни является паразитический гриб. Миланский профессор считал, что болезнь могла возникнуть самопроизвольно, «так как ни наблюдениям, ни разуму, — писал он, — не противоречит признание того факта, что разлагающееся живое вещество плесневеет».

Кривелли установил, что этот микроорганизм является «тайнобрачным растением из рода *Botrytis*» и назвал его вначале *Botrytis paradossa*. Позже грибок был переименован в честь Басси *Botrytis bassiana* Bals. Затем Герин-Менвиль (1847) изучал в экспериментальных условиях эту инфекцию, а также влияние внешних факторов на развитие болезни. Виттадини (1853) внес свой вклад в исследование биологии гриба, формы его спороношения, возможность его культивирования на жидких питательных средах. Де-Бари (1867) установил способность этого гриба заражать других насекомых, помимо шелковичных червей. Было изучено и действие дезинфицирующих средств на споры возбудителя мускардины (Квоят, Россинский и др.). Во второй половине прошлого столетия этиология этой болезни и многие ее особенности оказались наиболее изученными, в то время как относительно причин возникновения остальных заболеваний шелковичных червей все еще господствовали многочисленные домыслы.

**Систематическое описание возбудителя.** В свое время Ф. Пикар (1914) предложил следующую классификацию грибов из рода *Botrytis*: 1) мицелий мучнистый или меловой — *B. bassiana*; 2) мицелий комковатый или пушистый: а) споры овальные — *B. densa-tenella*; б) споры шаровидные — *B. glabulifera*.

К тому времени возбудитель мускардины тутового шелкопряда был уже отнесен к *Beauveria* (Vuillemin, 1912), в качестве «нового рода семейства *Verticillaceae*». Несмотря на достаточно характерное строение и расположение конидиеносцев, облегчающих распознавание гриба при его микроскопировании, вид этот очень пластичен; морфологические и особенно культуральные признаки вариабельны и изменяются под влиянием условий питания и культивирования или выявляются при моноспоровом расसेве; в результате исследователи насчитывали у рода *Botrytis* до 14 видов. Мак-Леод (1954) счел правильным свести их к двум: *B. bassiana* и *B. tenell*; все многообразие видов он рассматривал как штаммы этих двух.

Возбудитель белой мускардины шелкопряда относится к типу высших грибов (*Eumycetes*), к классу несовершенных (*Deuteromycetes* или *Fungi imperfecti*), к порядку *Moniliales*, семейству *Moniliaceae* (*Mucedinaceae*), к роду *Beauveria*, к виду *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (1912). Синонимы: *Botrytis bassiana* Balsamo, Linnaea, 1835; *Stachylidium bassianum* Mont., Saccardo, 1888; Ячевский, 1917. Грибница растет на поверхности субстрата в виде мучнистого налета или пушистого плотного войлока, белого или светлоокрашенного с кремовым или даже красноватым оттенком. На воздушных гифах расположены конидиеносцы со спорами (конидиями). Гифы бесцветные, септированные, разветвленные, местами анастомозирующие, соединяющиеся друг с другом. Клетка мицелия, которая служит основанием для развития фруктификационного (плодообразующего) органа, имеет один или два альтернативных (противоположных) выступа, на которых развиваются конидиофоры или конидиеносцы располагающиеся одиночно, партиями, или часто тесными группами — гроздьями (рис. 73); отсюда первоначальное название этого гриба *Botrytis* (от греч. *botrys* — гроздь). Конидиеносцы представляют



78. Конидиеносцы возбудителя белой мускардины *Beauveria bassiana* (по Виллемену, 1912)

с собой колбовидное образование, заостренная вершина которого заканчивается короткой и тонкой стеригмой, несущей одиночную конидию. У многих конидиеносцев их заостренная вершина продолжается тонким стеблем, зигзагообразным согнутым в одном-трех местах, и заканчивается стеригмой с находящейся на ней конидией. Форма конидий шаровидная, иногда яйцевидная, 2—3 мкм в диаметре, они бесцветные или слегка окрашенные с красноватым оттенком, с одним гаплоидным (одинарным) ядром (Семан, 1964).

Вид *Beauveria tenella* (Delacroix, 1937). Синонимы: *Botrytis tenella*, Saccardo, 1888; *Sporotrichum densum* Link, Ячевский, 1917. Морфологически очень близок к *B. bassiana*, но отличается от него более мощным белым пушистым, реже комковатым налетом воздушного мицелия и яйцевидными конидиями. Оба вида поражают большое разнообразие насе-

комых: чешуекрылых (бабочек), полужесткокрылых (клопов), жесткокрылых (жуков), перепончатокрылых (пилильщиков), прямокрылых прыгающих (кузнечиков, саранчу), очень редко — мух, иногда — клещей. Принято считать, что *B. bassiana* чаще всего встречается на личинках чешуекрылых, а *B. tenella* — на личинках жуков, особенно хрущей.

#### 4.5. Инфекционная фаза деятельности гриба

**Предынфекционный этап развития гриба.** Инфекционной стадией гриба являются конидии — воздушные споры, предназначенные для бесполого размножения и рассеивания во внешней среде. Конидии покрыты маслянистым клейким веществом, с помощью которого они прилипают к кутикуле насекомого. Часто споры накапливаются в складках межсегментарных сочленений, сочленений конечностей насекомого и ротовых придатках. Местом проникновения паразитического грибка в тело насекомого может быть практически любой участок неповрежденных кожных покровов

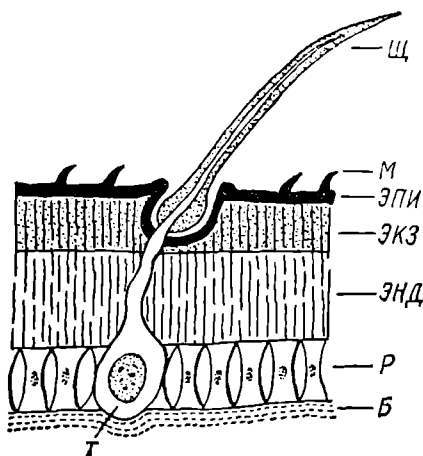
Оптимальная температура для развития конидий 24—26 °С. Однако они, видимо, способны развиваться и заражать насекомых при значительно более низкой температуре, по некоторым данным — даже при 10 °С. Прорастанию конидии благоприятствует высокая влажность воздуха (более 90%). В течение суток относительная влажность в помещении выкормки колеблется в зависимости от колебания влажности снаружи; на состояние влажности воздуха на выкормке влияет испарение влаги задаваемым кормом и выделяемой самими гусеницами. На теле гусениц и листьях шелковицы образуется тонкий слой воздуха, насыщенный парами. Увлажненность тонкого слоя воздуха на кожных покровах насекомого более или менее достаточна для начала развития

конидий. Повышенная влажность воздуха в червовой полости способствует прорастанию спор. Интенсивные же токи воздуха при проветривании помещения принудительной вентиляцией могут нарушить благоприятные для инфицирования насекомого условия.

Результаты наблюдений разных авторов в этом вопросе противоречивы. Объясняется это внутривидовой вариабельностью требований возбудителя мускардины к условиям существования. Как показали наши многолетние наблюдения, штаммы гриба различного географического происхождения, выделенные у гусениц тутового шелкопряда, отличались неодинаковыми требованиями к уровню температуры и влажности воздуха для своего роста и развития.

Процесс инвазии после попадания конидий на кожный покров насекомого наступает не сразу. Спора может оставаться на ее поверхности несколько часов и даже дней, не приступая к развитию. При благоприятной температуре и влажности зрелые споры начинают набухать и через 5—8 ч увеличиваются в четыре-пять раз; через 12 ч они прорастают. Проросшая спора выпускает ростковую трубку толщиной в 2,5—3,5 мкм, которая внедряется в гиподерму под прямым углом. После прорастания споры наступает преинвазионный этап, во время которого ростковая трубка растет и удлиняется. Продолжительность этого этапа может быть различной, но он все же ограничен необходимостью проростка гриба приступить к восполнению своих энергетических и пластических затрат. Энтомопатогенные грибы способны образовывать аппрессории — плоские утолщения на концах коротких ростковых трубок, которые служат для фиксации на поверхности кожных покровов. Как полагают, эта фиксация содействует внедрению гриба с помощью физического усилия. Аппрессорий посылает сквозь кутикулярный покров мицелиальный инвазионный росток. Однако у грибов рода *Боверия* инвазия не всегда совершается при участии аппрессория.

**Строение кожных покровов насекомого.** Кожный покров насекомых — непреодолимая преграда для всех болезнетворных микробов, за исключением энтомопатогенных грибов. Он состоит из трех структурных компонентов: из кутикулы (кожицы), гиподермы — подкожной ткани, состоящей из одного слоя эпителиальных клеток, и находящейся под ней базальной околоэпителиальной мембраны (пере-



79. Строение покровов гусеницы тутового шелкопряда:

б — базальная эпителиальная мембрана, отделяющая покровы от общей полости тела; р — эпителиальные клетки гиподермы; энд — эндокуткула; экз — экзокуткула; эпи — эпикуткула; м — шипики; щ — щетинка; т — образующая ее трихогенная клетка

понки), отграничивающей кожные покровы от общей целомической полости насекомого (рис. 79). Кутикула состоит из трех слоев. Наружный слой — эпикутикула, самый тонкий (около 1 мкм); в отличие от двух других слоев он не содержит хитина и почти целиком состоит из кутикулина, образованного полимеризованным липопротеином и хинонами. Эпикутикула покрыта сплошной пленкой из воска и полифенолов, которая делает этот слой водонепроницаемым, стойким против химических воздействий и прежде всего — против органических растворителей; ей обязаны покровы насекомых таким существенным физическим свойством, как несмачиваемость.

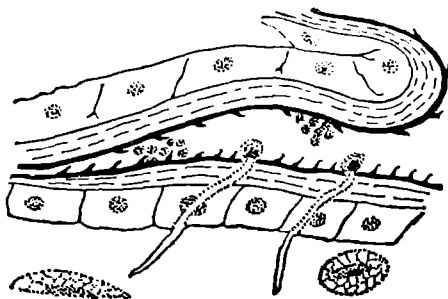
Экзокутикула — средний, наиболее твердый слой, выделяемый клетками гиподермы; он инкрустирован полимерными углеводами и содержит хитин. Гибкие сочленовные участки кожи покрыты наиболее тонким слоем экзокутикулы либо вовсе его не имеют. Если кожные покровы пигментированы, то пигмент располагается именно в этом слое. Эндокутикула — самый толстый слой кутикулы, непосредственно граничащий с гиподермальными клетками; он отличается прозрачностью и сложным строением. Эндокутикула состоит из тонких пластинок волокнистой структуры, уложенных друг на друга так, что направление волокон последующего ряда оказывается перпендикулярным к предыдущему. Такое взаимное расположение пластин этого слоя кутикулы увеличивает его прочность, не лишая необходимой гибкости, чему способствует возможность скольжения этих слоев по отношению друг к другу. Через эндокутикулу проходят многочисленные вертикальные каналы.

Одно из специфических веществ кожных покровов членистоногих — хитин. Это высокомолекулярное азотистое соединение, нерастворимое в органических растворителях, содержание которого в кожных покровах колеблется в зависимости от участка и слоев кожи от 20 до 80% и чаще всего служит каркасом, который заполняется протеином. После линьки мягкая кутикула превращается в твердую в результате совместного участия воднорастворимых белков кутикулы и мицелл хитина в процессах кристаллизации. Они образуют пространственную решетку, в которой белково-хитиновый комплекс затвердевает (склеротизируется); сам по себе хитин этими свойствами не обладает, хотя является механическим компонентом опорных структур тела насекомого. Сбрасываемая во время линьки кожа (экзuvia) состоит из эпикутикулы и экзокутикулы, а эндокутикула растворяется линичной жидкостью, поступающей в пространство между новообразованной эпикутикулой (защищенной сверху восковым налетом) и старой эндокутикулой. Экзокутикула выделяется клетками гиподермы перед линькой, тогда как эндокутикула — после линьки.

**Инфекционный процесс.** Проникает гриб через покровы насекомого при посредстве выделяемых ростковой трубкой ферментов, растворяющих кутикулу. Подтверждением этому служит анализ гистологической и гистохимической картины, наблюдаемой при внедрении гриба в кожные покровы (рис. 80). Это подтверждается также способностью возбудителя мускардины разлагать с помощью своих ферментов в опытах, поставленных вне организма насекомого, отдельные



соединения, входящие в состав кожных покровов: хитин, белок, липиды, восковые вещества. Первоначально относительно участия ферментов в преодолении кожных покровов насекомого считали, что кутикулярный хитин разрушается с помощью фермента хитиназы; способность продуцировать его и выделять верхушечным участком ростковой трубки приписывали энтомопатогенным грибам. Что касается *Beauvergia*, то этот гриб вырабатывает хитиназу, которая является конститутивным (постоянно вырабатываемым) ферментом, но выделяется



80. Прорастание спор возбудителя мускардины сквозь кожный покров гусеницы; набухшие споры в межсегментарной складке кожных покровов; два гемоцита в общей полости.

он экстрацеллюлярно (внеклеточно) только после лизиса мицелия (Клаус, 1961). Неравнозначность результатов исследования этого вопроса вызвана тем, что разложение хитина не всегда обусловлено деятельностью конститутивных ферментов, присутствующих в грибнице независимо от состава среды; оно может быть вызвано и индуцированными ферментами, возникающими в инфекционной гифе гриба под воздействием на него самого субстрата ферментации. Следует также иметь в виду, что кожные покровы насекомого представляют собой сложное строение, в котором хитин участвует в качестве составной части протеиново-хитинового комплекса, наряду с жирами, углеводами и восками. Плотность покровов в большей мере зависит не от присутствия хитина, а от степени задубленности протеина фенолами при формировании и отвердении кожных покровов насекомого. Эпикутикула, в частности, с которой начинается вторжение гриба в кожные покровы, не содержит хитина.

Хорошо известна способность точки роста растения развивать огромное взламывающее усилие при преодолении им механических препятствий, и грибы в этом отношении не составляют исключения. Робинсон (1966) испытал способность одного из распространенных фитопатогенных грибов (*Paecilomyces fagicinus*) преодолевать пластинки парафинированного воска различной твердости и толщины; оказалось, что глубина проникновения гиф гриба находится в прямой зависимости от твердости субстрата. Несовершенные грибы проникают через эпикутикулу с использованием только механического усилия, тем более, что проверенных данных о наличии у грибов ферментов, способных расщеплять восковые вещества, нет. Эти сведения получены Робинсоном в опытах на изолированной кутикуле мучного хрущака относительно пяти видов энтомопатогенных грибов, в том числе *B. bassiana*. Вместе с тем проникновение инфекционных гиф в более глубокие слои кожных покровов осуществляется при участии ферментативной активности гриба.

Не исключено, что инфекционные гифы гриба могут использовать для своего проникновения сквозь кутикулу поровые каналцы, а также более доступный участок кожи у основания сенсилл, хотя считается, что этот путь используется грибами редко. Помимо внедрения через интактные наружные покровы, через дыхальца, сочленения ротовых придатков или, что наименее вероятно для боверии — через стенку пищеварительного тракта, в качестве возможных ворот инфекции остаются еще ранки на коже; свеженанесенное поражение пригодно для инвазии грибом, однако меланизированные ранки значительно менее доступны для возбудителя мускардины тутового шелкопряда, в отличие от тех видов условно патогенных грибов, для которых воротами инфекции служит поврежденная кожа.

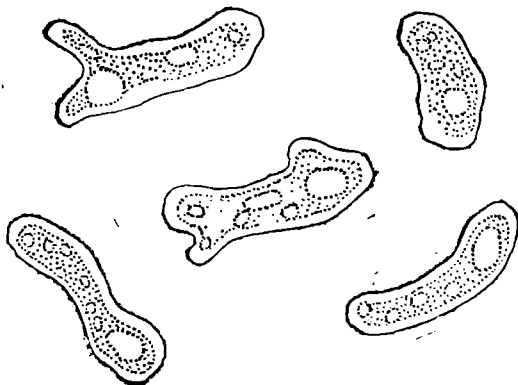
При благоприятной температуре и влажности воздуха конидиоспоры могут прорасти, казалось бы, независимо от природы субстрата; споры грибов прорастают в лабораториях на предметных стеклах или фильтровальной бумаге. Однако условия прорастания конидий на абиотическом (не живом) субстрате или на коже насекомого не однозначны: кроме благоприятного микроклимата на этот процесс влияют биологические вещества. По всей видимости, кожные покровы насекомых содержат в эпикутикуле компоненты, способные ингибировать или стимулировать инвазию гриба (Евлахова, Шехурин, 1963). Действительно, экстракты из кожных покровов поражаемых насекомых, особенно их липидная часть, способны стимулировать прорастание конидий и процесс их внедрения в модельные мембраны. Коидзуми (1957) обнаружил в экзвии насыщенные жирные кислоты, которые он склонен был отнести к каприловой (октановой)  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$  или капроновой кислоте (Н-гексановая,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ ). Они встречаются в составе ряда природных эфирных масел, обладают отчетливым фунгицидным действием, и присутствие их в кожных покровах в состоянии выполнять ингибирующую функцию. В эндокутикуле обнаружены другие соединения — фенолы и 3,4-диоксибензойная кислота, но их сдерживающее влияние на прорастание спор маловероятно; внедрение ростковой трубки происходит под влиянием тигмотаксического стимула (под влиянием прикосновения к плотному субстрату ее вершины) и может наблюдаться независимо от природы инвазируемой мембраны. Однако внедрению гриба в покровы насекомого фенолы могут, видимо, оказывать известное противодействие.

Процесс прорастания сопровождается интенсификацией обмена веществ в конидиях, усилением ферментативной и токсинообразовательной активности. С этим процессом сопряжено наиболее значительное выделение этих продуктов. В местах проникновения возбудителя мускардины в кожные покровы на теле насекомого образуются черные пятна неправильной формы с концентрическими кругами. Это результат окисления фенолов кожных покровов при участии фенолоксидазы и молекулярного кислорода воздуха с образованием хинонов. В местах оседания спор на коже могут прорасти целые группы инфекционных гиф, и по мере прорастания новых спор количество черных пятен возрастает. Размещение пятен на теле зараженной гусеницы может характеризовать топографию инвазии гриба и ее преимущест-

венное распределение на теле насекомого. При этом может быть отмечен тот парадоксальный факт, что в межсегментарных складках с менее плотными покровами, где споры наиболее защищены и находятся в благоприятных условиях влажности, пятна мускардины встречаются реже, чем на других участках тела.

#### 4.6. Паразитическая фаза жизни гриба

**Стадия паразитирования в гемолимфе.** Проникнув в гемоцель, инфекционные гифы продолжают развиваться некоторое время. Когда они достигнут определенного размера, от них отделяются одноклеточные мицелиальные фрагменты, так называемые *гифальные тельца* (Текстер, 1896). Сама же ростковая трубка, пронизывающая кожные покровы насекомого, отмирает и в значительной части резорбируется (рассасывается). Гифальные тельца (рис. 81) размножаются в гемолимфе делением и почкованием и разносятся по всей целомической полости. Спустя 36—48 ч после внедрения гриба гемолимфа оказывается обильно заполненной гифальными тельцами. Это активная стадия внутриполостного кровепаразитизма. Ее местонахождение и деятельность ограничены общей полостью и не сопровождаются прижизненным проникновением гриба в омываемые гемолимфой органы и ткани. Подобно тому, как размножение патогенных бактерий в крови называют септициемией или септической бактериемией, этот начальный этап развития мускардины может быть назван *мицесемией*.



81. Гифальные тельца боверии в гемолимфе гусеницы тутового шелкопряда.

Через 36—48 ч после внедрения гриба в гемолимфе гусеницы, еще не утратившей своей подвижности, гифальные тельца разрастаются, превращаются в короткие гифы, которые вскоре начинают ветвиться. Следует отметить, что такой же способ размножения гриба и развития мицелиальных фрагментов наблюдается и в процессе глубинного культивирования возбудителя бовериоза на искусственных жидких питательных средах при промышленном производстве биоинсектицидов. По некоторым данным, гифальные тельца при заражении ими насекомых более инфекционны, чем конидиоспоры.

**Гемолимфа как среда жизнеобеспечения насекомого.** Паразитическая деятельность возбудителя мускардины сосредоточена в гемолимфе — в важнейшей сфере жизнеобеспечения организма насекомого. Гемолимфа составляет 20—40% от массы тела гусеницы. Эта жидкая

гистологическая система состоит из плазмы и клеточных элементов крови—гемоцитов. Плазма шелковичного червя на 4/5 и более состоит из воды, диспергированных в ней гидрозолей белка (3/4 сухого остатка гемолимфы), из жиров, углеводов и минеральных веществ. В ней сосредотачиваются поступающие сюда из средней кишки продукты пищеварительной деятельности кишечника, которые служат исходным материалом для пластического и энергетического обмена веществ. Гемолимфа обеспечивает вынос ненужных и вредных для организма продуктов метаболизма, удаляемых из крови через мальпигиевы сосуды. Кровь шелковичного червя выполняет также многие другие функции; в ней протекают внеклеточные ферментативные и другие биохимические процессы. Она является той средой, «через которую совершаются все химические взаимодействия между органами» (Уигглсуорс, 1939), в том числе перенос гормонов, вырабатываемых эндокринной системой насекомого. Гемолимфа сохраняет в определенных параметрах физико-химическую характеристику динамического состояния внутренней среды организма: необходимую для локальных ферментативных процессов слабокислую реакцию — рН 6,6—6,8; молекулярную концентрацию, поддерживающую необходимый уровень осмотического давления, и т. п. Гемоцель является резервуаром водного запаса, используемого в осмотических процессах переноса воднорастворимых веществ и обеспечивающего нормальный уровень гидратированности коллоидов цитоплазмы клеток. Водный запас обеспечивает нормальное состояние упругости тела гусеницы и гидростатическое распределение мышечных усилий в нужном направлении: например, при разрыве и сбрасывании экзuvia линяющей гусеницей.

Значение гемолимфы как внутренней среды, в которой сосредоточены важнейшие ресурсы жизнеобеспечения насекомого, может быть продемонстрировано на обескровливании гусениц. Мелкие организмы не нуждаются в пигментах крови для переноса кислорода к тканям и органам, так как при своих незначительных размерах они используют диффузный принцип обеспечения организма кислородом; у членистоногих механизм этот несколько усложнен анатомически — трахейным способом его распределения. Поэтому обескровливание неспособно вызвать у гусеницы асфиксию (удушье) подобно тому, как это происходит у позвоночных. Организм насекомого может проявить, в известной мере, свою способность к восстановлению кровопотери, подобно тому как они регенерируют (восстанавливают) поврежденные ткани. И все же обескровливание наносит гусеницам ущерб, который можно сравнить, по мнению Р. Шовена (1949), с действием на позвоночных сочетания голодания с ишурией (задержкой мочи), т. е. невозможностью удалять из организма вредные продукты конечного распада белка.

**Участие форменных элементов крови в противоиnфекционной защите.** Несмотря на относительную малочисленность (150—200 тыс. клеток в 1 мм<sup>3</sup>), гемоциты деятельно участвуют в поддержании нормального состава внутренней среды целомической полости, освобождая ее от растворенных в гемолимфе или диспергированных в ней особо

вредных веществ. Фагоцитируя, они избавляют организм насекомого от попавших в кровь чужеродных тел, в данном случае — от гриба.

В начальный период инфекции фагоциты деятельно захватывают гифальные тельца и переваривают их. Гемоциты способны не только к фагоцитарной, но и к экстрацеллюлярной (внеклеточной) ферментативной деятельности, что видно на примере цитолитических процессов во время линек и особенно во время метаморфоза. Когда фагоцитам не представляется возможным в одиночку элиминировать (изъять) скопление гифальных телец или иных чужеродных форменных элементов, они окружают их, сливаясь вместе и образуя гигантскую клетку, в пределах которой экстрацеллюлярно переваривают то, что захвачено. Кроме того, таким путем гемоциты инкапсулируют (заключают в соединительнотканную капсулу, образованную при участии гемоцитов) массу захваченных гифальных телец, изолируя от них внутреннюю среду организма.

При отсутствии у гемолимфы способности свертываться гемоциты в состоянии тромбировать (закрывать) ранки своими телами, с последующим участием в регенеративных процессах в поврежденной ткани путем образования соединительнотканых структур. Фагоцитоз сопряжен с гибелью самих фагоцитов, нагруженных полупереваренными фрагментами гриба; количество кровяных клеток у гусеницы с самого начала ее заражения начинает быстро убывать. Из-за малочисленности кровяных клеток, медленного темпа гемопоэза (кроветворения) процесс восстановления состава крови не поспевает за развитием инфекционного агента. Поэтому гемоциты при микозах в состоянии выполнять лишь кратковременную роль первой линии защиты.

#### 4.7. Формирование факторов патогенности

**Ферменты патогенности гифальных телец.** Гемолимфа — идеальная среда для гифальных телец; они интенсивно питаются этой средой, размножаются и истощают ее. Гифальные тельца изменяют концентрацию веществ, нормальный состав гемолимфы, осмотические свойства, вязкость, реакцию, все более обезвоживая ее. В результате паразитарной деятельности гриба гемолимфа утрачивает исходные особенности, необходимые для нормальной жизнедеятельности омываемых ею органов и тканей. Но не только к этому сводятся губительные для гусениц последствия деятельности гриба в гемоцеле, равнозначной обескровливанию общей полости тела насекомого. Интенсивное размножение гифальных телец и сопряженный с этим анаболизм (усваивающий обмен) сопровождается выделением в гемолимфу экстрацеллюлярных ферментов гриба.

Возбудитель мускардины способен продуцировать многие ферменты, о чем свидетельствует его способность успешно расти на питательных средах различного состава и его широкая паразитарная специализация. В наборе этих ферментов для патогенеза наибольшее значение имеют хитиназа, протеиназа, липаза и амилаза. Различные ферменты, выделяемые грибами в среду их обитания, играют значительную роль в патологии насекомых. Это мощные средства, способствующие проник-

новению гриба в инфицируемый ими организм, многоцелевое средство внесклеточного переваривания вещества гемолимфы, а после гибели насекомого и его мертвых тканей. В фильтрах культур энтомопатогенных грибов и в тканях пораженных ими насекомых обнаружены многие гидролитические ферменты. У возбудителя белой мускардины тутового шелкопряда имеются протеолитические ферменты, пептонизирующие мочоко: уреазы, амилазы, аспаргиназы, хитиназы и др. Состав и активность ферментов, помимо других факторов, определяются возрастным состоянием паразитирующего гриба. Среди них в первую очередь должны быть отмечены протеазы (пептидгидролазы) — протеолитические ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление пептидных связей, т. е. связей между углеродом карбонильной группы и азотом амидной группы аминокислотных остатков в белках и пептидах.

Все пептидгидролазы в физико-химическом отношении — высокомолекулярные вещества белковой природы; они образуют подкласс гидролаз, очень распространенных у представителей живой природы, в том числе у микроорганизмов. Грибы являются особенно деятельными продуцентами этих экстрацеллюлярных ферментов. Протеолитическую активность их можно наблюдать по интенсивности разжижения желатинизированных питательных сред. Пептидгидролазы мускардинных грибов ферментируют пептидные связи у концевых аминокислот протеина гемолимфы. Впрочем из значительного количества электрофоретических фракций протеинового комплекса гемолимфы только часть подвержена гидролитическому расщеплению под действием этого фермента. Возможно, что это следствие высокой степени обеспеченности метаболических процессов гриба в условиях насыщенности гемолимфы аминокислотами.

Экстрацеллюлярные протеазы гриба не только лишают протеиновый комплекс гемолимфы его исходной целостности, но и участвуют в разрушении гемоцитов. Пептидгидролазы — только один пример ферментативной деятельности гриба в стадии гифальных телец. Подобная активность может быть отмечена и относительно углеводно-липидного комплекса гемолимфы. Иначе говоря, ферменты патогена, участвующие в инфекционном процессе, могут не только губительно вмешиваться в нормальное течение жизненно важных процессов, но и повреждать биологически активные структуры организма, ответственные за эти процессы. Это послужило основанием рассматривать подобных участников патогенеза среди ферментов как функционально обособленную группу ферментов патогенности. Их участие в смертельном исходе заболевания может быть объяснено разрушением протеинового комплекса гемолимфы и приобретением производными этих реакций свойств, дезорганизирующих физиологические процессы в организме насекомого. Однако при всем том ферменты патогенности неоднородны с другим мощным фактором патогенеза — с токсинами, оставаясь наиболее общим и в этом смысле неспецифическим инструментом патогенеза.

**Токсины возбудителя бовериоза.** Предположение о причастности токсинов к болезнетворному действию грибов возникло у ученых

и ранее, но наиболее определенные высказывания относительно таких хорошо известных энтомопатогенных агентов, как *Melarrizium anisopliae*, *Aspergillus flavus*, относятся к началу 30-х годов (Валленген, Йоханссон, 1929; Бернсайд, 1930; Туманов, 1931). Ходайра опубликовал ряд статей о токсинах грибов (1954 и позже), но наиболее полным для того времени был обзор Мюллер-Кёглера «Грибные болезни насекомых» (1965). Хотя признаки токсикозов у насекомых достаточно очевидны, сведений о самих токсинах добыто немного. В особенности это относится к токсинам возбудителей мускардинных болезней.

В прорастающих конидиях *V. bassiana* Дрезнер (1950) обнаруживал присутствие метаболитов гриба, токсичных для личинок комнатной мухи и картофельной моли при заражении их через кишечник. В дальнейшем это сообщение не было подтверждено, хотя сведения о способности прорастающих спор *V. bassiana* к обильной экстрацеллюлярной продукции биологически активных веществ разделяются многими. Точно также из хрущей, зараженных *V. bassiana*, было экстрагировано вещество с токсическими свойствами; при скармливании его личинкам жесткокрылых они погибали с симптомами токсикоза (Шонфенберг, 1957). Токсичность культуральной среды из-под *V. bassiana* при впрыскивании ее гусеницам большой пчелиной моли установлена Уэстом и Бригсом (1968); при этом изоляты гриба, выделенные из насекомых, были токсичнее тех, которых воспитывали в течение ряда поколений на искусственных питательных средах. Из грибки возбудителя бовериоза был экстрагирован другой депсипептид, чем те, которые ранее выделил Ходайра; он был назван *бове-рицином* и обладал слаботоксичными свойствами для личинок комара (Хамилл и др., 1969).

**Токсикозный эффект.** Имеется достаточно оснований рассматривать ферменты патогенности и токсины *V. bassiana* как ряд факторов, составляющих болезнетворный комплекс. Представление о том, что к гибели насекомого, пораженного мускардиной, причастны также токсины, основывается на ряде фактов и соотношений.

К токсинам микроскопических грибов нередко относят их метаболиты различной химической природы: кислоты, производные стеролов, ароматические соединения и др. Скармливание, а тем более впрыскивание в общую полость гусеницы каждого из этих продуктов само по себе не может служить достаточным основанием для установления токсической этиологии их гибели, так как не всякое повреждение физиологических функций можно приписать токсикозу. По установившемуся представлению, токсины — это метаболиты белковой природы, которые в процессе своего образования разными способами выделяются продуцентом: отсюда обыкновенно разделять их условно на эндотоксины и экзотоксины. Присутствие токсина в поврежденном организме сказывается дистанционно от инфицированной зоны, через посредство гуморальных (тканевых) жидкостей. Их действие проявляется в столь малых дозах (особенно экзотоксинов), что можно предполагать участие в этом каких-то физико-химических процессов, протекающих на молекулярном уровне. Экзотоксины особенно специфичны по характеру болезнетворного действия и по способности вызывать появление

наиболее характерных симптомов заболевания на фоне участия остальных факторов.

Наиболее ранний признак интоксикации — гусеницы теряют аппетит вследствие ослабления их пищевой активности. Один из наиболее характерных признаков токсикоза — параличи, свидетельствующие о нейротропном аффинитете токсина (действие на нервные клетки); при этом под влиянием токсина изменяется естественная окраска нервных узлов, различаемая в нативном препарате. Действие токсикоза проявляется и на функционировании эндокринной системы, ингибируя линьки и метаморфоз; в результате после нимфальной линьки можно наблюдать в куколочной стадии частичное сохранение личиночных покровов. Имеются литературные указания на гибель гонад под влиянием стерилизующего действия токсина возбудителя бовериоза.

Природа токсина сопряжена с видовой и, быть может, штаммовой особенностью патогена. С другой стороны, реакция насекомого на один и тот же токсин зависит от вида поражаемого насекомого или даже от породной принадлежности шелковичных червей. Вместе с тем эта зависимость распространяется и на особенности биологической системы, которая индуцирует (побуждает) ферментативную активность гриба.

#### 4.8. Заключительная фаза жизнедеятельности гриба в теле насекомого

Развитие паразита перед переходом его к сапрофитизму. В течение первых двух суток после начала паразитической деятельности гриба гифальные тельца его обильно размножаются и заселяют гемолимфу. Затем гифальные тельца превращаются в короткие ветвящиеся гифы, на отростках которых образуются одна-две (иногда более) яйцевидные или почти цилиндрические споры, сидящие на очень коротких стеригмах. Размер их около 10 мкм в длину и 3 мкм в поперечнике. Мак-Леод называет их *конидиями*. Вскоре после своего появления они отделяются от гиф, прорастают в гемолимфе и дают начало новым гифам с развивающимся на них таким же глубинным спорообразованием; они столь же инфекционны, как и конидиоспоры на воздушных гифах.

Почти тождественная картина развития гриба наблюдается и при его глубинном культивировании в жидких питательных средах. В течение первых суток после инокуляции питательной среды конидиями с воздушных гифов, они прорастают, гифальные тельца разрастаются в длину и образуют ответвления, на которых появляются яйцевидные конидии. Через двое суток большая часть их отделяется от гиф; через 72 ч с момента инокуляции питательной среды количество сформированных яйцевидных спор достигает максимума. Если эти споры падают на кожные покровы насекомого, они успешно заражают его, как и конидии, образованные на воздушных гифах.

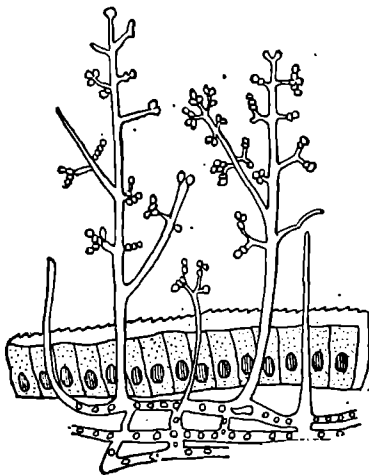
**Жизнедеятельность гриба в мертвом насекомом.** После гибели насекомого гифы проникают во все его ткани. При мускардинных болез-



нях, в том числе при бовериозах, гибель насекомого наступает не от разрушения тканей, а от глубокого функционального расстройства в деятельности организма под влиянием истощения и изменения состава гемолимфы, ее физико-химических характеристик и накопления в гемолимфе выделенных грибом некоторых высокомолекулярных продуктов обмена веществ с гидролитическими свойствами.

Перед смертью гусеницы обнаруживаются некоторые изменения в цитоплазме клеток тканей насекомого, расположенных по соседству с гифами, а мышечные волокна возле скопления гиф оказываются даже лизированными. Разрастаясь, мицелий неравномерно занимает общую полость тела и вначале только в отдельных местах проникает в ткани. Скопление грибницы можно наблюдать в гиподерме и в кутикуле под появившимися в местах внедрения гриба темными пятнами. Изредка гифы наблюдаются в жировом теле, в мальпигиевых сосудах, но при жизни насекомого не разрастаются в них. После гибели гусеницы возбудитель мускардины внедряется в ткани уже как сапрофит. При этом ранее других и наиболее сильно поражается жировое тело, которое, кроме того, может быть почти полностью истощено к моменту гибели гусеницы. Сильно оккупируется гиподерма. Мицелий обильно проникает в стенки и во внутреннюю полость мальпигиевых сосудов, значительно меньше — в шелкоотделительную железу и еще реже — в нервные узлы. Позже других и наименее охотно гриб поселяется в тканях пищеварительного тракта. В отдельных, редких случаях мицелий обнаруживается в средней кишке и разрастается в эпителиальной ткани стенки кишечника и в его полости.

Мицелий гриба, состоящий из плотно сплетенных гиф, заполняет все тело трупца, которое вначале имеет рыхлую консистенцию и не подвергается гнилоственному распаду; затем труп постепенно уплотняется и теряет остатки испаряющейся из него воды. Сохранив свои очертания, но несколько уменьшившись в размере и массе, труп становится твердым, как бы окаменевшим. При достаточной увлажненности воздуха разросшийся мицелий образует ответвления, которые пронизывают кутикулу и появляются на ее поверхности в виде воздушных гиф. Повторно ветвясь, они образуют конидиеносцы, на которых появляются конидии (рис. 82). Благодаря обильному плодonoшению труп кажется как бы посыпанным мелом. Конидиальное спорообразование наблюдается не только на открытой поверхности тела насекомого, но также в просвете трахей и в ротовой полости. После соз-



82. Развитие конидиального плодonoшения у возбудителя бовериоза на кожных покровах шелкопряда.

ревания споры легко отделяются от конидиеносцев и рассеиваются во внешней среде.

Разрастаясь, мицелий образует сетевидное сплетение, накапливает красноватый пигмент и обильно выделяет двойную соль щавелевокислого аммония и магнезия  $(\text{NH}_4)_2\text{Mg}(\text{C}_2\text{O}_4)_2$ . Эти соли являются продуктом обмена веществ гриба и поступают в большом количестве в ткани погибшего насекомого. В процессе склеротизации мицелия происходит интенсивное обезвоживание труппа, которое сопровождается кристаллизацией щавелевокислых солей; труп гусеницы становится окаменелым, а друзы кристаллов появляются даже на его поверхности, особенно на участках, свободных от конидиального налета. Скопление кристаллов щавелевокислых солей наблюдается и в старых культурах возбудителя бовериоза на питательных средах, содержащих значительное количество белка (например, на среде из риса с лептоном).

**Участие антибиотиков в мумификации трупов.** Грибы хорошо известны в качестве продуцентов метаболитов с антибиотическими свойствами. Антибиотики способны задерживать или полностью подавлять развитие других микроорганизмов, даже в тех случаях, когда эти метаболиты присутствуют в очень маленьких количествах. Антибиотическое действие их сопряжено, по некоторым данным, с ингибированием ими у микробов синтеза нуклеиновых кислот. Грибы как антагонисты возбудителей гнилостных процессов способны предотвращать порчу пищевых продуктов, а как средство врачевания и ускорения заживления ран известны человечеству с незапамятных времен. Многие из них используются в современной медицине и некоторых других областях человеческой деятельности; достаточно напомнить о той роли, которую сыграл в этом отношении пенициллин. Антагонистические свойства этой «зеленой плесени» впервые было предложено использовать для борьбы с кожными заболеваниями, вызванными бактериями, более 100 лет назад (В. А. Манассеин, 1871; А. Г. Полотебнов, 1872). Систематизирование всего многообразия антибиотических средств, вырабатываемых микроорганизмами, основывается на различиях их химического строения, на составе микроорганизмов, подверженных их антагонистическому действию и на характере конечного результата: цитостатического и цитолитического. Известно, что насекомые, пораженные грибными инфекциями, оказываются надежно защищенными от вторжения агентов вторичной инфекции или от разложения трупов гнилостными бактериями.

Имеется ряд сообщений о способности *V. bassiana* продуцировать антибиотические вещества. По данным А. А. Евлаховой и Л. М. Тарасевич (1970), культуральная жидкость этого гриба обладает четко выраженными антибиотическими свойствами с широким спектром активности. Выделенные ими в питательную среду антибиотики препятствуют развитию бактериальной микрофлоры, что позволяет выращивать этот гриб для получения инсектицидного биопрепарата на питательных средах без их предварительного автоклавирования (Евлахова и др., 1968). Стерилизующее действие обеспечивается обильным посевом спор гриба на поверхность среды (1—1,5 млн. на 1 см<sup>2</sup>). Бла-

годаря этой особенности *V. bassiana* стала возможной одноэтапная технология, позволяющая с меньшими затратами производить значительно большее количество препарата боверина.

**Двухфазный характер жизнедеятельности гриба и его развития в теле насекомого.** Паразитическая фаза жизни гриба в стадии гифальных телец протекает в гемолимфе. Чтобы проявить так называемую способность к первичному паразитированию (т. е. без содействия со стороны другой предварительной инфекции), гриб должен не только выжить в организме насекомого, но и обеспечить возможность увеличить в этой среде размеры своей популяции путем деятельного воспроизводства гифальных телец. Возбудитель бовериоза располагает в качестве сапрофита широким набором ферментов для использования разнообразных источников органического питания — от мертвых органических остатков до экскрементов насекомых и их трупов. Однако в условиях жизнедеятельного организма насекомого эти средства воздействия гриба на среду обитания оказываются недостаточными. Успех обеспечивается возможностью формирования дополнительного ферментативного аппарата гриба, индуцированного этими особыми условиями. Прежде всего, его генетически запрограммированная потенциальная способность к паразитированию позволила начать вырабатывать биологически активные продукты, обладающие как ферментативной способностью, так и ингибирующим действием на фагоцитарную систему насекомого; благодаря этому вырабатываемые макромолекулы из факторов жизнеобеспечения и питания гриба постоянно становятся факторами патогенности. В итоге, если в первой фазе развития гриба в качестве основного средства воздействия на субстрат питания используются макромолекулы с ферментативной активностью с тем, чтобы обеспечить потребность размножающихся гифальных телец, то на последующих этапах биологическая активность продуцируемых веществ носит токсический и антибиотический характер.

В общих чертах последовательность вступления факторов питания и патогенности совпадает с картиной двухфазности процесса обмена веществ у грибов, которая наблюдается при их культивировании с биопромышленными целями (Безбородов, 1969). Первая группа продуктов, вырабатываемых грибом в условиях культивирования, имеет преимущественно ферментативную природу. С их реализацией связано размножение гифальных телец. Главными продуктами потребления являются углеводы, источники азотистого питания и фосфор. Среди выделяемых метаболитов преобладают полисахариды и окисленные продукты брожения.

Во второй фазе темп размножения гифальных телец замедляется, начинают расти и развиваться грибницы. С приближением этой фазы изменяются физическое состояние и химический состав среды обитания гриба как индуктора ферментобразования, складывается новый профиль обменных процессов. В культуральную среду в возрастающем количестве начинают поступать биологически активные соединения иной направленности и антибиотики. Подготавливается следующая, заключительная фаза — фаза мицелиального развития гриба;

в организме насекомого эта фаза наступает с момента смерти гусеницы, когда грибу приходится переходить к сапротитному способу питания.

#### 4.9. Признаки и течение мускардины

**Проявление болезни.** Мускардина поражает шелкопряда во всех стадиях; чаще всего болеют гусеницы. Случаи массовой вспышки болезни могут наблюдаться уже в третьем возрасте. Одно из наиболее ранних проявлений болезни у инфицированного насекомого — усиление дыхания и связанных с ним окислительных процессов. Эта реакция в мире животных и растений — наиболее распространенный ответ на вторжение патогена. Она наблюдается у клеток, расположенных по соседству с инфицированной зоной, но непосредственно незагрязненных вторжением микроба. Предположительно эта реакция вызвана веществом, поступающим из зараженных клеток, способным в качестве своеобразного «сигнала бедствия» сделать более интенсивным дыхание здорового участка ткани. Вещество это выполняет роль индукторов ферментообразования и ферментоактивации. По мере гибели пораженных клеток и тканей сокращаются размеры жизнедеятельной зоны и кривая внешнего дыхания падает.

Инфекционный процесс очень рано начинает сказываться и на поведенческой реакции насекомого. После кратковременной вспышки активности и беспокойства наступает апатия. Больные гусеницы теряют аппетит, становятся вялыми, а затем неподвижными, тело их приобретает характерный матово-тусклый вид, иногда со слегка красноватым оттенком. Содержание воды в теле больных гусениц быстро снижается. Этому содействуют не только более интенсивное дыхание и транспирация, но и паразитарная деятельность гриба, вызывающая обезвоживание среды, в том числе под влиянием интенсивных гидролитических процессов. Вместе с тем поступление воды в организм гусениц по мере прекращения питания сокращается. Масса гусеницы снижается, тело понемногу теряет упругость, ямки на теле, возникающие при надавливании, сохраняются. Утрата нормальной упругости ослабляет работу мышц, движения становятся вялыми. На коже, в местах вторжения гриба остаются потемневшие пятна. Так как они представляют собой след от проникновения нескольких ростовых трубок из пучка склеенных между собой спор, пятна эти обычно имеют неправильную форму и неодинаковый размер. Чаще всего их можно обнаружить около дыхалец и у основания ложных ножек. Иногда концы ложных ножек чернеют и кажутся как бы опаленными. На границе между головой и первым грудным сегментом наблюдается своеобразное по форме, кольцевидное черное пятно («ошейник»). Если заражение произошло незадолго до линьки, то процесс линьки тормозится, нормальное протекание его нарушается. Бывают случаи, когда завершить линьку не удастся, и кожный покров предыдущей стадии насекомого частично сохраняется. Предположительно это может быть следствием нарушения функции эндокринной системы гусеницы. Возможно также, что эти явления — простой результат истощения насекомого и связанной с этим общей слабостью.

Ранее других органов поражается жировое тело. Возбудитель бовериоза, подобно многим другим инфекционным агентам, проявляет избирательную направленность к этому богатому питательными ресурсами органу. Клетки его разрушаются, ткани истощаются, и орган постепенно исчезает. Сильнее всего паразитарная деятельность сказывается на гемолимфе, которая под воздействием гриба истощается, обезвоживается, вязкость ее увеличивается. Циркуляция крови замедляется, слабеет сократительная функция спинного сосуда и, наконец, прекращается совсем. Позже других органов гистолитическому действию гриба подвергается кишечник. При микозах, в разные периоды заболевания, наблюдаются явления частичного или полного паралича, но при бовериозах у шелковичного червя он наступает обычно в конце болезни.

С начала заражения гусеницы и до ее гибели проходит от одной до полутора недель, в зависимости от возраста гусеницы, температуры воздуха и количества патогенного начала. Когда симптомы не характерны и мало заметны, гибель гусениц носит как бы внезапный характер.

**Посмертные изменения насекомого.** Труп мускардинной гусеницы приобретает слегка красноватый оттенок, который постепенно усиливается, но не в такой степени, чтобы походить на ярко окрашенные трупы насекомых, погибших от красной мускардины. Красноватый оттенок трупа вызван пигментообразовательной деятельностью гриба. Затем труп начинает темнеть и становится почти черным, иногда с красным оттенком, но в отличие от фляшерии, он не разлагается. Пронизанные гифами гриба во всех направлениях органы и ткани насекомого представляют собой единую анастомозирующую гифальную структуру, которая преобразуется в склероций, постепенно теряет остатки влаги и примерно через 10 ч твердеет.

В течение первой половины вторых суток с момента гибели гусеницы, а при благоприятной температуре — через 3—4 ч, труп начинает покрываться белым пушком конидиальных гиф. В начале они появляются главным образом на межсегментарных сочленениях, дыхальцах и ротовом отверстии. Затем вся поверхность гусеницы, за исключением головной капсулы, покрывается белым сухим порошком, состоящим из спор. Труп становится втрое легче живого шелковичного червя и значительно мельче его. Конечности и голова у такой мумифицированной гусеницы (рис. 83) трудно различимы. Черви, зараженные в последние дни пятого возраста, погибают на разных этапах завивки, вплоть до стадии куколки. Если заражение произошло накануне завивки, коконы могут оказаться вполне довитыми. Тело шелкопряда, погибшего от мускардины, высыхает, уменьшается и весит примерно в три раза меньше живого насекомого; коконы оказываются в два с половиной — три раза легче коконов с живыми куколками.



83. Мумифицированный труп гусеницы, погибшей от бовериоза; открыт налетом, образованным наружным плодоношением гриба.

ми и при встряхивании издадут звук, напоминающий погремушку.

Мускардинные бабочки встречаются редко, так как споры гриба, заразив гусеницу перед завивкой, чаще всего вызывают смерть на стадии куколки; коконная же оболочка препятствует более позднему заражению. Изменение цвета тела у имаго под влиянием заражения различными видами грибов менее заметно, чем у личинок, так как конидиальный налет частично маскируется чешуйками, обильно покрывающими тело бабочки. Споры гриба способны прорасти и на поверхности грены, если этому благоприятствуют температура и влажность воздуха. Гифы гриба пышно развиваются внутри яйца, и грена гибнет. Окраска ее становится розовой или красно-фиолетовой. Погибшая грена уменьшается в объеме, на ее поверхности спустя некоторое время появляется конидиальное плодоношение, и грена белеет.

#### 4.10. Диагностика мускардины

Прижизненный ранний диагноз мускардины, так же как и других инфекционных болезней насекомых, приходится ставить визуально, по немногим внешним признакам, большая часть которых оказывается не характерной и свойственной не только мускардине.

**Микроскопическое исследование.** Существенное уточнение прижизненного диагноза может быть сделано на основании микроскопирования гемолимфы подозреваемой гусеницы на предмет обнаружения гифальных телец и последующих стадий развития гриба.

Для этого достаточно приготовить временный нативный препарат, поместив каплю гемолимфы на предметное стекло и покрыв ее покровным стеклом, после чего исследовать под микроскопом с 600-кратным увеличением. Более уверенные результаты можно получить с помощью фазово-контрастной микроскопии или же исследования временных препаратов, но с витально (прижизненно) окрашенными объектами. Для окраски живого, не фиксированного микологического материала в нативном препарате можно использовать краски для прижизненного окрашивания, такие, как нейтральрот, генцианвиолет и др. Для изготовления временных и постоянных препаратов из высохших трупов в микологической практике часто используют различные методы мацерации и просветления материала, а затем их покрывают обычными красителями микробиологических лабораторий — фуксином, метиленовой синькой, Гимзой.

Более наглядно признаки болезни обнаруживаются визуально на трупах гусениц; они настолько характерны, что для их распознавания достаточен минимальный опыт. На других этапах онтогенеза: грены, куколки (кокона) и бабочки признаки болезни у погибших насекомых несколько менее заметны, но все же их отличительные черты — большая потеря массы из-за усыхания и мумификации, конидиальный налет на поверхности довольно характерны, ими можно руководствоваться при постановке диагноза.

**Определение видовой принадлежности возбудителя.** Несколько труднее определить систематическую (видовую) принадлежность возбудителя, но в этом случае, кроме определенных знаний и опыта в области систематики, можно обойтись без всех тех материально-технических средств, которые необходимы для лабораторного исследования бактериозов или вирусных заболеваний тутового шелкопряда. В основе определения систематического положения возбудителей мускардины лежат морфологические особенности конидиального спороношения гриба и его пигментообразовательная деятельность (цвет конидиального налета и труппа). Чтобы определить тип расположения и ветвления конидиеносцев, форму конидий и их внешний вид, достаточно приготовить нативный препарат из соскобленного конидиального налета с труппа насекомого и подвергнуть его исследованию под микроскопом. По результатам исследования можно охарактеризовать общий вид и строение плодоносящей части воздушных гиф.

Для исследования гистопатологии мускардины готовят постоянные гистологические препараты из микротомированных срезов с различными методами специальных окрасок, но эти работы выходят за пределы диагностических задач определения вида заболевания и видовой принадлежности его возбудителя.

#### 4.11. Эпизоотология боверноза

Массовое развитие болезни, приобретающее характер эпизоотии, становится возможным при следующих условиях: существование источника инфекции и способов ее переноса на выкормку шелколичных червей; возможность накопления инфекции в выкормочном помещении, благоприятные условия для сохранения патогена до следующего сезона выкормок; обстановка на выкормке, способствующая перезаражению гусениц за счет накопленного в ее зоне инфекционного начала. Одно из главных условий развития заболеваемости — температура и влажность воздуха, благоприятствующие развитию гриба.

**Роль внешних источников в формировании очагов поражения.** Первичным источником заражения выкормок шелколичных червей является окружающая среда. Споры возбудителя боверноза встречаются в почве и притом настолько часто, что этого было бы вполне достаточно, чтобы поддерживать возникновение перманентных эпизоотий у восприимчивых к ним почвообитающих насекомых. Этого не происходит только потому, что, как резонно отмечает Вейзер (1966), для возникновения заболевания совершенно необходима минимальная доза инокуляма в размере нескольких сотен одновременно прорастающих спор на каждой поверхности насекомого.

Все возбудители мускардины способны развиваться как сапрофиты. Именно поэтому культивирование их не только в лабораториях, но и в промышленных масштабах не составляет особого труда: возбудитель белой мускардины растет на среде из риса, макарон, картофеля или отрубей. По данным японских авторов, список субстратов, на которых способны сапрофитировать различные виды возбудителей мускардин, значителен и разнообразен, вплоть до обоей бумаги

и бамбуковых прутиков. Впрочем далеко не на всех субстратах грибы развиваются одинаково интенсивно и даже при удовлетворительном росте грибница не всегда оказывается способной плодоносить.

Возбудитель бовериоза тутового шелкопряда способен питаться в природных условиях различными органическими остатками и прежде всего растительными. Вследствие этого он может сохранять свою численность и даже увеличивать ее. Однако сапрофитный образ питания ослабляет вирулентность гриба. Многочисленные наблюдения показывают, что пассирование изолятов, воспитанных на искусственных питательных средах, через восприимчивое насекомое повышает их вирулентность, что позволяет получать летальный результат при меньших дозах заражения.

**Формирование инфекционного очага на выкормке.** Грена — маловероятный источник первичного заражения выкормки; во-первых, потому что герминативный путь передачи возбудителя от поколения к поколению в данном случае исключен. Во-вторых, хотя грена может быть поверхностно загрязнена спорами грибка, этот путь распространения мускардины в качестве первичного источника заражения гусениц при вылупливании редок, а промывка грены и ее дезинфекция в процессе гренопроизводства сводят их на нет. Когда грены, предназначенную для повторных выкормок, обрабатывают крепкой соляной кислотой, чтобы предотвратить наступление диапаузы, поверхность ее оказывается полностью обеззараженной.

Полагают, что энтомопатогенные грибы способны заражать насекомых различными путями: перкутанно (через кожу), перстигмально (через дыхальца), перорально (через рот) и через ранки на коже. Вопреки существующему представлению (Вейзер, 1972) гусеницы через пищеварительный тракт не заражаются, так как споры гриба плохо переносят щелочную реакцию кишечного сока и после того, как будут введены через рот, спустя 5—8 ч выводятся вместе с экскрементами. Однако заражение мускардиной через корм возможно, так как споры грибка способны прорасти в сочленениях ротовых придатков и таким путем проникать в организм гусениц. Инфекция передается через неповрежденную кутикулу на лобом участке тела. Передается она также через дыхальца.

Возбудитель белой мускардины паразитирует не только на тутовом шелкопряде, но и на различных других насекомых — вредителях плодовых, огородных и полевых культур. Известны практические начинания по использованию этого гриба как средства истребления вредных насекомых, таких, как майский и колорадский жуки, вредители сахарной свеклы, саранча и другие. Тутовые плантации и линейные насаждения шелковицы в окружении прочих сельскохозяйственных угодий с их разнообразным и, нередко, многочисленным составом вредителей представляют возбудителю бовериоза широкие возможности для усиления своей вирулентности путем многочисленных пассажей через разные виды насекомых. Такую возможность облегчают широкие рамки видовой принадлежности насекомых, поражаемых этим грибом. Перенос спор грибов из первичного очага их размножения в природе в зону выкормки тутового шелкопряда может быть успешно



осуществлен воздушными потоками, как об этом свидетельствует ряд известных сводок (Грегори, 1964; Ингольд, 1957; Степанов, 1962). Воздушные течения способны перемещать споры грибов на очень большие расстояния; чем меньше дистанция транспортировки, тем слабее рассеивание поднятой на воздух массы созревших спор. Особое место в распространении заразы занимает лист шелковицы, доставляемый на выкормку шелковичных червей, особенно в старших возрастах; возможность эта велика, так как за весь период развития гусениц на каждую партию из одной коробки грены необходимо скормить одну тонну листьев шелковицы. Переносчиками спор гриба с больных выкормок на здоровые могут быть многочисленные расхитители шелковичных червей — осы, муравьи, сверчки, мыши, воробьи и т. д. Наконец, средством доставки инфекционного материала может оказаться обслуживающий выкормку персонал, не всегда соблюдающий с достаточной тщательностью санитарные правила.

Большое значение имеют температура и влажность воздуха. При  $10^{\circ}\text{C}$  споры прорастают и мицелий развивается медленно; это нижняя температурная граница развития возбудителя мускардины. При  $15^{\circ}\text{C}$  гриб развивается несколько скорее, но спорообразование не происходит. В промежутке от  $22$  до  $28^{\circ}\text{C}$  гриб развивается нормально. Оптимальная температура для развития гриба и спорообразования около  $28^{\circ}\text{C}$ . При дальнейшем повышении температуры развитие гриба начинает замедляться и выше  $33^{\circ}\text{C}$  — прекращается. Заражение шелковичных червей при температуре ниже  $10^{\circ}\text{C}$  и выше  $30^{\circ}\text{C}$  удается лишь в очень небольшом проценте случаев.

При высокой (90—100%) относительной влажности воздуха и надлежащей температуре гриб развивается исключительно интенсивно; конидиеносцы появляются на пятый день с момента заражения. При более низкой относительной влажности (70—77% и ниже) споры прорастают не дружно, а гусеницы довольно слабо заражаются мускардиной. При одной и той же температуре и влажности воздуха, но без принудительной вентиляции и интенсивных токов воздуха в червоводне мускардина развивается лучше. Следует иметь в виду, что увлажненность воздуха на выкормочной поверхности выше, чем регистрируемая в самом помещении приборами, размещенными по всем правилам. Кроме того, в пределах этой зоны микроклимата имеются ниши повышенной влажности. Наконец, поверхность тела гусениц увлажнена конденсацией транспирационной влаги, выделяемой как самим насекомым, так и всей массой свежих листьев шелковицы.

Значение влажности в эпизоотологии мускардины наглядно видно из сопоставления степени развития этого заболевания по климатическим зонам шелководства. Наиболее значительные различия видны при сравнении заболеваемости мускардиной в среднеазиатских республиках и на юге Европейской части СССР; еще разительнее эта разница при сопоставлении с Японией. Следует отметить, что даже в Средней Азии, с ее очень сухим воздухом в сезон выкормок, где даже единичные случаи появления мускардины довольно редки, имеются зоны, где эта болезнь обнаруживается значительно чаще и иногда приобретает характер небольших локальных вспышек. Такой зоной, в частности,

является Ленинадский оазис в Таджикской ССР, расположенный в долине Сырдарьи.

Первичное заражение гусениц бовериозом, занесенным извне, — исходный этап формирования на выкормке инфекционного очага, размеры которого растут по мере последующих заражений и перезаражений гусениц. Основным источником его развития на самой выкормке являются трупы погибших от мускардины гусениц после образования на их поверхности зрелых конидий. С момента заражения гусеницы и до ее гибели проходит, как уже отмечалось, 6—12 дней, в зависимости от возраста гусениц, температуры воздуха и количества заразного начала, участвовавшего в ее инфицировании. Чем старше гусеница и больше размеры ее тела, тем продолжительнее болезнь. После смерти гусеницы на появление воздушных гиф и созревание конидий на поверхности трупа при благоприятной температуре и влажности воздуха понадобится еще 1—3 суток. Наиболее результативной в эпизоотическом отношении окажется такая первичная инфекция, которая одновременно поразит наибольшее количество гусениц, а сами гусеницы будут не старше третьего возраста. Гусеницы, заразившиеся перед завивкой в пятом возрасте, менее опасны как источник дальнейшего перезаражения, так как споры у них появляются после гибели куколки внутри кокона. Таким образом, из занесенных на выкормку спор очаг инфекции формируется через значительный промежуток времени.

**Сохраняемость спор, оставшихся после эпизоотии.** Наиболее вероятно возникновение эпизоотии посредством спор, накопившихся в инфекционном очаге во время предыдущей выкормки. Местом сохранения инфекции могут оказаться: помещение выкормки, прежде всего пол, особенно углы и пристеночная полоса; выкормочный инвентарь, в первую очередь стеллажи, спецодежда обслуживающего персонала выкормки, если она не прошла надежной санитарной обработки.

Споры не теряют инфекционности до двух лет. Возбудитель бовериоза может сохраняться длительное время в высохших трупах насекомых в виде псевдосклеротий — компактной массы грибницы. Длительное хранение ослабляет споры, и при экспериментальном заражении такими спорами процент заболевших значительно снижается. При 8°С и относительной влажности ниже 50%, в отсутствии света, 90% спор по истечении года сохраняли жизнеспособность. Рассеянный дневной свет действует на споры слабо, но при длительном облучении их жизнеспособность заметно снижается. Кратковременное облучение прямыми солнечными лучами в течение 3—5 ч убивает споры.

Дальнейшему распространению заболевания способствует возможность интенсивного рассеивания заразного начала из первичного очага — интенсивным током воздуха, вызванным сквозняком. Роль пылевой инфекции возрастает при неаккуратном обращении с подстилкой во время ее смены, при подметании пола. Переносу спор способствуют насекомые.

**Влияние на развитие эпизоотии восприимчивости шелкопряда.** Помимо количества заразного начала и его вирулентности, существ-

венным фактором в развитии эпизоотии бовериоза является степень восприимчивости гусениц к инфекции, прежде всего, вследствие уровня своей генетически обусловленной сопротивляемости. Породные различия могут быть замечены при сопоставлении достаточно отдаленных географических групп тутового шелкопряда: моновольтинных (европейских, китайских и японских) и бивольтинных, или субтропических поливольтинных рас. Это проявление относительно большей или меньшей устойчивости не избавляет их от возможности массового поражения мускардиной при благоприятных экологических условиях.

Врожденный относительный иммунитет к мускардине, его клеточный и гуморальный механизм все еще недостаточно изучены. Пассивную защиту против инфекции в какой-то мере осуществляет кожный покров насекомого, так как попавшие на него конидии подвергаются биохимическим воздействиям, которые ингибируют, если не активизируют, их прорастание и внедрение гриба. Известны также активные реакции насекомого по отношению к инфекционным гифам и гифальным тельцам, протекающие на клеточном уровне с участием явлений фагоцитоза, инкапсуляции и лизиса. Однако купировать (прервать) инфекцию они могут только при минимальных дозировках инокулюма. Еще меньше данных относительно приобретенного иммунитета. Более вероятен нестерильный иммунитет у насекомого по отношению к повторному заражению. Однако отличить подобный иммунитет от антибиотического эффекта, который проявляется при микозах и обязан первичному заражению, не всегда представляется возможным. Степень восприимчивости к мускардине изменяется в зависимости от состояния организма насекомого и различных причин, способных его ослабить. Наиболее подвержены заражению отставшие в росте гусеницы, находящиеся в толще подстилки; опыты с заражением таких гусениц, помещенных в одинаковые микроэкологические условия с нормально развивающимися, показали, что более высокий процент заболевания не определялся одной только повышенной влажностью в толще подстилки, где они находятся.

#### Вопросы для самопроверки

1. К каким систематическим группам относятся энтомопатогенные грибы?
2. Чем отличаются микозы, вызываемые грибами с облигатным характером паразитизма, от микозов, вызываемых условно патогенными грибами?
3. Что представляют собой аспергиллезы тутового шелкопряда?
4. Что известно о токсинах энтомопатогенных грибов и о вызываемых ими явлениях токсикоза у насекомых?
5. Каково систематическое положение возбудителя белой мускардины тутового шелкопряда и его отличительные морфологические признаки?
6. Как происходит заражение возбудителем мускардины и складывается паразитическая фаза деятельности патогена в гемолимфе?
7. Чем характерны внешние признаки заболевания мускардиной и каково течение этой болезни?
8. Из каких физиолого-биохимических особенностей складывается двухфазный характер жизнедеятельности возбудителя бовериоза?
9. Как формируется эпизоотический очаг мускардины на выкормке?
10. Какова сохраняемость спор, оставшихся после эпизоотии мускардины?

Пибрина, или нозематоз, тутового шелкопряда — заразная болезнь, вызываемая паразитическими простейшими из рода нозем, представители которого описаны как специализированные паразиты у различных членистоногих. На теле больных червей часто появляются мелкие темные пятна, и насекомое кажется как бы посыпанным перцем. Отсюда и название болезни<sup>1</sup>. Название это ввел в научную литературу французский зоолог А. де К а т р ф а ж — автор монографии о болезнях шелковичного червя (1858). Он подробно описал признаки болезни. В зависимости от способа заражения шелкопряда болезнь протекает различно. Если возбудитель попадает в организм гусеницы с кормом, насекомое часто успевает превратиться в бабочку и отложить грену. Если же возбудитель проникает в грену во время ее формирования, то вылупившиеся из грены гусеницы оказываются зараженными и погибают в первых возрастах. Способность паразита передаваться следующему поколению обусловила развитие современного гrenaжа, важнейшей задачей которого является приготовление грен, не содержащей возбудителя пибрины.

### 5.1. Из истории изучения пибрины

**Предшественники Л. Пастера.** На инфекционный характер пибрины впервые указал французский исследователь Герин-Менвиль (1849). Изучая под микроскопом гемолимфу пибринозных гусениц, он обнаружил блестящие, овальные тельца, которые отнес к микроорганизмам и назвал гематозритами. Вскоре эти «тельца пибрины», «тельца Корналиа»<sup>2</sup> стали общеизвестными признаками пибрины. Однако не все исследователи видели в них возбудителя болезни и возникновение её приписывалось неправильному хранению грен и плохому уходу за выкормкой. Леберт и Фрей (1856) разделяли мнение о парази-

---

<sup>1</sup> На южнофранцузском диалекте *pebriné* — «поперченные».

<sup>2</sup> По имени итальянского ученого Корналиа (1856), который, однако, долго не считал тельца возбудителем этой болезни.

тической природе болезни и установили присутствие паразита также в грене, отложенной педринозными бабочками. Тоже самое наблюдал Озимо (1859), который рекомендовал выборочное микроскопирование куколок, чтобы предупредить использование для гренажа зараженных партий коконов. Он был первым исследователем, назвавшим тельца педрины спорами.

Дальнейшие наблюдения показали, что в зараженной зимующей грене обнаружить педрину не всегда удается, так как в этот период в ней содержится относительно меньше хорошо различимых под микроскопом зрелых спор. Виттадини (1859) установил, что во время развития зародыша число телец в грене быстро увеличивается и предложил предназначенную для исследования грену преждевременно «оживить»<sup>1</sup>. Тогда же были разработаны методы взятия образца грены и его анализа (Корналиа, Ф. Габерландт и др.). Наконец, Кантони впервые в гренажной практике применил микроскопирование бабочек, но в дальнейшем отказался от этого, ошибочно полагая, вместе с Корналиа, что это не достигает цели, так как не избавляет выкормки от заболевания педриной.

**Рождение целлюлярного гренажа.** К началу XIX в. производство шелковых тканей во Франции добилось больших успехов. Урожай коконов с 6 тыс. в 1788 возрос к 1853 г. до 26 тыс. т. Высококачественный натуральный французский шелк стал престижной отраслью национального экспорта. Однако в результате массовых, всевозрастных заболеваний шелковичных червей сбор коконов начал стремительно падать и к 1865 г. снизился до 4 тыс. т, а убытки, причиненные эпизоотиями, достигли 10 млн. франков. Шелководы вынуждены были обратиться за помощью к правительству Франции. Они просили снизить налоги, обеспечить хозяйства греней надежного качества, принять меры по изучению «всех вопросов, относящихся к этой упорной эпизоотии, как с точки зрения патологии, так и гигиены». Петиция шелководов была передана в Сенат, где к ее обсуждению были привлечены крупные ученые во главе с известным химиком Ж а н о м Б а т и с т о м Д ю м а (1800—1884).

Дюма высоко ценил исследования Л. Пастера по так называемым болезням вина и вопросам ферментации, что послужило основанием поручить ему изучение болезней шелковичных червей и изыскание спосо-



А. де Катрфаж (1810—1892).

<sup>1</sup> Много лет спустя метод Виттадини был использован при разработке техник и искусственного оживления грены для повторных выкормок.



Л. Пастер перед домом в Понт-Жиске диктует жене книгу о болезнях шелкопряда.

бов их предотвращения. В первых работах по химии и кристаллографии Пастер описал особенности оптической активности кристаллов винной кислоты. Не имея никаких представлений о тутовом шелкопряде и его болезнях, он энергично взялся за решение проблемы, предполагая, что тем самым его недавние работы относительно участия микроорганизмов в болезнях вина и пива смогут быть продолжены на новом объекте.

6 июня 1865 г. Пастер покидает Париж и направляется на юг Франции, в департамент Гар — колыбель французского шелководства и районой наиболее интенсивных эпизоотий. Здесь, в окрестностях г. Алес, в местности Понт-Жиск, он приступает к исследованиям с тщательного изучения публикаций о шелкопряде и его болезнях. Он посещает выкормки, расспрашивает шелководов, микроскопирует больных и мертвых гусениц. В сентябре, через два с половиной месяца, Пастер представляет в Агрономическую комиссию Академии наук первое сообщение о результатах работы. На следующий год он продолжает исследование, на этот раз совместно с двумя ассистентами, к которым позже присоединяется его ученик и продолжатель многих начинаний Пьер Эмиль Дюкло (1840—1904). Перед небольшим каменным домом в Понт-Жиске, на площадке, огороженной низкой, сложенной из дикого камня оградой, он диктует жене первые главы своего труда «Изучение болезней шелковичных червей» (1870), оказавшегося счастливым началом его дальнейших классических работ в области ветеринарной и медицинской микробиологии, основоположником которой он стал.

В отличие от своих предшественников Пастер, основываясь на последовательном анализе причин распространения пембрины, доказал необходимость микроскопирования бабочек при приготовлении

грены и иллюстрировал целесообразность этого мероприятия четкими опытами. Он подчеркнул исключительную роль наследственного заражения в распространении пеприны. Предложение Пастера легло в основу современного клеточного метода приготовления грены.

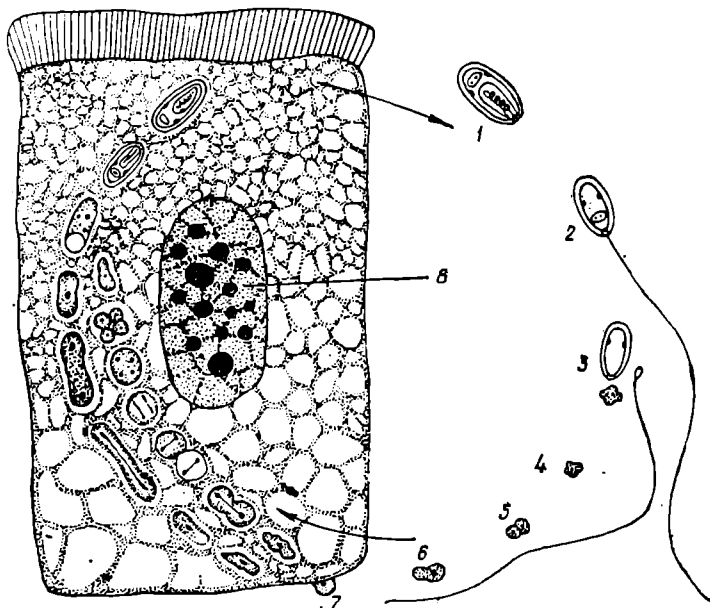
**Возбудитель пеприны приобретает имя.** Пастер не дал биологического описания паразита и его споры, он попросту называл их «тельцами» (корпускулами). Первую попытку систематического и подробного исследования пеприны предпринял Бальбиани (1884). Он отнес возбудителя пеприны к одноклеточным простейшим и назвал *Microsporidium bombycis*. Бальбиани установил, что спора раскрывается в кишечнике гусеницы и из нее выходит амeboподобное тельце, которое, проникая в ткани шелкопряда, размножается в них; затем синеватые тельца паразита уменьшаются и превращаются в споры. Позже Телоан (1895), исследовавший микроспоридий, описал строение споры и установил присутствие в ней полярной капсулы и стрекательной нити.

Более подробное описание цикла развития возбудителя пеприны и строения его споры было сделано В. Штемпелем (1909) на основе обширной компиляции протистологических работ своего времени и собственных наблюдений над возбудителем пеприны тутового шелкопряда и бабочки из семейства медведиц (*Arctia caja*). Хотя он полностью использовал возможности световой оптики и микроскопической техники тех лет, детали строения споры и некоторые особенности развития возбудителя пеприны оказались недоступными для наблюдений и вынудили прибегнуть к умозрительным выводам, основывающимся на описаниях более крупных представителей класса кнidosпоридий. Главную структурную особенность спор возбудителя пеприны — стрекательный аппарат — Штемпель представил себе по аналогии с книдоцистами в виде колбообразной полярной капсулы со свернутой в ней спиралью полярной нитью. Метод аналогов помог ему систематизировать собственные наблюдения над отдельными стадиями развития паразита, дифференциацию ядерного аппарата и участие последнего в органогенезе внутренних структур споры. Сложившиеся у него представления он изобразил в четкой схеме жизненного цикла паразита.

Штемпель закрепил за возбудителем пеприны название *Nosema bombycis* Naegeli, которое было дано еще в 1857 г. известным немецким ботаником К. В. Негели (1817—1891). Его студенты-альго-



К. В. Негели (1817 — 1891).



84. Схема цикла развития *Nosema bombycis* (по Штемпелю, из Догеля, 1962):

1 — зрелая спора с зародышем; 2 — 6 — выходение амебондного зародыща из споры; 7 — проникновение в эпителиальную клетку кишечника *Bombyx mori*. В клетке размножение макроспоридий и образование споры; 8 — ядро клетки хозяина.

логи, работая летом на знаменитой Неаполитанской биологической станции, привезли своему учителю пембринозных шелкоочных червей. Негели отнес обнаруженные в них тельца к дрожжеподобным и назвал этот организм *Nosema bombycis* (от греч. *nosos* — болезнь; буквально — «вызывающий болезнь шелкопряда»). После работы Штемпеля название ноземы для части микроспоридий стало родовым наименованием. Подробная и отлично иллюстрированная монография Штемпеля, посвященная возбуждению пембрины, в течение многих лет оставалась хрестоматийным описанием ноземы тутового шелкопряда в качестве типичного представителя этой обширной систематической группы облигатных паразитов беспозвоночных.

**На пороге эры электронной микроскопии.** Критический пересмотр и корректировка отдельных положений Штемпеля были начаты еще во времена световой оптики (Омори, 1912; Кудо, 1916; Пайо, 1928; Осима, 1937). Так, Кудо (1924), основываясь на своих многолетних исследованиях микроспоридий, внес существенные поправки в предпологаемое Штемпелем строение споры (рис. 84). В начале второй половины XX в. электронная микроскопия и ультрамикротомия открыли перед взором протистологов все то, что было недоступным прежде



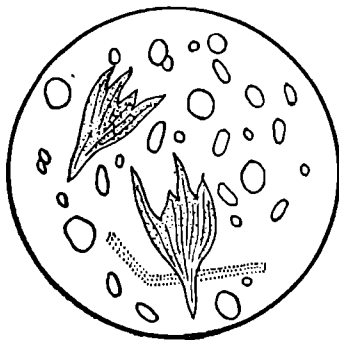
для световой микроскопии. В 60-е годы публикуются многочисленные работы, в корне меняющие прежние традиционные представления (Хугер, 1960; Лом, Вавра, 1961; де Пьюторак, 1961, 1962; Бюрне, Кинг, 1962; Кудо, Корлис, 1963; Вагга, 1965; Вавра и др., 1966; Лом, Корлис, 1967). Эти исследования выявили структуру главных компонентов споры микроспоридий: спороплазмы, полярной нити, полярного пласта, полюсного колпачка, задней вакуоли, скорлупки. Прежние схемы цикла развития ноземы шелкопряда подверглись полной ревизии. Наступил новый, более продуктивный этап изучения пембины.

## 5.2. Биология возбудителя пембины

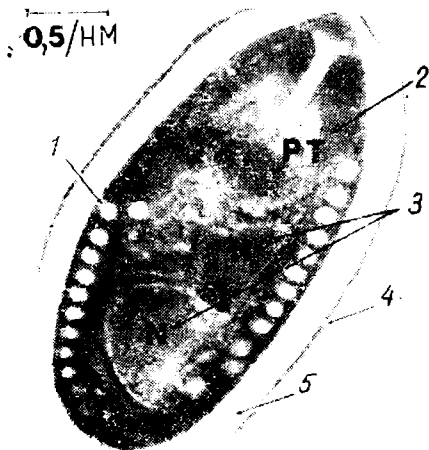
**Систематическое положение ноземы шелкопряда.** Возбудитель пембины тутового шелкопряда относится к типу простейших (Protozoa; Goldfuss, 1820), классу книдоспоридий (Cnidosporidia; Doflein, 1901), представителям которых описаны как специализированные паразиты различных членистоногих и некоторых других беспозвоночных; к отряду микроспоридий (Microsporidia; Balbiani, 1882), к семейству ноземовидных (Nosematidae; Labbe, 1899), к роду нозема (Nosema; Naegeli, 1875), к виду нозема тутового шелкопряда (*N. bombycis* Naegeli; Stempel, 1909).

Первоначально род нозема относился к классу споровиков (Sporozoa; Leuckart, 1879), к обширной группе простейших, образующих в цикле своего развития стадию, заключенную в более или менее толстую оболочку споры, приспособленную к сохранению во внешней среде. Шаудин (1900) разделил эту группу простейших на два подкласса: Telosporidia, включающего в себя грегариин, кокцидий и некоторых других, и Neosporidia, в число которых вошли, в частности, микроспоридии. Однако Дюфлейн (1901) предложил свою систематизацию типа протозоа. Всех, кто имел стрекательный аппарат (книдоцисты), он выделил в подкласс, а затем — в самостоятельный класс Cnidosporidia, а Telosporidia стали синонимом самостоятельного класса под прежним названием Sporozoa. Эти таксономические преобразования в истории систематики простейших послужили причиной тому, что в литературе по шелководству возбудителя пембины дольше, чем следовало, относили то к споровикам, то к книдоспоридиям.

**Цитоморфология споры.** Возбудитель пембины во внешней среде сохраняется в виде споры, являющейся стадией покоя паразита. Под микроскопом споры имеют вид эллиптических тел (рис. 85), сильно преломляющих свет, блестящих, с голубоватым оттенком. Величина

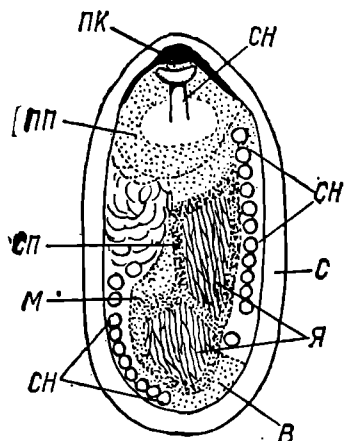


85. Споры возбудителя пембины в нативном препарате под микроскопом, среди жировых шариков и чешуек бабочки, растертой для ее микроскопического исследования.



86. Продольный разрез споры ноземы под электронным микроскопом:

1 — поперечный разрез спирально уложенной полярной нити; 2 — полярропласт, окружающий полюсный участок полярной нити; 3 — ядра споропласта; 4, 5 — скорлупка споры.



87. Топография органелл споры ноземы:

лк — полюсный колпачок; пл — полярропласт; сн — стрекательная нить; сп — спороплазма; м — ее мембрана, окруженная полирибосомами; в — вакуоль (на фото она вне плоскости среза), размеры которой увеличиваются по мере выбрасывания стрекательной нити и выхода спороплазмы; с — скорлупка споры; я — ядра спороплазмы.

спор колеблется и составляет 3—4 мкм в длину и 1,5—2 мкм в ширину. Один из признаков семейства нозем — длина споры, которая не должна превосходить ее ширину более чем в три раза. Размеры спор и форма у разных нозем близки, если не подобны. По данным Ватанабе (1975), из 24 видов нозем, паразитирующих на разных видах чешуекрылых, только три несколько отличались от остальных своими размерами. Варибельность размера спор не зависит от стадии развития насекомого. На примере трех видов нозем, паразитирующих на репнице, рисовой огневке и хлопковой карадрине, Ватанабе показал отсутствие разницы в размере спор не только у этих видов насекомых, но и на всех стадиях их развития — у гусениц, куколок, бабочек, а также у спор из их трупов. Продольный разрез споры ноземы и топография ее органелл показаны на рис. 86 и 87.

Оболочка споры, которая по своим физическим характеристикам больше соответствует понятию «скорлупка», бесцветная, с гладкой поверхностью эластичная структура, о чем можно судить по способности спор, деформированных под воздействием нагревания, восстанавливать первоначальную форму. Толщина скорлупки 0,2—0,3 мкм, на вершине переднего полюса она значительно тоньше. Оболочка скорлупки обладает, видимо, физико-химическими особенностями, позволяющими проникать в спору влаге окружающей среды и облегчающими прободение полюса стрекательной нитью в процессе ее выбра-

сывания. Известно, в частности, что полюсный участок скорлупки легче набухает, он более пластичен и в отличие от остальной поверхности скорлупки легче окрашивается специальными красителями. Вещество скорлупки в своей основе — аминополисахарид, близкий или тождественный хитину, частично инкрустированный белками и липидами. С внутренней стороны к своду переднего полюса скорлупки плотно прилегает полюсный колпачок — куполообразное образование, более толстое на вершине и постепенно утончающееся по направлению к краям. Края полюсного колпачка просгираются вдоль внутренней стенки скорлупки на  $1/6$  ее протяженности.

Внутри споры находится спороплазма — протоплазматическое тело простейшего, именуемое часто зародышем или амeboидом. Большую часть спороплазмы занимают два ее ядра. Спороплазма окружена оболочкой — плазматической мембраной и полирибосомами; ядра также имеют двойную оболочку и окружены полирибосомами. По своему местоположению спороплазма несколько смещена к переднему полюсу, а позади нее, в пространстве у заднего полюса споры находится большая вакуоль, ограниченная одиночной мембраной.

В передней части споры, вне тела споропласта расположена сферическая вакуолеобразная структура — полярoplast. Образованный в процессе дифференциации структурных компонентов споры, он, по мнению некоторых авторов (Вейзер, 1966), является аналогом остаточного тела у других простейших и представляет собой скопление неиспользованных в споруляции и обмене веществ неперевариваемых продуктов. Полярoplast заполнен гелем с жидкой дисперсной средой — пластическим содержимым, в котором под электронным микроскопом обнаруживаются нерегулярные по форме нитевидные структуры.

**Стрекательный аппарат споры.** Стрекательный аппарат кнidosпоридий служит отличительным признаком для всего класса; он состоит из особого органа — книдоцисты или стрекательной капсулы.

Наименование это заимствовано протистологами из описания колющего игловыталкивающего органа кишечнополостных, способных выбрасывать его мгновенно, подобно выстрелу с целью защиты или нападения. У микроспоридий, и в том числе у ноземы, в споре находится свернутая спиралью стрекательная нить. Передний ее конец приближен к полюсному колпачку, несколько расширен, на краях его — кольцевидное утолщение; отсюда синоним стрекательной нити — полярная нить (см. рис. 87). Передняя часть стрекательной нити прямая, проходит сквозь полярoplast, который выполняет главную функцию в механизме выталкивания нити из споры. Затем она направляется к боковым сторонам скорлупки споры, где переходит в спираль, свернутую вдоль стенки споры в один ряд, образуя 10 витков и занимая по периферии, в задней части, около  $2/3$  от общей длины споры. Длина выброшенной полярной нити  $90,7 \pm 14$  мкм, толщина  $0,2—0,3$  мкм (по Штемпелю, около  $0,07$  мкм).

Стенка нити представляет собой мембрану, окружающую канал, пронизывающий нить по всей ее длине. Полая нить лежит в споре в вывернутом наизнанку состоянии. На поперечных срезах через споры

спиральные витки имеют вид кружков с более темной сердцевинкой, образованной пучком фибрилл. При выбрасывании стрекательная нить выворачивается на всем своем протяжении и ее внутренняя поверхность становится наружной, а фибриллы оказываются на поверхности, вдоль всей длины нити, сообщая ей упругие свойства. Спираль нити окружает внутреннее пространство споры, в котором расположены спороплазма и задняя вакуоль.

**Факторы, побуждающие к выбрасыванию стрекательной нити.** Осима (1937) вел наблюдения, помещая споры в каплю кишечного сока гусениц. Нить выбрасывалась так стремительно, что наблюдать в микроскоп за деталями этого процесса было невозможно. Он использовал с этой целью также перекись водорода, а чтобы замедлить скорость выбрасывания нити, прибавлял к перекиси гипертонический раствор поваренной соли (5—10%). С увеличением концентрации соли спираль нити раскручивалась медленнее, а процент спор, выбрасывавших нить, уменьшался. В 10%-ном растворе выбрасывание нити наблюдалось только у половины спор, а в 25%-ном растворе споры нить не выбрасывали. Достаточно было разбавить этот раствор, как выбрасывание нити возобновлялось даже после трехчасового пребывания спор в 25%-ном растворе соли. В дальнейшем испытывали другие средства, чтобы принудить споры привести в действие стрекательный аппарат; само явление это приобрело интерес как экспресс-метод для косвенного установления жизнеспособности спор пеприны, в частности, при испытании эффективности дезинфицирующих средств. Ватанабе (1975), например, перечислил четыре метода провокационного воздействия на споры:

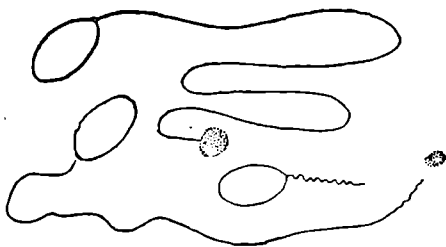
- 1) регидратация (увлажнение) подсушенных на воздухе спор;
- 2) перенос спор в нейтральную среду после их щелочной обработки;
- 3) обработка спор 1,5—3%-ной перекисью водорода;
- 4) суспензирование спор в щелочном буфере (рН 10,1), содержащем ионы калия.

Изучалось также влияние сочетания температуры и химических раздражителей на выбрасывание стрекательной нити (1979).

**Электронномикроскопическая картина выхода спороплазмы.** Первоначальное, во времена световой микроскопии представление о процессе выбрасывания стрекательной нити и выходе спороплазмы складывалось из наблюдений и домыслов. Так, Дисенайк и Кенинг (1957), изучая микроспоридию саранчовых, полагали, что стрекательная нить не имеет канала, что она сплошная и что амебонидный зародыш прикреплен к ее свободному концу; выброшенная нить, как пружина, выталкивает амебонид из споры, который затем отделяется от ее конца. По представлению других авторов, зародыш отделяется от оболочки споры и выползает через отверстие, образованное после отрыва стрекательной нити, становясь подвижной стадией паразита.

Между тем строение стрекательного аппарата, как его изобразил Штемпель, исключает возможность выхода зародыша, так как выход закрыт полярной капсулой. Узкая часть полярной капсулы — ее горлышко — изображено им как внутренняя стенка канала полюсного отверстия споры, а передний конец стрекательной нити помеща-

ется внутри горлышка капсулы и примыкает к внешнему краю выходного отверстия споры. При таком строении стрекательного аппарата выбрасывание нити, начиная с заднего свободного конца спирали, могло произойти только при условии прикрепления ее сбоку выходного отверстия. Кроме того, полярная капсула служила бы препятствием, если амeboид, лежащий, по Штемпелю, кольцом вокруг наружной стороны капсулы, должен был войти в полюсное отверстие споры. Настаивая на наличии полярной капсулы, оставалось только допустить, что перед выходом зародыша она предварительно растворяется.



88. Споры с выброшенными полярными нитями и выход спороплазмы (контурная копия фотографии).

Более верные представления относительно устройства и функционирования стрекательного аппарата у ноземы возникло под влиянием наблюдений за этим процессом в световой микроскоп еще у Моргенталера (1927) на примере пчелиной ноземы и у Осимы (1937) при наблюдении за выбрасыванием нити из споры возбудителя пембины и за выходом из нее амeboида.

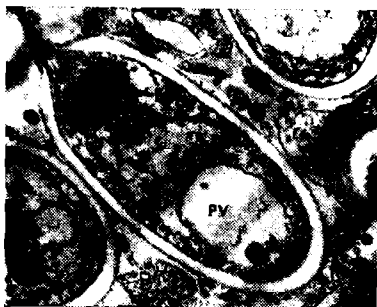
Осима показал в нативных препаратах, в которых было спровоцировано выбрасывание стрекательной нити, и на микрофотографиях, что эта нить может быть только трубкой. По ее каналу проходит зародыш споры и появляется на ее свободном конце в виде сферического тела, 3—6 мкм в диаметре (рис. 88). Незначительная ширина канала стрекательной нити не является препятствием для перемещения по нему зародыша; известно, что лейкоциты выходят в окружающие ткани через межмолекулярные пространства неповрежденной стенки капиллярных сосудов (диапедез). Сферическое тело появляется на конце нити только после ее полного выбрасывания (см. рис. 88). При этом выход его после выбрасывания нити происходит не одновременно и у части спор запаздывает. Блеск споры и самой стрекательной нити после выхода зародыша уменьшается, так как если бы он зависел от ее содержимого, а не от отражающей способности скорлупки споры; если выбрасывание нити замедлено и спора не освобождается от своего содержимого, блеск ее сохраняется. Спустя некоторое время сферическое тело отделяется от конца нити, окруженного оживленно двигающимися зернышками, а сама нить отрывается от опустевшей оболочки споры и переваривается кишечным соком гусеницы.

Много позже Крамер (1963) проследил на окрашенных препаратах отдельные этапы выхода амeboида из спор ноземы, поражающей личинок мучного хрущака, а Лом и Вавра (1961) провели микрокиносъемку этого процесса у микроспоридии, близкой в систематическом отношении к возбудителю пембины. Однако внутреннее строение споры и его участие в выбрасывании стрекательной нити, а также детали прохождения по ней спороплазмы остались недоступными для разрезающей

способности световой оптики. На помощь пришла электронная микроскопия. Наиболее полное использование электронного микроскопа при изучении возбудителя пембины осуществлено Исихарой и Хаяши (1968). Они ознакомились с цитологией спороплазмы до и после выхода из споры, в свободном состоянии во внешней среде и внутри инфицированной клетки. Выбрасывание полярной нити провоцировали щелочью и тут же споры помещали в подогретую гемолимфу гусениц. Чтобы наблюдать спороплазму не только в споре, где цитологические детали плохо различимы, исследовали препараты из ультратонких срезов клеток шелкоотделительной железы, суспензированных в подогретой гемолимфе вместе со спорами. В течение разного промежутка времени с момента заражения клеточной суспензии спорами — от 7 мин, до 1 ч — клетки железы и споры фиксировали, ультрамикротомировали и из сверхтонких срезов изготавливали препараты; на препаратах были видны споры, которые готовились вытолкнуть стрекательную нить и спороплазму, спороплазму, вышедшую в гемолимфу, и спороплазму, инфицировавшую клетки железы.

Под воздействием щелочи (по аналогии с тем, что испытывает спора в пищеварительном соке средней кишки гусеницы) верхушечный участок переднего полюса скорлупки споры становится проницаемым для жидкости, полярный пласт начинает набухать, размеры его увеличиваются; при этом он давит на содержимое споры и гидростатическим усилием смещаются спирали и свободный конец стрекательной нити, она начинает выворачиваться на лицевую сторону. Продолжая раскручиваться, стрекательная нить выталкивается через образовавшееся отверстие на переднем полюсе скорлупки. По мере выбрасывания нити полярный пласт перемещается в заднюю часть споры под спороплазму и вталкивает последнюю в канал нити. С продвижением спороплазмы к дистальному, свободному концу нити с отверстием, эластичная стенка канала растягивается. По этим каплевидным, электронно более плотным расширениям, представляется возможным проследить за процессом выхода спороплазмы из споры.

До конца выбрасывания стрекательной нити полюсный колпачок плотно прилегает к скорлупке споры и удерживается ею. По мере выхода спороплазмы эластичные края полюсного колпачка начинают втягиваться внутрь споры, отделяясь от скорлупки. Когда большая часть спороплазмы оказывается вытолкнутой из споры, становится видимой тонкая мембрана, соединенная с краями полюсного колпачка и образующая вместе с ним мешок. По мере выхода нити и спороплазмы участки с высокой электронной плотностью постепенно смещаются к переднему полюсу споры, а задняя часть споры, вакуоль и середина становятся более прозрач-



89. Завершение выхода спороплазмы из споры, увелич.  $\times 21\ 000$  (Исихара).

ными (рис. 89). С момента внесения спор в суспензию клеток шелкоотделительной железы начало инвазирования их спороплазмой можно было наблюдать примерно по истечении семи минут.

**Биологическая функция стрекательной нити.** В свое время Осима (1937) наблюдал, как вышедшее из споры и появляющееся на конце стрекательной нити сферическое тело приклеивалось к покровному стеклу, вследствие чего конвекционный ток не мог увлечь плавающую спору из поля зрения. Участки нити, содержащие клейкую жидкость, тоже легко прилипали к покровному стеклу, так как эта жидкость была способна, видимо, проходить через мембрану стрекательной нити. Являлась ли жидкость спутником выходящего из споры амeboида или последний сам обнаруживал способность прилипать к покровному стеклу, оставалось не выясненным. Было высказано предположение, что с помощью этих клейких свойств спора прикрепляется к стенкам средней кишки и что главная функция стрекательной нити — фиксация споры в средней кишке с тем, чтобы до выхода подвижной стадии паразита она не была выброшена из кишечника с экскрементами.

В другом варианте высказываний относительно биологической функции стрекательной нити, ее роли в инвазионном процессе приводились соображения о возможности токсического действия вещества, выделяемого нитью, на клетки эпителия кишечника гусеницы, которое облегчает процесс внедрения в них паразита (Осима, 1937; Кудо, 1924). В подтверждение этой версии ссылались на аналогичную роль стрекательной нити некоторых паразитических животных. Наличие токсикоza пытались усмотреть также в том, что скармливание гусеницам большого количества спор возбудителя пeбpины вызывает быстрое возникновение бактериальной септицемии при участии отдельных представителей пассантной бактериальной флоры. Смерть наступает значительно раньше, чем возбудитель пeбpины успеет оккупировать ткани гусеницы. Ей предшествует обильное проникновение бактериальной флоры кишечника в кровь, что, по мнению этих авторов, говорит о нарушении защитной функции эпителия средней кишки. Однако такое явление может быть не только следствием отравления эпителиальных клеток и утратой ими обычной сопротивляемости бактериальной инфекции, но и результатом механического повреждения клеточного барьера множественной инвазией ноземы.

Предполагалось, что стрекательная нить микроспоридий выполняет роль не только фиксатора споры в кишечнике насекомого, но и специализированного органа для введения спороплазмы непосредственно в заражаемую клетку.

Об этом свидетельствуют электронограммы Исихары (1968), снявшего клетки шелкоотделительной железы, суспензированные в гемолимфе и зараженные спорами возбудителя пeбpины. Выброшенная из споры стрекательная нить, преодолевая сопротивление оболочки инвазируемой клетки, концом прокалывает ее и внедряется в периферическую зону цитоплазмы. Эти наблюдения сделаны не на эпителии средней кишки, куда попадают споры ноземы при естественной инфекции, а на клетках органа из целомической полости гусеницы; по-ви-

димому, происхождение поражаемой клетки несущественно для дее-способности стрекательного аппарата.

Еще Осима (1937) показал, что не только стрекательная нить, но и спороплазма, попавшая в кишечник гусеницы, под действием пищеварительного сока через некоторое время разрушается. В кишечнике от губительного действия пищеварительного сока спороплазму надежно защищает скорлупка споры. Кроме того, опасную зону с кишечным соком спороплазме помогает благополучно миновать стрекательный аппарат споры. Эта функция стрекательной нити необходима облигатному паразиту в противовес формированию у насекомых в ходе эволюции противинфекционной защиты со стороны пищеварительного сока средней кишки. Вейзер (1966) полагал, что если спороплазма ноземы не всегда может быть непосредственно введена в клетку, действие инвазии со стороны стрекательной нити выражается «хотя бы в том, что она доставляет спороплазму непосредственно к стенке кишечника». Как при этом преодолевается находящаяся на ее пути перитрофическая мембрана, удалось увидеть много позже (Абе, 1978).

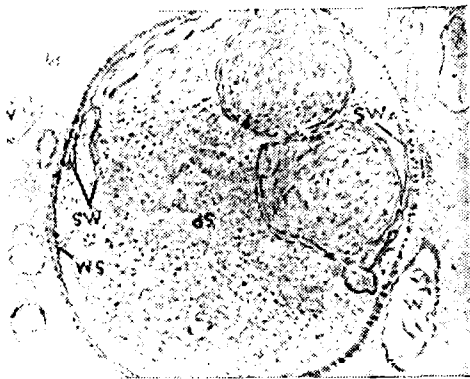
**Почему спороплазма, а не планонт?** Двухядерное тело спороплазмы в старых работах называли зародышем или амёбидом. Штемпель предложил свой термин — *планонт* (греч. — бродяга) для промежуточной стадии между зародышем, вышедшим из споры, и стадией внутриклеточного паразитизма — *меронтом*. По Штемпелю, стадия планонта образуется после слияния двух ядер у вышедшего из споры амёбида. Планонт имеет округлую или слегка эллиптическую форму (диаметр 0,5—1,5 мкм) и напоминает по размерам шаровидную бактерию кокк. В центре расположено ядро, которое в нативном препарате можно различить в виде блестящей точки. Планонт передвигается амёбидными движениями и имеет тонкую протоплазматическую оболочку, позволяющую передвигаться с помощью псевдоподий. Часть планонтов проникает в эпителиальные клетки кишечника, другие проползают по межклеточным пространствам в гемолимфу. Током крови планонты разносятся в общей полости и внедряются в ткани омываемых ею органов. По Штемпелю, планонты размножаются в кишечном канале и в гемоцеле зараженного насекомого до их превращения в стадию внутриклеточного паразита. Однако Омори (1912) и Кудо (1916) не удалось обнаружить «планонта». Исихара (1969), ссылаясь на работы ряда авторов, отмечает, что первым этапом заражения насекомого является непосредственное проникновение спороплазмы из споры в клетку по каналу стрекательной нити, а блуждающая и размножающаяся вне клетки стадия «планонта», по его мнению, является плодом воображения исследователя.

В дальнейшем было показано (см. гл. 5, раздел «Вторично инфицирующая форма ноземы»), что совмещение планонтом способности к размножению, расселению в насекомом и инфицированию клеток без участия стрекательного аппарата присуще также спороплазме но проявляется это раздельно, на разных этапах ее последующего развития в ходе инфекционного процесса.

**Цитологическое описание спороплазмы ноземы тутового шелкопряда.** Исихара (1968) исследовал цикл развития ноземы шелкопряда



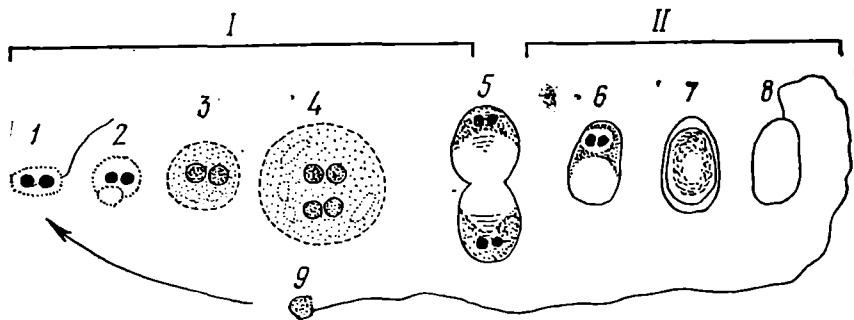
вне организма, заражая клетки переднего отдела шелкоотделительной железы, суспензированные вместе со спорами в подогретой гемолимфе. Чтобы вызвать выбрасывание поллярной нити в этих условиях, он предварительно обрабатывал споры слабым раствором щелочи. Затем под электронным микроскопом и на ультратонких срезах он изучал процесс заражения клетки и детали строения спороплазмы.



90. Спороплазма, вышедшая из споры; контурная копия электронная фотография, увелич.  $\times 43\ 000$  (Исихара, 1968).

Структурные детали спороплазмы (рис. 90), не попавшей в клетку и выброшенной стрекательной нитью в гемолимфу, были более доступны для изучения. Она окружена гладкой одиночной плазменной оболочкой (пелликулой) и содержит два ядра, каждое из которых имеет двойную мембрану; они тесно сближены и разделены очень узким щелевидным пространством. Наружная поверхность спороплазмы покрыта тонким слоем материала, чернеющего от осмиевой кислоты, под которым находится структурный слой, состоящий из плотно уложенных в наклонном положении коротких трубок диаметром в 50 нм, образующих шероховатую поверхность. Цитоплазма содержит многочисленные рибосомоподобные частицы; в ней рассеяны или прикреплены к внутренней поверхности плазменной оболочки многочисленные электронно-плотные сферические зерна, которые, так же как эндоплазматическая сеть, окружающая ядро, содержат РНК и являются центром синтеза белка. Клеточные ядра состоят из однородного гранулярного материала. В ядре есть электронно-плотный участок; возможно, что это нуклеола (ядрышко), представляющая собой сеть анастомозирующих нитей ядерных рибосом с высоким обычно содержанием РНК. Эндоплазматическая сеть встречается редко и имеет незернистую (агранулярную) структуру, типичных митохондрий в спороплазме он не встречал. Размножения спороплазм вне клеток не наблюдалось; выброшенная спорой в подогретую гемолимфу спороплазма вскоре претерпевала деструктивные изменения, сжималась, сохраняя оба ядра с небольшим количеством окружающей их цитоплазмы, или же напротив — набухала, в ядрах появлялось множество нитевидных образований.

В спороплазме, инъецированной стрекательной нитью в клетку шелкоотделительной железы, были обнаружены те же структуры, что и в выброшенной непосредственно в гемолимфу. Спороплазма, оказавшаяся внутри клетки, окружена двойной мембраной; из них внутренняя, сходная с эндоплазматической сетью с гладкой поверхностью, расположена вдоль внутренней поверхности наружной цитоплазматической мембраны; иногда было видно, что подобная мембрана окружает и ядра. Рибосомоподобных частиц в пораженной клетке больше, чем в



91. Основные этапы развития ноземы шелкопряда:

I — этап вегетативного размножения: 1 — спороплазма, выплывшая из споры; 2 — спороплазма во время миграции в общую полость; 3 — вторично инфицирующая форма, покидающая гемоциты; 4 — тетрауклеарный шизонт; II — этап спорогенеза: 5 — делящийся тетрауклеарный споронт; 6 — бинуклеарный споронт; 7 — споробласт; 8 — спора, выбрасывающая стрекательную нить с выходящей из нее спороплазмой (9).

спороплазме, вокруг которой они сосредоточены на наружной поверхности, как бы образуя вокруг нее дополнительный структурный слой. Это ответная реакция клетки в начальный период ее заражения на присутствие ноземы.

**Внутриклеточная стадия паразита.** По Штемпелю, планонт, проникший в клетку, спустя некоторое время превращается в меронта. Он имеет неправильную округлую форму, вытянутую в виде эллипса, более плотную (чем у планонта) пелликулу, четко обрисовавшую его контур и лишающую его возможности передвижения с помощью псевдоподий. Ядро меронта окружено кольцеобразным светлым пространством. Размеры молодых меронтов не превышают 2 мкм, взрослые перед делением вырастают до 5 мкм, у крупных особей эллиптической формы большой диаметр достигает 9 мкм.

Исихара изучал внутриклеточную стадию развития ноземы тутового шелкопряда в культуре клеток яичника, которую он заражал спорами. Наблюдения велись с помощью светового микроскопа ( $\times 1100$ ) в препаратах окрашенных по Гимзе (рис. 91). Спороплазма тотчас же после выхода из споры имела два ядра, они были округлыми, компактными, ярко-красного цвета; окружающая же их цитоплазма столь слабо воспринимала окраску, что обнаружить присутствие спороплазмы в препарате можно было только по интенсивно окрашенным ядрам. Первые часы после заражения нозема, паразитируя внутриклеточно и питаясь, увеличивается в размерах, сохраняя исходную округлую форму. Она развивается в крупный бинуклеарный плазмодий («шизонт»), который в отличие от спороплазмы имеет отчетливо красящуюся по Гимзе цитоплазму в голубой цвет и тесно сближенные красные ядра. По мере роста плазмодия ядра становятся менее компактными, более рыхлыми, светлоокрашенными и менее правильными по очертанию.

**Бесполое размножение ноземы.** После проникновения спороплазмы в клетку, спустя некоторое время она достигает определенных раз-

меров и приступает к серии делений, представляющих собой бесполое, агамное размножение, которое происходит без участия специализированных половых клеток — гамет. У протозоа агамное размножение может происходить путем митотического (кариокинетического) непрямого деления родительской особи с образованием дочерних. Оно может быть монотомическим, с однократным бинарным делением (надвое) или множественным — шизогонией. Шизогония — очень частое явление среди простейших класса споровиков и книдоспориций. Взрослые формы, подвергающиеся шизогонии, принято называть *шизонтами*, а молодые, представляющие продукт шизогонии — *мерозоитами* (*микрозоитами* — у французских авторов). У микроспориций особи бесполого размножения, делящиеся монотомически бинарно (однократное деление на две дочерние клетки) некоторые авторы называют *меронтнами*.

Штемпель различал у стадии внутриклеточного паразитирования несколько способов бесполого размножения: простым делением на две клетки, почкованием и множественным делением. Меронт сначала делится монотомически бинарно, затем дочернее поколение меронтов превращается в шизонтов и делится множественно. При шизогонии процесс деления ядра проходит значительно скорее, чем цитоплазмы: ядро в одноядерном шизонте делится на два, каждый из которых делится снова и образуется четыре одноядерные дочерние клетки. Штемпель описал также деление меронтов со значительной задержкой деления цитоплазмы, в результате чего образуются длинные, похожие на четки, многоядерные клетки.

Ватанабе (1974) изучал цикл развития и биологию ноземы египетской хлопковой карадрины в мазках из средней кишки зараженных им гусениц, окрашенных по Гимзе. Нозема эта оказалась довольно близкой по своему таксономическому положению к возбудителю пембрины тутового шелкопряда и, так же как нозема шелкопряда, заражает гусениц многих видов, за исключением самого тутового шелкопряда. Ватанабе отметил, что спороплазма развивается в клетках средней кишки в большой двуядерный шизонт с умеренно красящейся по Гимзе цитоплазмой в голубой цвет с ярко-красными ядрами. На третий и четвертый день после заражения двуядерные шизонты становятся преобладающей формой паразита с размерами  $3,2 \times 3,4$  мкм. Четырехъядерные (тетрануклеарные) шизонты встречаются реже, они крупнее двуядерных —  $4,6 \times 3,9$  мкм; восьмиядерные встречаются крайне редко. На пятый-шестой день после заражения наблюдаются двуядерные, четырехъядерные, делящиеся четырехъядерные шизонты, а также споробласты, споронты и молодые споры. Деление ноземы в препаратах отмечается нечасто и это, как полагает Ватанабе, указывает на то, что происходит оно очень быстро и потому трудно уловимо.

По мнению Исихары, размножение ноземы тутового шелкопряда в клетках начинается после того, как паразит примет овальновытянутую форму, но не ранее, чем через час после инвазии, и происходит монотомически бинарно. До достижения этой удлиненной формы, которая хорошо различима в световом микроскопе в окрашенных препаратах, плазмодий ноземы в обильно зараженных клетках обнару-

жить очень трудно, даже с помощью фазово-контрастного устройства. Шизогония, по мнению Исихары, представляет собой редкое явление, «если она вообще возможна у ноземы». Возникновение четырехъядерных форм или коротких цепочек из двуядерных форм он рассматривает как результат бинарного деления ядер, опережающее в этом цитоплазму.

**Бинуклеарный тип строения ноземы шелкопряда.** В последние годы становится общепринятым представление о бинуклеарном (диплокариотическом) строении ноземы шелкопряда, которое можно проследить в течение всего периода ее жизни, от выпшедшей из споры спороплазмы до стадии споры. Согласно Исихаре (1968, 1970) и Кали (1970), ядра у нозем всегда имеют парное расположение. Спраге и Верник (1971) считают эту особенность существенным систематическим признаком рода нозем. Иногда ядра двуядерных особей расположены столь тесно, что разграничивающая их тонкая щель невидима и плазмодий ноземы кажется одноядерным.

У стадии внутриклеточного развития бинуклеарная форма наиболее частая, но встречаются и тетрануклеарные (четырёхъядерные шизонты) (рис. 91, 3—4); ядра у них тесно сближены попарно и каждое из них покрыто оболочкой, которая под электронным микроскопом кажется несколько более плотной по линии их соприкосновения. Четырёхъядерные плазмодии делятся не на одноядерные, а на двуядерные; перед делением ядра у тетрануклеарных плазмодии мигрируют парами к полюсам клетки и остаются спаренными на всех этапах их деления. Иначе говоря, они ведут себя как так называемые полиэнергидные (многоядерные) клеточные образования.

Исихара избегает употребления термина *шизонт* применительно к внутриклеточным формам ноземы во время ее агамного размножения, как это все еще встречается у многих его современников (Ватанабе, Вейзер). Такая осторожность с его стороны объясняется, по-видимому, сомнением относительно правомочности считать множественным делением — шизогонией случай, когда четырехъядерная клетка («тетрануклеарный шизонт») делится мономерно на две бинуклеарные дочерние особи. В свете этих сомнений нам представляется более приемлемым назвать стадию внутриклеточного агамного размножения ноземы *плазмодием*, по аналогии с плазмодиями малярии — возбудителями заболеваний крови человека из класса споровиков, поскольку это наименование в данном случае не затрагивает особенностей размножения и не уточняет его положения в жизненном цикле.

**Споронты.** Изучая жизненный цикл ноземы тутового шелкопряда в культуре клеток яичника, Исихара установил, что спорогония (споруляция или спорообразование) обнаруживается со второго по четвертый день после заражения. Заключительный этап стадии агамного размножения перед началом споруляции ознаменовывается появлением двуядерных споронтов (буквально — «превращающихся в спору») в результате деления тетрануклеарных плазмодиев ноземы.

Начало споруляции сопровождается специфическими изменениями в теле плазмодия, который становится более вытянутым (6,2 × 2,7 мкм и менее), равномерно окрашивается по Гимзе. Цитоплазма на полюсах

становится темной, иногда с субполярными поперечными полосами, центральная же зона остается бледной. Под электронным микроскопом споронт отличается от стадии агамного размножения плазмодия ноземы (шизонта) хорошо различимым поверхностным слоем, образованным радиально расположенной трубчатой структурой. Поверхностный слой плазменной мембраны окрашивается осмием; вначале он составлен из отложений глыбок неправильных по форме, прикрывающих детали строения трубчатого слоя; затем этот слой на поверхности мембраны становится толще, цитоплазма и клеточное ядро — более плотными, отчетливо видны ядерная мембрана и эндоплазматическая сеть. Позже по мере формирования наружного слоя оболочки споры трубчатая структура становится неразличимой. На пятый-шестой день после заражения культуры клеток шелкоотделительной железы в них присутствовали делящиеся тетрануклеарные особи, бинуклеарные споронты, споробласты и молодые споры.

**Споробласты.** Митозы у споронта начинаются с образования четырех ядер, которые попарно мигрируют к полюсам, затем все тело споронта делится бинарно, образуя два дочерних бинуклеарных споробласта. Спраге и Верник (1971) характеризовали нозему как образующую споронта, который делится на два споробласта, чем отличается от других близких ноземам микроспоридий, а также тем, что в отличие от этих микроспоридий споробласт ноземы всегда бинуклеарен.

Исследуя цикл жизни возбудителя пембины, Исихара утверждал, что хотя споронт иногда делится на два споробласта, тетрануклеарные споронты, подготовленные к такому делению, встречаются очень редко. Ватанабе, изучая в мазках нозему из египетской хлопковой карадрины, установил наличие тетрануклеарных споронтов и деление их на два бинуклеарных споробласта, хотя такое диспоробластическое развитие ноземы (на два споробласта) обнаруживается, по его мнению, редко. Большинство споронтов бинуклеарны и, как он полагает, развиваются непосредственно в бинуклеарных споробластах. Складывается представление, что нозема не только полиэнергидное простейшее с двуядерным аппаратом, но и моноспорный род, развитие вегетативных особей которого завершается образованием одной двуядерной споры без деления простейшего на стадии, предшествующие споробластному.

Размеры молодых споробластов  $3,9 \times 2,3$  мкм, форма их более или менее четко контурированная яйцевидная, в более узком конне лежат два сравнительно слабо окрашенных и сомкнутых вместе ядра. В цитоплазме видны полярно расположенные гранулы, иногда со слабоокрашенной пряжей нитей, простирающихся от гранул к ядрам. Иногда через цитоплазму проходят окрашенные по Гимзе темно-пурпуровые пересекающиеся линии. Взрослый споробласт становится более компактным с более резко обозначенными линиями, обрисовывающими его строение. Под электронным микроскопом у молодого споробласта поверхностный слой оказывается толще, чем у предшествующей стадии, достигая 50—60 нм. Непосредственно под плотным поверхностным слоем, над поверхностью исходной плазменной мембраны, образуется электронно-прозрачный слой. Толщина всей этой фор-

мирующей оболочке достигает 200 нм, а толщина полностью развитой скорлупки споры около 250 нм, за исключением вершины переднего полюса, где она составляет примерно 80 нм. Вместе с тем трубчатый слой в толще наружной оболочки споронта сохраняется у споробласта, несколько выступая над поверхностью; предполагают, что такая структура оболочки обеспечивает возможность интенсивного поступления питательных веществ, необходимых для формирования внутренней структуры и завершения спорообразовательного процесса.

В ядрах споробласта вначале формируются электронно-плотные глыбки хроматина, но по мере созревания споры содержимое ее ядер становится гомогенным. Цитоплазма споробласта по сравнению с предшествующими стадиями становится значительно более плотной. Просветы в цитоплазме между эндоплазматической сетью обильно заполняются рибосомами. В молодых споробластах различают также кольцевидные мембраны, похожие на аппарат Гольджи.

**Формирование споры.** Первые признаки формирования комплекса поляропласта и стрекательной нити споры видны в электронном микроскопе уже в молодых споробластах. На переднем конце некоторых из них можно различить плотно уложенные в виде полос зачатки трубок и пластинок будущего поляропласта споры. Поляропласт образуется из пакета этих тонких пластин, напоминающих некоторые детали строения аппарата Гольджи. Из этих исходных структур формируется также полярный мешок.

В ультрамикротомированных споробластах более позднего периода можно различить поперечные срезы через формирующуюся стрекательную нить в виде неправильных асимметричных кругов, каждый из которых содержит более плотную центральную сердцевину. Они расположены вдоль обеих сторон по периферии споробласта. Стенка стрекательной нити состоит из относительно плотного, аморфного слоя и, предположительно, образуется при участии плотного, гранулированного материала цитоплазмы споробласта путем его агрегации. По другим предположениям наружный слой стрекательной нити образуется внешней двойной мембраны аппарата Гольджи. Задняя вакуоль у многих споробластов не видна.

Цитоплазма и ядра молодых спор окрашиваются легче, чем устаревших спор, которые обычными методами окраски по Гимзе не окрашиваются без предварительного протравливания, например, по методу Вейзера. Под электронным микроскопом видно, что гомогенное, умеренно плотное клеточное ядро окружено ядерной оболочкой и слоем цитоплазмы, содержащей полисомы (или полирибосомы — рибосомы, объединенные в комплекс с помощью молекулы информационной РНК, образующиеся во время синтеза белковых макромолекул), расположенную зигзагообразно. Вся эта часть споры заключена во вместилище («листерну») из эндоплазматической сети, так что ядра кажутся заключенными в мешок, отделяющий их от остальной цитоплазмы споры и поляропласта. Это расположение ядер в споре непосредственно граничит с поляропластом.

Споры имеют тенденцию образовываться, начиная с периферии пораженной клетки, с ее отдаленной от активного клеточного центра

зоны. Эти наблюдения наводят на мысль, что нозема в оккупируемой ею клетке встречается с условиями, если не отчетливо антагонистическими, то все же, в известной мере, тормозящими спорогонию.

**Гаметогенез и автогамия.** В жизненном цикле простейших чередуются два типа поколений: агамное (бесполое) и половое. Особи бесполого поколения растут и размножаются в условиях, чаще всего, паразитарного образа жизни и дают начало половому поколению в форме специализированных мужских и женских половых клеток — гамет. У многоклеточных организмов образование гамет (гаметогенез) происходит в результате двуступенчатого мейотического «деления созревания», состоящего из редукционного и эквационного делений. Во время редукционного или собственно мейотического деления сначала происходит слияние (конъюгация, синапсис) гомологических хромосом и взаимный обмен генами, затем во время деления в каждую клетку переходят спаренные гомологичные хромосомы, и количество их в двух образовавшихся дочерних клетках окажется сокращенным вдвое — редуцированным, гаплоидным. Эквационное (гомеотичное) деление происходит без уменьшения числа хромосом. Это обычный митоз (кардиокинез) с расщеплением каждой хромосомы на две тождественные половины, отчего количество гаплоидных особей, образовавшееся в итоге мейоза, сохраняется.

У ряда систематических групп протозоа половое поколение образуется мужским и женским началом в виде двух гаплоидных ядер, принадлежащих одной клетке, которая носит название *автогаметоцита*. Слияние этих ядер в одной и той же клетке и образование диплоидного зиготического ядра представляет собой особую форму полового акта, названного *самооплодотворением* или *автогамией*. Приято считать, что случай наиболее бесспорной автогамии в мире простейших описан именно у микроспоридий. Эти представления в значительной мере обязаны своим возникновением классическому описанию Штемпелем цикла развития ноземы шелкопряда. По Штемпелю, этот цикл начинается со смены бесполого агамного размножения спорообразованием, после которого происходит автогамия. У одноядерного споробласта в ходе спорообразования от ядра отделяется одно небольшое дочернее ядрышко, которое делится на два; эти ядрышки участвуют в образовании скорлупки споры. Затем от материнского ядра отделяется еще одно ядро, которое участвует в образовании полюсной капсулы и стрекательной нити. В зрелой споре имеется два ядра, происходящих от одного, которое разделилось после начала развития покоящейся споры в кишечнике гусеницы. Двухядерный зародыш отделяется от оболочки споры и, выйдя из нее, становится подвижной стадией — амебондом, с амебоподобным псевдоподиальным способом передвижения. Спустя некоторое время оба ядра амебоида сливаются, и он становится следующей стадией ноземы — планонтом. Тем самым зародышу по существу происходящего приписывается функция автогаметоцита. Планонт инвазирует клетку и превращается во внутриклеточную стадию паразитизма — новое поколение агамного размножения.

Можно ли в описанном Штемпелем процессе ф р а к ц и о н и р о в а н и я ядерного аппарата споры видеть возникновение гаплоидной ядерной фазы из диплоидной или же это происходит позже, при делении ядра в споре с началом ее развития в кишечнике гусеницы после состояния покоя? К сожалению, достаточных оснований для точного ответа на этот вопрос нет; сведения в монографии Штемпеля позволяют выбрать произвольное суждение.

**Место полового процесса в цикле развития ноземы.** Протистологи нашли, что у части изучаемых ими одноклеточных организмов распространена одноступенчатая смена ядерных фаз в гаметогенезе, который сводится только к одному редукционному делению. Одноступенчатый мейоз достоверно известен у класса споровиков с зиготической редукцией, при которой мейоз происходит при первом делении зиготы. Это единственная диплоидная фаза в их жизненном цикле. Что же касается микроспоридий, то у них прогамный период (предшествующий образованию гамет) также «сильно редуцирован», а типичный половой процесс в их цикле «не обнаружен, если не считать слияния ядер планонта атипичной копуляцией» (Догель и др., 1962). Эти критические сомнения в адрес утверждений Штемпеля могут быть усилены, если вспомнить, что половой акт у простейших обычно рассматривается как предшественник споруляции, способный стимулировать наступление последней (Sprague, Vernick, 1968).

Более приемлемо описание цикла развития микроспоридий, данное Вейзером (1966). На примере микроспоридий из рода *Thelohanapia* он привел следующую схему жизненного цикла. Двухядерный зародыш сразу после выхода из споры делится, и дочернее поколение представляет собой амебондов (планонтов) с одним ядром, которые «проникают в кишечный эпителий и по мере продвижения преобразуются в шизонтов». Многоядерные шизонты, размножаясь, делятся на мерозоитов (они же — меронты); у них пузырьвидное ядро, с кариосомой в центре (хроматиновая масса глыбок, не содержащих РНК) и слабоокрашенная цитоплазма. После «возникновения лентовидной стадии развития» (плазмодия со многими ядрами) она делится и возникает следующая стадия развития с двумя близколежащими ядрами. Эти ядра увеличиваются в несколько раз и становятся похожими «на кофейные зерна, которые тесно сближены своими вогнутыми сторонами». По предположению Вейзера, эта «диплокариотическая», двойная форма, как ее назвал Дебезье (1919), является автогаметоцитом, у которого в одной клетке помещаются мужское и женское ядра. Судя по этому предположению Вейзера, «диплокарионт» — если он автогаметонит, является продуктом мейотического деления. Далее имеет место автогамия, которая совмещается с циклом «бурных митозов». В результате появляются два дочерних ядра, и клетка делится на два споронта.

Схема Вейзера упускает из виду, что у части микроспоридий — как это показано на примере возбудителя пембрины — особи постоянно сохраняют бинуклеарную структуру, начиная с «планонта» (спороплазмы) и кончая спорой. Правда, Вейзер отмечает, что «у некоторых родов микроспоридий (октоспора, баниллидум) оба ядра и после перехода в покоящуюся стадию остаются постоянно друг возле друга



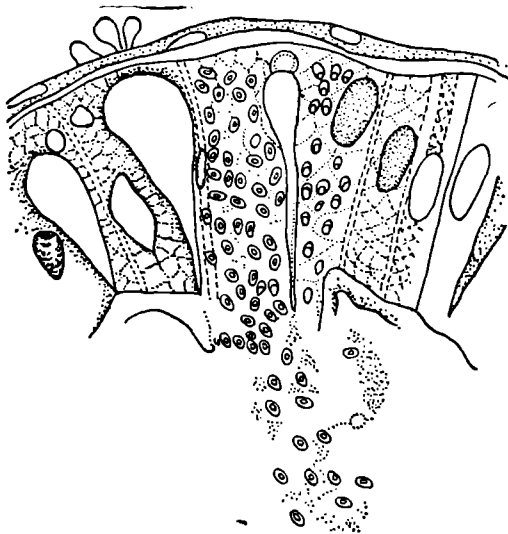
и делятся всегда одновременно; таким образом, в стадии спорогонии микроорганизм всегда двуядерный». Однако в этой ремарке нельзя усмотреть ссылку на существование, по крайней мере, части микроспоридий с дикариотической структурой постоянного, а не этапного характера. Неопределенность и противоречивость представлений, касающихся смены ядерных фаз и особенностей полового процесса у ноземы тутового шелкопряда, в значительной мере вызваны ее малыми размерами. Кроме того, известной помехой для анализа смены ядерных фаз является дикариотическая структура этого простейшего. Нет сомнения, однако, что дальнейшее совершенствование методики и техники электронной микроскопии позволит преодолеть эти затруднения.

### 5.3. Паразитическая деятельность ноземы

Гусеницы тутового шелкопряда заражаются пембриной, заглатывая споры с пищей. Начальная зона поражения — клетки эпителия средней кишки, в которые проникает спороплазма ноземы.

**Патологические изменения в клетках, вызванные инфекцией.** Размножение паразита в клетке сопровождается увеличением ее размеров, нарушаются структурные особенности цитоплазмы, она разжижается, мутнеет, клеточная оболочка становится тонкой и менее прочной; жир и гликоген постепенно исчезают, образуются вакуоли, в которые проникает паразит. По наблюдениям Исихары (1969), ядро клетки изредка также поражается ноземой. Такое высказывание противоречит общепринятому мнению, что паразит никогда не поселяется в ядре. Тем не менее оно уменьшается, приобретает несвойственную ему форму, хроматин собирается в виде различных по размеру и нерегулярных по форме глыбок; в конце концов ядро распадается, а клетка гибнет. С утратой жизнедеятельности клеток пораженные на 2/3 ткани функционально парализуются.

Зараженные, набухшие клетки вытесняются молодыми регенеративными клетками. Содержимое разрушенных клеток (вегетативные стадии ноземы, незрелые и зрелые споры) выпадают в общую полость тела — в гемолимфу или в просвет пищеварительного тракта. Например, клетки трахей вытесняются в гемолимфу, а не в просвет трахей, так как этому мешают тенидии (спиральные утолщения экзокутискулы трахей). Клетки жирового тела, мышц и шелкоотделительной железы, разрушаясь, изливают содержимое в гемолимфу. Базальная перепонка в гиподерме после гибели гиподермальных клеток разрушается, и споры из такого разрушенного очага попадают в гемолимфу. Внутри проколов и резервуара железы споры никогда не наблюдаются, как и в выделенной пембринозной гусеницей шелковине, если только спора не пристала к ее поверхности позже. Клетки мальпигиевых сосудов, разрушаясь, освобождают содержимое в просвет сосудов, и споры возбудителя пембрины выводятся в задний кишечник вместе с экскретом. Иначе ведут себя клетки слюнных желез и эпителия средней кишки. На 12—15-й день после заражения гусеницы клетки тех и других разрушаются и их содержимое выпадает в просвет кишки



92. Разрушение ноземой эпителиальных клеток средней кишки и выход спор в просвет кишечника (в сифонogliф).

чества фокусов поражения. Внутриклеточные стадии паразита, по Штемпелю, не в состоянии переходить из пораженной клетки в соседнюю. Только в клетках жирового тела, в гиподерме, в соединительной ткани, т. е. во всех случаях, когда индивидуальные границы клеток слабо выражены, плазмодии ноземы, как он предполагал, могут перемещаться в соседние участки, в результате ряда последовательных делений.

Контактное заражение спорами ноземы невозможно, если она не попала в кишечник вместе с кормом; после выхода из споры паразит проникает в тело гусеницы, атаковав ее со стороны кишечной полости. Споры, попавшие на раневую поверхность кожных покровов или внесенные в них коготками ложных ножек, не могут вызвать заражения. Полагают, что, попадая в гемолимфу, они не развиваются и из них не может выйти спороплазма. В литературе упоминались случаи заражения насекомых ноземой в результате повреждения хищниками и паразитами кожных покровов; так, перепончатокрылый паразит-наездник заражал ноземой капустную белянку, репную белянку, боярышницу он вводил им под кожу *Nosema mesnili* с помощью яйцеклада, загрязненного перед этим спорами при откладке яиц в тело пембринозной гусеницы. Достоверность подобных сообщений можно было бы объяснить, если предположить что в гемолимфе (участвующей в качестве инокулюма), наряду со спорами, присутствует активная стадия — спороплазма.

Штемпель считал, что в распространении инфекции в организме гусениц участвуют только планонты. У более поздних авторов воз-

(рис. 92). Часть паразитов выводится при этом наружу вместе с экскрементами, а некоторое количество зрелых спор, как предполагают, тут же под действием кишечного сока выбрасывают стрекательную нить и, таким образом, начинается новый цикл развития паразита. Эта вторичная инфекция паразита, размножившегося в теле гусеницы, называется *аутоинфекцией* (самозаражением).

**Способ распространения ноземы в теле шелкопряда.** Источником появления в теле шелкопряда спор нового поколения являются зараженные клетки, которые участвуют в дальнейшем увеличении коли-

возможность самозаражения за счет нового поколения спор также вызвала сомнение, так как в организме гусениц достоверно известной средой, способной активировать покоящуюся спору и вызвать выбрасывание стрекательной нити, являлся кишечный сок. Впрочем, по мнению Вейзера (1966), аутоинфекция спорами новой генерации у микроспоридий возможна в исключительных случаях, так как, по его словам, «пустые оболочки спор (после выхода из них инфекционной стадии паразита) были случайно обнаружены в тканях некоторых насекомых». Факт этот представляется нам сомнительным.

Возможно, что очаги повреждения во время метаморфоза могут перемещаться при участии фагоцитов, а также в результате развития новых органов бабочки из содержащих паразита имагинальных дисков.

**«Вторично инфицирующая форма» ноземы.** Сомневаясь относительно возможности инвазирования клевок спороплазмой, попавшей в гемолимфу без участия стрекательной нити, Исихара (1968, 1969) вместе с тем показал возможность заражения спорами взвеси клеток шелкоотделительной железы, суспензированными в гемолимфе (вне организма гусениц); перед тем как поместить споры в гемолимфу, он обработал их слабым водным раствором калийной щелочи, чтобы вызвать выбрасывание стрекательной нити. В этих опытах он обнаружил, что, помимо молодых спор нового поколения, в клетках и гемолимфе встречаются двудерные формы, похожие на спороплазму. От спороплазмы, которая введена с помощью стрекательной нити в клетку или оказалась выброшенной из споры в гемолимфу, эти формы отличались несколько большими размерами, изменчивыми и менее правильными (амебовидными) очертаниями и значительно более сильной восприимчивостью к красителям. Они возникают из тех спороплазм, которые были введены в клетку с помощью стрекательной нити, но не стали размножаться в ней. В отличие от остальных они способны покинуть зараженную клетку, выйти в гемолимфу, мигрировать к другим клеткам и внедриться в них, продельвая после этого весь нормальный путь развития, вплоть до спорообразования. На основе полученных им электронных микрофотографий Исихара пришел к выводу о существовании у ноземы особой стадии перезаражения тканей в теле насекомого; по его мнению, именно она осуществляет дальнейшее распространение инфекции от клетки к клетке. Он назвал ее «вторично инфицирующей формой».

До начала спорогонии, т. е. не ранее чем через 2—4 дня после заражения клеток шелкоотделительной железы, вторично инфицирующие формы (ВИФ) не появлялись. Как уже отмечалось, Штемпель обнаруживал планонтов в гемоцеле через два дня после заражения. По мнению Исихары, он принимал ВИФ за своих планонтов, точно так же, как Ивабуши (1913), который видел их в клетках эпителия овариол. Треджеру удалось заразить культуру тканей тутового шелкопряда ноземой, используя в качестве инокулюма гемолимфу пембринозных шелковичных червей; он считал при этом, что инвазирующей стадией в его опыте были планонты. По мнению же Исихары, источником инфекции могли стать гемоциты, содержащие, помимо спороплазмы и спор, ВИФ. Действительно, Треджер не смог заразить культуру

клеток, когда гемолимфа была взята в качестве инокулюма у шелкови-  
чных червей через день после их заражения; он сам отметил, что гемо-  
лимфа становится заразной только через два дня после инокуляции  
червей. Сведениями о причинах превращения спороплазмы в ВИФ,  
о способах выхода из зараженной клетки и внедрения в другую Иси-  
хара (1969), по его признанию, не располагал.

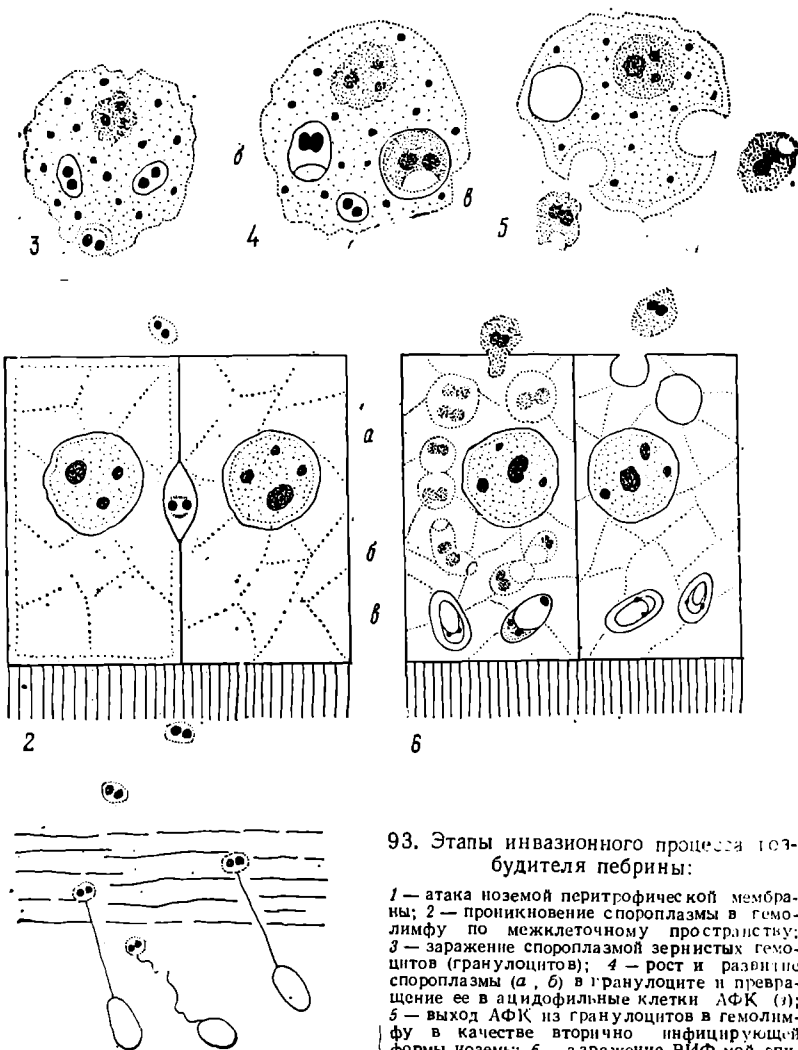
Исихара проводил наблюдения за инвазионным этапом развития  
ноземы вне организма — на суспензии клеток, поэтому Г. Абе решил  
дополнить их результатами заражения самих гусениц. Он скармливал  
во втором возрасте листья шелковицы с высушенной на них суспен-  
зией спор и спустя 30—60 и 120 мин фиксировал гусениц целиком  
в жидкости Карнуа, готовил парафинированные срезы и окрашивал их  
по методу Хамма для исследования под световым микроскопом. Через  
30 мин после поедания листьев в передней и средней кишке были обна-  
ружены покоящиеся и развивающиеся споры, а также вышедшие из  
спор спороплазмы с небольшим количеством цитоплазмы, окружающей  
ядра. Спороплазма, по Абе, растет и развивается в кишечнике, стано-  
вится значительно большей по размеру клеткой, округлой или  
овальной, с двумя ядрами и вакуолью.

Оставалось неясным, как именно удастся споре приблизиться к  
эпителиальной стенке кишечника на дистанцию «выстрела» стрекате-  
льной нити, преодолев заслон из перитрофической мембраны. Абе  
видел в своих препаратах спороплазмы возле и внутри перитрофиче-  
ской мембраны (рис. 93); некоторые из них оказались возле края раб-  
дориума (наружного слоя) цилиндрического эпителия; другие же про-  
никали сквозь рабдориум цилиндрических клеток — зоны всасыва-  
ния продуктов пищеварения.

Вышедшей из споры спороплазме на пути от полости пищевари-  
тельного тракта к гемоцелю предстоит преодолеть трассу с интен-  
сивным двусторонним движением (пищеварительного сока и продуктов  
пищеварения), которая пересекает три зоны: перитрофическую мем-  
брану, сифоноглиф и зону рабдориума. Из осторожности Абе не пы-  
тался опровергать сложившиеся до него мнения о губительности для  
спороплазмы пребывания ее в кишечном соке. Вместе с тем он высказал  
предположение, что перитрофическая мембрана выполняет по отно-  
шению к спороплазме, введенной в нее стрекательной нитью защит-  
ную функцию.

Абе проследил за последующим распространением инфекции  
в общей полости зараженной гусеницы, после того, как гусеницам  
второго возраста были введены с кормом споры возбудителя пеприны.  
Через 24 ч паразит наблюдался в гранулоцитах (зернистых гемоци-  
тах); это были первые клетки, которые поражаются ноземой. Грануло-  
циты причисляются к наиболее активным фагоцитам; создается впечат-  
ление, что для первичной инвазии ноземы в клетки насекомого оказы-  
вается необходимым соучастие самой пораженной клетки в форме  
активного поглощения ею паразита.

Паразит размножается в гранулоцитах и развивается в них в круп-  
ные ацидофильные клетки (АФК). Через 48 ч после заражения боль-  
шинство особей паразита становятся АФК. Затем ноземы начинают



93. Этапы инвазионного процесса возбудителя пеприны:

1 — атака возбудителя перитрофической мембраны; 2 — проникновение спороплазмы в гемолимфу по межклеточному пространству; 3 — заражение спороплазмой зернистых гемоцитов (гранулоцитов); 4 — рост и развитие спороплазмы (а, б) в гранулоците и превращение ее в ацидофильные клетки АФК (1); 5 — выход АФК из гранулоцитов в гемолимфу в качестве вторично инфицирующей формы возбудителя; 6 — заражение ВИФ-мной эпителия главным образом в заднем и среднем участках средней кишки (в отличие от внедрения спороплазмы); завершение цикла развития паразита: а — шизонты; б — споронты; в — споробласт; г — спора.

покидать оккупированные гемоциты, оставляя после себя пустые вакуоли; они превращаются в амебоподобную клетку с псевдоподиями. Эти амейбоды перемещаются вместе с током гемолимфы. Через двое суток в зараженных этим путем клетках мышечного слоя, окружающего среднюю кишку, обнаруживаются пустые, оставленные ими вакуоли, а через 72 ч после его заражения АФК появляются в бокало-

видных клетках кишечного эпителия; возле базовой мембраны эти клетки видны опустевшие вакуоли, а в противоположном конце клеток, обращенном к полости кишечника, появляются споробласты. Та же картина к этому сроку наблюдается и в цилиндрических клетках эпителия, а через четверо суток возле базовой мембраны этих клеток появляется большое количество свободных вакуолей, а на участках клеток, обращенных к просвету кишечника, образуются споры.

Абэ считает АФК ответственными за начало инфекции, а амебондов — за ее распространение. Представление Исихары о превращении спороплазмы в активную ВИФ в работах Абэ получили дальнейшее развитие: АФК и амебонды оказались звеньями процесса возникновения ВИФ. Чтобы обнаружить признаки преобразования первичной инфекционной формы, Абэ поместил споры после водного раствора калийной щелочи в культуральную среду Грейса. Через 30—60 мин. прорывания спор в искусственной среде в капле на предметном стекле появляются спороплазмы, тождественные по своему виду тем, которых он видел на препаратах из кишечника гусениц. Через час они обнаруживают способность к дальнейшему развитию, увеличиваются в размерах, меняют тинкториальные свойства (отношение к красителям): протоплазма утрачивает свою базофилию, свойственную молодым клеточным элементам, и становится ацидофильной.

Продолжая эти исследования, Абэ совместно с Фудзиварой (1979) описал цикл развития простейшего (*Plastophora* sp., отряд *Microsporidia*, семейство *Nosematidae*), споры которого в отличие от ноземы тутового шелкопряда образуются из многоядерных споробластов и оказываются заключенными в цисту. Виды этого простейшего паразитируют на разных насекомых и могут инфицировать гусениц тутового шелкопряда. Проглоченные шелкобичным червем споры выбрасывают в средней кишке стрекательную нить, которая вонзается в многослойную перитрофическую мембрану. Вышедшие из спор спороплазмы проникают сквозь рабдорнум в цилиндрические клетки переднего отдела средней кишки, где развиваются в длинные, батнообразные плазмодии (шизонты), в результате многократного деления бинуклеарного аппарата простейшего. Затем многоядерный шизонт делится на двоядерные округлые клетки, которые являются вторично инфицирующей формой (ВИФ). Они выходят в полость средней кишки (очевидно, между перитрофической мембраной и эпителием) и инвазируют здоровые клетки цилиндрического эпителия среднего и заднего участков средней кишки. Здесь они вновь развиваются в четкообразные многоклеточные шизонты; последние делятся на бинуклеарные округлые формы, которые стягиваются споронтами. Споронты развиваются в крупные и округлые формирования, сопровождающиеся многократным делением ядер, и образуют панспоробласт, который превращается в цисту со спорами.

**Последовательность поражения органов и тканей гусеницы.** Описана избирательная приуроченность ноземы к какому-либо одному органу или ткани: например, пчелиной ноземы — к эпителию кишечника, ноземы саранчи — к жировому телу. Нозема тутового шелко-

пряда относится к тем видам, которые характеризуются способностью вызывать генерализованную инфекцию с поражением всех, без исключения, органов и тканей. В свое время это послужило поводом для Леберта (1958) назвать этот микроорганизм *Panhistophyton ovatum*, что в буквальном переводе означает «яйцевидный, живущий во всех тканях».

Существует известная последовательность в распространении инфекции в организме. Вейзер (1966) приводит об этом следующие сведения. На второй день после скармливания гусеницам спор пембины и заражения клеток эпителия средней кишки паразит проникает в мышечную ткань кишечника, на третий день — в жировое тело, затем в шелкоотделительные железы и мальпигиевы сосуды. Далее заражается трахейный матрикс и подкожная соединительная ткань. В последнюю очередь нозема проникает в соединительную ткань яичников и семенников и далее — внутрь гонад.

Японский ученый К. Миттани считает, что все органы гусеницы по последовательности заражения могут быть разбиты на четыре группы: 1) эпителий средней кишки; 2) кольцевые и продольные мышцы кишечника; 3) мальпигиевы сосуды, трахеи, шелкоотделительные железы, жировое тело, гемоциты; 4) гиподерма, спинной сосуд, нервная система, половые железы.

Разница срока появления ноземы в каждой из этих групп тканей составляет примерно двое суток. Между стадиями агамного размножения, незрелыми спорами и зрелыми спорами проходит в среднем около суток. По данным Миттани, у большинства тканей споры появляются на протяжении восьми дней с момента заражения, за исключением четвертой группы, которая заражается только на десятый день. На 14-й день с момента заражения все ткани гусеницы содержат много спор. В гемолимфе споры новой генерации из разрушенных клеток появляются сравнительно поздно. В передний и задний отделы кишечного тракта (стомодеум и проктодеум) гусениц нозема проникает со стороны общей полости, из гемолимфы, после поражения всех остальных органов. Мальпигиевы сосуды поражаются на всем своем протяжении, как секреторный, более толстый участок, впадающий в кишечник, так и реабсорбционный (всасывающий) тонкий и длинный отдел. Однако более вероятно что нозема проникает в этот орган через гемолимфу, а не со стороны кишечника. Хотя гиподерма и трахеи — одного и того же эктодермального происхождения и стигмы дыхательного аппарата анатомически непосредственно связаны с кожными покровами насекомого, нозема обнаруживается в трахеях даже несколько раньше, чем в гиподерме. После оккупации паразитом концевых трахейных («звездчатых») клеток поступление кислорода в обслуживаемую ими зону уменьшается, возникает явление местного кислородного голодания.

Как уже отмечалось, опыты искусственного заражения шелкоочных червей, проведенные Абэ, показали, что темп развития паразита может быть более быстрым и, что особенно существенно, начало распространения инфекции приурочено к гемоцелю, а не к эпителию кишечника, куда он проникает со стороны общей полости.

При нозематозе насекомых одним из наиболее часто и обильно поражаемых органов является жировое тело. Клетки его богаты резервными веществами, постоянно пополняемыми за период интенсивного роста личинок и увеличения размеров самого органа. Вместе с тем паразитирование в клетках жирового тела представляет значительно меньшую опасность для жизнедеятельности организма, чем нарушение функции каких-либо других органов, а сохранение жизни насекомого отвечает интересам паразита, в особенности облигатного, каким являются микроспоридии. Нанесенный ущерб сказывается на благополучии насекомого, главным образом в период окукливания, когда его потребность в резервном запасе жира и белка резко возрастает. При сильном истощении клеток жирового тела под влиянием инфекции наступление линьки на куколку затягивается или формируется только торакальная часть куколочных покровов. Большинство же куколок погибают, не завершив метаморфоз. Соединительная ткань поражается значительно чаще и во многих случаях оказывается первичным очагом для следующего распространения ноземы в прилежащие ткани; соединительная ткань между пучками мышечных волокон становится исходным участком для перемещения инфекции в мышечные клетки, соединительная ткань оболочки гонад служит промежуточным этапом для заражения самих гонад.

Скорость развития болезни при одной и той же дозе инокулюма на единицу массы насекомого зависит от его возрастных размеров, которые у гусениц тутового шелкопряда изменяются значительно. В младших возрастах оккупация органов и тканей происходит скорее, чем в старших. У гусениц большего размера для выведения органа из строя нужен большой срок, и потому участие генеративных клеток в восстановлении пораженных тканей оказывается более эффективным. Темп развития паразита в теле гусеницы зависит также от количества проглоченных ею спор. По данным А. И. Хаханова (1956), новые споры обнаруживаются в яичнике при дозе заражения в 2 тыс. спор на гусеницу — через 6 дней, при дозе  $5 \cdot 10^4$  тыс. спор — через 48 ч. В связи с зависимостью темпа от размеров тела насекомого пеприна проявляется в младших возрастах чаще всего в острой форме, а в старших она носит характер медленно протекающего, хронического заболевания.

При малых дозах инфекции не все органы гусеницы оказываются поражены возбудителем пеприны к концу личиночного периода. Сказывается последовательность их заражения и меньшая скорость распространения инфекции при низких дозах инокулюма, а не только различная степень выраженности местного тканевого иммунитета, если он, как предполагают, имеется у тутового шелкопряда. Вместе с тем на темпе инфекции сказывается общее состояние сопротивляемости организма по отношению к паразиту, обусловленной индивидуальными и популяционными особенностями шелкопряда и влиянием на сопротивляемость организма внешних условий, в которых протекает выкормка. У ослабленных выкормок убыль гусениц от пеприны более заметна.



**Признаки и течение болезни.** Пибрина поражает все стадии насекомого — от грены до бабочки включительно. Почти все внешние признаки этого заболевания не специфичны. Многие из них могут возникнуть как результат физиологических нарушений неинфекционного происхождения. Только при интенсивном заражении совокупность хорошо выраженных признаков создает более или менее характерную картину.

Пибринозные кладки грены при слабом заражении внешне неотличимы от здоровых. При сильном заражении бабочек не вся гrena откладывается ими, вследствие чего размер кладок оказывается меньше нормального. Порядок откладки грены также нарушается. Если гrena откладывается больными бабочками клеющих пород, то кладка бывает слабо приклеенной, неправильно размещенной или склеенной в комки, вне всякой связи с круговым движением бабочек, характерным для этого процесса. У сильнозараженных кладках содержатся так называемые неоплодотворенные яйца, точнее — погибшие до образования пигмента серозной оболочки. Часть зародышей погибает позднее, в разные периоды жизни, причем это становится особенно заметным во время инкубации. Зараженная гrena развивается неравномерно. Характерное для последнего периода инкубации побеление и потрескивание грены наступает недружно. Оживление затягивается на несколько дней, и часть гусениц гибнет на разных этапах выхода из яйца.

Плохое оживление грены и большая смертность среди вылупившихся гусениц — первые приметы заболевания пибриной, обнаруживаемые перед выкормкой. Гусеницы, вылупившиеся из пибринозной грены, погибают в первом и втором возрастах и лишь редко переживают третью линьку. Для заразившихся при выходе из грены или вскоре после этого характерны те же симптомы заболевания, что и для наследственно зараженных; разница лишь в том, что признаки эти появляются на один-полтора возраста позднее, и гусеницы в значительной своей части гибнут в первой половине личиночного периода. При заражении в четвертом, пятом возрастах заболевание протекает без внешних примет, больные гусеницы завивают нормальные коконы и превращаются в бабочек.

Пибринозные гусеницы в начальный период заболевания теряют аппетит, становятся очень беспокойными. Затем появляются признаки истощения, гусеницы слабеют. Эти особенности послужили поводом для итальянского наименования пибрины — паразитарная атрофия (Sanfuga, 1931). Ослабевшие гусеницы с трудом линяют и часто гибнут, не сбросив шкурку. После каждого сна выкормка редет, вследствие того, что тяжело больные гусеницы не могут обратиться на свежий корм и остаются в подстилке. Особенно характерна для случаев сильного заражения пибриной внезапная изреженность выкормки, обнаруживаемая после смены подстилки.

Истощение и связанное с ним замедление роста гусениц обуславливают неравномерность развития выкормки: время сна и возрастов совмещаются. На такой выкормке бросается в глаза пестрота возрастного состава. Уже в первом возрасте запаздывает посветление

гусениц, которое нормально наступает через два-три дня после вылупливания. В третьем возрасте больные гусеницы дольше обычного сохраняют зеленовато-серую окраску. То же можно сказать о послелиночной бурой окраске и о сморщенном виде гусениц, перелинявших на старшие возрасты. Во второй половине возрастов фаза утолщения тела гусениц запаздывает, и на фоне нормально развивающейся выкормки пембринозные кажутся особенно тонкими. Зрелость у пембринозных гусениц наступает неравномерно и обычно слабо выражена. У здоровых шелковичных червей нижняя сторона первого брюшного сегмента в этот период становится полупрозрачной, у больных же, пошедших на коконники, она остается матовой.

В период массовой завивки гусеницы ползают по подстилке, не едят, долго остаются матовыми, выделяют немного шелка или не выделяют его вовсе и, не созрев, погибают. На коконниках наблюдается гибель на разных стадиях завивки и окукливания. Некоторые гусеницы окукливаются, не завив кокон. Урожай состоит из коконов разных размеров — от нормальных до очень мелких с различной по плотности оболочкой.

Признаки заболевания у куколок внешне мало заметны. При сильном заражении шелкопряд гибнет на стадии куколки, и труп его в коконе постепенно высыхает. Иногда на теле куколок появляются пембринозные черные и свинцовые пятна. Продолжительность жизни у пембринозных бабочек короче, чем у здоровых; сильнозараженные погибают, не отложив грены. Спаривание и откладка грены у пембринозных бабочек протекает вяло. Японские авторы описали много признаков пембрины у бабочек: черные и свинцовые пятна на теле и крыльях разной величины и формы, смятые и редуцированные крылья, разная степень облысения тела и крыльев, вытянутость или вздутость брюшка. Из этих признаков более или менее характерны только свинцовые и, может быть, черные пятна. Отсутствие каких бы то ни было признаков пембрины не может служить указанием на незараженность бабочки, как и появление этих примет не всегда совпадает с наличием пембрины.

#### 5.4. Эпизоотология пембрины

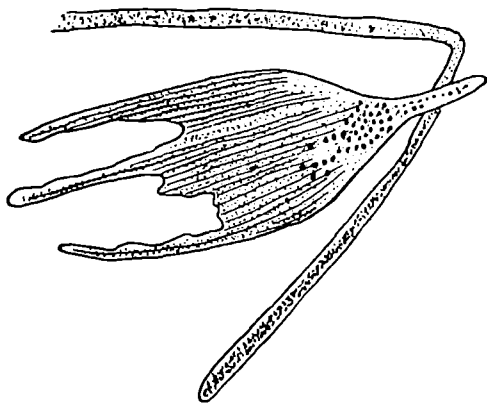
Первоисточник заразного начала пембрины — больной тутовый шелкопряд. Споры возбудителя пембрины попадают во внешнюю среду вместе с трупами пембринозных гусениц, куколок, бабочек, с скорлупками пембринозной грены, а также шкурками, чешуйками бабочек и с экскрементами больного шелкопряда. В зобной жидкости бабочек и на шелковине спор нет, исключая случаи загрязнения этих выделений извне. Наиболее важный источник инфекции — экскременты и, отчасти, шкурки шелкопряда.

**Тутовый шелкопряд как источник инфекции.** Установлено, что через два дня после заражения в экскрементах гусеницы наблюдаются споры, которые не раскрылись в кишечнике и были выделены из него. Споры новой генерации, образовавшиеся в теле зараженного шелкопряда, появляются значительно позже. Поэтому нередко в экскрементах больных гусениц они не обнаруживаются (Ван-дер-Флаас).

По данным Ишиваты, для появления спор новой генерации в экскрементах зараженной гусеницы нужно примерно две недели (11—14 дней). Гусеницы, заразившиеся в начале четвертого возраста, лишь в незначительном проценте случаев выделяют споры в конце пятого возраста. Гусеницы, вылупившиеся из зараженной грены, выделяют экскременты со спорами с первых дней существования и потому в эпизоотологическом отношении наиболее опасны. Особую опасность для заражения червоводен представляют жидкие экскременты перед завивкой, так как к концу выкормки количество гусениц, выделяющих споры, увеличивается. Кроме того, споры после высыхания жидких экскрементов распыляются в помещении значительно легче, чем из плотных, оформленных экскрементов.

Возможность распространения спор через личинные железы оспаривается Ван-дер-Флаасом, так как в пространстве между новой и старой шкурками он нозему не обнаружил. Споры, сосредоточенные на участке гиподермального пятна, при сбрасывании шкурки представляют сравнительно небольшую опасность, так как, дегенерируя, они утрачивают способность заражать. Более опасны молодые пятна, образовавшиеся в старших возрастах незадолго до начала линьки, так как в них содержатся нормальные, не пожелтевшие споры. По данным японских исследователей, споры в шкурках появляются примерно через 15 дней после заражения. Наибольшее количество спор содержится в шкурках, сбрасываемых при линьке на куколку и бабочку. Освобождаются они только после разрушения шкурки. При легком заражении и при недавних сроках инфекции шкурки могут не содержать спор. В тех случаях, когда трихогенные клетки наполнены спорами, они вместе с отростком трихогенной клетки, образующим волосок, попадают в полость нового волоска. По мнению Ван-дер-Флааса, при обламывании таких волосков, споры могут выпасть наружу и заразить гусениц. Споры очень часто содержатся и в чешуйках бабочек (рис. 94). Зараженные клетки гиподермы в процессе формирования наружного покрова имаго вовлекают паразита внутрь чешуек. Особенно часто это наблюдается у волосковидных чешуек. Микроскопирование пылевых частиц в папильонажных амбарах одного из среднеазиатских гренажных заводов показало, что содержание спор в них весьма значительно (Иногамов, 1933). Следует отметить, что заразительность спор пембины из сухих бабочек и из чешуек слабее, чем из тела больных гусениц.

**Внешняя среда как посредник в распространении**



94. Чешуйки бабочки, содержащие споры ноземы (по К. Миттани).

**побринны.** Вне организма шелкопряда паразит не размножается, но споры его во внешней среде стойко сохраняют жизнеспособность. Вследствие этого зараженные предметы внешнего мира могут служить передатчиком возбудителя побринны от больного шелкопряда здоровому. По данным Л. Пастера, длительное пребывание спор вне организма шелкопряда настолько ослабляет их, что на следующий год они почти полностью утрачивают заразительность. Этим утверждением он хотел акцентировать исключительную опасность передачи болезни через зараженную грену. Действительно, если подсушенные споры хранить при комнатной температуре, через три месяца многие из них оказываются мертвыми. При температуре близкой к нулю свежие споры сохраняют жизнеспособность, по меньшей мере, в течение года.

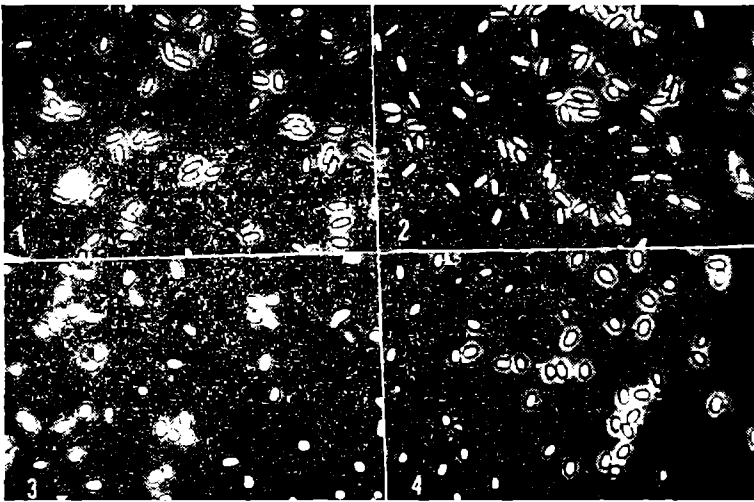
По мнению Контони (1867)<sup>1</sup>, споры из побринозных куколок сохраняют заразительность 4—6 лет. Гайяши (1912) установил, что в год образования споры обладают максимальной заразительностью, которая на следующий год резко падает и затем в течение шести лет остается почти неизменной. На восьмой год заразительность спор снижается еще больше, на девятый утрачивается совсем. Заразительность спор на рассеянном свете сохраняется значительно хуже, чем в темном помещении.

Пребывание спор в воде в течение пяти месяцев не уменьшает их заразительность, в почве же жизнеспособность их значительно ослабляется по истечении этого срока. Процессы, протекающие при разложении навоза, по-видимому также небезразличны для спор побринны. Однако вопрос этот недостаточно изучен. По данным японских специалистов споры в компосте при температуре 70—83°С погибают в течение недели.

Прямые солнечные лучи убивают споры через 6—7 ч. Споры ноземы тугового шелкопряда, подобно спорам других микроспоридий, проявляют значительную устойчивость по отношению к пищеварительным сокам млекопитающих, птиц, хищных насекомых, проникающих на выкормку (осы, шершни, сверчки и др.). Споры проходят через их пищеварительный тракт почти без ослабления вирулентности. Поэтому многочисленные вредители выкормок, расхищающие гусениц и поедающие побринозных червей, могут переносить инфекцию на большое расстояние.

**Другие виды бабочек — источники возбудителя побринны.** Возбудитель побринны — не единственный представитель микроспоридий из рода нозем, способных вызвать заболевание тугового шелкопряда. Т. Фудживара (1980) обнаружил на выкормках гусениц старших возрастов в трех префектурах Японии три новых вида ноземы, которых он условно обозначил как  $M_{11}$ ,  $M_{12}$  и  $M_{14}$  (рис. 95). Он их подробно охарактеризовал инфекционность, болезнетворную деятельность и сравнил по этим признакам с возбудителем побринны тугового шелкопряда. Все три ноземы поражают те же ткани и характеризуются одинаковыми стадиями споруляции. У ноземы  $M_{11}$  спора яйцевидно-цилиндрическая, размер ее  $3,9 \times 1,7$  мкм, длина полярной нити 79—

<sup>1</sup> Цит. по А. Ф о а, 1923.



95. Новые виды ноземы (Г. Фуджинари, 1980):

1 —  $M_{11}$ ; 2 —  $M_{12}$ ; 3 —  $M_{14}$ ; 4 — возбудитель.

90 мкм. Патогенность для шелковичных червей выражена слабее, чем у ноземы тутового шелкопряда. У ноземы  $M_{12}$  спора тоже яйцевидно-цилиндрическая, но крупнее ( $5,1 \times 2,1$  мкм), длина полярной нити 106—133 мкм. Патогенность для шелковичных червей такая же, как у ноземы тутового шелкопряда. У ноземы  $M_{14}$  спора яйцевидная, по очертанию более сходна со спорой возбудителя пембрины, размер ее  $4,2 \times 2,4$  мкм, длина полярной нити 106—115 мкм. Патогенность выражена слабее, чем у ноземы тутового шелкопряда. Размеры спор возбудителя пембрины, полученные тем же микрографическим методом, —  $3,8 \times 2,2$  мкм. Отношение длины к ширине споры у этих нозем:  $M_{11}$  — 2,3;  $M_{12}$  — 2,5;  $M_{14}$  — 1,8 и у возбудителя пембрины — 1,7. Для сопоставления инфекционной способности только что снявших на второй возраст гусениц заражали взвесью спор в дозировке 4000, 600, 160 с последующим микроскопированием через 15 дней. Процент заразившихся соответственно дозировке оказался следующим:  $M_{11}$  — 60, 27, 33;  $M_{12}$  — 100, 97, 100;  $M_{14}$  — 47, 37, 20; возбудитель пембрины — 100, 100, 97.

Для выяснения их систематической самостоятельности нужна была серологическая идентификация. Сато и Ватанабе (1980) очистили споры нозем от сопутствующих примесей с помощью изопикнического равновесного центрифугирования в градиенте коллоидного селюката Перколла. К очищенным спорам приготовили антисыворотку для идентификации нозем с помощью непрямого метода применения флуоресцирующих антител. Из семи исследованных нозем четыре дали положительную реакцию (1981),  $M-11$  и  $M-12$  отрицательную.

Хотя нозема тутового шелкопряда является высокоспециализированным облигатным паразитом, возможность заражения им других

видов гусениц, как показали многочисленные опыты, не исключена Представители семейства нозем поражают не только тутового шелкопряда, но и других членистоногих. Чаще всего это ноземы, различные по своей систематической принадлежности, хотя есть указание, что нозематоз различных видов бабочек может вызываться одними и теми же видами нозем или же более или менее близкими формами. Известно, например, что гусеницы кольчатого коконопряда (*Malacosoma neustria*) заражаются возбудителем пембрины гораздо легче, чем сам тутовый шелкопряд (Бальбиани, 1884). Довольно легко заражаются пембриной шелкопряда бабочки медведицы *Arctia carya* L. (Штемпель, 1909).

По мнению японских авторов, носителями возбудителя пембрины являются многие виды бабочек. Так, по сообщению К. Миттани (1930), *N. bombycis* обнаружена у представителей следующих семейств бабочек: мешочниц, пядениц, волнянок, ночниц (совок) и глазчаток. Он отмечает, что в результате пассажа ноземы тутового шелкопряда через организм диких шелкопрядов споры ноземы становятся крупнее; это же наблюдала Филатова по результатам заражения дубового шелкопряда ноземой тутового (1947).

Миттани, совместно с Ц. Хаиши (1927), доказал возможность заражения пембриной тутового шелкопряда различных видов вредителей шелковицы. Установлено, что в префектуре Аити (на юго-западе о. Хонсю) среди насекомых, собранных на тутовых плантациях, количество особей, зараженных ноземой, колебалось (по отдельным видам насекомых) от 0,09 до 3,05%; сильнее всего оказались заражены психиды (мешочницы) и медведицы.

Ватанабе (1976), сравнивая инфекционность трех видов нозем для десяти видов бабочек при заражении гусениц спорами через рот, получил следующие результаты (табл. 5).

Таблица 5

Восприимчивость гусениц разных видов к перекрестному заражению тремя видами нозем

Вид ноземы	Источник спор	Восприимчивые (+) и невосприимчивые (-) виды									
		AO	AI	HC	BM	PM	LS	MB	CS	PR	SL
N.S.I.	<i>Spod. litura</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>N. mesnili</i>	<i>B. mori</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>N. bombycis</i>	<i>B. mori</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

АО — чайная листовертка (*Adoxophyes orana*); AI — совка-ипсилон (*Agrotis ipsilon*); HC — американская белая бабочка (*Huphantria cunea*); BM — тутовый шелкопряд (*Bombyx mori*); PM — капустная моль (*Plutella maculipennis*); LS — многоядная наземная совка (*Leucania separata*); MB — капустная совка (*Mamestra brassicae*); CS — рисовая огневка (*Chilo suppressalis*); PR — белянка-репница (*Pieris rapae crucivora*); SL — египетский хлопковый листовой червь (*Spodoptera litura*).

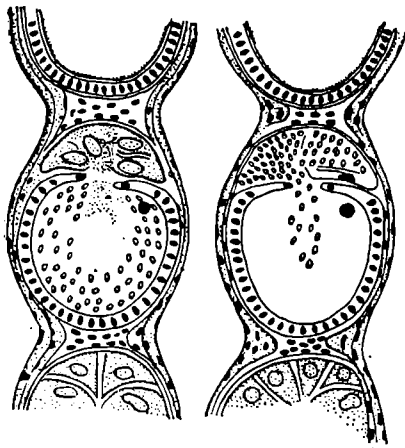
Сравнивались нозема египетской хлопковой карадрины (*Spodoptera litura*), *N. mesnili*, открытая А. Пайо в 20-х годах у бабочек белянок (капустной и репницы), и нозема тутового шелкопряда

(*N. bombycis*). Ватанабе тщательно исследовал степень их систематической близости, в частности, сопоставлял величину спор; разница в ней была столь мала, что при визуальном сравнении в смежных полях зрения микроскопа она была практически неразличима. Остальные стадии цикла развития этих нозем морфологически также тождественны, даже при электронной микроскопии. Однако результаты перекрестного заражения показали существенные различия между этими тремя видами нозем по признаку их инфекционности для разных видов бабочек. Нозема тутового шелкопряда оказалась патогенной для всех видов, участвовавших в опыте.

Следовательно, размножение в природе возбудителя пембрины по крайней мере у 10 видов свободноживущих чешуекрылых вполне возможно. Два разных вида нозем (*N. mesnili* и *N. bombycis*), пассированных через тутового шелкопряда, оказались неравнозначными по своей инфекционности: *N. mesnili* смогла заразить только половину видов бабочек. *N. S. l.* для тутового шелкопряда была непатогенна. Подобные исследования биоценозов необходимы для выяснения состава их обитателей, которые могут стать резервацией (местом сохранения) для возбудителя пембрины на плантациях шелковицы или по соседству с ними.

Агроном Кокандского гренажного завода С. Халматов при микроскопировании с фазовым контрастом 168 личинок восточного листопада, собранного им на иве, обнаружил у 27% особей споры микроспоридия, неотличимые по внешнему виду от спор ноземы тутового шелкопряда. Промытые и отцентрифугированные споры скармливались гусеницам тутового шелкопряда третьего возраста в суспензии, нанесенной на листья шелковицы, с концентрацией две-три споры в поле зрения микроскопа. Контрольные гусеницы получали неинфицированный лист. Под влиянием заражения гусеницы становились менее активными и со второго-третьего дня пятого возраста появились отстающие, отдельные гусеницы погибли, большинство дошло до завивки. Погибших гусениц, куколок и вышедших из коконов бабочек микроскопировали: в первом опыте оказалось 12,5% зараженных особей, во втором — несколько меньше. В результате пассажа через тутового шелкопряда у этого микроспоридия отмечалось появление небольшого количества более крупных и удлинённых спор.

**Трансовариальная и герминативная инфекция ноземы.** Жидкие извержения бурого цвета (мекония) из кишечника пембринозной бабочки содержат густую взвесь кристаллов мочевой кислоты, с нею могут быть выделены споры возбудителя пембрины. Прилипнув к поверхности скорлупки грены, отложенной бабочкой, на том же участке, который прогрызает гусеница при вылупливании, споры будут поглощены. Кладка грены, кроме того, может быть поверхностно загрязнена спорами, находящимися в чешуйках пембринозных бабочек: присутствие спор возбудителя пембрины неоднократно обнаруживалось при микроскопировании пыли в папильонажных амбарах гренажных заводов и в самой пыльце бабочек, состоящей из волосков и чешуек. На заводах грену провеняют, моют, но обеззаразить ее этими операциями в полной мере не удается. Такой путь инфекции называется



96. Ооциты в овариолах куколки: *слева* — непосредственно зараженные ноземой, *справа* — заражающиеся через посредство питательных клеток их яйцевых камер (по Ивабуци).

при сильном заражении нозема размещается по всему яйцу и в самом зародыше. При слабом заражении паразиты содержатся главным образом в желтке, в центральной части яйца. По Ивабуци и Миттани (1912), слабо зараженные оогонии в итоге трехкратного деления способны дифференцироваться на один ооцит и семь питательных клеток. Ооцит непосредственно заражается паразитом реже, чем более многочисленные питательные клетки (рис. 96). В период роста ооцита в него вместе с веществом питательных клеток переходят также плазмодии ноземы и даже споры. В зависимости от заражения тех или других категорий клеток нозема распределяется или на периферии яйца (место образования зародыша), если она унаследована от оогоний, или в центре, если яйцо заражено питательными клетками. Когда заражение идет двумя путями, нозема оказывается рассеянной по всей массе яйца.

Зародыш значительно чаще образуется в яйцах, в которых заражены питательные клетки. Грена оживает нормально, если зародыш был заражен в последний период его развития, в результате заглатывания желточных клеток, содержащих зрелые споры ноземы. В этом случае споры раскрываются в средней кишке формирующейся гусеницы перед вылупливанием и заражают ее. При заражении blastodermy пестрикозная грена чаще всего гибнет после откладки и до образования серозной оболочки. Непосредственное заражение зародышевого диска — еще более редкое явление, и зародыш в этом случае гибнет до завершения эмбриогенеза. Если же эмбриогенез удавалось завершить, то у сформировавшихся гусениц оказывались поражены главным образом производные наружного зародышевого листка — эктодермы, в частности кожный покров. Объясняется это тем, что при

трансовариальным (через яйцо). Трансовариальной можно назвать инфекцию также, если она передается следующему поколению в результате проникновения инфекции внутрь яйца. Однако это может быть сопряжено с заражением самого зародыша и тогда такую инфекцию точнее было бы называть герминативной (через зародыш). Переносчиком инфекции от родительской к дочерней генерации в этом случае становится развивающийся зародыш в оплодотворенном яйце.

Гистологические исследования показали, что нозема поражает все без исключения стадии развития половой клетки, вплоть до момента образования скорлупки яйца, защищающего его от дальнейшего проникновения паразита. Анна Фoa (Италия) установила, что при



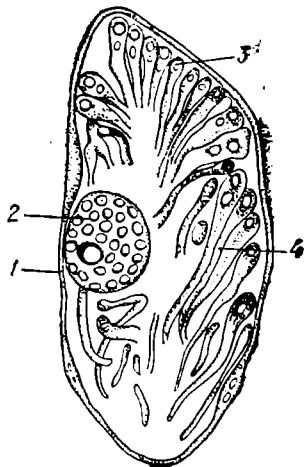
дифференциации зародышевых листков наиболее обширная зона зародышевого диска становится эктодермой. При заражении же желточных клеток паразит в теле эмбриона оказывается более или менее рассеян.

**Роль самцов в передаче ноземы следующему поколению.** Вопрос этот изучали многие исследователи (Пастер, Иванов и др.). Спаривание здоровой самки с пепринозным самцом исключительно редко становится причиной заражения шелкопряда, который в момент вылупливания может проглотить споры, приклеившиеся к поверхности скорлупки.

Гистологические исследования показали, что при заражении семенников нозема проникает не только в соединительнотканную оболочку половой железы, но и в оболочку семенных шаров, а также в спермиогонии и спермиоциты (рис. 97). В сформированном нитевидном сперматозоиде паразит не может уместиться. В пределах одного и того же семенного шара здоровые спермидии начинают вытягиваться в нитевидные сперматозоиды, находящиеся среди них зараженные зародышевые половые клетки погибают, сохраняя вид неправильных, округлых образований. Разрушающиеся спермидии по мере формирования сперматозоидов и самого семенного пучка образуют под его оболочкой скопления в виде припухлостей. В процессе осеменения копулятивной сумки в нее попадают зараженные семенные пучки. По некоторым данным, переход ноземы от зараженных самцов в копулятивную сумку совершался примерно в 25% наблюдавшихся случаев. Плазмодии ноземы при этом погибают, не достигая семяприемника, а споры не раскрываются. Величина просвета микропиларных трубок исключает вероятность попадания спор этим путем внутрь яйца. Опасен перенос спор, увлекаемых сперматозоидами в яйцевод, где они прилипают к внутренней поверхности его дистального участка и могут попасть на скорлупку откладываемой грены.

**Зависимость зараженности яиц в кладке от зараженности бабочки.** В пределах каждой пепринозной кладки наиболее сильно заражены последние порции отложенных яиц (табл. 6).

Больше всего колеблется процент пепринозных яиц у слабозараженных бабочек — от 0 до 36. У сильнозараженных эти колебания меньше, а кладка оказывается зараженной больше, чем наполовину. Стопроцентное заражение яиц в кладке встречается довольно редко. Чаще количество пепринозных яиц в кладке колеблется очень широко, в отдельных случаях пепринозные бабочки могут отложить совершенно здоровую грену (табл. 7). Нередко первые порции отложенных яиц



97. Развитие спермиоцитов, пораженных ноземой:

1 — оболочка семенного шара; 2 — спермиоцит, заложный ноземой и прекративший свое развитие; 3 — споры ноземы; 4 — сперматозоиды, завершающие свое формирование (по К. Миттману).

Зараженность пеприной отдельных порций откладываемой грены, %

Порции откладки (по 100 яиц)	1-я бабочка	2-я бабочка	3-я бабочка
1	26	14	31
2	31	27	22
3	28	32	26
4	43	21	37
5	64	72	59

Таблица 7

Количество спор в поле зрения препарата из растертых бабочек и процент пепринозных яиц в кладках (порода багдадская)

До 5 спор	До 50 спор	До 100 спор	До 5 спор	До 50 спор	До 100 спор
36	67	85	27	38	69
0	12	100	2	40	82
14	41	71			

свободны от пеприны, в последующих порциях это явление никем еще не зарегистрировано. Существует указание, что между интенсивностью заражения бабочек и процентом зараженных яиц в кладке имеется прямая зависимость (Михайлов, 1931).

Большое значение для интенсивности заражения кладки имеют, по-видимому, сроки инфицирования гусениц; чем позже срок, тем меньше возможностей для заражения яиц, даже если в кишечник гусеницы попало много спор.

Э. Ф. Поярков (1940), ссылаясь на случаи слабого заражения бабочек (Латипов, 1933; Богаутдинов, 1934), которые могут быть не замечены при микроскопировании на гренажных заводах, писал: «Несмотря на целлюлярный гренаж заражение пеприной в ничтожной мере, но все же постоянно передается от одного поколения к другому». И. А. Щербаков (1952) отметил, что представления эти возникли в результате экспериментальных работ САНИИШ (1934—1935) с искусственно дозированным заражением гусениц, которое в методическом отношении было не безупречным. Кроме того, трудно представить себе ситуацию, при которой паразит смог проникнуть в яичники раньше, чем успел размножиться в теле самой бабочки в количестве, доступном для его обнаружения с помощью микроскопа.

**Проявление противозематозного иммунитета.** Организм тутового шелкопряда активно противодействует паразитической деятельности простейших. Ё. Абэ (1979) наблюдал, как гусеницы тутового шелкопряда избавляются от инфицирующих их жгутиковых простейших — лептомад (представителей семейства трипаносом) с помощью фагоцитоза; об этом свидетельствовали дегенерированные тельца лептомад и их фрагменты, поглощенные гемоцитами. Известны клеточ-

ные защитные реакции, сводящиеся к инкапсуляции ноземы в хитиновом слое гиподермы (Ван-дер-Флаас, 1932) и в жировом теле (Михайлов, 1945). При этом наблюдается дегенерация спор, они желтеют, теряют обычный блеск. Неясен вопрос о взаимоотношении паразита с отдельными типами гемоцитов. Кровяные клетки шелкопряда могут быть в этом случае не только объектом паразитизма, но и средством защиты организма. Некоторые категории гемоцитов способны образовывать вокруг вегетативных стадий ноземы и спор изолирующие капсулы, внутри которых они гибнут и разрушаются. У пебринозных гусениц отмечено изменение химического состава крови (Габерландт) и состава форменных элементов гемолимфы, т. е. изменение ее формулы крови (Коц); возрастает численность недифференцированных молодых клеток — прогемоцитов и количество образованных из них гранулоцитов и эритроцитов, способных участвовать в противонозематозных реакциях насекомого. Гематологическую реакцию на присутствие ноземы в организме тутового шелкопряда наблюдал также А. И. Ханов (1956).

Вероятнее всего, что клеточная реакция в обычной ситуации не приводит к выздоровлению гусениц, хотя и свидетельствует об активном сопротивлении организма тутового шелкопряда оккупационной деятельности ноземы. Эта борьба требует немалых усилий, о чем свидетельствует снижение сопротивляемости бактериальным и вирусным инфекциям, которое наблюдается уже в самом начале заражения гусениц пебриной. Нозема провоцирует пробуждение латентной инфекции вируса ядерного полиэдроза. О других средствах защиты против возбудителя пебрины, в частности, гуморальных, сведений еще меньше. По данным японских исследователей, чем выше щелочность кишечного сока гусеницы, тем больше процент заражения. Поэтому в середине возраста гусеницы заражаются легче, чем в конце. Известно также, что при заражении на 4—5-й день последнего возраста гусеницы проявляют повышенную устойчивость к этой инфекции и что восприимчивость к пебрине у старших возрастов несколько меньше, чем у младших.

По поводу проявления врожденного относительного иммунитета имеются многочисленные указания (нуждающиеся, впрочем, в проверке); в частности, что гусеницы из незараженной грены, отложенной пебринозной бабочкой, обнаруживают несколько большую устойчивость к этому заболеванию. Еще Л. Пастер отмечал повышенную устойчивость к трансовариальной инфекции у китайских и в несколько меньшей степени — у японских пород. Эти сведения подтверждаются позднейшими данными японских авторов, сообщающих, что в кладках китайских пород, отложенных бабочками с одинаковой интенсивностью заражения, процент пебринозных яиц в 20 раз, а у японских — в 10 раз меньше, чем в кладках европейских пород; у моновольтинных зараженность больше, чем у бивольтинных и поливольтинных.

Пебрина через зараженную грену передается следующему поколению. Следует сказать, что подобный способ сохранения в составе популяции насекомого нозематозной инфекции обнаружен у сравнительно небольшого числа видов членистоногих. У подавляющего боль-

лишества видов нозем зона поражаемых ими органов ограничена кишечником и жировым телом. Генерализованная инфекция (заражение всех органов и тканей) отмечена у 25—30 видов нозем. Обусловлено ли это какими-то иммунологическими особенностями поражаемого организма, обеспечивающими более эффективную сопротивляемость (резистентность) тканей и органов в отношении инвазии или же нозема в этих случаях, попросту, не находит необходимых условий для своего существования — ответить пока не представляется возможным. Не исключено, что в большей или меньшей интенсивности поражения кладок грены тутового шелкопряда представляет себя тот же самый защитный механизм, который стоит на пути оккупационной деятельности ноземы у менее доступных для этого патогена видов членистоногих, не подвергающихся генерализованной инфекции.

Индийские исследователи (Davaiah, Krishnaswami, 1975) отмечают, что хотя случаи заболевания пембриной наблюдаются у всех пород, максимальный процент поражения обнаруживается у породы С122, минимальный — у породы Нистари. В обычных, не лабораторных условиях выкормки порода Нистари тоже проявляет некоторую степень резистентности к пембрине. Опыты других авторов с пассированием ноземы тутового шелкопряда через трудно заражаемые виды бабочек позволили получить более вирулентные к этим насекомым линии паразита. Экологические факторы, такие, как температура, сезонные и сортовые различия в качестве корма, влияют на восприимчивость шелкоочных червей к пембрине. Известно, что в наиболее жаркой зоне шелководства в Советском Союзе — в Туркмении при одинаковых технологических правилах гренопроизводства на протяжении многих лет пембрина обнаруживалась значительно реже, чем в более северных районах Средней Азии. Вместе с тем серьезные вспышки этого заболевания временами отмечаются и в этой климатической зоне.

Упомянутые выше индийские исследователи (Davaiah и др., 1975) в 1969 г. изучали сезонную частоту заболеваемости пембриной в штате Майсур, на юге Индостанского полуострова. По количеству заболевших пембриной гусениц получены следующие показатели: январь — февраль 10,4, февраль — март 32,6, апрель — май 4,7, июнь — июль 6, июль — август 14,6, сентябрь — октябрь 9, ноябрь — декабрь 14,9%. Самая высокая температура и влажность воздуха в этом штате приходились на апрель-июль, самая низкая температура на август-октябрь. Следовательно, заболеваемость пембриной значительно снижается в сезон с более высокой температурой и влажностью. В других публикациях (Napiati и др., 1971) такой зависимости не отмечают.

Высокая степень адаптации ноземы как облигатного паразита тутового шелкопряда, для которой это насекомое является необходимой средой обитания, предполагает также широкий диапазон приспособленности и к генетической вариабельности самого насекомого, и к колебаниям экологических условий, пригодных для его существования. Поэтому паразитарная специализация возбудителя пембрины оставляет организму тутового шелкопряда очень мало возможностей для оказания сопротивления инвазионной деятельности ноземы.

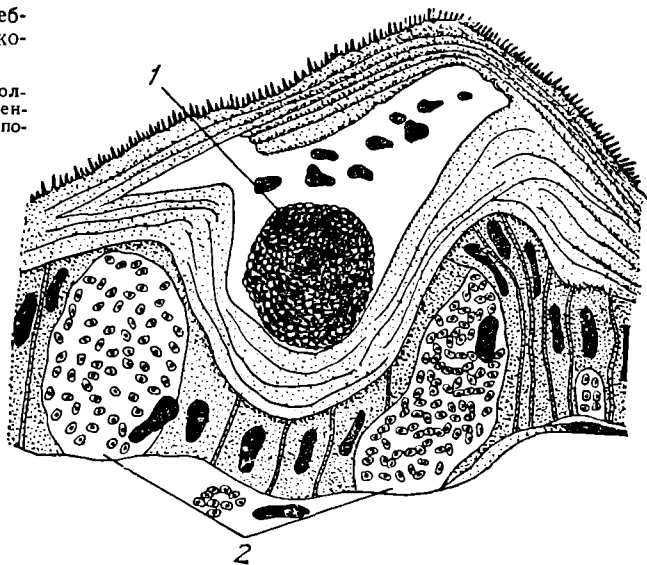
## 5.5. Диагностика пемрины

Предварительное суждение о зараженности шелкопряда пемриной может быть составлено по совокупности внешних признаков болезни. К ним относится, прежде всего, описанная выше общая картина проявления и развития болезни. Однако окончательный диагноз можно поставить только на основе микроскопического исследования. На выкормках такие исследования не всегда могут быть произведены и потому диагностика по внешним признакам представляет известный практический интерес.

**Пемриновые пятна на кожных покровах шелкопряда.** На теле больных гусениц в промежутках между линьками появляются пемриновые пятна в виде черных точек. Это результат гистологических изменений на пораженных ноземой участках эпителиальных клеток кожных покровов (гиподермы). Точно такие же пятна обнаружены и у других видов гусениц, у которых нозема поражает клетки кожи (рис. 98). Так, А. Паё (1918) описал их у гусениц капустной белянки (*Pieris brassicae* L.) при сильном заражении ее *N. mespili*. Через сутки после линьки некоторые зараженные клетки гиподермы отделяют по направлению к кутикуле часть протоплазмы со спорами. На следующие сутки эпителиальные клетки, лежащие под этим скоплением спор, выделяют хитин, так что споры оказываются заключены между двумя хитинизированными слоями, в том числе — эндокутикулой. По-видимому, в этом случае секретируют здоровые клетки; через некоторое время они оказываются изолированными между кутикулой и гиподермой. По данным Ван-дер-Флааса (1932), кожный покров может восстанавливаться этим путем и на участках гиподермы, сплошь состоящих из клеток, переполненных спорами.

98. Образование пемринового пятна на коже гусеницы:

1 — скопление спор в толще хитина; 2 — пораженные клетки гиподермы (по Ван-дер-Флаасу).



На первой стадии формирования пятна сквозь бесцветные слои кутикулы просвечивает скопление пожелтевших спор, в массе кажущихся темно-коричневыми. Молодые пятна не имеют резких границ, кажутся туманными и появляются через двое суток после линьки. На третий день после линьки пятно становится отчетливо видимым. Чем старше возраст гусениц, тем чаще встречаются пятна на зараженной выкормке; вместе с тем в старших возрастах пятна появляются позже, чем в младших. Если пятна образуются вскоре после линьки, то они довольно долго сохраняют характер молодых туманных пятен; если они обнаруживаются в конце возраста — перед линькой, то очертания их почти сразу становятся резкими. По мере старения пятен слой лежащей под ним кутикулы становится темно-желтым, причина же дегенерации самих спор не совсем ясна.

Пятна на теле шелкопряда могут быть вызваны, помимо пембрины, укулами коготков ложных ножек гусениц. Они наблюдаются также при нежелательных патологических процессах в хитине при заболевании желтухой (Ван-дер-Флаас), при септицемиях, вызванных некоторыми бактериями (Михайлов, 1940). В руководстве по шелководству, составленном специалистами Министерства сельского хозяйства и лесоводства Японии (1972), отмечается, что пятна могут быть образованы при мускардине или вследствие укусов насекомых. Поэтому умение отличать по внешнему виду пембринозные пятна от пятен другого происхождения очень важно. По данным японских исследователей для пембрины типичны крупные (слитые из нескольких) или мелкие (одиночные) черновато-бурые пятна, более темные в центре и светлые по периферии.

А. А. Тихомиров (1914) тоже отмечал, что светлый ободок не наблюдается у пятен другого происхождения. Ван-дер-Флаас объясняет такой вид пятен тем, что лежащие рядом с ними клетки набиты светлыми, не пожелтевшими спорами; вследствие контраста с темным участком пятна эти клетки выделяются в виде светлого ободка. Так как скопления светлых спор в клетках по соседству с пятном может не быть, то (по его мнению) пятна пембрины могут не иметь этого признака. У старых пятен окраска по краям более светлая, чем в центре потому, что в центре цвет пятна определяется потемнением спор и хитина, тогда как цвет краев зависит только от желтизны хитина. Наиболее характерны не резкие, туманные пятна; такой вид они приобретают (по мнению Ван-дер-Флааса) на ранней стадии своего образования, когда хитин над пожелтевшим скоплением спор еще не изменил своего вида. Оттенок пятен виден только под лупой с увеличением не менее, чем в 50 раз, и простым глазом они неразличимы.

Некоторое значение имеет и расположение пятен. Пембринозные пятна появляются прежде всего на участке вокруг дыхалец, у основания ложных ножек и в области шипа. Наконец, известную ориентировку при диагностике по данному признаку дают также сроки появления пятен. Во втором возрасте пятна, хотя и встречаются, но редко и только в последние дни. В более ранние сроки пятен на коже больных червей не бывает. Чем старше возраст червей, тем раньше появляются пятна. В старших возрастах пятна возникают вскоре

после линьки. Однако выкормка педринозных гусениц развивается неравномерно, некоторые из них отстают в развитии и возраст их визуально не всегда может быть установлен.

**Патологоанатомические признаки педрины.** Для практической диагностики известный интерес представляет внешний вид патологических изменений внутренних органов, которые можно различить без оптических средств или через лупу.

Пораженные педриной участки ткани утолщаются в виде неправильных по очертанию молочно-белых припухлостей. Эти припухлости хорошо заметны не только на прозрачных и слабоокрашенных тканях слюнной и шелкоотделительной желез, но и на буро-фиолетовом фоне нервных узлов и на темноокрашенных трахеях. На мышцах видны продольные молочно-белые утолщения, расположенные между мышечными волокнами в виде лодочек, так как нозема размножается вдоль миофибрилл и разжижает эти участки. Кроме этих признаков, диагностическое значение имеет внешний вид шелкоотделительной железы. Если гусеница сильно заражена педриной, пораженные места шелкоотделительной железы нетрудно заметить, рассматривая внутренние органы невооруженным глазом. Над поверхностью прозрачной шелкоотделительной железы выступают характерные пятна молочного цвета. Эти выпуклые участки вязкой консистенции приобретают у белококонных пород молочно-белую, а у желтококонных — грязно-желтую окраску.

Сливаясь, они нередко образуют кольцевидные вздутия, и железа напоминает бусы. Все это особенно хорошо видно, если железу из разорванного червя положить на белое блюдо с прозрачной водой. На других органах, не прозрачных или не окрашенных в темный цвет (мальпигиевы сосуды, жировое тело), пораженные места визуально трудно различимы. Картина крови при педрине как диагностический признак не представляет практического интереса: изменение в составе гемоглобина и в их цитопатических особенностях проявляются тогда, когда споры возбудителя педрины могут быть обнаружены у шелкопряда в достаточном количестве, в том числе в нативном препарате из капли гемолимфы. Поэтому микроскопирование окрашенных препаратов с помощью иммерсионного объектива с большим увеличением имеет смысл не с диагностической целью, а с задачами научно-исследовательского характера.

**Микроскопические исследования на присутствие спор педрины.** Обычно исследование на присутствие спор педрины производится под микроскопом с 600-кратным увеличением в нативном препарате из растертого в воде материала: каплю исследуемой жидкости наносят на предметное стекло и покрывают покровным стеклом (Ковалев, 1951). Исследование на присутствие спор педрины могут быть подвергнуты все стадии жизни тутового шелкопряда, от гренды до бабочки включительно; объекты исследования могут быть живыми или мертвыми. Иногда в нативном препарате исследуют гемолимфу, а также отходы червокормления — скорлупки гренды, личинные шкурки, экскременты. Задача исследования — обнаружить споры, а не вегетативные стадии паразита. Поэтому, чем позднее взят материал с момента заражения

и чем больше вегетативных стадий ноземы превратилось в споры, тем легче их обнаружить. Возможности обнаружения спор пеприны в различных объектах исследования показаны в табл. 8.

Т а б л и ц а 8

Объекты микрокопирования, содержащие споры пеприны  
(по И. А. Щербакову, 1952)

Объекты микрокопирования	Содержание спор пеприны
Нормальная грена Неоплодотворенная Погибшая грена Скорлупки грены Гусеницы	Содержит большое количество спор с некоторой тенденцией к повышенной зараженности неоплодотворенной грены Споры встречаются в 25% случаев Споры обнаруживаются начиная со второго-третьего возрастов
Куколки	Содержат спор больше, чем гусеницы, но меньше, чем бабочки
Бабочки Личинные шкурки	Содержат большое количество спор Незначительное содержание спор в шкурках гусениц младших возрастов; увеличивается в старших возрастах и достигает сравнительно большого количества в шкурках при линьке на куколку и бабочку
Экскременты гусениц	Споры обнаруживаются начиная с третьего-четвертого возрастов гусениц при условии заражения в первом возрасте, при наследственном заражении — раньше; при заражении в четвертом-пятом возрастах в экскрементах гусениц спор не обнаруживается.
Жидкие экскременты зрелых гусениц	Содержит большое количество спор пеприны, если с момента заражения прошло более 20 дней
Жидкие экскременты бабочек	Содержат большое количество спор
Чешуйки бабочек Шелк	Не содержат спор
Зобная жидкость бабочек	
Кладка грены	От 4 до 80% яиц содержат споры, при этом порции грены последних дней откладки подвергаются преимущественному заражению
Гемолимфа	Содержит споры

Гусениц младших возрастов целиком растирают в ступке с водой и микрокопируют. В старших возрастах растирают в ступке целого червя или только кишечник, который более всего заражен. Исследуют кишечник потому что при микрокопировании целой куколки большое количество жировых капелек маскирует присутствие спор. Кроме того, кишечник заражен сильнее и содержит спор больше, чем остальные органы куколки. Микрокопировать бабочку целесообразнее после ее естественной смерти и высыхания, чтобы внутриклеточные стадии паразита закончили цикл развития и превратились в легко обнаруживаемые под микроскопом споры. Чтобы облегчить микрокопирование, особенно если исследуются препараты из куколок и бабочек, к растертому материалу рекомендуется прибавлять слабые растворы



щелочи, разрушающие жировые тельца. Для более надежного обнаружения спор, если количество их недостаточно велико, растертый материал центрифугируют или отстаивают в конических стаканчиках.

Наиболее трудный объект исследования — грена. В ней споры легче обнаружить только к концу инкубации, с появлением первых вылупившихся гусениц («разведчиков»). Кроме того, грена менее удобна для нативного микроскопирования из-за множества желточных клеток, покрывающих поле зрения препарата. Иногда рекомендуют, как дополнительное мероприятие по надзору за качеством грены, микроскопировать скорлупки, остающиеся после инкубации. Еще Л. Пастер отмечал, что паразит чаще всего обнаруживается в мертвой, «не ожившей» грене. Это относится прежде всего к бурой грене, погибающей в начальной стадии пигментации серозной оболочки. Микроскопирование пустых скорлупок дает менее надежный результат, так как грена, из которой вылупились гусеницы, заражена обычно слабо. Кроме того, серозная оболочка и периферийная часть яйца, составляющие главную массу остатков после вылупления, в случае благополучного завершения эмбриогенеза, содержат меньше паразитов.

**Технические средства и методы микроскопирования, усиливающие контрастность изображения.** Споры возбудителя пембины в нативном препарате, подобно многим другим микроорганизмам, прозрачны в видимом свете и детали их строения оптически почти неразличимы. Чтобы усилить контрастность изображения в нативном препарате при пользовании обычным биологическим микроскопом, можно прибегнуть к различным техническим средствам. В свое время для микроскопирования спор пчелиной ноземы использовали фонирующее препаратом тушью по методу Бурри, предложенного им для обнаружения бледной спирохеты (трепонемы) — возбудителя сифилиса. Каплю жидкой китайской тонкодисперсной туши смешивали на предметном стекле с каплей, содержащей споры ноземы, размазывали краем другого предметного стекла в виде тонкого мазка, просушивали и микроскопировали с помощью иммерсионного масляного объектива. В поле зрения резко вырисовывались овальные контуры неокрашенных спор на темношоколадном фоне. Несмотря на возможность четкой демонстрации варьирования величины и формы спор, использование этих препаратов ограничивалось довольно узкой исследовательской и педагогической областью. Предложен также способ окраски спор карболовым фуксином, с фонирующим препаратом малахитовой зеленью для последующего микроскопирования сухим объективом ( $\times 40$ ) (Кириченко, 1977).

Значительно больший практический интерес представляет увеличение контрастности изображения в нативных препаратах с помощью оптических средств. К ним относится темнопольная микроскопия. Эффект темного поля создается боковым освещением специальным конденсором, который пропускает только краевые, очень косые лучи, не попадающие в объектив. В результате поле зрения оказывается темным. Косые лучи проходят через нативный препарат и, встречаясь

со спорами, огибают их; благодаря измененным дифракцией волнам света, на темном фоне поля зрения становятся видимыми светящиеся, окруженные ореолом споры. Известный интерес представляет микрофотографирование в темном поле при исследованиях различных воздействий на клетку, на ее структурные элементы — ядро, цитоплазму, вакуоли и т. д. Состояние дисперсности поврежденных белков клетки — степень их агрегации при этом изменяется и это сказывается на яркости свечения исследуемого объекта. Еще более щедрым источником информации о состоянии клеток или микроорганизмов является люминесцентная микроскопия. Холодное свечение исследуемого объекта (люминесценция) возбуждается поглощаемой им световой энергией при его облучении. Чаще всего в практике люминесцентного микрофотографирования для облучения используют ультрафиолетовые лучи. Объект исследования на препарате обрабатывают растворами флюоресцирующих веществ (флюорохромов) и микрофотографируют в виде мокрого препарата под покровным стеклом; люминесцирующий объект в препарате светится различным светом в темном поле зрения. Достигается не только высокая степень контрастности самосветящихся тел, но и возможность изучения различных жизненных процессов. Люминесцентный анализ с применением флюорохромов позволяет установить природу люминесцирующего вещества, его локализацию в клетке и состояние. Люминесцентная микроскопия существенно расширяет возможности цито- и гистохимических исследований и экспресс-методов диагностики; выполняется она люминесцентным микроскопом с источником света в виде специального осветителя и набором светофильтров. Микрофотографирование можно вести в отраженном (для непрозрачных объектов) и проходящем свете; в последнем случае вместе с люминесцентным эффектом может быть использовано фазово-контрастное устройство.

**Фазово-контрастная микроскопия.** Из всех средств контрастирования изображения при микрофотографировании нативных препаратов наиболее практически ценным для шелководства оказалось фазово-контрастное устройство к биологическому микроскопу.

Контрастность изображения зависит от степени поглощения света структурными деталями исследуемого объекта. В полупрозрачных объектах отдельные их участки в разной степени поглощают свет. В прозрачных объектах свет не поглощается, но, проходя через них, испытывает смещение фаз колебания световых волн, вызванных неравномерной толщиной и неодинаковыми показателями преломления отдельных участков исследуемых структур и окружающей среды. В результате сдвига фаз световых волн возникает так называемый фазовый рельеф, но эти оптические явления глаз микроскописта не различает. Голландский физик Цернике (1932, 1934) разработал теорию, а Кёлер и Лоос (1941) сконструировали устройство для превращения оптическим путем невидимой разности фаз в разность амплитудного характера. В результате прозрачные объекты воспринимаются как контрастные. Устройство, участвующее в этих оптических преобразованиях, состоит из фазовой пластинки с кольцом, которую помещают под фронтальной линзой биологического микроскопа. При про-

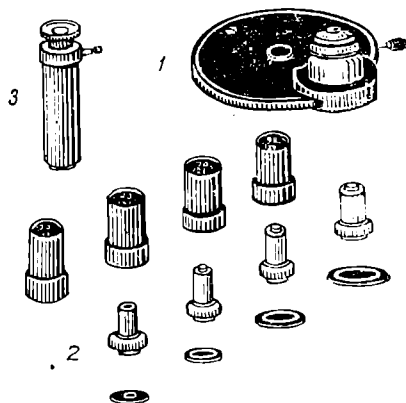
хождении лучей света через фазовое кольцо фаза световой волны сдвигается и длина ее укорачивается на  $1/4$ .

Фазово-контрастное устройство к биологическому микроскопу состоит из объективов с фазовым кольцом, конденсора *1* с приспособлением, позволяющим совместить изображение диафрагмы *2* конденсора с фазовым кольцом объектива, и вспомогательного микроскопа *3*, помогающего выполнению операции по их совмещению (рис. 99). Этот метод, принятый нашими гренажными заводами, дает возможность повысить тщательность и достоверность текущего контроля за ходом микроскопического анализа на пеприну. Благодаря повышенной резкости изображения, многие из объектов гренажного микроскопирования, такие, как споры в незрелой куколке или в неинкубированной грене и др., обнаруживаются гораздо легче. Этот прибор дает возможность несколько упростить подготовительные операции к микроскопированию; например, отказаться от инкубирования грены при ее контрольном анализе на пеприну.

Существует еще один способ повышения контрастности структур исследуемого объекта с помощью аноптральной микроскопии. При таком способе микроскопирования в объективах устранена возможность отражения световых лучей от рабочей поверхности линзы, на которую нанесен светопоглощающий слой. Изображение, получаемое с помощью аноптрального объектива, более контрастно, чем при фазово-контрастном микроскопировании, очень детально и поле зрения отличается большей глубиной фокуса — до 2 мкм, т. е. в пять раз больше, чем у обычного иммерсионного объектива с увеличением в 90 раз.

**Микроскопирование постоянных окрашенных препаратов через иммерсионные объективы.** Постоянные препараты приготавливают в виде мазков на предметном стекле или микротомированных срезов с помощью обычной гистологической техники. В них можно видеть не только споры возбудителя пеприны, но и плазмодии на разных этапах их развития; для нативного микроскопирования эти объекты недоступны. Фиксация материала для гистологических срезов чаще всего выполняется смесью Шаудина или Бузна, а окраска гистологических препаратов, так же как мазков, — по Романовскому—Гимзе.

Известно, что у микроспоридий для выявления количества ядер, участвующих в спорогонии, используют реакцию Фельгена. Вместе с тем зрелые споры ноземы с сформированной оболочкой не поддаются окраске и их предварительно протравливают. Вейзер (1976) предло-



99. Комплект фазово-контрастного устройства к микроскопу:

*1* — фазовый конденсор револьверной системы; *2* — набор диафрагм и объективов с фазовыми кольцами к ним; *3* — вспомогательный микроскоп, служащий для контроля за совмещением кольцевой диафрагмы и фазовой пластинки.

жил всю модификацию метода окраски спор микроспоридий. Чтобы улучшить проникновение красителя, он применил протравливание препарата соляной кислотой. Пропись этого метода следующая: мазок из растертой ткани насекомого наносят на обезжиренное предметное стекло и фиксируют метиловым спиртом или фламбированием на пламени горелки. Гидролиз ДНК производится погружением мазка на 2 мин в нормальный раствор соляной кислоты, нагретой до 60—100°С. Затем препарат промывают под водопроводной струей и окрашивают азур-эозином по Романовскому—Гимзе двумя каплями краски, разведенной в 1 мл дистиллированной воды в течение 10—20 мин, споласкивают, просушивают и микроскопируют иммерсионным объективом. Свой метод Вейзер демонстрировал на двух типичных микроспоридиях с дву- и одноядерным строением споры. У возбудителя пембрины при этом методе окраски двуядерная структура видна у большинства спор, тогда как с этой же окраской, но без обработки соляной кислотой, ее можно различить только у споронтов и молодых спор.

**Электронная микроскопия.** Особое место в изучении возбудителя пембрины и морфолого-цитологических особенностей строения стадий его развития занимает электронно-микроскопическое исследование. Необходимость в нем вызывается сочетанием весьма малых размеров этого простейшего с многокомпонентностью его строения, особенно споры, детали которого доступны наблюдению только при субмикроскопических средствах и методах исследования. Один микрометр (таков средний размер спороплазмы — «планонта») — это точка в световом микроскопе при увеличении в 600 раз; даже при самом скромном увеличении электронного микроскопа ( $\times 10\,000$ ) она достигнет одного сантиметра в поперечнике.

В отличие от световой оптики, которая для дифференциации микроскопической картины, помимо оптических средств контрастирования, широко использует различные методы окрашивания препаратов, в электронной микроскопии основными средствами выявления структурных особенностей исследуемого объекта являются методы оттенения, негативного и позитивного контрастирования и методы реплик. Кроме того, современные сканирующие микроскопы снабжены приспособлениями для стереоскопического видения.

#### **Вопросы для самопроверки**

1. Каковы морфологические и структурные особенности спор возбудителя пембрины?

2. В чем различия между планонтом Штемпеля и спороплазмой Исихары?

3. Как осуществляется заражение пембриной и из каких этапов состоит этот процесс?

4. Что такое «вторично инфицирующая форма» и какие вопросы решаются с ее открытием?

5. Какая наблюдается последовательность заражения органов и тканей тутового шелкопряда?

6. Как происходит превращение спороплазмы в спору?

7. Как протекают трансвариальная и герминативная передачи инфекции ноземы тутового шелкопряда?

8. Какая наблюдается зависимость зараженности яиц в кладке от зараженности бабочек?

9. Каковы характерные признаки пембрины и особенности ее течения?

10. Какие технические средства и методы микроскопирования могут быть использованы для обнаружения спор пембрины?

## Глава 6. СИСТЕМА МЕР БОРЬБЫ С БОЛЕЗНЯМИ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

### 6.1. Содержание мероприятий

Цель борьбы состоит в том, чтобы предотвратить поражение гусениц массовыми инфекционными болезнями, защитить урожай коконов от частичной или полной гибели. Как известно, предупреждать болезни всегда проще и надежнее, чем бороться с ними, спасти заболевший организм. Поэтому наиболее надежным средством защиты урожая коконов от потерь, вызванных массовыми инфекционными заболеваниями, является предупреждение их появления. Совокупность мер по предупреждению заболеваний принято еще со времен античного врачевания называть *профилактикой*.

Профилактика может быть представлена системой мер по предупреждению заболевания всей выкормки, но может быть также нацелена на защиту отдельных гусениц от заражения со стороны их заболевших сородичей. Последние меры направлены непосредственно против дальнейшей убыли урожая коконов больной выкормки и являются конкретной сущностью борьбы за его сохранение.

Наука, посвященная разработке профилактических мер на основе создания условий жизни, обеспечивающих сохранение здоровья и предупреждающих возникновение болезней, называется *гигиеной*. Наука эта опирается на очень широкий круг знаний человечества, среди которых ведущее место принадлежит, помимо этиологии, выяснению роли экологических факторов, условий питания и режима жизнедеятельности организма. Применительно к тутовому шелкопряду можно отнести, в первую очередь, такие детали оптимизации условий червокормления, как гигротермический режим, освещение и аэрация, плотность размещения гусениц, техника ухода за выкормкой, режим кормления и качество корма. Роль гигиены выкормки тутового шелкопряда в значительной степени сводится к поддержанию на высоком уровне генетически обусловленной, врожденной сопротивляемости организма шелкопряда червя различным инфекциям.

Мероприятия, направленные на реализацию требований гигиены для обеспечения здоровых условий существования, носят название *санитарных*.

Среди средств санитарно-гигиенического характера особое место занимают те, которые направлены против болезнетворных микроорганизмов.

Эпизоотия не является результатом одномоментного заражения всего поголовья гусениц на выкормке; для распространения инфекции нужно время, на много превышающее длительность заболевания отдельных особей. Даже при значительной «кучности» первоначального инфицирования время для завершения выкормки может оказаться недостаточным для охвата эпизоотией многочисленного поголовья. Заболевание в младших возрастах, в порядке преемственности, передается старшим, но у последних возможность дальнейшего распространения болезней прерывается коконированием и метаморфозом; они оказываются своеобразным «эпизоотическим тупиком». Положение это достаточно известно специалистам (Е. Н. Михайлов. Эпизоотология болезней тутового шелкопряда. Ташкент, 1982).

Матсумото и др. (1981), разрабатывая асептический метод выкормки шелкопряда на искусственном корме, показали, что централизованные выкормки младших возрастов, помимо известных достоинств подобной организации червокормления, способны резко повысить гарантию успеха промышленных выкормок, если для докармливания старших возрастов на естественном корме будут взяты гусеницы, предварительно воспитанные в асептических условиях. Успех объясняется тем, что младшие возрасты в асептических условиях лишены возможности выполнить свою обычную функцию накопителя эпизоотических факторов, которые в старших возрастах реализуются в массовых заболеваниях. Ликвидация этого начального звена эпизоотии имеет решающее значение для сохранения урожая коконов.

## 6.2. Дезинфекция

*Дезинфекция* — обеззараживание, уничтожение во внешней среде возбудителей болезней. Цель ее в каждом конкретном случае уничтожить определенных патогенных микробов — причину заразных заболеваний, поэтому дезинфекция имеет менее радикальный характер, чем стерилизация. *Стерилизация*, обеспложивание — полное уничтожение каких бы то ни было микроорганизмов и их спор в какой-нибудь среде, лишение ее присутствия жизни; обычно это достигается физическими средствами, например, высокой температурой.

Дезинфекции могут быть подвергнуты производственные помещения — инкубатории, червоводни, листохранилища, папилонажные амбары, залы микроскопирования, выкормочный и гренажный инвентарь, выкормочная поверхность, занятая гусеницами, поверхность грены и тела гусениц, руки и одежда обслуживающего персонала и т. д. Однако основной зоной применения дезинфекции как меры предотвращения заражения тутового шелкопряда является выкормка шелковичных червей. Объясняется это тем, что главными воротами инфекции (исключая микозов) является кишечник, через который возбудитель болезней проникает в организм шелкопряда вместе с пищей, а единственная стадия этого насекомого, поглощающая пищу, — гусеница.

Различают *предварительную* (профилактическую или предупредительную) *дезинфекцию*, связанную с подготовкой к предстоящему использованию производственных помещений и инвентаря, и *текущую*

дезинфекцию в ходе производственных процессов как меры поддержания санитарного состояния рабочей обстановки. Наиболее конкретную цель имеет *заключительная дезинфекция* как средство ликвидации болезнетворных микроорганизмов, накопившихся в производственных помещениях и на инвентаре к моменту завершения всех производственных операций; *заключительная дезинфекция* проводится после окончания выкормки, пораженной болезнью, и завершения сбора коконов.

**Физические средства обеззараживания.** Дезинфекцию проводят, используя губительные для микроорганизмов и вирусов физические и химические средства. К физическим средствам относятся разные виды термического воздействия: кипячение, обработка зараженных предметов сухим горячим воздухом или нагретым водяным паром, пастеризация (нагревание жидкостей до 55—70°С с целью обезвреживания от микроорганизмов), тиндализация (дробная стерилизация, чтобы предотвратить разрушение нагреваемого вещества), обжигание пламенем паяльной лампы или лабораторной горелки (фламбуирование), сжигание и др. В большинстве своем эти средства стерилизуют, а не только дезинфицируют.

Температурное воздействие на заразные начало при прочих равных условиях зависит от формы применения тепла. Наиболее радикальное средство — пламя; на пламени горелки стерилизуют лабораторные инструменты, металлические вещи; фламбуруют горлышко пробирок, колб и пробки к ним. Сжиганием уничтожают все заразные отбросы — трупы гусениц, мусор и малоценные предметы.

Сухой жар используют для стерилизации в сушильных шкафах, проглаживания горячим утюгом, нагретым до 200—250°С; эти средства в состоянии вызвать полную гибель даже наиболее термостабильных микроорганизмов.

Влажный жар употребляют при приготовлении микробиологических питательных сред (стерилизация в автоклаве или коховском аппарате паром), при кипячении, ошпаривании кипятком и т. д.; стерилизующее действие его сильнее, чем действие сухого жара. По данным японского справочника по гrenaжу, летальная экспозиция при действии текущего пара (100°С) для спор возбудителя пемрины 20—30 мин., вируса желтухи — 30, спор бациллы тюрингиензис вар. сотто — 10, спор возбудителя мускардины — 5, стрептококков шелкопряда — 3 мин.

Низкая температура не применяется, так как большинство возбудителей выдерживает ее действие в течение продолжительного срока.

Наиболее доступным физическим обеззараживающим средством является *солнечный свет*. Губительное влияние на патогенных микробов и вирусов прямых солнечных лучей складывается из действия ультрафиолетовой части их спектра (наиболее результативный фактор), прогревания и высушивания. Под влиянием высушивания сроки отмирания микробов различны и зависят от устойчивости их к этому фактору и от условий его действия. Обеззараживающее действие прямых солнечных лучей в летние безоблачные дни характеризуется

следующей величиной эффективной экспозиции: вирус желтухи — 16—22 ч, споры возбудителя пеприной 6—7, споры возбудителя мускардины — 3—5, вегетативные (неспоровые) формы бактерий — 1—2 ч. Рассеянный дневной свет действует значительно слабее; его слабопроникающее действие может быть сведено на нет небольшим количеством органического вещества, покрывающего микробов и выполяющего защитную функцию. Недостаток солнечного света как дезинфицирующего средства в том, что интенсивность освещения изменяется и не может быть регулируема; поэтому облучение используют дополнительно перед или после других обеззараживающих средств.

Хорошим дезинфицирующим средством являются ультрафиолетовые лучи (Зворыкина, 1964); наиболее губительны для вирусов и микроорганизмов лучи с длиной волны 253,7 нм; они способны также разрушать токсины бактерий. Очень удобным и эффективным источником облучения являются так называемые *бактерицидные лампы*. Отечественная промышленность выпускает несколько типов этих газоразрядных ртутных ламп низкого давления с трубкой из увиолевого стекла, с ультрафиолетовым излучением, имеющим наиболее действенную длину волны. Бактерицидные лампы предназначены чаще всего для обеззараживания воздуха в помещениях: при горении этих ламп в течение суток, из расчета 1 Вт на 1 м<sup>3</sup>, количество микробов и вирусов в облученном помещении сокращается на 60—80%.

Сильным стерилизующим действием обладают *токи ультравысокой частоты (УВЧ)*; при использовании наиболее результативных параметров длины волны, мощности установки, экспозиции и температуры — бактерицидное, спорицидное, вируцидное действие УВЧ может обеспечить достижение полной стерильности, на значительную глубину обеззараживаемого материала, в течение 1—3 мин. Сильным разрушительным действием на бактерии и вирусы обладает ультразвук; его используют для стерилизации жидкой среды, для приготовления преципитиногена из разрушенных ультразвуком бактериальных клеток.

Полезна в санитарном отношении тщательная уборка помещений, удаление пыли и другие операции, выполняемые средствами механической чистки. При неаккуратном выполнении этих операций возможно рассеивание заразного начала. Поэтому механическую чистку необходимо проводить после увлажнения предметов или же пользоваться влажными тряпками, вениками и т. д. Для увлажнения употребляют дезинфицирующие растворы, сочетая механическую чистку с химическим обеззараживанием. Поверхности, которые могут быть вымыты в помещении, целесообразнее всего очищать с применением детергентов (моющих средств) горячей водой или просто щелочи (сода, поташ, шелок).

**Химические средства дезинфекции.** Наиболее широкое применение нашли химические средства дезинфекции (Окуневский, 1926—1936). К ним предъявляют следующие требования:

а) полное и быстрое обеззараживающее действие, сопровождающееся проникновением дезинфицирующего вещества в толщу обрабатываемой поверхности;



б) растворимость в воде, сохранение обеззараживающих свойств при длительном хранении и во время применения;

в) легкая удаляемость, нейтрализуемость, безопасность для людей, безвредность для шелкопряда, а также безопасность для дезинфицируемых предметов;

г) дешевизна, возможность приобретения в больших количествах и простота применения.

Идеальных средств, удовлетворяющих всем этим требованиям, нет. Поэтому при выборе вещества для дезинфекции сообразуются с эффективностью его действия в определенных условиях, а также с экономичностью его использования.

Из неорганических веществ в дезинфекционной практике применяют кислоты и щелочи. Кислоты употребляют главным образом как растворители некоторых дезинфицирующих средств; щелочи — для усиления при дезинфекции растворяющего действия горячей воды на белки и жиры. Такую же роль выполняют соли, дающие щелочные растворы (сода, поташ, зольный щелок), известь (обладающая, кроме того, некоторыми бактерицидными свойствами), а также слабые растворы поваренной соли.

В дезинфекционной практике применяют также соли тяжелых металлов — ртути, железа, меди (сулема, купорос).

Из органических соединений наиболее известными дезинфицирующими средствами являются метиловый и этиловый спирты и формальдегид.

Из циклических соединений наиболее известны производные бензола — фенолы и крезолы; особенно часто пользуются 3—5%-ным водным раствором кристаллической карболовой кислоты, которую не следует смешивать с «неочищенной», или «черной», или «технической» карболкой — продуктом перегонки каменного угля, являющимся смесью нескольких производных ароматического ряда.

Действие дезинфицирующих средств на микроорганизмы может быть сведено, в самой общей форме, к окислительным процессам, разрушающим отдельные компоненты протоплазмы, или к процессам необратимой коагуляции. Например, обеззараживающее действие перекиси водорода, перманганатов калия и хлорной извести объясняется способностью их окислять органическое вещество микробной клетки, тогда как соли тяжелых металлов, спирт и формалин свертывают протоплазму.

Сила действия дезинфицирующих средств зависит от: а) физических или химических свойств веществ; б) продолжительности действия; в) концентрации растворов; г) температуры растворов; д) смачиваемости дезинфицируемых объектов и их физических свойств, облегчающих или затрудняющих обеззараживание (пористость, шероховатость, неровности и т. д.); е) устойчивости микробов, против которых направлена дезинфекция.

Способ применения дезинфицирующих веществ может быть различен. Наименее эффективно использование их в сухом состоянии, в виде порошков (например, хлорной извести). Растворами дезинфицирующих веществ орошают или моют объекты, подлежащие дезин-

фекции. При этом так называемом *влажном методе* объекты можно обрабатывать тряпкой, веником, побелочной кистью, опрыскивателями. Обработка должна обеспечить смачивание объектов без пропусков, экономичность расходования жидкости и высокую производительность. Легче всего этого достигнуть опрыскивателями.

Выработаны методы дезинфекции и газообразными веществами (формальдегидом, сернистым ангидридом и т. д.), превращаемыми в газообразное состояние химическими реакциями или выпариванием. Недостаток этого метода — необходимость герметической изоляции дезинфицируемого помещения, чтобы сохранить требуемую концентрацию газа на определенное время.

**Газообразные средства и аэрозоли.** Наиболее ранним по времени своего возникновения средством борьбы с заразными заболеваниями человека и с бытовыми паразитами было «окуривание» (фумигация) с применением газообразных средств дезинфекции и дезинсекции. Для этого использовали двуокись серы, хлор, а в последние годы прошлого столетия — формальдегид, бактериоубивающее действие водных растворов которого стало известно незадолго до этого. Парами формальдегида стали обеззараживать помещения после эвакуации из них больных заразными заболеваниями (заклещивательная дезинфекция).

Формальдегид — альдегид муравьиной кислоты  $\text{CH}_2\text{O}$ , бесцветный газ удушливого запаха, легко растворяется в воде (до 50%), химически присоединяя ее и превращаясь в моногидрат  $\text{CH}_2(\text{OH})_2$ , который почти исключительно содержится в разбавленных растворах.

При дезинфекции газообразным формальдегидом используются специальные аппаратами различной конструкции; существуют также безаппаратные способы обработки. На  $1 \text{ м}^3$  обеззараживаемого помещения необходимо 5 г формальдегида. Время действия — 24 ч.

И. П. Чичигина и Ю. М. Осипова (1980) рекомендуют для газации выкормочных помещений применять 38—40%-ный формалин из расчета 40 мл на  $1 \text{ м}^3$ , разведенный водой в соотношении 1 : 3 и доведенный до полного выпаривания раствора.

Начиная со второго десятилетия нашего века использование этого средства стало сокращаться, чему содействовало выявление многих его недостатков, снижающих результативность обеззараживания. Среди них главным оказалась значительная трудность в обеспечении необходимой длительности действия на микроорганизмов губительной концентрации. Требуемая степень герметичности может быть достигнута только в специальных дезинфекционных камерах, а не в жилых и производственных помещениях, где утечка парообразного формалина неизбежна.

В свое время это было показано при испытании различных средств и способов дезинфекции, в том числе, газообразного формальдегида, против возбудителей основных болезней тутового шелкопряда. Опыты ставились в сельских постройках Узбекистана, которые обычно использовались для размещения выкормки гусениц старших возрастов; жилые крестьянские дома, помещения для скота, складские постройки, школы, клубы, комнаты в административных зданиях (Михайлов, 1932).

Газообразное химическое вещество улетучивалось сквозь щели, которые не удалось обнаружить и достаточно тщательно законопатить, как этого требуют правила фумигации. Кроме того, разнообразная по своей фактуре поверхность внутри обрабатываемого помещения вместе с находящимися в нем предметами представляет собой значительную площадь адсорбционного осаждения формальдегида, снижающего его концентрацию. В тонких слоях адсорбированный формальдегид быстро подвергается полимеризации, к которой он очень склонен, опережая в этом сроки действия губительной для микробов экспозиции. Конденсируемая на дезинфицируемых поверхностях влага воздуха в помещении, которое должно быть при обработке достаточно увлажнено, растворяет газообразный формальдегид, с образованием раствора формалина слишком слабой концентрации для обеспечения контактного бактерицидного действия. К этому следует добавить, что способность формальдегида к проникновению в глубь пористой поверхности (в частности — стен) проявляется довольно слабо.

Краткая экскурсия в историю использования газообразной дезинфекции, в частности, формальдегидом, может быть полезна для тех, кто полагает, что многочисленные огрехи при орошении дезинфицируемого помещения раствором формалина могут быть компенсированы проникновением газообразного формальдегида в необработанные участки.

Специализировавшиеся на этих вопросах американские экспериментаторы (Филлипс, Варшавский, 1958; Форт Детрик Мериленд, США), разделяя приведенные здесь критические соображения относительно парообразного формальдегида, считают, что теперь не составляет особого труда указать на более надежные средства; такие, в частности как *окись этилена*. Этот фумигант при наличии всех положительных свойств, присущих формальдегиду, обладает существенными преимуществами: он значительно больше способен проникать через многослойные препятствия и убивать наиболее устойчивых спорообразующих бактерий; обеззараживание можно вести без необходимого для формальдегида поддержания в помещении высшей степени увлажненности воздуха. Еще более перспективен, с их точки зрения, *пропиолактон* — циклический эфир бета-оксипропионовой кислоты. Его растворы и пары губительны для микроорганизмов; стерилизующая концентрация растворов в отношении вегетативных форм — 0,2—0,3%, спорных — 0,5—0,7% (масса/объем).

В последние годы стали широко применять инсектициды в форме аэрозолей. Аэрозоль — это система, состоящая из газообразной среды (чаще всего, воздуха) и взвешенной в ней твердой или жидкой дисперсной (раздробленной) фазы. Если дисперсная фаза представлена капельками жидкости, такую систему называют *туманом*, в отличие от дыма, образованного твердой дисперсной фазой. Крупнодисперсные твердые фазы образуют пыль и характеризуются тем, что не диффундируют, но быстро осаждаются в неподвижной воздушной среде. Дым и пыль — аэрозоли дисперсной фазы, которая крупнее коллоидных систем, и в этом отношении близки к дисперсности суспензий (взвесь в жидкости твердых частиц) и поэтому их точнее было бы назы-

вать аэроаэрозольными, а туманы — равнозначные в том же смысле эмульсии (взвесели нерастворяющихся мельчайших капель в жидкости) — аэроэмульсиями.

Созданы различные технические средства получения аэрозолей, начиная с аэрозольных шашек и аэрозольных бомб (по существу, баллонов) и кончая аэрозольными генераторами большой мощности. В шелководстве испытаны экономичные, не требующие сложного оборудования способы аэрозольной дезинфекции черводен с использованием хлорной извести для возгонки паров формальдегида из формалина; при этом использование хлорной извести, а не применяемого с этой же целью перманганата калия, оказалось более дешевым, доступным и одинаково результативным способом. Хлорную известь и формалин берут в соотношениях 1 : 1 (30 : 30 г/м<sup>3</sup>); такая смесь интенсивно вскипает и разогревается с выделением формальдегида и хлора. Сообщается о положительных результатах такого способа дезинфекции в отношении вируса желтухи<sup>1</sup>, а также бактерий (в том числе спорообразующих) и конидий гриба боверии<sup>2</sup>.

**Методы установления результативности дезинфекции.** Чтобы выяснить пригодность для дезинфекции химического вещества или установить результативность того или иного метода в определенных условиях, пользуются обычно бактериологическим контролем. Дезинфицирующее средство испытывается на ряде бактерий с различной устойчивостью, являющихся в этом отношении прототипом возбудителей заразных болезней, против которых направлена дезинфекция. Такими хорошо изученными музейными культурами бактерий (обычно сапрофитами) заражают полоски фильтровальной бумаги, батистовые лоскутки, шелковые нити или гранатовые бусы. Зараженные опытные объекты, или, как их принято называть, *тест-объекты*, дезинфицируют в течение различных сроков. Чтобы по истечении нужного срока прекратить действие дезинфицирующей жидкости на тест-объект, его погружают в нейтрализующий раствор. Например, формалин нейтрализуют 3%-ным раствором аммиака, сулему — раствором сернистого аммония. После этого тест-объекты переносят в жидкие питательные среды; отсутствие роста на питательной среде говорит об эффективности дезинфекции. Чтобы приблизить условия испытания к производственной обстановке, бактериальные культуры наносят на деревянные, глиняные, отштукатуренные плитки небольшого размера. Иногда для этого используют поверхность предметов и стен производственных помещений.

Видовая принадлежность использованных в испытаниях бактерий должна быть строго определенной. Чтобы узнать, сколько живых микробов осталось на дезинфицированных тест-объектах, по ним проводят стерильным тампоном или смывают; с того или другого производят засев на питательную среду и помещают в благоприятные условия для

<sup>1</sup> Алиев А. Г., Караев И. И. Аэрозольная дезинфекция против ядерного полндроза тутового шелкопряда. — Вестник с.-х. науки, 1975, № 3.

<sup>2</sup> Кириченко И. А., Рыхлицкая А. И., Буняк Н. В. Газово-аэрозольный способ дезинфекции помещений, оборудования и инвентаря в шелководстве. — Шелк, 1980, № 1.

выявления клеток микроорганизмов, оставшихся живыми и не утративших способность к размножению. Для сравнения эффективности действия дезинфицирующих средств или выяснения влияния условий их применения сопоставляют численность выживших и погибших микроорганизмов.

Графическое выражение зависимости между временем действия дезинфицирующего агента и количеством выживших микробных клеток имеет вид ниспадающей кривой между двумя координатами: на одной из них — логарифмы отсчета времени, на другой — количество живых клеток. Кривая эта получила название *кривой выживания*. С помощью ее можно сопоставить результативность действия ряда химических агентов для разных условий их применения, сравнительную эффективность разных концентраций (Дж. и Э. Мейнелл, 1967).

Недостаток этого метода состоит в том, что у низших организмов различить эти два состояния — живой или мертвый — на основании способности микроба размножаться на питательной среде представляется возможным. Вследствие этого всякий раз остается невыясненным: является ли действие испытуемого агента бактерицидным или только бактериостатическим? Основанием для этих сомнений служат найденные многочисленные средства для успешной «реанимации» («оживления») микроорганизмов, обработанных химическими стерильянтами. Например, формалин при малых концентрациях оказывает бактериостатическое действие, которое обратимо при действии сульфата натрия; известны также многие другие случаи «воскрешения» бактерий, подвергнутых бактериостатическому действию дезинфицирующими средствами, с помощью соответствующих антидотов (противоядий).

Для шелководства большое практическое значение имеет изучение действия дезинфицирующих средств на возбудителей, которые не культивируются на питательных средах и вместе с тем наиболее устойчивы к различным внешним воздействиям. Такими возбудителями, превосходящими по своей устойчивости бактерий, являются вирус желтухи и споры ноземы. Результаты обработки их дезинфицирующими средствами проверяются заражением не питательной среды, а самого шелкопряда (биологическая проба).

Устойчивость патогенных микробов к дезинфицирующим средствам неоднозначна, поэтому они не могут быть в полной мере универсальными; выбирая обеззараживающие средства, так же как и условия их применения, следует учитывать эти особенности. Но даже при тщательном соблюдении этих условий, мы не можем рассчитывать на полную результативность дезинфекции и потому реальная возможность этого мероприятия сводится к уменьшению количества жизнеспособных инфекционных единиц «до численности, которой можно пренебречь» (Дж. и Э. Мейнелл, 1965).

### 6.3. Обеззараживающие средства, используемые в шелководстве

Считают, что на необходимость обеззараживать червоводни впервые указал Л. Пастер, хотя чутье шелководов подсказало им задолго до этого возможность избежать заболевания шелковичных червей, если

перед выкормкой или во время ее проведения «отпугнуть» болезни; они сжигали помещения, сжигая хворост хвойных деревьев или можжевельник, не подозревая при этом, что слабое обеззараживающее действие дыма объясняется присутствием в нем небольшого количества формальдегида. Практиковалось также опрыскивание гусениц винным уксусом, который, как стало известно позже, способен убить возбудителя мускардины. Постепенно под интуицию народного знахарства в области предотвращения болезней была подведена научная основа, испытано обеззараживающее действие различных средств, в том числе тех, которые были подсказаны народным опытом.

В шелководстве из физических средств, помимо механической чистки, уборки помещений, мытья инвентаря с использованием щелочной воды или других моющих средств чаще других пользуются солнечным светом, затем — крутым кипятком, паром при морке коконов, горячим утюгом — при обеззараживании спецодежды, полотенец, бумажных съемников, изоляционных марлевых мешочков и т. п. Из химических средств наибольшее распространение получили формалин, хлорамин и негашеная известь.

**Формалин.** В шелководстве — у нас и за рубежом — широко применяют влажную обработку 2—4%-ным формалином, представляющим собой водный раствор формальдегида. Формалин — прозрачная, бесцветная жидкость, легко распознаваемая по едкому запаху, раздражающему слизистые глаз и органов дыхания. Получают его окислением метилового спирта, который всегда содержится в небольшом количестве (до 15%) в формалине. По существующим правилам формалин должен содержать 37% формальдегида; обычно количество его колеблется от 35 до 40%. Кроме формальдегида и метилового спирта, в формалине иногда есть примесь ацетона, муравьиной и уксусной кислот.

Испытывая доброкачественность формалина, главное внимание обращают на процентное содержание формальдегида, отсутствие избытка кислоты и весомого остатка при прокаливании. Количественно формальдегид определяют йодометрически.

С увеличением концентрации формальдегида в растворе начинают появляться более сложные гидраты; это наблюдается при выпаривании формалина, а в крепких растворах, содержащих более 30% формальдегида, — самопроизвольно, при длительном хранении. Из разнообразных продуктов полимеризации можно отметить группу параформальдегидов или параформов —  $(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}_2\text{O}$ . Параформ — белое вещество, при нагревании с водой он снова дает воднорастворимый  $\text{CH}_2\text{O}$ , а без воды — газообразный формальдегид. Чтобы предотвратить быструю полимеризацию раствора, его хранят при ровной средней температуре, в защищенном от прямых солнечных лучей месте.

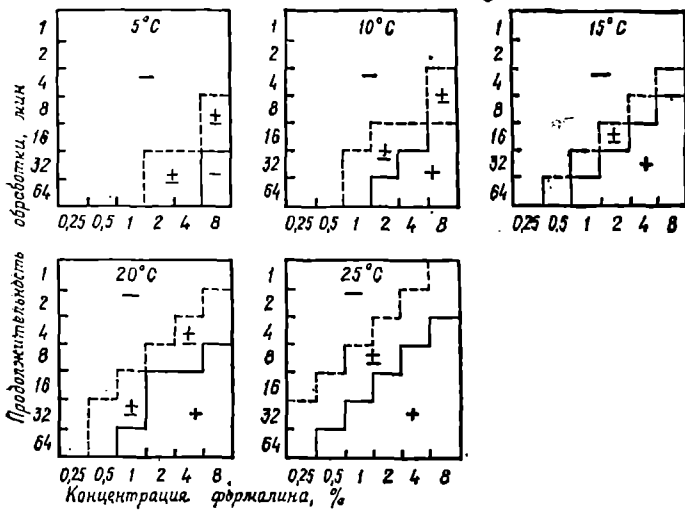
Растворами формальдегида дезинфицируют червоводни, листохранилища, гренохранилища, инкубатории, производственные гренажные помещения, инвентарь (за исключением металлических предметов, которые при длительном соприкосновении с растворами формальдегида портятся), а также грену.

Дезинфицирующие свойства формальдегида объясняются резко выраженной способностью давать продукты присоединения (уплотнения) с аминокислотами, протеинами и вызывать необратимую коагуляцию белков протоплазмы. По этой же причине непосредственное соприкосновение 4%-ных растворов со слизистой вызывает смертельные. Формальдегид жадно поглощается веществами, особенно пористыми, например, пористой поверхностью нештукатуренных стен, но неглубоко в них проникает, не портит их, умерщвляет микробы, особенно поверхностно расположенных, быстро испаряется, лучше действует в присутствии водяных паров и тем сильнее, чем выше температура. Лучшее время для дезинфекции растворами формальдегида — душные, насыщенные влагой, теплые дни. При низкой температуре (15—16°С) бактерицидное действие формальдегида значительно слабее; поэтому во время дезинфекции температура воздуха должна быть не ниже 20°С, а относительная влажность — не ниже 70%.

Троицкая и Насратуллаев (1982) показали эффективность дезинфекции 4%-ным формалином помещений шелководческих комплексов по отношению к их бактериальному загрязнению. После предварительной, предвыкормочной дезинфекции количество бактерий в воздухе помещений сократилось в 60 раз, а на поверхности стен и выкормочных этажерок — в 3 раза. За время выкормки (30 дней) количество бактерий в воздухе возросло в 14 раз и достигло 114 тыс. микробных клеток в 1 м<sup>3</sup>; на стенах возросло в 9 раз, на этажерках — в 4 раза. Увеличение количества бактерий — результат сосредоточенности гусениц в помещении, больших масс поступающих на выкормку отнюдь не стерильных листьев, скопления экскрементов и других остатков червокормления, недостаточной эффективности мер по поддержанию санитарного состояния выкормок. После заключительной дезинфекции в воздухе помещения количество бактерий уменьшилось в 142 и в 110 раз (по данным двух лет); на стенах количество их сократилось в 145 и 73 раза, а на этажерках — в 130 и 97 раз.

Следует иметь в виду, что летальная экспозиция для вегетативных клеток бактерий во много раз меньше, чем для их спор. Вирусы ядерного полиэдроза при 24°С в 4%-ном формалине погибают через 15 мин.

Т. Кагава (1980) изучал эффективность формалина как дезинфицирующего средства против спор возбудителя пембрины. Зависимость гибели спор от условий использования формалина, его концентрации, времени воздействия на споры он выяснял применительно к одной из пяти температур, при которых проводились наблюдения: 5°, 10°, 15°, 20° и 25°С. Результативность обеззараживания им выражена в процентах гибели гусениц после заражения их спорами, выдержанными в формалине. Результаты сгруппированы в следующие три степени эффективности: гибель 100% спор, гибель от 50 до 100%, гибель 50% и меньше количества спор. Итоги многочисленных опытов он представил в графиках, изобразив три степени эффективности в виде трех зон, соответственно обозначенных знаками +, ±, —; параметры зон для каждой из пяти температур были ограничены по оси абсцисс — концентрацией формалина в рабочих растворах, а по оси ординат —



100. Гибель спор ноземы шелкопряда в зависимости от температуры, концентрации формалина и продолжительности обработки.

длительностью их воздействия на споры (рис. 100). Центральное место среди испытанных концентраций занимают растворы 2—4%-ного формалина, чаще всего применяемые на практике и не только в шелководстве; при 20°C эффект этих концентраций равнозначен, если длительность контактного действия раствора может быть обеспечена в течение 16 мин. Минимальная экспозиция, обеспечивающая полную, 100%-ную гибель спор — 4 мин, 1 раствор 8%-ный, температура 25°C. Следовательно, лимитирующим фактором применения формалина для опрыскивания им дезинфицируемой поверхности является время, в течение которого требуемая концентрация раствора на ней в состоянии сохраниться и его контактное действие на спору могло бы оказаться для нее смертельным.

Т. Янагита (1980), исследуя противомальдегидную стойкость грибов из рода аспергиллус, поражающих тутового шелкопряда, обнаружил у них альдегидную гидрогеназу. Фермент был выделен из мицелиальной массы *Aspergillus flavus-oryzae*, осажден сульфатом аммония и спиртом, частично очищен. Оптимум pH для окисления формальдегида этим ферментом — 8,1. Фермент окисляет, кроме того, ацетальдегид (уксусный альдегид), однако его активность по отношению к формальдегиду много выше. Изолированный фермент нестабилен при комнатной температуре (22—25°C).

Культивируемый гриб аспергиллус проявляет максимальную противомальдегидную дегидрогеназную активность на седьмой день содержания его при 30°C. Ферментативная активность обнаружена и у других видов аспергиллуса, которые не подвергались когда-либо



действию формальдегида; уровень ее различен у этих видов и соответствует их противомальдегидной устойчивости.

**Хлорамин.** Среди препаратов, содержащих хлор, хорошим средством для дезинфекции червоводен оказался хлорамин. Это белый или желтоватый, кристаллический порошок, представляющий собой натриевую соль хлорамина бензолсульфокислоты, в которой один атом хлора в виде натриевой соли непосредственно связан с атомом N амидной группы. Наиболее широкое распространение в качестве универсального средства для дезинфекции получил хлорамин Б ( $C_6H_5SO_2NNaCl \cdot 3H_2O$ ). Его используют для обеззараживания различных объектов, начиная с раневых поверхностей и слизистых оболочек и кончая неметаллическим инвентарем; он содержит 25—29% активного хлора и растворяется в воде в количестве до 20%.

Дезинфицирующее действие выделяемого в водном растворе хлора на бактерий проявляется в связи с замещением им водорода в аминокетонных макромолекулах белка. Кроме того, водные растворы обладают довольно сильным окислительным действием. Хлорамин сильнее всего действует на вегетативные формы бактерий, но в больших концентрациях (10%) проявляет спорцидные свойства. Хлорамин легко растворяется в воде, при низкой температуре и в негерметических помещениях достаточно надежен. В сухом состоянии он очень стоек и хорошо сохраняется при любых температурах, в бумажной, картонной, деревянной таре в сухих и слабоосвещенных или темных помещениях.

Для дезинфекции применяются активированные растворы хлорамина. Метод активации хлорамина впервые был применен отечественными учеными по отношению к спорам сибирской язвы (Куликов, Гинзбург, Виноградов, 1928). Бактерицидное действие активированных растворов возрастает в два-три раза. Это дает возможность уменьшить концентрацию растворов, не снижая результативности дезинфекции. Лучшими активаторами являются аммонийные соли сильных кислот: хлористый и азотнокислый аммоний. Вирус желтухи обеззараживается 2%-ным хлораминном с 2%-ным раствором хлористого или азотнокислого аммония (Осипов, 1947—1948). Споры пеприны погибают под действием 2%-ного раствора, активированного 1%-ным раствором аммонийной соли. Хлорамин без активатора или активированный серноокислым аммонием не оказывает необходимого действия. Согласно рекомендации САНИИШ, для дезинфекции червоводен и выкормочного инвентаря на каждые 10 л рабочего раствора берут 200 г хлорамина и столько же хлористого аммония или аммиачной селитры. Оба вещества последовательно растворяют в воде (при температуре не ниже 15°C). Раствор хлорамина с активатором годен для употребления только в течение 2 ч. Обработанное помещение закрывают на полдня, после чего проветривают.

Хлорамин вызывает коррозию металлов и разрушительно действует на масляные краски; там, где это существенно, дезинфекцию лучше проводить формалином. Хлорамин ядовит для человека и животных; ядовит он и для гусениц тутового шелкопряда. Растворы хлорамина при дезинфекции выделяют газообразный хлор, раздражающий слизистую век и дыхательных путей, поэтому во время обработки по-

мещений надевают противогаз и спецодежду, так как раствор обесцвечивает ткани.

Среди хлорсодержащих дезинфицирующих средств достаточно хорошо известен также гипохлорит кальция  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ . Его применяют для обеззараживания помещений и оборудования в животноводстве, воды в бассейнах, в медицинской и ветеринарной практике. И. П. Чичигина и Ю. М. Осипова (1979) испытали его эффективность на возбудителях болезней тутового шелкопряда, нанесенных на тканевые тест-объекты. По заключению авторов, 1%-ный гипохлорит кальция при норме расхода рабочего раствора 1 л на 2 м<sup>2</sup> обрабатываемой площади, активированный 0,2%-ной аммиачной селитрой, обладает таким же обеззараживающим действием, как и 4%-ный формалин.

**Хлорная (белильная) известь** — комплекс, состоящий из гипохлорита кальция (50—65%), гидрата окиси кальция (гашеная известь), углекислого кальция (карбоната кальция) и хлористого кальция.

Это белый, сухой, комковатый порошок, издающий характерный запах хлора, нерастворимый полностью в воде и образующий в ней взвесь (известковое молоко). Осадок состоит из гидроокиси кальция  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  и углекислого кальция  $\text{CaCO}_3$ . Раствор содержит главным образом  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  — гипохлорит кальция. Химически чистый препарат этой соли, легко растворимый в воде, тоже применяется для дезинфекции. Гипохлорит кальция под действием углекислого газа и влаги воздуха или кислоты разлагается с образованием хлорноватистой кислоты, которая, в свою очередь, становится источником свободного хлора и кислорода.

Количество хлора, который выделяется при действии на хлорную известь кислотой, называется *активным хлором* и служит для условного обозначения окислительной способности хлорной извести. Хотя окислителем является не хлор, а кислород, активность хлорной извести практически удобнее рассчитывать по хлору, так как кислород в этом веществе эквивалентен двойному числу атомов хлора. Определение активного хлора основано на том, что известь в подкисленной среде выделяет из раствора йодистого калия эквивалентное действующему хлору количество йода, которое находят титрованием стандартным раствором гипосульфита в присутствии крахмала как индикатора. Содержание активного хлора в белильной извести колеблется от 25 до 40%. Минимально допустимое его содержание в каждом из трех сортов составляет соответственно 28, 32 и 35%; несортовая известь (менее 15% активного хлора) непригодна для дезинфекции.

В процессе хранения хлорная известь теряет часть активного хлора, разлагается, образуется белый порошок  $(\text{CaCO}_3)$  с частичным выделением  $\text{HClO}$ . Месячная потеря может колебаться от 0,25 до 3% активного хлора. На свету, особенно солнечном, белильная известь быстро разлагается с выделением кислорода. Повышение температуры ускоряет разложение. В результате известь теряет обеззараживающие свойства. Хранить ее следует в темном, прохладном, сухом помещении, в некоррозируемой и плотно закрывающейся таре, так как хлорная известь очень гигроскопична.

Образующейся хлорноватистой кислоте принадлежит главная роль в обеззараживающем действии извести: разлагаясь и выделяя кислород, она действует на микробную клетку как энергичный окислитель, а, выделяя хлор, как источник хлорирования amino- и иминогрупп протоплазмы.

Сухой хлорной известью посыпают поверхность почвы, места складирования отходов выкормки из расчета 1 кг на 1 м<sup>2</sup>; применяют ее также для обеззараживания воды.

Обеззараживающее действие извести в растворе значительно превосходит эффективность от применения ее в виде порошка; в шелководстве употребляют 5%-ное хлороизвестковое молоко, что соответствует 1%-ному раствору активного хлора; им дезинфицируют помещения, употребляя свежеприготовленную взвесь для побелки стен, дезинфекции земляного пола, для обработки выброшенной подстилки из-под гусениц. Чтобы приготовить из хлороизвесткового молока осветленный раствор—хлороизвестковую воду, готовят 10—20%-ную водную взвесь в некоррозируемой емкости (керамической, деревянной): на 10 л воды берут соответственно 1 или 2 кг извести. Взвесь отстаивают в темном месте в течение суток, после чего отстоявшуюся жидкость сливают с садка и получают декантированную (слитую) 1—2%-ную хлороизвестковую воду.

Летальная экспозиция для некоторых возбудителей болезни шелкопряда при погружении их в раствор хлорной извести следующая: для спор возбудителя пембрины при температуре 21—26°C и концентрации активного хлора в растворе 2% — 2—5 ч, 5% — 0,5—2, 10% — 1 ч и 20% — 15 мин; для конидий возбудителя мускардины К. Миттани установил летальную экспозицию 5%-ного раствора при температуре 20—25°C — 15 мин. По данным Лягина, споры ноземы при 22°C в 5%-ном растворе (по активному хлору) погибали через час, споры бактерии (сенная палочка) при температуре 18°C и концентрации раствора 2,5% — через 2 ч; при этом гибель была не полной. Неспорообразующие бактерии (туркестанская бактерия) в слабых растворах (0,05 и 0,1%) при температуре раствора 18°C погибли соответственно через 10 и 5 мин, а стрептококки гибли в первом случае быстрее, через 5 мин. Наиболее интенсивное отмирание вегетативных форм микробов в водных растворах этого препарата наблюдается в первые 30 мин, затем процесс идет относительно медленно.

Недостатки хлорной извести: 1) щелочная реакция используемого раствора, его окисляющее и белящее действие портят вещи; 2) содержание активного хлора подвержено большим колебаниям; 3) в присутствии органических веществ обеззараживающее действие ослабляется.

**Негашеная известь** (едкая известь, окись кальция СаО). Белое пористое вещество в виде твердых глыб. Перед употреблением для дезинфекции известь гасят, смачивая водой, вследствие чего она сильно разогревается, выделяются пары воды. Поэтому негашеную известь называют еще кипелкой. Твердые куски рассыпаются в мелкий сухой порошок пушонку — гашеную известь или гидроксид кальция Са(ОН)<sub>2</sub>. Чтобы погасить 1 кг извести, надо примерно 600 см<sup>3</sup>

воды. Из свежегашеной извести готовят 10—20%-ное известковое молоко. Во время приготовления раствора следует остерегаться, чтобы брызги не попали в глаза. Известковым молоком белят помещения, чем достигается, кроме обеззараживания, механическая изоляция микробов на поверхности стен. Им можно заливать также зараженный материал (подстилку, трупы червей), пол в помещении и зараженную территорию у входа в черводводню. Наибольшим дезинфицирующим действием обладает свежеприготовленное известковое молоко: оно убивает не образующих споры бактерий и споры грибов. Для устойчивых споровых форм (бациллы, нозема) обеззараживающее действие его очень незначительно.

Просветленный раствор, получающийся после отстаивания известкового молока, называется известковой водой и обладает свойствами сильной щелочи. На воздухе известковая вода поглощает углекислоту и мутнеет, вследствие образования углекислого кальция. Использование ее для дезинфекции весьма ограничено, так же как и всякого щелочного раствора. При хранении в сыром помещении негашеная известь «гасится», рассыпается в порошок и в таком состоянии для дезинфекции уже не пригодна.

Сулема  $\text{HgCl}_2$  — двухлористая ртуть; фармацевтическое название — сублимат. Продается в виде крупных бесцветных кристаллов или таблеток (по 1—0,5 г), часто окрашенных розовой минеральной краской, чтобы бесцветный ядовитый раствор не был принят за чистую воду; в таблетках сулема смешана в равных весовых частях с хлористым натрием. Применяются обычно 0,1—0,5%-ные растворы в дождевой или дистиллированной воде. В горячей воде лучше растворяется, чем в холодной: при 17°C насыщенный раствор содержит 6,5% сулемы (1 : 16). Растворы эти не имеют запаха, прозрачны и бесцветны. Простейшая качественная реакция: капля раствора оставляет на медной монете серебряное пятно амальгамы; реакция чувствительна даже при разведении 1 : 5000. Для количественного определения обычно применяется йодометрический метод объемного анализа.

Ртутьсодержащие соединения обладают сильным обеззараживающим действием; многие органические соединения с ртутью по силе действия несоизмеримы с сулемой. Так, минимальная концентрация, способная задержать размножение стафилококков для хорошо известного антисептика-мертиолята (натриевой соли этилмеркуртисалициловой кислоты  $\text{C}_2\text{H}_5\text{HgSC}_6\text{H}_4\text{COONa}$ ) составляет 1 : 1000 000, а для мерфенила ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{HgOH} \cdot \text{C}_6\text{H}_5\text{CHgNO}_3$ ) даже 1 : 4 000 000, тогда как для сулемы применительно к тем же бактериям бактериостатический эффект достигается при концентрации 1 : 200 000. Ароматические соединения ртути обладают более сильным бактерицидным действием и слабее — фунгицидным, тогда как алифатические соединения ртути (ациклические — соединения жирного ряда) сильнее действуют на грибы и слабее на бактерий.

По отношению к спорам сулема обеззараживающего действия, практически, почти не проявляет или обнаруживает его в слабой степени. И, все же, растворы двухлористой ртути — наиболее сильное дезинфицирующее средство среди тех, с которыми встречаются шелко-

воды: концентрация 1 : 1000 в несколько минут убивает неспорных бактерий. По данным Казаровой, при 24—25°C летальная экспозиция раствора сулемы с концентрацией 1 : 40 000 для туркестанской бактерии и стрептококков шелкопряда составляла 5 мин. Такая же летальная экспозиция, по данным Т. Фудзи, была получена для конидий мускардины при концентрации 1 : 1 000 (при концентрации 1 : 4 000 она составляла 20—30 мин). В японском справочнике по гренажу отмечено, что при погружении в раствор сулемы с концентрацией 1 : 200 споры ноземы шелкопряда гибнут через 5 мин, споры бациллы тюрингиензис вар. сотто — через 8 мин, а вирус желтухи — через полчаса.

Сулема как дезинфицирующее средство имеет существенные недостатки. Растворы ее малостойки и разлагаются под влиянием различных неорганических и органических веществ: белков, жиров, кислот солей, мыла, солей щелочноземельных металлов, жесткой воды; поэтому она не пригодна для дезинфекции объектов, загрязненных этими веществами, покрытых масляной краской, а также при употреблении совместно с мылом или щелочью. Сулема непригодна для дезинфекции металлических предметов, которые амальгамируются ею. Сулема очень ядовита и поэтому хранится по известным правилам. Она совершенно неприменима для дезинфекции предметов, соприкасающихся с пищей. Противоядием при отравлении людей могут служить молоко и яичный белок, принимаемые немедленно и в большом количестве; соединяясь с белками, сулема образует нерастворимые альбуминаты. Наиболее надежное средство для удаления следов сулемы с дезинфицированных предметов — спирт.

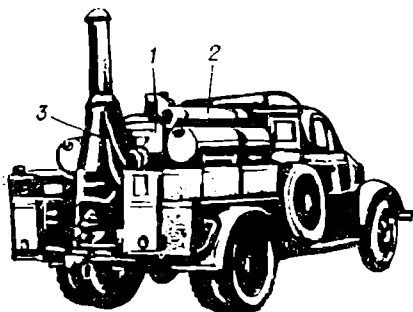
В шелководстве сулема может быть использована для опрыскивания червоводен и гренажных помещений 0,5%-ными растворами. Японская инструкция не рекомендует пользоваться сулемой для дезинфекции предметов, непосредственно соприкасающихся с кормом и греней, а также грено- и листохранилищами. Целесообразнее всего использовать это сильное обеззараживающее средство в рабочих помещениях научно-исследовательских учреждений — в лабораториях, экспериментальных червоводнях, инсектариях и, особенно, для обеззараживания различных предметов, соприкасающихся с зараженными насекомыми и другими носителями инфекции. При дезинфекции помещений потолок, пол и стены вытирают тряпкой или щеткой, смоченной раствором, содержащим 0,5% сулемы и 1% соляной кислоты или 0,5% поваренной соли. Дезинфицируемая поверхность должна оставаться мокрой в течение 20—30 мин. Лучшее время для дезинфекции — облачный, жаркий и безветренный день. Помещения обрабатывают последовательно, начиная с потолка; особенно тщательно смачивают углы и щели. Во избежание порчи металлические предметы предварительно покрывают парафином или растительным маслом. Циновки, тростниковые и веревочные съемники, этажерки, подстилочную бумагу смачивают раствором сулемы, чтобы она хорошо впиталась, затем оставляют в таком состоянии на несколько часов. После этого промывают и просушивают на солнце. Сулему употребляют также для вымачивания халатов, спецодежды, полотенец.

## 6.4. Техника дезинфекции

**Техника дезинфекции помещений и инвентаря.** Помещение перед дезинфекцией освобождают от посторонних предметов. Потолок и стены обметают влажным веником, пол моют. Если в помещении зимовал скот, то с пола, пропитанного навозной жижей, снимают слой земли толщиной 5—10 см, насыпают свежую землю и утаптывают. Щели в стенах замазывают глиной и белят. Мусор после уборки сжигают. Выкормочный инвентарь (циновки, этажерки, корзины и т. д.) ошпаривают крутым кипятком со щелоком и выставляют на два-три дня на солнце. После уборки в помещение вносят все предметы, используемые при червокормлении, и приступают к дезинфекции.

Большие колхозные и совхозные червоводни, инкубатории, помещения гребенных заводов дезинфицируют мощными распылителями и механизированными дезинфекционными установками. В ветеринарной практике используют установку ДУК-2, смонтированную на шасси грузового автомобиля. Установка состоит из цистерны вместимостью 1 м<sup>3</sup> для рабочего дезинфицирующего раствора; двух резервуаров-бачков вместимостью 50 л для исходных концентрированных дезинфекционных средств и подогревателя (водогрейного котла). Раствор подогревается в котле до 90°С и по системе трубопроводов попадает в напорный и приемный шланг (рис. 101). При расходе 1 л рабочего раствора на 1 м<sup>2</sup> поверхности за 8 ч установкой можно обработать около 3 000 м<sup>2</sup>.

Небольшие помещения опрыскивают широко распространенными в шелководческой практике ранцевыми аппаратами или гидропультом. Ранцевые аппараты выпускают трех типов: опрыскиватели ранцевые диафрагмовые — ОРД с диафрагмовым насосом с воздушным колпаком, приводимым в действие ручным рычагом; опрыскиватели ранцевые поршневые — РДП-4 с поршневым воздушным насосом, расположенный снаружи резервуар соединен трубкой с его верхним дном; опрыскиватель ранцевый пневматический ОРП-В «Автомаск» (рис. 102); ранцевый аппарат типа «Автомаск» удобен для переноски и пользования, производителен, просто устроен и прочен. Вместимость 12 л, заправленный аппарат весит 21,3 кг. В зависимости от типа наконечника (распылителя) при работе аппарата получается различный по размеру конусообразный распыл: от 1,5 до 2 м в диаметре у основания конуса, находящегося на расстоянии 1,3—2 м от отверстия наконечника. Преимущество его перед остальными ранце-



101. Установка ДУК-2:

1 — цистерна для дезинфицирующего раствора; 2 — резервуары для исходных концентрированных дезинфекционных средств; 3 — подогреватель.

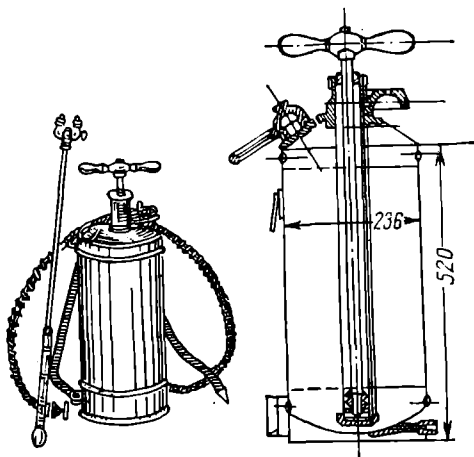
выми аппаратами в том, что опрыскивание протекает без дополнительных усилий на качание насоса, благодаря чему все внимание сосредоточивается на управлении брандспойтом.

Расход жидкости нормируют из расчета потребности на одну коробку грены, на единицу кубатуры или площади. Наименее точны расчеты на коробку грены и единицу кубатуры; они могут широко колебаться в зависимости от линейных размеров помещения, количества ниш в стене и т. д. Нормы расхода, исчисленные на единицу площади, без учета особенностей дезинфицируемой поверхности, способов дезинфекции и свойств применяемого вещества, также не могут быть вполне точными. Например, расход жидкости для надлежащего смачивания глинобитных стен будет вдвое больше, чем для стен с черной штукатуркой, а минимальное количество жидкости для смачивания поверхности из жердей или камыша точному учету не поддается. Кроме того, предел необходимого увлажнения установить трудно, и субъективные расхождения здесь всегда возможны. Наконец, величина расхода жидкости зависит от способа ее распределения на дезинфицируемой поверхности (кисть, тряпка, веник, опрыскиватель с различной конструкцией распылителя и т. д.).

Наиболее экономный расход жидкости дают опрыскиватели и распылители, равномерно увлажняющие орошаемую поверхность. В этом случае в зависимости от свойства поверхности на  $1 \text{ м}^2$  нужно 0,25—0,75 л жидкости. На помещение площадью в  $50 \text{ м}^2$  требуется от 12 до 36 л жидкости. Эту норму следует считать минимальной, при аккуратном и умелом использовании жидкости. Раствор можно экономить, менее обильно смачивая потолок, так как теоретическая высота зоны, подлежащей обеззараживанию, не превышает 2 м.

Важным условием эффективного применения дезинфицирующих средств являются температура и влажность воздуха. Циркуляция и сухость воздуха ускоряют испарение растворов на поверхности обеззараживаемых предметов и сокращают срок их действия. Вопреки существующим представлениям улетающий из растворов формальдегид не имеет существенного значения для обеззараживания; эффективность обработки достигается только при непосредственном соприкосновении растворов с микроорганизмами.

Перед опрыскиванием в помещении плотно закрывают окна, двери, вентиляционные отверстия, замазывают щели, смачивают пол и стены водой. По окончании работы опрыскиватель промывают водой, так как



102. Опрыскиватель ранцевый пневматический ОРП-В «Автомаск».

химические вещества разрушают металл. После дезинфекции помещение оставляют на сутки закрытым, а затем открывают окна, двери и проветривают его. Чтобы быстрее удалить запах формальдегида, помещение орошают 20%-ным раствором аммиака, которого берут по объему в два раза меньше по сравнению с количеством израсходованного формалина.

Дезинфицированное помещение ни для каких других целей, кроме червокормления, занимать нельзя. Поэтому санитарную обработку проводят в возможно более сжатые сроки, перед получением гусениц.

**Дезинфекция поверхности грены.** Задача современного гренажа в значительной мере заключается в приготовлении незараженной грены, отложенной бабочками, которые при поголовном микроскопическом исследовании оказываются здоровыми. Инструкция по приготовлению грены предусматривает браковку коконов и кладок по признаку зараженности их не только пембриной, но и возбудителями других болезней. Например, браковке подлежат кладки от бабочек, при микрокопировании которых были обнаружены бактерии. Это мероприятие рекомендовано еще Л. Пастером. По представлениям того времени, присутствие бактерий в теле бабочек указывает на заболевание шелкопряда фляшерией и может передать следующему поколению возбудителей этой болезни, а также предрасположение к ней. Между тем существуют три возможности для формирования бактериальной флоры в теле бабочек:

1) бактерии, унаследованные от личиночной стадии физиологически ослабленного шелкопряда и размножившиеся в кишечнике бабочек;

2) бактерии, размножившиеся в трупах бабочек, погибших от септицемии;

3) бактерии, размножившиеся в трупах бабочек вследствие неполной их консервации (высыхания) при хранении во влажном и плохо проветриваемом помещении.

По результатам микрокопирования бабочек нельзя судить ни о наследственном предрасположении, ни о заразных свойствах обнаруженных бактерий, ни о заражении грены, отложенной этими бабочками. Между состоянием здоровья выкормов, фактом обнаружения бактерий в бабочках и микрофлорой грены последовательности может и не быть.

Изучая возможность перехода бактериальной флоры из тела бабочки в яйцо, Мазер тщательно дезинфицировал его поверхность и затем растирал в стерильном бульоне стеклянной палочкой, вставленной в ватную пробку пробирки. Сделанные по этому методу посевы в отдельных случаях прорастали; по мнению Мазера, это вызывали бактерии, находящиеся внутри яйца. Он указывает также, что процент проросших посевов возрастает тогда, когда гrena взята от бабочек, трупы которых содержали обильную бактериальную флору. Возможно, что рост бактерий в посевах Мазера наблюдался вследствие несовершенной дезинфекции поверхности грены, хотя появление бактерий внутри грены, насколько можно судить по результатам исследования яиц домашних птиц, вполне правдоподобно. Дальнейшая судьба



зараженной бактериями грены неизвестна; возможно, что она погибает во время хранения и инкубации, или же, напротив, дифференцирующиеся в процессе эмбриогенеза мезодермальные клетки разрушают бактерий. В литературе известны случаи проявления целлюлярного (фагоцитарного) иммунитета у клеток дифференцирующихся зародышевых листков.

Более определенны сведения относительно бактерий, встречающихся на скорлупке грены. Поверхность грены может быть загрязнена микроорганизмами различного происхождения. Состав их довольно разнообразен. Чаще встречаются широко распространенные в природе бактерии сапрофиты — стафилококки и споровые палочки. Источником загрязнения служат пылевые частицы и трупы бабочек, сохраняющиеся в изоляционных мешочках вместе с греной. Иногда бабочки содержат относительно устойчивую флору, состоящую главным образом из стрептококков и унаследованную от ослабленных гусениц.

В. Д. Штибен установил, что выкормки, болюющие чахлостью, дают много бабочек (свыше 27%), зараженных стрептококками; на поверхности отложенной ими грены, как правило, содержатся эти бактерии, а вышедшие из нее гусеницы оказываются стрептококконосителями, причем такие выкормки с повышением температуры более 23°С легко заболевают чахлостью (Штибен, Максианович). По-видимому, поверхностное заражение грены патогенными для шелкопряда бактериями менее опасно, чем возбудителями пембины, желтухи и мускардины, так как даже наиболее опасные для шелкопряда септические инфекции в младших возрастах осуществляются с большим трудом. Известен случай, когда гrena перед инкубацией была сильно загрязнена чистой культурой возбудителя септицемии шелкопряда *Bact. prodigiosum*. Наблюдение за гусеницами первого возраста не установило случаев гибели, вызванной этой бактерией, а подробное бактериологическое обследование во втором возрасте не смогло обнаружить ее ни у шелкопряда, ни на самой выкормочной поверхности (Михайлов, 1945).

Бабочки, пораженные мускардиной, встречаются крайне редко; споры гриба все же загрязняют поверхность грены, попадая на нее из иных источников; они способны прорасти на скорлупке, внедряться внутрь грены и вызывать ее гибель. Гренажное производство бракует партии, содержащие свыше 3% мускардинных коконов, руководствуясь не столько санитарными соображениями, сколько тем, что наличие их уменьшает процент выхода бабочек. Гренажные заводы всегда браковали партии коконов с «глухарями», еще до того, как возможность проникновения вируса ядерного полиэдроза в грену была доказана; впрочем, Л. М. Тарасевич считает, что вирус значительно чаще находится на поверхности скорлупки. Наибольшую безопасность в эпизоотическом отношении представляет гrena, на поверхности которой нет болезнетворных микроорганизмов.

Некоторую пользу приносят механическая очистка и промывка грены, освобождающие ее поверхность от загрязнений и микроорганизмов. Лучшие результаты может дать дезинфекция.

Японская инструкция рекомендует дезинфицировать грену в ноябре или декабре, перед промывкой ее, или же весной, перед инкубацией. Для этого пользуются 2—3%-ным раствором формалина, погружая в него грену при температуре 21°C. Время обработки 2%-ным формалином — 30 мин, 3% — 20 мин. После тщательной промывки водой грену просушивают.

Шуршикова не наблюдала вредного действия на грену 70-минутной ванны из 2%-ного формалина и 50-минутной из 3%-ного при температуре 10°C и последующей промывки водой в течение 20—25 мин. Хотя японские специалисты и предостерегают против пользования сулемой для дезинфекции грены, Казарова показала, что обработка 0,1—0,2%-ными растворами сулемы не влияют на оживляемость грены.

Итальянские авторы рекомендуют дезинфицировать грену против мускардины погружением на несколько минут в 5%-ный лизоформ или 0,1%-ную сулему. Известно также, что соляная кислота с удельной плотностью 1,129 и экспозицией 8 мин при 30°C полностью дезинфицирует поверхность грены от всех патогенных для шелкопряда микроорганизмов.

В соответствии с инструкцией МСХ СССР (1948) грену на гренажных заводах дезинфицируют 3%-ным раствором формалина, продолжительность обработки 50—60 мин, после чего ее промывают проточной водой в течение 25—30 мин. Часто встречающиеся на поверхности грены спорообразующие бактерии проявляют, по мнению И. А. Кириченко (1977), значительную устойчивость по отношению к формалину. Он предложил применять для обработки грены эритромицин-антибиотик, продуцентом которого является почвенный актиномицет *Streptomyces erythreus*. Он обладает широким спектром сильного антимикробного действия против многих грамположительных бактерий. Грену обрабатывали раствором эритромицина в концентрации 2 млн. единиц на 1 л воды при экспозиции 45 мин. По результатам бактериологического контроля установлено, что предлагаемое средство обеззараживает естественно инфицированную грену на 97,5%, тогда как 3%-ный формалин, взятый в качестве контроля, только на 27%. Этот же автор с соавторами (1979) испытывали обеззараживающее действие на грену дихлорфоса. Подобно многим фосфорорганическим инсектицидам, это сильный ингибитор холинэстеразы в развивающейся грене (с 5—6 дня после откладки); он оказывает на нее отрицательное действие, чем значительно ограничивает допустимые сроки дезинфекции грены, несмотря на возможный обеззараживающий эффект.

Научные сотрудники Украины и Узбекистана Т. Б. Аретинская, И. М. Азимджанов и В. Н. Синицкий (1981) провели испытание антибиотика патулина, продуцентом которого является *Aspergillus clavatus* в качестве средства для дезинфекции поверхности грены.

Кириченко и Рыхлицкая (1982) предложили для дезинфекции грены в гренажном производстве антибиотик канамицин, относящийся к группе стрептомицинов и выделенный в 1957 г. Умедзавой из культуральной жидкости актиномицета *Streptomyces kanamyceticus*. Антибиотик обладает значительной бактерицидной активностью и ме-

нее токсичен для теплокровных, чем стрептомицин. Ими испытан 0,2%-ный раствор (2 млн. ед на 1 л), в который погружали грену в марле на 40 мин. Результаты сопоставлялись с дезинфицирующим действием эритромицина, предложенного для той же цели ранее (Кириченко И. А., 1977). Канамицин не снижает жизнеспособность грены и не уступает эритромицину в обеззараживающем действии, но имеет ряд существенных преимуществ. Рекомендация внедрена в гренопроизводство Украины.

### 6.5. Целлюлярный гренаж как профилактическое мероприятие

Из истории перестройки гренаж в интересах борьбы с пембриной. Наиболее эффективный и радикальный метод предупреждения заболевания выкормок пембриной — приготовление грены от бабочек, содержащих в себе возбудителя этой болезни. Чтобы это положение приобрело для шелководства основополагающую значимость, нужен был авторитет Л. Пастера, подтвердившего сделанные до него наблюдения Осимо (1859) и Виттадини (1859), что патоген может распространяться не только от больных гусениц к здоровым, загрязняя спорами лист шелковицы, но и через зараженную грену, отложенную больной бабочкой. В конце 60-х годов прошлого столетия Пастер, руководствуясь результатами своих опытов, предложил «закрыть пембрине именно этот путь проникновения паразита на выкормки шелковичных червей». Для этого гренопроизводство должно было оставлять грену только от здоровых бабочек после их микроскопирования и уничтожать зараженные кладки.

К тому времени гrena успела стать предметом широкой международной торговли, и пембрина стала распространяться по торговым путям из стран Юго-Западной Европы в страны Ближнего Востока, Закавказье и Среднюю Азию. Производственная деятельность гренажных предприятий тогда еще сводилась к сортировке и удалению дефектных коконов (скупленных гренером, чаще всего, на рынках), к организации папильонажа, сбору грены, провеиванию ее от пыльцы бабочек и от мусора, к мойке, сушке и развеске грены в фирменную упаковку.

Пастер предложил новый порядок приготовления грены. Бабочек-самок, тотчас после их распаривания, рассаживали поодиночке на квадратные лоскутки материи. Отложивших грену бабочек заворачивали в уголок лоскутка и закалывали, во избежание потери, булавкой, затем их подвергали микроскопическому исследованию на присутствие в них спор пембрины.

Новый способ приготовления грены был сопряжен с дополнительными расходами труда и материалов, однако страх перед катастрофическими эпизоотиями и стремление сохранить напуганную клиентуру заставили собственников гренажных предприятий пойти на дополнительные расходы по приготовлению грены, вызванные предложением маститого ученого. Гренеров смущала также необходимость завести на своих предприятиях микроскоп — прибор, который в то время был еще связан с представлением о «высокой» науке, недоступной широ-

кому кругу людей. По словам Пастера, он был вынужден демонстрировать шелководам, как его дочь, несматря на юный возраст, успешно справляется с микроскопическим исследованием бабочек.

Одним из участников практической реализации предложений Пастера был австрийский ученый Ф. Г а б е р л а н д т (1826—1878), работавший на шелководческой опытной станции в Граце в Штирии (юго-восточная провинция Австрии). Он использовал для изоляции бабочек сначала марлевые, а затем перфорированные полупергаментные мешочки. В Италии первым, кто применил эти мешочки на своем гренажном предприятии, был Гвидо Сузани. Приписать приоритет кому-либо из этих двух имен сейчас не представляется возможным, тем более, что известный итальянский исследователь в области шелководства Версон был частым гостем в Граце. Так или иначе, изоляционные мешочки из полупергамента, сложенные в форме тетраэдра, стали вместе с микроскопом символом метода Пастера, получившего название *целлюлярного гренажа*.

В стране исконого и наиболее развитого шелководства — в Японии, где бабочки местных пород откладывают приклеивающуюся грену, заимствованный метод целлюлярного гренажа был видоизменен. Изоляция бабочек осуществлялась на картоне, разграфленном на 28 нумерованных квадратов и напоминающих по форме карточки для игры в лото. Бабочек раскладывали по этим клеточкам и изолировали друг от друга высокими металлическими кольцами, мешающими им перемещаться на соседнюю клетку. После откладки грены бабочек раскладывали по 28 нумерованным ячейкам картонного пенала, в соответствии с нумерацией на картоне.

**Сущность целлюлярного гренажа.** Наиболее последовательная и строгая система целлюлярного гренажа разработана и освоена государственной гренажной промышленностью Советского Союза. В первые годы существования Советского государства на созданных в шелководческих республиках многочисленных гренажных заводах был внедрен разработанный на основе достижений отечественной (Шавров, Жмуйдзинович, Иванов, Платов, Щербаков и др.) и зарубежной науки и практического опыта единый принцип построения технологии промышленного целлюлярного гренопроизводства (Щербаков, 1952; Ковалев, Шевелева, 1966).

Согласно ныне существующей схеме построения племенной работы, грену предварительного размножения из районированных пород, одобренных Государственной породоиспытательной сетью, готовят племенные станции. Приготовленную ими грену передают гренажным заводам для выкармливания племенных партий коконов. Из племенных коконов на заводе производят основной вид продукции — грену для промышленных выкормок в колхозах и совхозах, представляющую собой гибридные комбинации, полученные путем спаривания бабочек, вышедших из племенных коконов. Коконы промышленных выкормок направляют в морку, где они разматываются на шелкомотальных фабриках, а шелк-сырец служит сырьем для текстильной промышленности.

Микроскопическая проверка на зараженность производится на всех этапах гренопроизводства. Первое выборочное микроскопиче-

ское исследование в прежние годы проводили на заводе, перед инкубацией племенной грены: исследовались на педрину заранее отобранные и инкубированные образцы. На племенных выкормках, начиная с третьего возраста, проводится проверка на зараженность гусениц педриной. Микроскопическому исследованию подвергают образец гусениц с каждой коробки грены и, прежде всего, — отставшие в развитии и подозрительные на заболевание, обнаруживаемые чаще в подстилке.

Выкормки, на которых обнаружены педринозные гусеницы, сжигают вместе с подстилкой, а помещенные выкормки, выкормочный инвентарь и прилегающую к черводне территорию дезинфицируют.

Поступившие на завод коконы предварительно оценивают по урожайности и количеству карапачаха, которое не должно превышать 1% от массы партии. Каждую принятую заводом партию коконов подвергают микроскопическому исследованию на зараженность педриной; эта проверка называется *предварительным исследованием по куколке*. Для этого из каждой партии отбирают образцы (100 коконов) и инкубируют их до полного созревания куколок; как только у куколок потемнеют глаза, их по одной растирают в ступках с несколькими каплями дистиллированной воды. На предметное стекло наносят три капли, по одной из каждой ступки. Каждый препарат (т. е. каплю под покровным стеклом) исследуют в трех полях зрения. При обнаружении спор в каком-либо препарате партию коконов отправляют в морку.

Второе предварительное исследование проводится по бабочке. Это вызвано тем, что у куколок не все плазмидии ноземы успели превратиться в споры и потому случаи позднего заражения шелкопряда на выкормке могут быть пропущены. Для этого исследования в первый день вылета бабочек и не позже второго дня их выхода из кокона из каждой партии коконов, принятых в гренаж и разбитых по полу, выборочно отбирают 100 бабочек. Стараются отбирать главным образом самцов, чтобы уменьшить расход самок. Для микроскопирования растирают всю бабочку, кроме крыльев. Партии, в образце которых по результатам микроскопирования оказалась хотя бы одна педринозная бабочка, отправляют в морку.

Второе предварительное исследование, которое проводится по бабочкам, должно быть завершено в короткий срок — до начала их изоляции. По итогам микроскопирования этих бабочек подтверждается пригодность коконов для гренопроизводства и определяется норма их изоляции. По первоначальным правилам приготовления целлюлярной грены при зараженности партии от 0 до 1% — изолировали в одном мешочке три бабочки, при заражении 2—3% — по две, более 3% — по одной бабочке.

По истечении одного месяца после откладки грены и перед сплошным микроскопированием бабочек кладки грены сортируют, удаляя по внешнему виду «физиологический брак» и неполноценные кладки; затем приступают к микроскопированию бабочек. При сплошном микроскопировании всех бабочек, отложивших грену, оторванное от головогруды брюшко растирают на специальных машинах, в ступке вместе с несколькими каплями воды. Из трех ступок наносят по одной

капле на одно предметное стекло и каждую каплю покрывают стеклом. Каждую каплю, называемую гренерами *препаратом*, микроскопируют в пяти полях зрения. При исследовании племенных партий брюшко бабочки растирают в ступке вручную и препарат рассматривают в 10 полях зрения. Результат сплошного микроскопирования партии кладок с зараженностью не более 1% контролируют по оставшейся жидкости с растертым брюшком, предварительно слив ее из девяти ступок в одну. По результатам анализа кладки делят на здоровые, зараженные и сомнительные — с различными микроорганизмами, в том числе похожими на споры пембрины. Зараженность партий кладок в процентах определяют по числу пембринозных бабочек (т. е. препаратов), деленных на общее число исследованных бабочек и умноженных на 100. Если в партии более 1% зараженных кладок, ее уничтожают. Партию с более слабым заражением направляют на производственное контрольное микроскопирование по головогрудь бабочек. Следовательно, помимо брюшка бабочек, отдельному микроскопированию подвергается также их головогрудь. При заражении партии от 0,6 до 1% в одной большой ступке вручную растирают головогрудь от четырех бабочек, при 0,1—0,5% — от шести бабочек. Из партий, свободных от заражения по результатам сплошного микроанализа, в одной ступке растирают головогрудь от восьми бабочек. Производственный контроль выполняется штатом микроскопистов-контролеров.

Производство гренажных заводов проверяла Государственная инспекция по качеству грены Министерства сельского хозяйства СССР. Контролировалась вся гrena, приготовленная отечественными заводами, племенными шелководческими станциями, научно-исследовательскими учреждениями или импортированная в нашу страну. Инспекция отбирала на заводе образцы грены; от промышленной — вдвое меньше образцов, чем от племенной. Образцы выдерживали не менее месяца при температуре зимовника (+2, +4°C), затем грену инкубировали до почти полного выхода гусениц. Анализ зашифрованных образцов поручался другому гренажному заводу, которому не было известно происхождение грены. Для анализа все содержимое инкубированного образца — гусеницы, нежившая гrena и скорлупки — помещают в ступку и растирают в 2%-ном растворе едкого калия или едкого натра. Госинспекция разрешает реализацию только той партии грены, в которой не была обнаружена пембрина. В наши дни функции государственного контроля возложены на управления шелководства Министерства сельского хозяйства республики.

За годы своего существования технология отечественного гренопроизводства, многие стороны его оснащения и организации претерпели ряд существенных изменений. То, о чем здесь сообщалось, не имело в виду ознакомить читателей со всеми сторонами работы гренажных заводов наших дней.

Цель этого краткого описания, опускающего многие технологические детали, показать, что, создавая промышленное гренопроизводство, у нас стремились, прежде всего, к тому, чтобы оно функционировало как непроницаемый для пембрины многослойный фильтр. При

современных укрупненных масштабах производства такая «ювелирная» технология целлюлярного гренажа оказалась труднореализуемой. Для тех, кто закладывал фундамент советского шелководства, ставка на борьбу с пембриной средствами промышленного гренс-производства имела свое основание. В те годы шелководство в его исконных зонах сохраняло еще нетронутыми особенности этого древнего народного промысла, основанного на домашнем приготовлении гренны. Перспектива замены домашней гренны продукцией заводов, за которую приходилось платить деньги, представлялась всем нам тогда нелегким процессом, в котором главным союзником могла стать гарантированная незараженность гренны.

Много позже, когда целлюлярный гренаж достиг определенных результатов в борьбе с пембриной, усилия гренных заводов были направлены на расширение объема производства гренны, как этого требовало увеличение производства коконов. Предстояло осуществлять это в рамках имеющегося технического обеспечения и сложившейся технологии гренажа; к решению этой задачи шелководы не были готовы. В поисках выхода за счет устранения наиболее трудоемких процессов пришлось пойти по наиболее легкому пути — пересмотру существовавших нормативов изоляции бабочки и уплотненному микрокопированию.

**Варианты отступления от принципов целлюлярного гренажа.** В европейских странах, после того как микрокопирование бабочек стали применять в гренпроизводстве, предприниматели широко использовали форму выборочного контроля на зараженность бабочек. Партии из большего или меньшего количества бабочек, не разобренных изоляцией, откладывали совместно грену, и контроль за ее зараженностью устанавливался выборочно, путем микрокопирования нескольких бабочек, чтобы иметь примерное представление об уровне инфицированности всей отложенной гренны. Этот, намного более дешевый, но гораздо менее надежный способ приготовления гренны, получил название *индустриального*. Индустриальный способ приготовления гренны был подсказан коммерческими интересами предпринимателей, а перед наукой, обслуживающей эти интересы, была поставлена задача обосновать целесообразность этих начинаний. В нашей стране, с первых лет существования советского шелководства, индустриальный метод приготовления гренны был решительно запрещен. Имелось в виду, что гренпроизводство, как всякая племенная работа, является фундаментом прогресса отрасли и при ее организации неразумно руководствоваться коммерческими соображениями.

Неуклонное и последовательное соблюдение целлюлярного принципа приготовления гренны и высокая требовательность к качеству работы на протяжении четверти века привели к тому, что на гренных заводах Среднеазиатских республик, где еще недавно использовалась не свободная от пембрины гренна домашнего приготовления («джойдоры»), зараженность снизилась до тысячных долей процента, а лаборанткам — чтобы не забывали внешнего вида спор — приходилось время от времени показывать демонстрационные препараты. В связи с этим И. А. Щербakov (1952) в свое время предупреждал: «Исследова-

ние, таким образом, сводится к просмотру основной массы совершенно здоровых кладок. Вследствие этого возникла вредная мысль, нельзя ли уплотнить препараты и составлять их из содержимого не одного мешочка, а нескольких». Искушение «упростить» целлюлярный гренаж и на этой основе несколько удешевить приготовление грены было очень велико. С. А. Миносьянц предложил на заводах, где зараженность пеприной составляла менее 0,05%, использовать групповую изоляцию из пяти бабочек. В. А. Струнников разработал способ укрупненной групповой изоляции бабочек с уплотненным микрокопированием, предназначенный для заводов с низким уровнем зараженности партий: при зараженности 0,001% изолируется по 100 бабочек, при зараженности 0,001—0,05% — по 50 бабочек, при зараженности более 0,05% — по 25 бабочек. Для их изоляции были рекомендованы коробочки вместо мешочков. Уплотненное микрокопирование, предложенное В. А. Струнниковым (1966), предусматривало более тщательное микрокопирование с применением отставивания и центрифугирования микрокопируемой жидкости, использованием фазово-контрастного устройства и некоторых других особенностей организации микрокопического анализа.

В сочетании с некоторыми организационно-техническими средствами, страхующими от ошибок при анализе, методы групповой изоляции в своих крайних выражениях вплотную приближались к индустриальному способу приготовления грены. Более того, в таком виде они стали проникать в практику работы тех заводов, где в течение ряда лет не наблюдалось заражения пеприной. В одних случаях эта модификация состояла в том, как это имело место в практике приготовления грены в Туркменской ССР и в РСФСР, что анализ на пеприну ограничивался микрокопированием гусениц во время выкормки и предварительным анализом по куколке и бабочке. На других гренажных заводах групповая изоляция по 50 и 100 бабочек помогала преодолеть организационные трудности, особенно в дни их массового вылета.

Еще более решительным отходом от целлюлярного способа приготовления грены, рассчитанным на то, чтобы совершенно избавить завод от операций по микрокопированию бабочек, был так называемый *биологический способ приготовления грены*, предложенный Э. Ф. Поярковым (1945). Куколок в коконах прогревают в специальных термокамерах («биокамерах», после чего весь процесс приготовления грены идет в обычном порядке, но без операций по изоляции самок и микрокопированию их. Термическое воздействие существенно снижало зараженность кладок, но некоторое «статочное» присутствие патогена все же сохранялось.

Второй метод приготовления грены с использованием ее термической обработки без микрокопирования бабочек был предложен Б. А. Астауровым (1952).

**Причины появления зараженной грены в продукции гренажных заводов.** Замена принципов целлюлярного гренажа, в том виде, как он был разработан специалистами, стоявшими у колыбели советского шелководства, на более простые и дешевые способы приготовления



грены, но с большей вероятностью пропуска герминативной инфекции довольно быстро обнаружила свою слабую сторону. Вспышки заболевания пеприной на выкормках стали поводом для серьезного беспокойства и вызвали попытку уяснить причину их появления, не затрагивая, предпочтительно, тех перемен в технологии гренопроизводства, которые были к этому причастны. В свое время, до начала «модернизации» целлюлярного метода, когда на отдельных заводах по причине производственных упущений пеприне удавалось «проскочить», в Среднеазиатском НИИ шелководства возникли споры относительно возможности существования слабых степеней заражения бабочек, которые легко могут быть пропущены при заводском микрокопировании. Вопреки этим суждениям, некоторые специалисты (И. А. Щербатов и др.) считали, что слабые степени заражения бабочек, которых не может обнаружить лаборантка, если они существуют в действительности, вряд ли могут представлять опасность как источник герминативного заражения грены, так как яичники гусеницы заражаются в последнюю очередь.

При чрезмерной «массированной» изоляции бабочек возникла возможность появления «слабых степеней заражения» иного и более вероятного происхождения; споры из единичных пепринозных бабочек в условиях уплотненного микрокопирования могут оказаться так сильно разбавлены в эмульсии всей массы растертых бабочек, что вероятность их обнаружения будет крайне низкой. Имея в виду это обстоятельство, необходимо предостеречь от оптимизма тех, кто считает опасность пропуска слабых степеней заражения преувеличенной. Достаточно сказать, что герминативный путь формирования эпизоотий пеприны обеспечивается именно относительно слабыми степенями заражения отдельных бабочек. У сильного заражения — уж если на то пошло — возможностей для распространения трансвариальным путем меньше, так как при большом количестве спор, заглатываемых гусеницей, она погибает от септицемии, вызванной кишечной микрофлорой. При сильном инфицировании спорами гибель от септицемии в течение первых пяти дней может достичь 50% и более. Кроме того, гусеницы, зараженные пеприной, особенно легко становятся жертвой активизированного латентного вируса желтухи, который вызывает гибель шелкопряда раньше, чем разовьется нозематоз. Только при небольших дозах заражения и притом в старших возрастах, не превышающих 200—300 спор на одну гусеницу, становится возможным такое развитие заболевания, которое приводит к герминативной инфекции. Вместе с тем именно герминативный путь распространения пеприны является наиболее мощным эпизоотологическим фактором по сравнению с прижизненным заражением.

Эти критические замечания не следует понимать так, будто целлюлярный способ приготовления грены является пределом человеческих возможностей в борьбе с пеприной. На смену ему может прийти более совершенный во всех отношениях метод. Однако нельзя судить о ценности метода вне реальной обстановки, существующей на гренажных заводах с их высокими производственными планами, которые слабо механизированы, не всегда должным образом обеспечены в технологи-

ческом и, особенно, в организационном отношении. Нередко вызывают озабоченность слабая обеспеченность рабочей силой, техническими кадрами, недостаточно высокий уровень их квалификации. Наконец, стремительность биологических процессов в гренаже при их больших масштабах — постоянная угроза, готовая смять производственные графики завода, нарушить заданный ритм работы. У целлюлярного гренажа в подобных ситуациях были надежные подстраховывающие резервы в виде каскада микроанализов, следующих через весь производственный процесс, на всех без исключения этапах приготовления грены. Поэтому усложненность последовательной системы целлюлярного гренажа следует рассматривать как издержки производства, порожденные существующими условиями работы гренажных предприятий и оказывающиеся необходимыми ради сохранения качества продукции. Нельзя забывать, что гренопроизводство — своеобразная разновидность семеноводческого дела, где категорическим требованием является соблюдение качественных показателей продукции; все то, что может внести элемент риска при достижении этих настоятельных требований, полностью противопоказано этому виду производства.

История отечественного гренопроизводства знает случаи, когда в результате снижения требовательности система целлюлярного гренажа не могла в полной мере справиться с возложенной на нее задачей — обеспечения выпуска здоровой грены. Так, один из крупнейших в Советском Союзе по размерам производства Самаркандский гренажный завод в начале 40-х годов вынужден был выполнять производственные планы, вдвое превышающие его проектную мощность, и вместо 30 тыс. приготавливать 60—65 тыс. коробок грены в год. Не имея возможности разместить на своей производственной площади весь объем работы, завод вынужден был рассредоточить часть папильонажа на внезаводских пунктах, снизив тем самым эффективность инженерно-технического контроля за выполнением этой части операций. Изоляция бабочек не поспевала за ходом папильонажа и часть преждевременно отложенной грены оказалась в мешочках с бабочками, не имевшими к ней отношения. Кроме того, источником заражения выкормок в хозяйствах, соприкасающихся с племенным районом завода, а частично и в самом районе, были выкормки из грены домашнего приготовления, неблагоприятные по пембине; присутствие их не всегда удавалось обнаружить среди основной массы гусениц из целлюлярной грены, хотя по существовавшим тогда законам они подлежали уничтожению.

В результате государственной инспекцией было забраковано и сожжено из продукции завода в 1938 г. около 1200, в 1939 г. — 2500, в 1940 г. — 5000, в 1941 г. — 7000 коробок грены. Было решено поручить техническое руководство заводом одному из тех опытных специалистов, которые с самого начала рождения советской гренажной промышленности принимали участие в ее становлении. Понадобилось два года квалифицированных усилий для восстановления нормального целлюлярного технологического режима. В итоге в 1942 г. количество забракованной грены снизилось до 500 коробок.

Несколько раньше в Туркмении трем гренажным заводам в Чарджоу, Мары и Фирюзе предстояло в течение года почти вдвое увеличить производство грены (с 50 тыс. до 90 тыс. коробок); заводы вынуждены были расширить зону племенных выкормок, не проводя предварительных мер по оздоровлению привлекаемых для этого новых хозяйств. В результате в 1931 г. продукция этих заводов оказалась сильно заражена пеприной и к реализации было допущено только 18,5 тыс. коробок. Однако последовавшее за этим особенно тщательное выполнение правил по производству целлюлярной грены на всех этапах ее приготовления позволило в два-три года значительно снизить зараженность, а затем полностью оздоровить продукцию этих заводов. Если в 1931 г. зараженность грены составляла 29%, то в 1932 г. она снизилась до 5,25% (более, чем в пять с половиной раза), в 1933 г. — 2,18%. в 1934 г. — 0,33%, в 1935 г. — 0,08% и в 1936 г. — 0,03%.

Приведенные примеры свидетельствуют о способности последовательной системы целлюлярного гренажа обеспечивать быстрое оздоровление гренопроизводства, даже тогда, когда эту операцию приходится сочетать с выполнением напряженных производственных планов. Подобные случаи — подлинное испытание на прочность, на надежность целлюлярного метода приготовления здоровой грены. К сожалению, рационализаторы гренопроизводства не сочли нужным обеспечить дальнейшее сосуществование принципа целлюлярного гренажа. Под знаком борьбы за сокращение трудовых затрат и экономии производственного времени осуществлялся переход к укрупненной групповой изоляции бабочек и уплотненному микроскопированию. Разрабатывались механизмы для отдельных звеньев технологического процесса с тем, чтобы подготовить перевод производства на частичные или связанные конвейерные циклы. При этом игнорировалась возможность внести радикальные изменения в технику микроскопического анализа бабочек, приблизив ее к современному уровню достижений в этой области.

Между тем отечественная наука располагает реальными возможностями решать эту задачу на основе успехов оптико-структурного машинного анализа, автоматизации количественных исследований микроструктур, осуществляемых с участием ЭВМ и не только в световом, но и в высоковольтном электронном микроскопе. Новейшие достижения науки и техники находят широкое применение в микроскопическом контроле за биологическими процессами в микробиологической промышленности, в медицинской патологической гистологии, минералогии и металловедении. Использование этих методов и приборов позволило бы гренопроизводству обеспечить экономию времени и затрат труда и вновь вернуться к принципам целлюлярного гренажа, к индивидуализации анализа бабочек, сохранить большое количество кладок, уничтожаемых при уплотненном микроскопировании, повысить надежность избавления выкормок от герминативной инфекции пеприны.

## 6.6. Предупредительные санитарно-гигиенические мероприятия во время выкормки

**Использование противоинойфекционной сопротивляемости организма гусениц.** Предварительная дезинфекция червоводни и инвентаря не может предохранить выкормку от последующего заражения возбудителями, находившимися за пределами червоводни, точно так же, как от присутствия среди гусениц носителей трансвариальной инфекции. Заражаемость отдельных гусениц от этих источников инфекции, дальнейшее распространение болезни на выкормке и превращение ее в эпизоотию в значительной мере зависят от состояния восприимчивости выкармливаемой популяции шелкопряда, от уровня его сопротивляемости инфекции. В принципе возможны попытки мобилизовать резервы самозащиты организма от инфекции, повысить сопротивляемость дачей гусеницам стимуляторов, экологическим и пищевым воздействием, но пока еще неизвестно, как это делать, а отдельные попытки в этой области не представляют практического интереса.

Вместе с тем накопленный шелководами опыт говорит о том, что отностительный врожденный иммунитет шелкопряда может быть легко нарушен, если изменить экологические условия и режим выкормки. Вследствие этого круг возбудителей окажется значительно расширенным, благодаря так называемым условно патогенным микроорганизмам. Например, среди бактерий известны такие, которые при заражении общей полости шелкопряда, не вызывают септицемии. К ним, между прочим, относятся бактерии, вызывающие заболевания у теплокровных животных (туберкулезная палочка, холерный вибрион и т. д.). Наряду с этим существуют бактерии, к которым шелкопряд очень восприимчив; многие из них относятся к непатогенным или малопатогенным для теплокровных сапрофитам. Между этими двумя группами есть промежуточная, характеризующаяся тем, что болезнетворные свойства ее представителей проявляются только в определенных условиях. Типичные представители этих условно патогенных бактерий — стрептококки. Летом гусеницы погибают от септицемии, вызываемой такими бактериями, которые весной для них не опасны. Следовательно, задача состоит в том, чтобы сохранить свойственный популяции уровень врожденного иммунитета к определенной группе заболеваний, обеспечив гусениц оптимальными условиями жизни.

**Оптимизация экологических условий как средство содействия сопротивляемости инфекции.** Гигиеническое значение состояния влажности воздуха, температуры, воздухообмена, степени освещенности на выкормочной поверхности, плотности размещения гусениц и связанной с этим площади выкормки очевидно. Мы не знаем, каковы параметры всех этих условий, за пределами которых возникает угроза увеличения частоты поражаемости организма патогенами; исключение составляют только микозы, которым благоприятствует определенная влажность воздуха. Повышенная относительная влажность (более 70—75%) при оптимальной для гусениц или близкой к ней температуре (что соответствует разнице в 3°C между показаниями сухого и смоченного термометров) способствует появлению мускардины.

Чем выше абсолютная влажность, тем опаснее понижение температуры. Кратковременное повышение влажности (4—5 ч) не может вызвать заболевания. Но мы, вероятно, не делаем большой ошибки, когда, упрощая свою задачу, принимаем за требуемый оптимум условий жизни шелкопряда технологический режим червокормления, обеспечивающий получение наивысшего урожая полноценных коконов.

Чаще всего уделяется внимание температуре и влажности воздуха как наиболее существенным показателям состояния микроклимата на выкормочной поверхности.

Гигротермический режим, в конечном счете, определяет уровень энергетического обмена у гусениц, что сказывается и на способности организма сопротивляться инфекции. Колебание уровня относительной влажности, этого наиболее изменчивого элемента гигротермического режима выкормки, зависит от влагосодержания наружного воздуха, относительной влажности самого помещения, испарения влаги, выделяемой свежим листом, поступающим на выкормку, от транспирации гусениц и интенсивности вентиляции. Установлению режима высокой относительной влажности воздуха на выкормке способствуют также климатические особенности района и время года. Особенно легко повышается относительная влажность воздуха во время похолоданий в сырое время года. Повышению влажности способствует и то, что в середине старших возрастов в червоводню поступает наибольшее количество листа, а затем наступает завивка коконов, во время которой происходит энергичная эвакуация содержимого кишечника (жидкие экскременты) и выделение шелковины, представляющей вместе с недостаточно высохшими коконниками значительный источник влаги.

Следует иметь в виду, что микроклимат выкормочной поверхности неоднороден; в этой зоне, особенно при кормлении на ветках, отдельные ее участки образуют микроклиматические ячейки — ниши.

Некоторые технические приемы червокормления также способствуют повышению влажности, а поэтому с появлением мускардины их следует избегать. Сюда относится кормление в младших возрастах резаным листом, кормление под мокрыми покрывалами, смоченным листом, выкормка в «фонарях» и т. д. Этому же способствует практикуемое в старших возрастах на весенних выкормках кормление ветками так как при этом влага испаряется больше, чем при кормлении побегами или листом. Влажность на выкормке повышается в связи с особенностями размещения червоводни поблизости от лесов, прудов, рисовых полей, сырых низких мест и т. д. В республиках Средней Азии шелководам приходится иметь дело с низкой влажностью воздуха, особенно в период старших возрастов, что порождает свои проблемы, но с санитарно-гигиенической точки зрения такое нарушение оптимальных параметров гигротермического режима выкормки более терпимо, чем избыток влаги.

Оставляя в стороне вопрос об оптимальных размерах площади для выкормки, можно сказать, что в борьбе с заразными болезнями никакая максимальная разреженность гусениц не может быть сочтена лишней; чем она больше, тем меньше возможности для развития эпи-

зоотии. Кормление старших возрастов на ветках шелковицы увеличивает размеры пространства, занятого гусеницами, а благодаря наслаиванию рыхлой подстилки уменьшается возможность непосредственного соприкосновения здоровых гусениц с больными. Переход здоровых гусениц на свежий корм постоянно поддерживает пространственную разобщенность между верхней «зоной выпаса» и загрязненной инфицированной подстилкой из веток предыдущей раздачи корма. Из-за быстрого наращивания подстилки и, что особенно важно, систематического ее удаления, выкормочная поверхность часто обновляется.

Чтобы наиболее полно использовать явления естественной относительной сопротивляемости шелкопряда заразным заболеваниям, необходимо, помимо представления оптимальных экологических условий, обеспечить тщательным уходом дружное развитие выкормки. Неправильный уход приводит к тому, что развитие гусениц замедляется, и вместе с тем увеличивается дифференциация возрастного состава выкормки. Появляются так называемые отсталые гусеницы, темп развития которых больше не совпадает с развитием всей выкормки. Отсталые гусеницы — результат систематического недокорма при скученном размещении червей, неправильной раскладки корма или невнимательного и неумелого ухода за выкормкой во время сна. Ослабленные гусеницы наименее устойчивы к различным инфекциям. Возможность инфекции облегчается тем, что эти гусеницы находятся в наилучших санитарных условиях, обычно в толще подстилки, в нижнем ярусе выкормки. В кишечнике отсталых гусениц сосредоточивается бактериальная флора (главным образом стрептококки), тогда как у ослабленных гусениц бактерии в кишечнике не размножаются.

Очень важно оберегать целостность кожных покровов гусеницы — непреодолимую преграду на пути всех инфекционных агентов, за исключением энтомопатогенных грибов. Неправильный уход увеличивает число случаев ранения гусениц. Чаше оно наблюдается при неумелом обращении со спящими и проснувшимися червями, при смене подстилки и раскладке веток шелковицы. Причиной ранения может быть также тесное или неравномерное размещение гусениц старших возрастов, вследствие чего они ранят друг друга коготками ложных ножек. В этом отношении особенно опасны осы, шершни, сверчки, муравьи, которые не только уносят гусениц, но и ранят значительную их часть. Раненый шелкопряд исключительно легко заражается септицемией и желтухой.

Отсталые и раненые гусеницы являются как бы входными воротами инфекции, через которые она особенно легко проникает на выкормку. В результате заболевания отдельных червей возбудители начинают накапливаться на выкормочной поверхности, заражают наиболее восприимчивых гусениц, создаются предпосылки для возникновения эпизоотии.

При профилактических мероприятиях необходимо следить за санитарным состоянием выкормки. Надо охранять ее от заноса инфекции посторонними посетителями или обслуживающим персоналом; бороться с возможными переносчиками возбудителей — насекомыми,

грызунами, птицами. Жмудзинович (1889), Пигорини и Теодоро (1926—1927) установили, что мухи переносят споры пембрины в червоводни, на листья шелковицы и представляют большую опасность. Кормя мух сахарной водой, которой был залит растертый труп пембринозной гусеницы, Теодоро отметил, что споры пембрины выделяются мухами в течение трех дней с момента покормки и на протяжении этого времени способны заражать шелкопряда. Антисанитарное состояние выкормочной поверхности, разложившиеся трупы гусениц, у которых в числе гнилостных микроорганизмов могут оказаться возбудители септицемии, — все это опасно для шелкопряда.

**Профилактические мероприятия на многократных выкормках.** Перевод шелководства на промышленную основу снова пробуждает интерес к многократным выкормкам. Период вегетации шелковицы в зонах промышленного производства коконов характеризуется значительным перепадом температуры и влажности воздуха. Несмотря на специально подготовленные для многократной выкормки плантации, качество корма в течение удлиненного выкормочного сезона претерпевает существенные изменения в худшую сторону. Санитарно-гигиенические условия тоже значительно ухудшаются по сравнению с весенней выкормкой.

Сухость воздуха летом и осенью, особенно в Средней Азии, и более интенсивная инсоляция, несомненно, играют положительную санитарную роль во время повторных выкормок. Благодаря им подстилка и трупы червей быстро высыхают и не разлагаются, а инфекционное начало, попавшее за пределы червоводни, быстро обеззараживается солнцем. Наряду с этим температура и влажность воздуха в это время года менее благоприятны для шелкопряда, а лист менее питательный, чем весной. Поэтому гусеницы оказываются более восприимчивыми к заразным болезням. Накопившиеся весной возбудители не успевают к началу повторных выкормок утратить жизнеспособность или просто рассеяться в окружающем пространстве, подобно тому как это в той или иной мере происходит с ними ко времени следующих весенних выкормок. Температура во время повторных выкормок обычно более благоприятна для развития микроорганизмов, причем оптимум для них несколько выше, чем для самого шелкопряда.

Большой практический интерес в распространении желтухи представляет роль весенних выкормок. Понижение температуры весной, в период младших возрастов, провоцирует желтуху. Не всегда это приводит к массовым заболеваниям. Однако высокая температура во время повторных выкормок увеличивает восприимчивость гусениц к вирусу, оставшемуся в червоводне после весенних выкормок, вследствие чего заражение может происходить от значительно меньших доз вирусом, чем весной. В результате возникает массовое заболевание желтухой, которое в этих случаях носит внезапный характер.

Условия для развития пембрины на повторных выкормках более благоприятны, чем на весенних. Это объясняется, во-первых, тем, что споры, накопившиеся весной, полностью сохраняют жизнеспособность, которая через год в значительной мере утрачивается; во-вторых, при приготовлении повторной грены микроскопический анализ и осо-

бенно государственный контроль по условиям производства и характера материала (микроскопирование живых бабочек, исследование грены задолго до ее оживления) оказываются менее точными, чем при приготовлении грены весеннего назначения.

Экологические условия летних и летне-весенних выкормок способствуют также развитию септицемии, кишечного токсикоза или энтеритов. Высокая температура понижает устойчивость червей к бактериальной инфекции, вследствие чего они заражаются ничтожными дозами возбудителя, во много раз меньшими, чем те, которые способны вызвать заболевание на весенних выкормках. Вследствие повышенной восприимчивости гусениц заражение бактериями и вирусом желтухи летом удастся не только через ранки на коже, но и через кишечник.

Менее питательный лист во время летних и особенно осенних выкормок также служит причиной ослабления организма гусениц и функциональных расстройств, способствующих появлению стрептококкового энтерита. Наиболее существенные профилактические мероприятия, предупреждающие развитие заболеваний на повторных выкормках следующие:

а) выведение и подбор пород и гибридных комбинаций, наиболее приспособленных к условиям повторных выкормок;

б) обеспечение листом, качество которого наиболее соответствует физиологическим потребностям гусениц в летних и летне-осенних условиях;

в) кондиционирование температуры и влажности, обеспечивающее наибольшую жизнеспособность гусениц.

Для повторных выкормок огромное значение имеет предварительная дезинфекция. Она должна быть особенно тщательной, потому что ее действие в этом случае направлено против значительно более жизнеспособных возбудителей, чем во время весенней обработки. Очень поучителен следующий пример из практики японского шелководства. Систематическое проведение ряда профилактических мероприятий против мускардины — дезинфекция, отопление червоводен (для уменьшения влажности в них) — сделало это заболевание сравнительно редким на весенних выкормках. Несколько позднее, когда стали развиваться повторные выкормки, сроки которых в Японии совпадали с дождливыми летними месяцами, эпизоотии мускардины вспыхнули с новой силой. Этому способствовали климатические условия сезона и лучшая сохраняемость спор грибка между весенними и повторными выкормками. Но наиболее существенной причиной было небрежное отношение к дезинфекции и другим предохранительным мероприятиям, вызванное успешным предупреждением появления мускардины на весенних выкормках.

## **6.7. Борьба с заболеваемостью шелковичных червей на выкормках**

**Обнаружение заболевания.** Чтобы успешно противодействовать заболеваниям, их необходимо обнаружить как можно раньше, лучше всего — в самом начале, до того, как первоначальные носители инфекции приобретут возможность распространить ее на незараженную часть



выкормки. Кроме того, превращение единичных случаев заболевания в эпизоотию, в рамках короткого (3—4 недели) периода жизни гусениц протекает столь быстро, что для организации и проведения необходимых мер противодействия остается немного времени. Чем раньше будет обнаружено заболевание, тем быстрее будет поставлен диагноз и, следовательно, выяснены его природа и степень опасности, которые оно представляет для пораженной выкормки, и те меры, которые могут быть намечены для дальнейшего противодействия инфекции.

Раньше всех это может сделать агротехнический персонал, обслуживающий выкормку. Целесообразнее всего, чтобы именно работники выкормочных бригад выполняли функцию «пункта сигнализации» низовой производственной инстанции, для чего вполне достаточен тот уровень специальной подготовки, который позволяет отличить по поведению и внешнему виду больную гусеницу от здоровой. Они не должны пытаться диагностировать болезнь; в их обязанность входит только срочное оповещение следующей инстанции — районного агронома, о появлении заболеваний с указанием даты, дня возраста, визуальной характеристики больных и мертвых гусениц, размера поражения и темпов распространения инфекции. Лучше всего, если эти сообщения будут иметь вид отпечатанной в типографии карточки с перечнем сведений, которые необходимы районному агроному; на пункте сигнализации в выкормочной бригаде остается только поставить дату заполнения карточки и подчеркнуть слова, которые составят картину наблюдаемого заболевания.

Размеры поражения могут быть обозначены примерно, с указанием, на скольких полках стандартных этажерок обнаружены мертвые и больные гусеницы и в каком количестве. Если на каждой полке трехъярусных этажерок (2 м<sup>2</sup>) при нормальной плотности размещения (т. е. 47 500 гусениц, составляющих одну коробку, на 50 м<sup>2</sup>) будут обнаружены в среднем две больных гусеницы, то это составит примерно 0,1% от всего количества их в коробке, а если по 10 больных, то 0,5% (232 гусеницы на коробку). Представление о темпе распространения заболевания может быть получено, если учитывать численность больных и мертвых гусениц в течение трех дней подряд в одно и то же время суток.

Получив такую карточку, районная агрономическая служба заносит в нее сведения о диагнозе, установленном более квалифицированной инстанцией, о принятых мерах и судьбе заболевшей выкормки. За ряд лет карточки станут ценным материалом для анализа заболеваемости выкормок в районе и результатов борьбы с ними.

**Диагностика болезни.** Второй шаг к осуществлению мероприятий по борьбе с болезнями — заключение о природе заболевания, его диагноз. Диагностика — распознавание болезни на основании изучения ее признаков, лабораторных исследований и анализа этих сведений. Она должна соответствовать уровню современных знаний, как самой болезни и причины, ее порождающей, так и ее эпизоотологических особенностей. От диагностики требуется точность заключения при предельной экономии времени и средств; эти требования к диагнозу

выражены следующей классической формулой: *totum, cito et exactum* т. е. полно (исчерпывающе), быстро и точно. Без достоверного диагноза меры борьбы носят безадресный характер и нецелесообразны. Даже в критической ситуации, когда после установления природы заболевания наука не может предложить радикальные меры борьбы с новой или малоизученной болезнью, всегда сохраняется возможность подобрать систему мер, способных контролировать дальнейшее распространение болезни, и наметить шаги для сдерживания эпизоотии.

Первое заключение о причине заболевания районный агроперсонал может вынести на основании визуального диагноза во время обследования заболевших выкормок после получения с мест соответствующего сигнала. *Визуальной* называется диагностика по доступным невооруженному зрению признакам, без помощи оптических приборов: поведение заболевших гусениц (наиболее ранний, но и наименее специфичный симптом для разных болезней), рвота и понос, изменение окраски тела, пятна — начиная с точечных и кончая большими, размытыми; черная, темно-бурая или иная окраска отдельных сегментов тела, сопровождающая наступление предсмертной агонии и являющаяся, чаще всего, результатом некротического распада тканей при участии протеолитических бактерий, присутствие которых может не иметь прямого отношения к этиологии заболевания. Особенно часто могут ввести в заблуждение приметы смешанных инфекций, поэтому основанием для заключения должна служить, по возможности, совокупность симптомов заболевания, стечение признаков — *синдром болезни*.

Визуальный диагноз приблизителен и часто неточен, даже при самом тщательном учете всех особенностей заболевания, известных опытному специалисту. Однако не следует отказываться от предварительного заключения о природе заболевания по визуальным признакам, в качестве попытки охарактеризовать причину эпизоотии. В сочетании с результатами простейших и широко доступных способов микроскопического анализа они часто оказываются достаточным основанием для предварительного, если не окончательного заключения. Такое провизорное (предварительное) исследование проводится путем микроскопирования сухой системой объектива, с 600-кратным увеличением и в нативном препарате (нефиксированный и если окрашенный, то только витальными красками). Микроскопируют каплю гемолимфы, или целиком растертую гусеницу, либо ее среднюю кишку, а также другие объекты (экскременты, сброшенные шкурки), помещенные в каплю воды на предметное стекло и покрытое покровным.

*Провизорным* это микроскопирование называется потому, что оно ограничено в диагностических возможностях, но может быть выполнено агротехниками на месте обследования выкормок или с использованием микроскопов гренажного завода, а также ближайших ветеринарных учреждений. Такая техника исследования используется на гренажных заводах; она позволяет обнаружить споры возбудителя пембины, полиэдры ядерного полиэдроза, а при сильном заражении тканей — другие виды полиэдрозов. Обнаружив бактерий, нативное

микроскопирование не может установить их видовую принадлежность, но может оказаться достаточным для определения вида возбудителя микозов. При слабой инфицированности исследуемого объекта или при непривычном внешнем виде и форме патогена микроскопирование нативного препарата при недостаточном увеличении лишено возможности рассеять возникающие сомнения; непсиальной задачей для него является обнаружение вирусов с более мелкими включениями, чем полиэдры.

Несколько большие возможности в этом отношении представляет микроскопирование с фазово-контрастным устройством. Наконец, предельно значительные для световой оптики результаты могут быть достигнуты с помощью иммерсионных систем объективов при увеличении изображения в 1000—1200 раз и исследовании фиксированных и окрашенных препаратов, в том числе приготовленных с помощью гистологической техники из полученных на микротоме срезов тканей насекомого. Хотя в техническом отношении эти исследования сложнее, а аппаратура дороже, они все же доступны агрономической службе. В областных городах несложно организовать региональные центры содействия диагностике и руководства борьбой с болезнями шелкопряда.

Областная инстанция должна иметь возможность, в отдельных случаях, привлекать для решения специальных вопросов повышенной сложности республиканский центр по изучению болезней шелкопряда и разработки средств и методов борьбы с ними; совершенно очевидно, что этим центром должен быть научно-исследовательский институт или республиканская опытная станция, располагающие высококвалифицированными специалистами, оснащенные надлежащим образом, включая электронную микроскопию и ультрамикротомирование, налаженную серодиагностику и возможность наработки в требуемом количестве диагностических сывороток. В задачу этой, наиболее квалифицированной инстанции в сети службы по борьбе с болезнями входит выявление новых болезней и их изучение, разработка рациональных методов борьбы на основе новейших достижений медико-ветеринарной науки, инспектирование всей сети, методическое руководство, переподготовка кадров, курирование предприятий гренопроизводства и т. п. В этой инстанции сосредоточиваются собранные системой карточки с регистрацией эпизоотий, на основании анализа которых выясняются динамика эпизоотий по годам, их цикличность, формирование эндемических (энзоотических) очагов; разрабатывается методика сезонных прогнозов заболеваемости, осуществляется заблаговременное оповещение областных и районных управлений шелководства.

**Прогноз развития заболеваемости и ее исхода.** Если обнаружено заболевание гусениц, возникает необходимость предугадать, могут ли единичные случаи превратиться в массовые, насколько стремительным может быть развитие эпизоотии и на какой исход выкормки можно рассчитывать? Методика краткосрочного прогнозирования развития болезней на выкормках все еще не разработана, хотя проблема эта заслуживает особого внимания. Состояние знаний об инфекционных болезнях в наши дни позволяет наметить основные подходы к решению этой задачи.

Возможность развития эпизоотии из спорадических (одиночных) заболеваний, ее динамика и интенсивность определяются множеством факторов. Главные из них: а) природа патогена; б) трансвариальный или внешний источник инфекции; в) исходное количество инфекции, попавшей на выкормку или, что более доступно учету — количество первоначально обнаруженных больных и мертвых гусениц; г) длительность репродукционного цикла у патогена, его продуктивность и связанный с этим темп накопления инфекции в зараженной гусенице; д) прижизненно или только посмертно заражают заболевшие гусеницы окружающую среду; е) контагиозность («прилипчивость») инфекционного начала, т. е. степень его заразности при передаче возбудителя контактным путем; ж) степень восприимчивости популяции шелкопряда к возникшему заболеванию; з) в какой мере благоприятны условия на выкормке для передачи инфекции от больных и мертвых гусениц здоровым (плотность размещения), прочая благоприятствующая эпизоотии экологическая и агротехническая обстановка выкормки: режим и техника кормления, гигрометрический режим, частота и техника смены подстилки.

Влияние некоторых факторов, способствующих заражению и развитию болезни, таких, как агроэкология выкормки и ее техника, поддаются контролю со стороны агротехников, другие же неотъемлемы от природы инфекции.

Хотя многие из этих факторов могут быть охарактеризованы количественно, совокупность их действия не легко интегрировать и итог выкормки предсказать совсем непросто. Все же имеет смысл сопоставить отдельные факторы, которые оказывают решающее влияние на темп развития эпизоотии: это происхождение инфекции и связанное с этим начало гибели гусениц, количество первоначально обнаруженных мертвых («широта фронта у старта заболеваемости»), длительность репродукционного цикла патогена и контагиозность инфекции; данные эти позволяют прогнозировать характер развития эпизоотии и ее исход.

К сожалению, случаям немногочисленной и малозаметной гибели грены во время инкубации и смерти вылупившихся из нее гусениц не придается того значения, которое они имеют для выявления первоначального источника инфекции. Микроскопирование послειнкубационных остатков в инкубаториях (скорлупок, мертвых гусениц, нежившей и высохшей грены), а также больных и мертвых гусениц первого возраста и их экскрементов позволяет выяснить наличие или отсутствие трансвариальной инфекции пембины. Даже исследование гусениц второго возраста позволяет ответить на этот вопрос. Обнаруженные при микроскопировании инкубированной грены и гусениц первого и второго возрастов полиэдры свидетельствуют обинфицированности родительского поколения вирусом желтухи. Точно так же стрептококки в теле больных гусениц младших возрастов довольно часто наследуются ими от пораженных этими бактериями родителей. Для большей надежности исследуемый материал должен быть тщательно измельчен и подвергнут центрифугированию, а микроскопиро-

вание целесообразнее всего проводить с помощью фазово-контрастного устройства.

Выявление первоисточника у обнаруженных диагнозом патогенов в старших возрастах — более трудная задача; относительно исследуемых гусениц, прежде всего, должна быть полная уверенность в том, что трансвариальное происхождение инфекции исключается. Только после этого есть смысл приступить к ревизии внешних источников инфекции. Ближайший из них — сама червоводня. Необходимо точно знать, не заразились ли гусеницы в самой червоводне инфекцией, оставшейся от предыдущей выкормки, и если она болела, то чем именно. При заболевании старших возрастов необходимо также установить, не могут ли быть источником инфекции текущие ближайшие выкормки в результате контактов с ними различного характера. Если это не подтвердится, под подозрением остается только окружающая среда и прежде всего зона расположения шелковицы, где проводится заготовка корма. В этом случае наиболее вероятную опасность представляют собой остротоксичные варианты бактерий-кристаллофоров, поражающие листогрызущих вредителей из отряда чешуекрылых.

Динамика развития эпизоотии в значительной степени определяется не только исходным количеством инфекционного начала, попавшего на выкормку и вызвавшего заболевание, но и темпом воспроизводства последующих поколений возбудителя в зараженном организме и скоростью обращения инфекции по цепочке: больной организм (донор инфекции) — заражаемая внешняя среда (посредник) — здоровый организм (реципиент инфекции). Так, количество энтомопатогенных бактерий особенно быстро нарастает в пределах этого цикла. Скорость накопления бактерий в больных и мертвых насекомых весьма значительна и, при широком распространении этой инфекции среди гусениц, обильное загрязнение ими выкормочной поверхности неизбежно. Иначе дело обстоит с заражением выкормки нозематозом. Возбудитель пембины, в силу особенностей цикла своего развития и репродукционной способности, воспроизводит инфекционное начало менее быстро, чем бактерии. Наиболее раннее возникновение пембины на выкормке возможно при трансвариальной инфекции; хотя в этом случае дальнейшее распространение болезни с участием нового поколения спор становится возможным только с момента выделения их зараженными гусеницами, пембина такого происхождения оказывается, в конце концов, губительной для значительной части выкормки, которую приходится уничтожать. У прижизненно заразившихся гусениц до начала образования спор новой генерации и последующего их выделения с экскрементами проходит 11—13 дней, т. е. спустя половину или несколько менее личиночного периода жизни тутового шелкопряда. Поэтому в отличие от трансвариальной инфекции при прижизненном заражении гусениц выкормка может пойти на завивку коконов, существенно опередив развитие эпизоотии и став источником трансвариальной инфекции для следующего поколения.

Темпы формирования эпизоотии желтухи занимают промежуточное место между септико-токсическим поражением бактериями и нозематозом. В этом смысле преимуществом перед прижизненным зараже-

нием (как причиной возникновения эпизоотии) обладает индуцированная латентная инфекция вируса, которая может вызвать заболевание гусениц в младших возрастах. По данным японских авторов, особенностью ядерного полиэдроза является то, что вирус распространяется не с экскрементами, а с «гнием» (по обозначению этих авторов), т. е. с мутным жидким содержимым гемоцеля желтушных гусениц, выступающим наружу через лопающиеся кожные покровы, утратившие прочность в результате разрушения вирусом клеток гиподермального (эпителиального) слоя. Наблюдается это через 7—10 дней с момента заражения, в последней стадии развития желтухи, когда болезнь приближается к своему финалу, и после гибели гусениц. Другие виды полиэдрозов — цитоплазматический и кишечный — способны инфицировать вирусом окружающую среду в ходе самого заболевания, вследствие вытеснения в полость средней кишки пораженных эпителиальных клеток вместе с находящимися в них вирусами и выноса последних с экскрементами наружу. Возможность заражения подобным способом внешней среды, осуществляемого в ходе восстановления пораженного инфекцией эпителия средней кишки, ограничено во времени, особенно в тех случаях, когда болезнь сопровождается параличом кишечника под влиянием интоксикации, поскольку больные гусеницы вскоре перестают поглощать корм и, следовательно, выделять экскременты.

Для большинства заболеваний гусеницы становятся особенно сильным источником заражения окружающей среды после гибели и разрушения их тела. Однако для того чтобы пораженное мускардиной насекомое стало источником распространения инфекции, болезнь должна завершиться гибелью, после чего через 8—12 дней с момента заражения труп становится местом появления новой генерации инфекционного начала — конидиальных спор. Следовательно, для формирования эпизоотии из единичных заболеваний в большинстве случаев требуется достаточно продолжительный период, при инфицировании гусениц в старших возрастах; этого времени чаще всего может не хватить до конца выкормки и ущерб, наносимый урожаю коконов, будет незначительным. Другое развитие событий наблюдается при раннем появлении болезни, в первом и втором возрастах; здесь наибольшую опасность представляет герминативная инфекция пембины и латентной желтухи, которые могут вызвать гибель наибольшей части урожая. Решая вопрос о дальнейшей судьбе выкормки, на которой обнаружены больные гусеницы, учитывают санитарную и экономическую стороны дела. Зараженная выкормка является местом размножения возбудителей и представляет собой непосредственную угрозу для остальных выкормок. Вопрос о том, в каких случаях по санитарным условиям допустимо, а по экономическим — целесообразно продолжать выкормку, решается на основании прогноза развития заболевания и ожидаемого его итога. Исходя из этих соображений, принимают решение о мерах противодействия развитию эпизоотии или же об уничтожении выкормки и сжигании гусениц вместе с подстилкой.

**Карантинизация пораженных инфекциями выкормок.** *Карантином* называются противоэпидемические и противоэпизоотические мероприя-

приятия, направленные на предупреждение распространения массовых заболеваний из очага их появления. Эта мера возникла и в значительной степени продолжает осуществляться в качестве средства борьбы с заносом инфекции из зарубежных стран. Первоначально оно обозначало запрет для иностранных судов, подозреваемых в наличии заразных заболеваний, заходить в порт в течение 40 дней (от итал. quaranta — сорок) до выяснения состояния здоровья экипажа. В наши дни это также обязанность специальной карантинной службы. Карантин в растениеводстве — это система государственных мероприятий, направленных на защиту страны от завоза опасных сорняков, вредителей и болезней растений, а в случае проникновения — на ликвидацию их. Внутри страны карантинная служба проводит обследование сельскохозяйственных культур для выявления карантинных вредителей и болезней, ликвидирует обнаруженные очаги.

В животноводстве карантин — комплекс мер для локализации возникшего эпизоотического очага; эта сторона мероприятия является также необходимым средством и в борьбе с инфекционными болезнями тутового шелкопряда. Если обнаружено возникновение заболевания (нозематоз, вирусные инфекции, массовые вспышки кишечного бациллярного токсикоза и бовериоза), выкормка объявляется карантинной. Посещать больные выкормки посторонним лицам запрещено. Обслуживающий персонал обязан соблюдать санитарные правила: мыть руки дезинфицирующим раствором, халаты оставлять после работы в червоводне, при выходе из червоводни ноги вытирать о тряпку, смоченную дезинфицирующим раствором; лучше пользоваться галошами, предназначенными только для выкормки. С назначением карантинного режима выкормку и прилегающую к ней зону ограждают от заезда различных видов транспорта. Для этого в нужных местах устанавливают ограничительные знаки. Доставка веток шелковицы, уборка из помещений карантинной выкормки отходов червокормления: подстилки, подстилочной бумаги, экскрементов, мертвых гусениц, мусора и т. д. осуществляются в строгом соответствии с санитарными правилами.

Карантинный режим на территории может быть снят после полной ликвидации выкормки, обеззараживания территории, помещений, оборудования и всех предметов, контактировавших с карантинной выкормкой; письменное разрешение на снятие карантина может быть дано только агрономической службой, по распоряжению которой был установлен карантин.

**Меры по подавлению развития заболевания на выкормке.** После того, как установлен диагноз болезни и прогноз развития эпизоотии, намечают меры, которые могут воспрепятствовать развитию заболеваемости, предотвратив превращение его в эпизоотию, и спасти от гибели наибольшее количество коконов. Чем раньше будет достигнута ясность в этих планах, тем результативнее окажется борьба.

Она должна идти в двух направлениях: во-первых, предотвратить дальнейшее увеличение количества больных и превращение единичных случаев в массовые; достигается это мерами защиты основной

массы внешне здоровых гусениц от заражения и, прежде всего, от находящихся среди них носителей инфекции — больных и мертвых гусениц. При возникновении болезней на выкормке контингент гусениц может быть разделен на следующие четыре категории: 1) здоровые по внешним признакам и поведению; 2) явно больные и агонизирующие; 3) скрытые носители инфекции с инкубационной стадией болезни и 4) с латентной инфекцией. Гусеницы двух последних категорий могут ошибочно восприниматься как здоровые, хотя это скрытые кандидаты на заболевание. Меры по подавлению возникшей заболеваемости имеют в виду воспрепятствовать заражению здоровых. Что же касается явно больных и умирающих гусениц, то чем раньше выкормочная поверхность этажерок будет избавлена от их присутствия, тем меньше возможностей для дальнейшего распространения заразного начала. Первоочередная задача в борьбе с эпизоотией состоит в том, чтобы как можно скорее выявить гусениц — носителей инфекции и обеспечить изоляцию их от незараженной части гусениц. Избавление от них по мере обнаружения является одним из радикальных методов подавления эпизоотии; к нему необходимо прибегать по возможности чаще в течение всего периода выкормки.

**Избавление выкормки от гусениц — носителей инфекции.** Операция по удалению с выкормочной поверхности явно больных и мертвых гусениц может быть выполнена одним из двух способов, в зависимости от размеров поражения. Обычно червоточы попросту отбирают руками на выкормочной поверхности больных и мертвых гусениц и выбрасывают их, не соблюдая при этом каких бы то ни было санитарных предосторожностей; этим они могут содействовать еще большему распространению инфекции. Сам по себе прием ручного отбора и удаления с выкормочной поверхности единично заболевших и подозрительных гусениц может быть использован, с соблюдением, однако, самых строгих санитарных правил, относящихся как к отбираемому и выбрасываемому заразному материалу, так и к лицам, выполняющим эту операцию. Когда размеры поражения выкормки возрастают, ручной отбор становится трудно выполнимым. Кроме того, в распространении инфекции принимают участие не только больные гусеницы, но и зараженная ими подстилка, без удаления которой ручной сбор носит характер незавершенного мероприятия по оздоровлению выкормки. Наконец, практически невозможно отделить здоровых гусениц от зараженных с не проявленными еще признаками болезни.

В Японии распространен прием отделения здоровых от больных гусениц, особенно удобный для младших возрастов. Для этого их посыпают просушенной рисовой шелухой или мелко резанной соломой, поверх которой раскладывают свежие листья шелковицы; проползая сквозь эту преграду, гусеницы обильно ее оплетают выделяемой шелковиной, облегчающей их продвижение. Когда они все, кроме больных, перейдут на поверхность такого коврика (мата), его осторожно свертывают вместе с гусеницами в рулон и переносят на подготовленный обеззараженный плетеный выкормочный противень; рекомендуют также смачивать или пересыпать шелуху дезинфицирующими средствами.



Чтобы выявить носителей инфекции и отделить эту визуально не дифференцируемую группу внешне здоровых гусениц от действительно не зараженных, наиболее доступный способ в условиях крупномасштабных выкормок состоит в использовании резких различий в поведении здоровых и болеющих гусениц. Если поведение здоровых определяется четким положительным тропизмом к свежесданному корму, то для больных характерна потеря аппетита, утрата рефлекса на свежесданный корм. В начале заболевания гусеницы проявляют повышенное беспокойство, характер перемещения их на выкормочной поверхности меняется. Здоровые гусеницы движутся вверх по направлению к свежему корму, а заболевшие — беспорядочно расползаются во все стороны, собираются на краю выкормочной поверхности и редко покидают тот ярус подстилки, на котором их застало развитие болезни. Затем апатия переходит в общую иммобилизованность (неподвижность) гусениц и в этом состоянии их застают предсмертные признаки и гибель.

Различия в поведении здоровых и болеющих гусениц позволяют последовательно, в несколько приемов, освобождать популяцию выкармливаемых гусениц от присутствия носителей инфекции в начальный период ее проявления. Гусениц некоторое время выдерживают без корма (пропуская одну покормку); в период голодания существенным дополнением к рекомендуемому приему дифференциации здоровых и болеющих гусениц служит повышение температуры воздуха на 2—3°С. Это содействует подсыханию старого яруса веток (подстилочного), повышает аппетит у здоровых гусениц и вместе с тем формирует развитие симптомов заболевания у подозреваемых гусениц. Затем раскладывают крупные ветки с некоторым интервалом между ними. Количество задаваемого корма должно быть таким, чтобы гусеницы смогли в короткий промежуток времени полностью съесть его; кормить их рекомендуется как можно чаще, малыми порциями, выбирая крупные ветки с редко расположенными листьями и раскладывая их поочередно, во взаимно перпендикулярном направлении, «колодцем». При этом надо использовать возрастное и суточное повышение аппетита гусениц и поддерживать его оптимальным температурным режимом. Количество раскладываемого корма устанавливают на основании пристального наблюдения за переходом на него гусениц. Кратность кормления должна быть по возможности увеличена, чтобы менять подстилку не менее двух раз в сутки (применительно к старшим возрастам).

В итоге в короткий срок можно нарастить многоярусную подстилку, выявить активно питающихся гусениц и отделить их от заболевших. Здоровые и больные гусеницы постепенно размещаются на разных ярусах подстилки и оказываются разобщенными друг от друга. К концу дня, после очередной покормки, здоровых гусениц вместе с ветками укладывают на чистый, дезинфицированный равендук (парусиновый холст) или носилки и переносят в свободное от заражения, предварительно подготовленное отделение червоводни или иное изолированное от пораженной выкормки место.

Г. И. Янин, В. Д. Зинченко и др. (1980) предложили применять

дырчатые съемники из пленки для фракционирования коконозавивки. В полиэтиленовой пленке толщиной 100 мкм пробиты на расстоянии 4 см друг от друга отверстия диаметром 15 мм. Такой съемник с успехом может быть использован для описанной нами операции по съему здоровых гусениц. Когда выкормка проводится не на ветках, а на побегах или на ошмыганном листе, обновлять выкормочную поверхность и удалять больных червей можно с помощью подобных съемников из полиэтиленовой перфорированной пленки. Больные гусеницы при этом не в состоянии выбраться на съемник и остаются в старой подстилке.

В промежутках между сменами подстилки можно рекомендовать ручной сбор и удаление больных и мертвых гусениц с соответствующими санитарными предосторожностями. После эвакуации здоровых гусениц оставшихся подозрительных можно попытаться докормить, особенно, если приближается срок завивки. При этом необходимо строго соблюдать карантинные правила изоляции такой выкормки, включая санитарные требования к обслуживающему персоналу. Если гусеницы болеют пембриной и желтухой, такие попытки докормить выкормку недопустимы. При бактериозах и микозах подозрительных гусениц, не перешедших на свежий корм, но не имеющих каких-либо иных признаков заболевания, есть смысл отобрать вручную и попытаться докормить, изолировав от больных и здоровых. Такая трудоемкая операция может оказаться целесообразной, особенно, если она выполнена непосредственно перед очередной линькой, когда и здоровые гусеницы корм прерывает привлекать.

**Удаление зараженной подстилки.** После съема здоровых гусениц подстилку с мертвыми и больными гусеницами выносят из червоводни на парусиновом холсте и аккуратно укладывают на носилки. Несоблюдение этой предосторожности может привести к раструске инфекционного начала по пути транспортировки подстилки за пределы червоводни. Рекомендуется, когда инфекции накопилось много или она особенно заразна, сменяемую подстилку оросить дезинфицирующим раствором (например, хлоризвестковым молоком) и только после этого вынести из червоводни.

Подстилку из зараженной червоводни нередко закапывают. Следует, однако, заметить, что дождевые черви весной способны вынести инфекцию на поверхность; факты эти были установлены еще Л. Пастером в отношении спор возбудителя пембрины. В Японии трупы и больных гусениц сжигают или собирают в сосуд с обеззараживающей жидкостью — раствором хлорной, свежегашеной извести или сулемы. Целесообразнее вырыть достаточно вместительную яму, облить сброшенную в нее подстилку с больными и мертвыми гусеницами керосином и сжечь.

Дезинфицируя помещение выкормки после удаления подстилки, особенно тщательно обрабатывают участок ее съема и весь путь следования эвакуируемой подстилки с мертвыми гусеницами, экскрементами и шкурками к месту сжигания. Прямые солнечные лучи, особенно в летние месяцы при безоблачном небе, могут быть мощным обеззараживающим агентом; этим вспомогательным дезинфицирующим средством не следует пренебрегать. В частности, рекомендуется, чтобы место

уничтожения подстилки и пути ее транспортировки к месту сожжения находились на южной стороне червоводни и, по возможности, на участке, не затененном деревьями, живой изгородью и т. п.

Зараженную подстилку с мертвыми гусеницами лучше всего удалять ранним утром, когда влажность воздуха несколько выше. Мертвых гусениц, упавших со стеллажа на пол, собирают совком. Руки надо тщательно продезинфицировать раствором лизоформа и вымыть; халаты, косынки и полотенца выстирать и прогладить утюгом. Равендук обильно смачивают 1%-ным формалином и погружают на час в этот раствор, а затем простирывают и прополаскивают в проточной воде.

**Текущая дезинфекция выкормки.** Периодическое удаление гусениц — источников инфекции с выкормки — сопровождают дезинфекцией; такая дезинфекция называется *текущей*. Текущая дезинфекция — одно из существенных санитарных мероприятий на выкормке. Заключается она в систематическом обеззараживании выкормочной поверхности, инвентаря и помещения; ее неоднократно повторяют в период выкормки, а время проведения приурочивают к смене подстилки, которую приходится проводить не только после каждой линьки — как этого требует техника червокормления, но и для удаления мертвых и больных гусениц — как средство предотвращения накопления инфекции.

Для борьбы с желтухой и другими болезнями в Японии научно-исследовательские учреждения рекомендуют проводить текущую дезинфекцию на выкормках гусениц младших возрастов 3%-ным формалином, а выкормки старших возрастов ежедневно обеззараживать порошком, содержащим 95%  $\text{CaCO}_3$  и 5% хлорной извести (Ремидовский, Таджиев и др., 1980). При механической текущей чистке выкормочного оборудования используют различные подсобные средства, такие, как мыло, соду, поташ, щелок, известковую воду, крутой кипяток. При уборке помещения следует иметь в виду, что не только трупы гусениц, упавших на пол, или шкурки слиявших гусениц, но и менее заметные экскременты, просыпавшиеся сквозь подстилку, могут стать источником инфекции.

В отдельных случаях дезинфицируют доставленный на выкормку корм. Ветки шелковицы споласкивают в проточной воде, удаляя с листьев пыль, а потом дезинфицируют лизоформом, который в слабых концентрациях не опасен для гусениц. В промежутке между дезинфекциями в червоводне и на прилегающей к ней территории постоянно поддерживают безукоризненную чистоту.

Иногда опрыскивают слабым дезинфицирующим раствором выкормочную поверхность с находящимися на ней гусеницами. Сильнодействующие средства могут причинить вред гусеницам, поэтому этот вид дезинфекции направлен главным образом против малoustойчивых возбудителей болезней — неспорозных бактерий и грибов.

**Обеззараживание поверхности тела гусениц.** Хотя линька гусениц является надежным способом освобождения кожных покровов от микроорганизмов, идея обеззараживания поверхности тела гусениц во время эпизоотии не раз привлекала к себе внимание исследователей. В этом плане особый интерес представляет собой возможность обезза-

раживания крыльев на ложных ножках гусениц, которые чаще других придатков тела (включая ротовые придатки, охраняемые инстинктивной «предубежденностью» гусениц ко многим запахам) пачкаются инфицированным материалом и могут стать прививочным инструментом при переползании гусениц друг через друга.

Южноевропейские шелководы издавна орошали гусениц на выкормочной поверхности скипидаром, чтобы избавиться от мускардины. В Японии в качестве меры борьбы с мускардиной выкормку опрыскивают уксусной кислотой. Перед обработкой гусениц посыпают рисовой шелухой или мелкорубленной соломой. Затем накладывают съемники, подстилку убирают и гусениц опрыскивают из пульверизатора 5%-ной кислотой из расчета 35 см<sup>3</sup> раствора на 1 м<sup>2</sup> поверхности. Черви остаются в таком состоянии примерно на один час; затем их снова посыпают тонким слоем шелухи или мелкорубленной соломой и поверх посыпки задают свежий лист шелковицы. В качестве профилактической меры обработку выкормки рекомендуют проводить один-два раза за возраст, лучше тотчас после линьки. Итальянские авторы рекомендуют против мускардины опрыскивать выкормку бордоской жидкостью или 3%-ным лизоформом.

Более универсальное средство — поверхностное обеззараживание гусениц сулемой, предложенное В. Д. Штибенем. Сулемовые ванны были испытаны им как средство борьбы с эпизодией бактериальной септицемии, вызванной особо контагиозной граммотрицательной бактерией. Гусениц помещают в решето (не металлическое), которое опускают в ванну с раствором сулемы в концентрации 1 : 10 000, где выдерживают 30 сек. Затем их в решете тщательно промывают из лейки проточной водой и после этого пускают на свежий корм. Хотя Штибен в своих опытах не достиг ожидаемого им радикального результата по ликвидации у подопытной выкормки септицемии (Штибен, Циклаури, 1931), наши более поздние наблюдения (1936) оказались достаточно успешными.

**Санитарные мероприятия после окончания выкормки.** По окончании выкормки проводят заключительную дезинфекцию помещения, инвентаря, спецодежды, территории вокруг червоводни, а все малоценные предметы (например, коконники) сжигают.

Недовитые коконы и коконы с погибшими гусеницами или куколками обеззараживают сухим жаром. Остальные коконы, годные для промышленного использования, замаривают. Если коконы не будут дезинфицированы, они неизбежно станут источником инфекции. Наиболее опасными переносчиками в этом случае являются вредители коконосушилок — крысы, мыши, кожееды.

Шимизу и Комори (1981) обследовали коконы с пятнами на внутренней поверхности оболочки. Оказалось, что 70,4% этих коконов содержали вирус ядерного полиэдроза. Ими было установлено, что инфекционность этого вируса и токсичность кристаллов бациллы тюрингиензис не инактивируются обычной тепловой обработкой при морке и сушке коконов. Полное обеззараживание коконов, содержащих вирус ядерного полиэдроза, может быть достигнуто прогревом их при 110°C в течение двух часов. Кристаллы эндотоксина бациллы тюрин-

гиензис сохраняют свою токсичность после тепловой обработки коконов при 140°C в течение одного часа; полная детоксикация кристаллов достигается двухчасовым прогревом при 150°C. Такая высокая термостабильность этого токсина представляется несколько неожиданной, так как его аморфный белок полностью денатурируется при 65°C в течение часа. Вирусы фляшерии и цитоплазматического полиэдроза полностью инактивируются сухим прогревом коконов при 40°C в течение одного часа.

## 6.8. Лечебные мероприятия на выкормке

Цель лечения—восстановить нормальное состояние внутренней среды организма и его функций. При лечении инфекционных болезней это достигается обезвреживанием находящегося в организме болезнетворного живого агента, его вредоносных веществ и мобилизацией защитной функции организма через посредство нервной и эндокринной систем. Такая направленность лечебного мероприятия относится к так называемой *этиологической терапии*; в борьбе с инфекциями у тутового шелкопряда она представляет наибольший интерес.

Животные и растения располагают средствами более или менее надежного противодействия инфекциям, благодаря которым они способны обратить вспять начавшийся процесс заболевания. У личинок насекомых способность к подобному самоизлечению от инфекционных болезней выражена слабо и притом по отношению лишь немногих патогенов. В тех случаях, когда это могло произойти, болезнь, скорее всего, еще не вышла из инкубационного периода, т. е. до наступления депрессии пищевого рефлекса (потери аппетита) и состояния иммобилизованности (неподвижности). Следовательно, факты самоизлечения шелковичных червей от инфекционных заболеваний, когда они наступают, по внешним признакам за редким исключением не могут быть обнаружены.

Каковы возможности по оказанию лечебной помощи заболевшей выкормке? Наименее надежными следует считать попытки спасти явно больных, а тем более агонизирующих гусениц; в отношении последних эти попытки не только совершенно бесполезны, но и в высшей степени вредны, поскольку такие гусеницы являются наиболее щедрым распространителем заразы среди своих сверстниц. Намерения вылечить гусениц могут касаться только ранних этапов заболевания.

**Химиотерапия.** Первое препятствие на пути использования лекарственных средств для лечения тутового шелкопряда — отсутствие рационального способа введения их в организм насекомого. Совершенно очевидно, что впрыскивание лекарства в гемолимфу гусеницы в масштабах промышленных выкормок нереально.

Прием лекарства с пищей может быть осуществлен до того этапа в развитии болезни, когда рефлексы на присутствие свежих листьев шелковицы не успели еще исчезнуть и гусеница продолжает питаться; с появлением первых симптомов болезни введение лекарства с кормом в пищеварительный тракт становится невозможным. Длительность промежутка времени, когда возможен прием гусеницей лекарства

с кормом, совпадает с инкубационным периодом; часто он настолько короток, что не сможет обеспечить курса лечения, если однократное введение лекарства окажется недостаточным. Кроме того, стремительное развитие болезни сильно сокращает период, во время которого сохраняются еще шансы эффективно вмешаться в развитие патогенеза. Поэтому лекарства, нанесенные на лист шелковицы, можно скармливать только здоровым гусеницам или же вскоре после их заражения. Это значит, что применение лекарств скорее всего носит не столько лечебный, сколько профилактический характер.

Существенным препятствием в применении лекарств путем их скармливания являются защитные функции органов обоняния, осязания и вкуса, сигнализирующие гусенице о присутствии препарата на листьях шелковицы, даже тогда, когда, руководствуясь нашими органами чувств, мы не улавливаем для этого каких-либо оснований. Замаскировать их присутствие очень трудно, если это вообще возможно.

На выкормках шелковичных червей с лечебно-профилактической целью можно применять пенициллин. Эта возможность облегчается тем, что лист, смоченный им, своим вкусом и запахом не отпугивает гусениц и они охотно его поедают. А. Саипов (1973) предложил для борьбы со стрептококковым энтеритом скармливать шелкопряду пенициллин в более высоких концентрациях (4950 ед/мл воды), чем другие авторы (50—200 ед/мл воды). И. П. Чичигина и И. М. Азимджанов (1981) попытались обосновать целесообразность использования этого антибиотика в более низких концентрациях и предложить примерные рекомендации для производственных выкормков. Они испытывали в лабораторных условиях концентрации 50, 100, 150 ед/мл воды на весенней, летней и осенней выкормке. Лист смачивали раствором антибиотика, подсушивали и скармливали два раза в сутки на протяжении трех дней четвертого возраста и первых четырех дней пятого. Концентрация 50 ед/мл воды оказалась неэффективной, а две остальные — одинаково результативными. Неэффективным было также кормление антибиотиком во втором и третьем возрастах, по мнению авторов, из-за малых дозировок, которые в состоянии были съесть с листом гусеницы этих возрастов. Результаты лабораторных наблюдений были подтверждены на весенних выкормках в совхозах с использованием пенициллина в концентрации 100 ед/мл воды. В опытном варианте жизнеспособность гусениц составляла 90,3%, масса кокона — 2,2 г, шелковой оболочки — 0,49 г или 22,9% по сравнению с двумя контрольными выкормками, показавшими результат соответственно 85,3% и 80,9%; 2,05 и 2,05 г; 0,43 и 0,42 г, т.е. 20,7 и 20,5%. Результаты производственных испытаний позволили рекомендовать пенициллин для промышленных выкормков, а успех разносезонных лабораторных наблюдений — высказать предположение о значении этого лечебно-профилактического приема при многократном червокормлении.

В принципе введение лекарственных веществ в организм насекомого может быть осуществлено не только через кишечник, но и через кожные покровы; этот путь допускает проведение лечебной операции в масштабах промышленных выкормков. Поверхностная тонкая несма-

чивающаяся пленка кутикулы служит надежной защитой против проникновения в организм химических агентов. Тем не менее энтомологи располагают значительным арсеналом инсектицидов контактного действия, рассчитанных на отравление в результате их проникновения в кроветок насекомого через кутикулу. Главная особенность этих инсектицидов — их способность растворяться в жирах и липидах. Соединения, обладающие этими свойствами, в состоянии проникать сквозь кутикулу, распространяться током гемолимфы, достигать нервной системы и других жизненно важных центров организма. Однако такими лекарственными препаратами шелководы пока не располагают; фармацевтических средств, сочетающих в себе лечебные достоинства со способностью проникать через кутикулу шелковичных червей, обнаружить пока не удалось. Еще менее ясен вопрос о возможности использования для этой цели дыхалец, а в качестве лекарств — тонкодисперсных аэрозолей или фумигантов (газообразных веществ), с последующей диффузией действующего начала из трахеол в гемолимфу.

Мы все еще слишком мало знаем о лечебных препаратах, которые можно было бы использовать против различных патогенов, хотя многие фармацевтические средства были испытаны на гусеницах тутового шелкопряда.

Все же некоторый опыт применения лекарственных средств для предотвращения гибели шелковичных червей от инфекционных болезней имеется. Установлена эффективность скармливания гусеницам некоторых сульфаниламидных препаратов при бактериальных кишечных инфекциях; испытано при бактериозах действие антибиотиков (Саипов, 1969; Африкян, 1973).

Г. В. Самохвалова (1980) на основании своих опытов убедилась в благоприятном влиянии скармливания левомецетина гусеницам тутового шелкопряда, воспитываемым на одуванчике и скорцонере. Этот антибиотик применяется в Японии при приготовлении искусственного корма для шелкопряда; японскими исследователями установлена также способность добавок левомецетина к заменителям шелковицы — листьям салата и бородавника, предупреждать замедленность роста и гибель гусениц тутового шелкопряда. По ее данным, левомецетин в значительной степени предотвращает развитие у гусениц кишечных заболеваний, в том числе вирусных (цитоплазматический полиэдроз и вирусную фляшерью), повышает выживаемость; способствует скорости и дружности развития, увеличению шелковой продуктивности.

Сложность разработки химиотерапии вирусных болезней в том, что в результате оккупации вирусом клетки образуется единый жизнедеятельный комплекс (вирус-клетка) и вещества, способные воспрепятствовать размножению вируса, «не менее эффективно, а в ряде случаев даже более эффективно угнетают обмен веществ самой клетки» (Соловьев, Баландин, 1969). Среди приемов противовирусной химиотерапии значительный интерес представляют антиметаболиты нуклеинового обмена (Першин, Богданова, 1973). Л. М. Тарасевич испытала с этой целью ряд соединений, способных вмешиваться в нуклеиновый

обмен оккупированной вирусом клетки: оказалось, что фолиевая, парааминобензойная кислота и антагонист нуклеинового обмена — 2,6-диаминопурин при скармливании их гусеницам за несколько дней до заражения в той или иной степени подавляют желтуху. Так, число полиэдров у заболевших гусениц под влиянием 2,6-диаминопурина уменьшилось по сравнению с их количеством у контрольных гусениц на 25%, а под влиянием фолиевой кислоты — на 7,5%.

Е. Н. Троицкая и др. (1980) испытали способность фермента, гидролитически разрушающего нуклеиновые кислоты вирусом, обеззараживать гемолимфу шелковичных червей, пораженных ядерным полиэдрозом и вытекающую из ранок на их коже. В опытах использована эндонуклеаза, вырабатываемая в качестве внутриклеточного продукта бактерий *Serratia marcescens* (бактерия продигиозум или «чудесная палочка»); препарат получен из Института цитологии и генетики Сибирского отделения АН СССР и безвреден для гусениц шелкопряда. Ферментом обрабатывали зараженную гемолимфу и очищенные полиэдры в течение 3 и 24 ч, после чего ими заражали здоровых гусениц. В результате гибель гусениц от желтухи оказалась заметно меньшей, чем в контроле от скармливания зараженного листа. По заключению авторов, противовирусное действие фермента проявляется главным образом против внеклеточных инфекционных частиц в гемолимфе, не имеющих полноценной белковой оболочки и потому более доступных гидролизующему действию фермента; его действие может быть использовано для сдерживания распространения болезни на выкормках через, в частности, зараженный лист.

Использование химических средств борьбы с заболеванием гусениц полиэдрозом и другими вирусными инфекциями может иметь также другую направленность. Известно, что избавление от трансвариальной инфекции возбудителя пембины — основная задача гренопроизводства; к сожалению, его возможности по предотвращению вирусных инфекций невелики. Наибольшую опасность в этом отношении представляет распространение с гроей латентной формы вируса, которую пока диагностировать не научились. Предпринимались попытки выявить латентную инфекцию методом провокации — использовали индукторы, «пробуждающие» инфекцию, с последующей выбраковкой заболевших гусениц. Помимо экологических факторов, обладающих индуцирующим действием, применяли химические агенты; так, Ваго (1953) предложил для индукции латентного вируса прибавлять к корму соединения фтора. Чтобы предотвратить развитие латентной инфекции, разработана система агротехнических мероприятий, предусматривающая устранение во время выкормки индуцирующих факторов. Существуют попытки избавления от этой опасности мерами противоположного действия — «стабилизацией» латентного состояния провируса, уменьшающей возможность его пробуждения; опыты показали возможность задержать активацию провируса у тутового шелкопряда, добавляя к корму соли кобальта и цинка (Гершензон, 1958). Интерес к изучению химиотерапии микроспориозов ограничен главным образом попытками лечить полезных насекомых — пчел, тутового и других шелкопрядов, а также, отчасти,



необходимостью защитить подопытных насекомых от гибели их в инсектариях (Михайлов, 1978). Удалось выяснить, что ряд испытанных веществ: перманганат калия, салициловая и муравьиная кислоты, перекись водорода, бетанафтол и многие другие обладают низким уровнем безопасности для насекомых и потому эффективные против микроспоридий дозы не могут быть применены. Испытаны средства, применяемые для лечения позвоночных: антисептик риванол, сперматоцид (противозачаточное средство), хинозол, противоамебиазное — ятрен, противоспоридиозное средство в ветеринарии — трипафлавин. В отношении микроспоридий все они проявляли непостоянство действия, что пытались объяснить неодинаковыми возможностями проникновения их в ткани и органы насекомого. Что же касается сульфаниламидных препаратов, то их антисептическое, главным образом бактерицидное действие, проявляет себя положительно при скармливании гусеницам: развитие септицемии, вызванной бактериями кишечника после поражения ноземой эпителия, предотвращается. На отдельные стадии развития возбудителя пембины этот препарат губительного действия не оказывает.

В последние десятилетия для подавления развития некоторых микроспоридий насекомых был использован фуимидил Б, коммерческий препарат фуимагиллина ( $C_{27}H_{36}O_7$ ), антибиотик, образуемый грибом *Aspergillus fumigatus*; он успешно применяется для лечения пчел, зараженных пчелиной ноземой *N. apis* (Бейли, 1953). Несколько позже его стали использовать для борьбы с другими микроспоридиозами, в частности, против *N. fumiferanae* (Томсон, 1955), которая поражает гусениц еловой листовертки — почкоеда *Choristoneira fumifera* Clemens (Вильсон, 1972). Армстронг (1976) испытал этот препарат с положительными результатами на *Nosema kingi* у дрозофилы (*D. willistoni*). Бейли (1953) предполагал, что фуимидил приостанавливает развитие вегетативных форм ноземы или уничтожает их. На основании своих цитохимических исследований Хартвиг и Пржелечка (1971), пришли к выводу, что действие фуимидила Б на нозему пчелы в кишечнике этого насекомого сводится к ингибированию синтеза РНК. Аналогичные выводы относительно действия фуимидила Б на синтез РНК у микроспоридии *Octospora muscadomesticae*, поражающей личинок мясной мухи *Phormia regina*, сделаны Яронским (1972). По его данным, если обработать зараженное насекомое фуимидилом Б в концентрации свыше 16 мг, РНК в цитоплазме споронта и споробласта разрушается. Вильсон (1972) сообщил, что препарат уменьшает зараженность ноземой или полностью избавляет от нее гусениц еловой листовертки-почкоеда, если он скормлен в концентрации 0,007% и если эта обработка произведена вскоре после того, как гусеницы появились из зимующих почек. Шинхольстер (1974) отметил, что фуимидил Б, который он некоторое время скармливал зараженной *Nosema whitei* личинке мучного хрущака *Tribolium costaneum* Hbst. в концентрации 0,001% или даже вдвое меньшей, вызывал у ноземы образование ненормальных по форме спор. Армстронг (1976) заражал взрослых плодовых мух дрозофил ноземой, скармливая им 5%-ный сироп сахарозы со спорами паразита. Лечебный эффект был испытан

в отношении фумидила Б в концентрации от 2500 до 8000 мг/л; в более низких концентрациях действие препарата не проявлялось. Скармливание и наблюдение проводилось в течение 20 дней. Оказалось, что в группе незараженных и необработанных фумидилом (контроль) выжило 92% насекомых, а у обработанных препаратом (не зараженных) выжило при дозе 250 мг/л — 78%, 500 и 1000 мг/л — 90%, 4000 мг/л — 82%, 8000 мг/л — 76%; токсичность, если она имела, была незначительной. В группе насекомых, зараженных ноземой, среди необработанных фумидилом (контроль) зараженность составляла 82%, а смертность — 88%; среди зараженных и обработанных препаратом количество зараженных оказалось значительно ниже контроля: при 250 мг/л — 46%, 500 мг/л — 30%, 1000 мг/л — 34%, 4000 мг/л — 4%, 8000 мг/л — 0%. Максимальная дозировка полностью избавляла насекомых от паразита.

Тем же автором в качестве противонозематозного средства испытан беномил (син. бенлат, дюлонт-1991), который выпускается в США в виде 50%-ного смачивающегося порошка. Это синтетический фунгицид, применяемый для уничтожения патогенных грибов полевых, огородных и садовых культур. Кроме того, он обладает акарицидным действием. Возможность его использования против микроспоридий была показана на ноземе люцернового долгоносика *Phytonomus variabilis* Hrbst. (Хсиао, 1973). Установлено отсутствие вредного действия препарата на насекомое в дозе 0,25%. Съеденный долгоносиком вместе с кормом беномил за трехдневный период питания полностью избавлял его от ноземы. Имеется сообщение (Шиндалстер, 1974), что беномил в концентрации 0,025—0,05% можно использовать для подавления ноземы у личинок мучного хрущака; при этих концентрациях споры в теле насекомого утрачивают обычный блеск и становятся темными.

Результаты опытов Армстронга с беномилом на дрозophile, зараженной ноземой, показали, что в группе незараженных и не обработанных препаратом выжило 92% насекомых, а у обработанных препаратом (незараженных) выжили при дозе 250 мг/л — 72%, 500 мг/л — 56%, а при остальных дозировках (1000 мг/л и более) все насекомые погибли. В группе зараженных и обработанных беномилом по мере увеличения концентрации препарата, наряду с увеличением смертности у мух, процент зараженных ноземой имел тенденцию снижаться. По мнению экспериментатора, беномил в дозировках 250—500 мг/л может быть использован для подавления развития ноземы, хотя в этих концентрациях он все еще токсичен.

В других опытах химиотерапии при заражении шелковичных червей ноземой тутового шелкопряда были испытаны фумагиллин (0,8, 0,08, 0,008%) и антибиотик мономицин (600, 400 тыс. ед. на 1 л); терапевтическое действие антибиотика оказалось несколько значительнее, но все же, по мнению авторов, «только ежедневное, как можно более раннее, от начала возникновения инфекции, введение лекарств, поддерживающее определенную концентрацию их в организме насекомого, при слабой интенсивности заражения способно в некоторой степени подавить развитие паразита и снизить инфицированность» (Хаханов, Вербицкая, Атабекова, 1979).

**Термотерапия.** Ещё более перспективна в борьбе с желтухой, как и со многими другими вирусными заболеваниями, термотерапия. Этот способ борьбы с вирусной инфекцией у тутового шелкопряда предложен японскими авторами по аналогии с использованием его фитопатологами для избавления растений от некоторых фитопатогенных вирусов; Ямагуши и др. (1969) предложили прогрев как средство борьбы с цитоплазматическим полиэдрозом, Иноуэ (1977) — с инфекционной (вирусной) фляшерией. Ватанабе и Танада (1972) наблюдали, что у совок после их прогрева ядерный полиэдроз развивается медленнее и полиэдры не образуются.

Г. А. Вербицкая (1971) рекомендует использовать фактор прогрева в ином плане: как отборочное средство для выведения желтухоустойчивых линий тутового шелкопряда.

Исследуется результативность термотерапии против вирусной фляшерии. Установлено, что повышение температуры на выкормке с 25 до 32°C на сутки в состоянии сдерживать дальнейшее развитие болезни у искусственно зараженных гусениц. Особенно эффективен прогрев гусениц в течение 24—48 ч при 36—38°C или в течение 7 ч при 40°C. Результативен метод сдерживания развития болезни на основе сочетания воздействия относительно невысокой температуры (34—35°C) со скормливанием антибиотиков — хлормицетина или ахлотицина. Исследователи утверждают, что повышенная температура ускоряет регенерацию поврежденного эпителия и отрицательно влияет на инфекционную активность и размножение вируса фляшерии. Пойкилотермный характер насекомого позволяет подобрать такое термическое воздействие, которое не является губительным для его носителя, но позволяет достигнуть определенного положительного результата с целью ликвидации или угнетения возбудителя не только вирусных, но и протозойных болезней.

Известно, что гибель от вируса цитоплазматического полиэдроза (ВЦП) будет меньше, если шелкопряда выкармливать при относительно высокой температуре. Частично это объясняется тем, что при повышенной температуре усиливается процесс отторжения зараженных клеток эпителия в просвет средней кишки и удаления их с экскрементами. Возможно также, что высокая температура сдерживает развитие вируса настолько, что позволяет гусеницам избежать гибели. М. Кабаяши и С. Кавасе (1980) поставили перед собой задачу выяснить, наблюдается ли у гусениц тутового шелкопряда, зараженных цитоплазматическим полиэдрозом и выкармливаемых при температуре выше оптимальной, отсутствие накопления этого вируса? В их опытах гусеницы выкармливались в асептических условиях на искусственном корме при 25°C. Слиявших на пятый возраст гусениц помещали на зараженный корм и выдерживали на нем в течение 18 ч. Затем зараженных гусениц разделили на две группы и содержали далее одну из них при 25°, а другую — при 35°C. В первой группе полиэдры появились на второй день после заражения и количество их логарифмически увеличивалось, достигнув максимума на 4—5-й день, на 8-й день они погибли. У гусениц, выкармливаемых при 35°C, полиэдры не были обнаружены до четвертого дня с момента заражения. Хотя у некоторых

из этой группы полиэдры были обнаружены на пятый день, количество их было весьма незначительным и на восьмой день около одной трети гусениц начали завивать коконы. У гусениц, содержащихся при 25°C, вирусы впервые были обнаружены на третий день после заражения и по мере развития заболевания количество их быстро увеличивалось. У гусениц, которые содержались при 35°C, хроматограмма никогда не показывала значительного присутствия вирусов, и если они накапливались, то много меньше летальной дозы.

Швейцарский исследователь Лотмар (1944) наблюдал, что пчелы избавляются от возбудителей нозематоза после того, как их содержат в течение 10 дней при 37°C, т. е. чуть выше температуры в «гнезде» с расплодом. Аллен и Брансон (1945) для освобождения лабораторных партий картофельной моли *Spogimoschema operculella* Zeller от ноземы *N. destructor* погружали ее яйца на 20 мин. в воду, нагретую до 47°C и этим ликвидировали заболевание у 75—90% особей.

Э. Ф. Поярко (1945) предложил биологический способ борьбы с пембиной путем прогревания коконов с куколкой определенной зрелости при температуре 33,3—34,3°C. Рекомендовалось содержать куколок при температуре 34°C по 16 ч ежедневно, а остальные 8 ч — при 21°C, и так до конца кукольного периода, т. е. не менее 12 дней. Метод рассчитан на прямое летальное воздействие высокой температуры на нозему и на усиление активности иммунобиологических средств сопротивления организма шелкопряда по отношению к возбудителю пембины. В итоге ему удалось снизить зараженность грены с 67 до 2%. Разрабатывая варианты этого принципа термотерапии, сотрудники САНИИШ (О. Г. Сапрыкина, В. В. Зворыкина, А. И. Хаканов, Л. Ф. Рождественская) предложили применять прогревание куколок в течение двух суток, чередуя через каждые 13 ч температуру в 40° и 25—26°C. Для этих опытов гусениц заражали в начале пятого возраста, скармливая им споры пембины. Прогрев куколок приводил к снижению зараженности грены до 0,5—26,5% против 4—46% непрогретых. Результаты термотерапии экспериментаторы объясняли ускоренным формированием грены в овариолах и образованием скорлупки, препятствующей проникновению в яйцо ноземы, а также усилением деятельности фагоцитов; возможно, также участие других каких-либо факторов противнозематозной защиты организма тутового шелкопряда.

Остаточное заражение при биологическом способе оздоровления грены по методу Э. Ф. Пояркова попытались снизить с помощью термического способа, разработанного Б. А. Астауровым при участии В. И. Лобжанидзе и Т. Т. Ованесян (1952). Прогреванию подвергалась грена, в которой паразит находится преимущественно в вегетативной стадии, менее защищенной от воздействия температуры, чем споры. Обработке подвергается свежееотложенная грена при появлении пигментации серозной оболочки. Метод этот нашел частичное применение на гренажных заводах Грузии. Грену насыпают в двойные марлевые мешочки по полкило в каждый и прогревают, погрузив в горячую (46°C) воду на 30 мин.

Н. А. Беднякова и В. Н. Верейская (1958, 1969) пришли к заключению, что остаточное заражение при термическом обеззараживании не может быть признано допустимым при приготовлении грены массового назначения, так как несколько процентов зараженных яиц в состоянии вызвать дальнейшее развитие пембины. По мнению Вейзера, в тех случаях, когда желточные клетки в грене, содержащие нозему оказываются в сформировавшейся средней кишке зародыша, ткани которой не инфицированы, вылупившаяся гусеница может успеть избавиться от паразита, выделив его вместе с экскрементами. Если же ткани зародыша заражены, прогревание грены может ускорить завершение вегетативных стадий ноземы и образование споры; тем самым снизить степень инфицированности грены за счет невозможности дальнейшего перезаражения, в которых участвуют только плазмодияльные стадии паразита. В тех же случаях, когда инфекция расположена в грене вне тканей самого зародыша (в желточных клетках, в клетках серозной оболочки), вышедшие из зараженной грены гусеницы независимо от термического воздействия могут оказаться здоровыми.

Термотерапия обладает широким оздоровительным действием, обеззараживающим шелкопряда; она избавляет его не только от ноземы, но и от различных протозойных инфекций. По наблюдениям Абэ (1979), при температуре выше 35°C в течение 24 ч лептомонады (жгутиковые простейшие из семейства трипаносом) полностью погибают, как в организме гусениц, так и вне его.

## **6.9. Тактика и стратегия борьбы с болезнями тутового шелкопряда**

Операции против заболевания во время очередного выкормочного сезона представляют собой решение задач, которые носят, так сказать, тактический характер. Они состоят из, во-первых, предупредительных мероприятий и, во-вторых, из попыток прервать развитие эпизоотии, а если это не удалось, ликвидировать очаг инфекции вместе с заболевшими гусеницами. Тактическая задача направлена на то, чтобы «выиграть бой» с появившимися болезнями, но она не в силах «выиграть войну» и выйти победителем в борьбе за полную ликвидацию заболеваемости выкормок или, если быть более точным, — свести их появление до предельно низкого уровня, утрачивающего экономическую значимость для отрасли.

Выиграть войну с болезнями можно только на основе стратегического плана, состоящего из долговременных усилий, направленных на решение следующих главных задач. К ним относятся, в первую очередь, приобретение точных данных относительно территориального распределения отдельных видов инфекции, их эпизоотических очагов, цикличности возникновения эпизоотий и динамики заболеваемости выкормок по годам. Очень важна характеристика преобладающих на эпизоотиях вариантов (или штаммов) возбудителей и местоположения связанных с ними источников инфекции во внешней среде. Сбор и анализ этих данных позволит подойти к разработке сезонных прогнозов. Без научно обоснованного прогноза эпизоотий профилак-

тические мероприятия, на долю которых приходится наибольшие усилия в шелководстве, не смогут быть достаточно эффективными, даже тогда, когда они выполнены добросовестно и умело.

К мероприятиям стратегического плана относятся дальнейшее совершенствование борьбы с трансвариальной инфекцией, надежность приготовления здоровой грены, методы выявления носителей латентного вируса и борьбы с этим видом инфекции; методы выведения пород, устойчивых к инфекционным заболеваниям, прежде всего вирусным. Очень важна дальнейшая долговременная работа по повышению уровня знаний, касающихся болезней шелкопряда и методов борьбы с ними, у всех работников шелководства с тем, чтобы их осведомленность в этих вопросах отражала действительное состояние науки в этой области.

В настоящее время мы не только очень далеки от такого состояния дел, но даже не имеем возможности судить о той дистанции, которую предстоит преодолеть нашей отрасли в ближайшие годы, чтобы выйти к исходным рубежам для реализации этих стратегических планов.

### Вопросы для самопроверки

1. Какими методами устанавливается результативность дезинфекции?
2. Что собой представляют профилактические и санитарно-гигиенические мероприятия и какие цели они преследуют?
3. Какие физические обеззараживающие средства используются шелководством и для обработки каких объектов?
4. Какими дезинфицирующими свойствами обладает формалин и какова техника его применения?
5. Какова техника дезинфекции хлорамином?
6. Каково обеззараживающее действие хлорной извести и для обработки каких объектов ее используют?
7. Чем вызвана целесообразность поверхностной дезинфекции грены и какие существуют методы выполнения этой операции?
8. Почему ранняя диагностика заболевания выкормки и прогноз течения эпизоды повышают надежность борьбы с болезнями шелкопряда?
9. По каким ранним признакам узнают заболевающих гусениц и с помощью какого приема изолируют от них здоровых гусениц?
10. Каковы возможности применения лекарственных средств и термотерапии в борьбе с болезнями тутового шелкопряда?

**Автогамия** (*аута* — сам, *гамос* — брак) — самооплодотворение, способ размножения у простейших, при котором сначала делится ядро клетки, затем продукты деления сливаются между собой, после чего делится сама клетка, становящаяся как бы прообразом зиготы.

**Агглютинация** (от лат. *ад-к*, *глютинаре* — склеивать) — склеивание в хлопья бактерий, кровяных и других клеток друг с другом под действием сывороток иммунизированного животного или же физико-химического изменения состояния среды, в которой они взвешены (рН, концентрация солей и т. п.).

**Аллергия** (от греч. *аллос* — другой, *эргон* — действие) — изменение реактивности организма в ответ на поступившие в него аллергены — вещества биологического происхождения (в основном, чужеродные белки), способные вызвать более или менее опасное нарушение состояния организма, вплоть до шока. Частный случай аллергии — *анафилаксия* (от греч. *ана* — обратно, *филаксис* — защита), возникающая в результате повторного введения антигена, вызывающего вместо иммунизирующего действия повышенную чувствительность («ранимость») организма.

**Антигены** (от *анти* и греч. *генос* — рождение, происхождение) — микробы, вирусы, а также высокомолекулярные соединения биогенного происхождения — чужеродные белки, токсины и др., способные вызывать образование в организме антител (см.).

**Антитела** — гамма-глобулины (иммуноглобулины), вырабатываются в иммунизированном или больном организме и появляются в сыворотке крови в ответ на присутствие антигенов (см); способны вступать в реакцию со строго тождественными антигенами и обезвреживать их.

**Артефакт** (от лат. *арте* — искусственно, *фактус* — сделанный) — искусственно вызванное образование в биологических структурах; чаще всего употребляют применительно к препаратам, в которых артефакты — результат несовершенной фиксации или окраски.

**Аски** (от греч. *аскос* — мешок) — сумки, органы размножения грибов, относящихся к классу аскомицетов, сумчатых грибов. Внутри сумок образуются аскоспоры.

**Аффинитет** (от франц. *аффините* — сродство) — способность клеток и тканей избирательно захватывать, связывать или поглощать определенные вещества, поступающие в организм или образующиеся в нем.

**Базидия** (от греч. *базидион* — фундамент) — орган спороношения обширного класса базидиальных грибов (базидиомицетов); состоит из особых выростов (стеригм), на которых образуется ограниченное число спор, обычно четыре.

**Бактериемия** (от *бактерии* и греч. *хайма* — кровь) — присутствие бактерий в крови; у насекомых известна возможность проникновения некоторых бактерий в кровь со стороны кишечника или ранок на коже, как временное явление, ликвидируемое фагоцитами или как этап патогенеза (при стрептококковом энтерите); в остальных случаях она обычно заканчивается септиемией (см.).

**Бактэрии** (от греч. *бактерион* — палочка) — класс низших микроскопических, преимущественно одноклеточных организмов, не имеющих оформленного ядра; в узком смысле — палочковидные представители их, не образующие, в отличие от *бацилл* (см.), споры.

**Бактериолизины** — вещества, растворяющие бактерий (см. лизис) и появляющиеся в крови больных или иммунизированных животных.

**Бактериологические исследования** — совокупность методов и технических приемов, направленных на изучение систематической принадлежности бактерий; в основе их — выделение чистых культур из одной бактериальной клетки или из одиночной колонии (что равнозначно), выросшей на плотной питательной среде, с последующими бактериоскопическими (см.) и культуральными (см.) исследованиями.

**Бактериологический контроль** — оценка эффективности действия дезинфицирующих средств по отношению к типовому набору бактерий, характеризующихся различной степенью устойчивости и являющихся по этому признаку неопасным

прототипом возбудителей заразных болезней, против которых направлена дезинфекция.

**Бактериоскопические исследования** (от греч. *σκοπεο* — смотрю, наблюдаю) — различные методы микроскопирования бактерий с помощью световой и электронной оптики.

**Бактериостатические факторы** (от греч. *στασις* — неподвижность, застой) — физические, химические, биогенные средства, способные вызвать прекращение размножения бактерий (бактериостаз); бактериостаз может быть истинным, когда бактерии перестают делиться, или культуральным — когда бактерицидные (см.) условия уравнивают размеры гибели и размножения популяции.

**Бактериофаг, фаг** (от греч. *φαγος* — пожиратель) — вирус, вызывающий лизис, растворение бактерий.

**Бактерицидность** (от лат. *caedes* — убийство, умерщвление) — способность физических, химических и биогенных (вырабатываемых различными организмами) факторов убивать бактерий.

**Бациллы** (от лат. *bacillum* — палочки) — палочковидные бактерии, образующие споры.

**Вакцина** — убитая или ослабленная культура возбудителя, применяемая для иммунизации.

**Визуальная диагностика** (от лат. *visuалис* — зрительный) — определение заболевания по внешним признакам его проявления.

**Вирион** — элементарная частица зрелого внеклеточного вируса, его инфекционная единица.

**Вирулентный фаг** — фаг, способный при заражении бактерии проделать полный цикл развития: размножиться в ней и вызвать ее лизис (см.) с выходом нового поколения фагов.

**Ворота инфекции** — место проникновения возбудителя болезни в заражаемый им организм: *перкутанно* — через кожный покров, *перстигмально* — через дыхальца; *перорально* — через рот; *парентерально* — в пищеварительный тракт; *интрацелюмально* — непосредственно в общую полость.

**Генетический код** — «запись» наследственных свойств организма в молекулах нуклеиновой кислоты (см.).

**Геном** — в широком смысле — совокупность ядерных элементов, обуславливающих генетические свойства клетки, а в цитологическом — совокупность генов гаплоидного одиночного набора хромосом.

**Герминативная инфекция** — инфекция, передаваемая через зараженного зародыша.

**Гимза окраска** (окраска Романовского, Романовского — Гимза) — обработка микроскопических препаратов азур-2-эозином, в результате которого цитоплазма клеток приобретает голубой цвет, а ядро — красный; применяется главным образом для окраски крови и простейших.

**Гифальные тельца** — фрагменты гиф энтомопатогенных грибов, наблюдаемые на этапе их паразитической жизни в гемолимфе насекомого.

**Грама окраска** — метод дифференциальной окраски микроскопических препаратов, в результате которой одни бактерии окрашиваются в красный цвет (грамположительные или неокрашивающиеся по Граму), а другие — в фиолетовый (грамположительные или красящиеся по Граму); эти особенности бактерий используют как систематический признак.

**Гуморальная теория иммунитета** (от лат. *гумор* — тканевая жидкость) — в отличие от клеточной теории иммунитета (см.) стремилась объяснить явление невосприимчивости организма к инфекционным болезням свойствами крови и соков организма.

**Детергенты** (от лат. *детергере* — очищай) — синтетические поверхностно-активные вещества, обладающие моющим и бактерицидным действием.

**Детерминант** (от лат. *детерминаре* — определять) — группа поверхностно расположенных молекул антитела (см.) с определенной пространственной конфигурацией, способной реагировать с активным центром комплементарного (см.) антигена (см.).



**Дизъюнктивный способ** (от лат. *дизъюнкцион* — разобщение, различие) — рабовещенный способ воспроизводства потомства у вирусов, при котором синтез дочерних нуклеиновых и белковых составных частей вирионов (см.) разобщены во времени и пространстве; они возникают на разных структурах оккупированной вирусом клетки, накапливаются на разных ее участках, после чего из них происходит сборка вирионов.

**Додекаэдр** — двенадцатигранный; ромбический додекаэдр ограничен двенадцатью плоскостями, каждая из которых — ромб.

**Жгутиковые, жгутиконосцы** (флагеллята) — класс простейших, подвижная стадия которых снабжена жгутиками — органами движения; например, лептомонаты из семейства трипаносомид, представитель которых часто поражает шелковичных червей.

**Идентификация** — отождествление, опознание видовой (вариететной, штаммовой) принадлежности микроорганизмов и вирусов на основании совокупности признаков или установление идентичности по какому-либо одному признаку, например серологическому.

**Инвазия** (лат. *инвазио* — вторжение, внедрение) — заражение, применительно главным образом к паразитам животного происхождения, в том числе к простейшим.

**Интрацеломальная полость** — см. Ворота инфекции.

**Иммунобиологические реакции** — ответ организма на инфекцию, обуславливающий его невосприимчивость; чаще всего имеются в виду отдельно взятые реакции противодействия: фагоцитоз (см. фагоциты), серологические реакции (см.) и др.

**Импрегнирование** — пропитывание, например, обеззараживающими или консервирующими растворами.

**Инактивация вируса** — потеря вирусом инфекционных свойств под воздействием различных факторов, например, прогрева зараженной им ткани.

**Ингибиторы** — вещества, главным образом, биогенного происхождения, сдерживающие (ингибирующие) биохимические, физиологические процессы или вовсе приостанавливающие их.

**Индуктор** (в биологии) — фактор, способный вызвать пробуждение биологических (биохимических, физиологических) процессов, выполнить по отношению к ним пусковую функцию.

**Инкапсуляция** — процесс заключения в капсулу, например, изоляция паразитов новообразованной тканью соединительно-тканного происхождения.

**Инкубационный период** — первоначальный, скрытый этап развития болезни, во время которого внешние признаки проявления заболевания отсутствуют.

**Инокулюм** (лат. *инокулюм* — прививочный материал) — заразное начало, подготовленное для искусственного заражения подопытных организмов; обычно с учетом количеством инфекционных единиц.

**Интáктный объект** (от лат. *интактум* — нетронутый) — природный объект с ненарушенными экспериментатором естественными особенностями и свойствами.

**Интóксикация** — явление отравления ядами, введенными в организм или образованными в нем самом при участии болезнетворного начала.

**Иньекция** — впрыскивание.

**Капсид** (от лат. *капса* — коробка) — белковый футляр вириона (см.), воспроизводящий свойственную данному вирусу форму (палочковидную, сферическую).

**Капсомеры** — единообразные структурные элементы белковой природы, из которых собран капсид (см.).

**Комменсализм** (от франц. *комменсал* — сотрапезник) — нахлебничество, частный случай симбиоза, когда один организм питается остатками пищи или второстепенными продуктами пищеварения другого.

**Комплементарный процесс** (от лат. *комплементус* — дополняющий) — процесс дупликации (см.) парных спиральных цепей ДНК, после их продольного расщепления и расхождения каждая доукомплектовывается комплементарной с нею цепью нуклеотидов, расположенных в том же порядке. Комплементарными, взаимодополняющими являются также организации детерминантов (см.), делающими возможной серологическую реакцию (см.) между антигеном и антителом.

**Конидии** (от греч. *конио* — пыль, *эйдос* — вид) — споры бесполого размножения у сумчатых и несовершенных грибов, образующиеся на концах особых выростов грибонычей — конидионосцев.

**Контагиозная инфекция** — заразная, передающаяся в результате соприкосновения с больным организмом, непосредственно или через зараженные предметы.

**Коремий** (от греч. *корема* — метла) — пучок тесно сближенных конидионосцев в виде высокой колонки.

**Кубическая система симметрии у вирусов**: капсиды (см.) всех сферических вирусов относятся к икосаэдрическому типу симметрии — телу, которое вписывается в куб (икосаэдр — двадцатигранник, а каждая ограничивающая его плоскость — равносторонний треугольник).

**Культуральные исследования** — изучение чистых культур бактерий с целью определения их систематического положения, основанного на их требованиях к условиям культивирования, по внешнему виду их роста на питательных средах и по их ферментативной деятельности, регистрируемой на наборе специальных диагностических питательных сред.

**Культура ткани** — содержание участков ткани или отдельных клеток вне организма, в стерильных питательных растворах, в которых они сохраняют способность к росту и делению клеток (в отличие от «переживающей» культуры ткани, не проявляющей этой способности).

**Латентная инфекция** (от лат. *латентис* — скрытый) внешне не проявляющая себя, «спящая» инфекция вируса, сохраняющая это состояние до перехода его в активное состояние под влияние различных индукторов (см.).

**Лизис** (греч. *лизис* — растворение, уничтожение) — растворение, разрушение клеток (кровяных — *гемолиз*, бактериальных — *бактериолиз*, вообще клеток — *цитолиз*) под действием лизинов (гемолизинов, бактериолизиннов, цитолизиннов) — веществ главным образом ферментативного характера, нарушающих целостность клеточных оболочек (мембран), в результате чего клетка распадается.

**Лизогения** — явление, при котором зараженный фагом бактерии не лизируются и не выделяют фаговых частиц (см. умеренный фаг).

**Мерозойты** (от греч. *мерос* — часть, *зоон* — живое существо) — молодые особи простейших, появившиеся в результате вегетативного размножения (шизогонии или агамогонии).

**Меробонт** — стадия агамного (бесполого) размножения микроспоридий, названная так частью протистологов (Штемпель, 1909 и др.), в отличие от шизонтов, потому что они делятся монотомически бинарно, т.е. однократно на две дочерние особи.

**Микоплазма** (греч. *микес* — гриб) — микроорганизм, который подобно вирусам проходит сквозь бактериальные фильтры, так как в его структуре содержатся фильтрующиеся элементы. В отличие от вирусов, содержит обе нуклеиновые кислоты. Единственный из известных ультрамикробов (сверхмалых), способный расти на искусственных бесклеточных средах и образовывать на них колонии, сходные с бактериальными. Желтухи и карликовости у растений вызываются не вирусами, как всегда считали, а микоплазмоподобными организмами или же по длинным представителями семейства Микоплазматацеа.

**Мицеллы** (от лат. *мица* — крошка, крупинка) — мельчайшие нитевидные или игловидные кристаллические частицы, являющиеся основой строения коллоидных веществ и многих биологических структур.

**Мицетомы** — органоподобные образования в теле насекомых из видоизмененных клеток, наполненные микробами — симбионтами.

**Морфогенез**, **формообразование** — процесс развития морфологических структур организмов в ходе их индивидуального (онтогенетического) эволюционного (филогенетического) развития.

**Нативный микроскопический препарат** (от франц. *нативе* — естественный, свежий) — препарат, состоящий из нефиксированного материала, находящегося в жидкой среде, обычно в капле воды, нанесенной на предметное стекло и покрытой покровным стеклом.

**Некрóz** (от греч. *некрос* — мертвый) — омертвление тканей в живом организме.

**Нозология** (от греч. *нозос* — болезнь) — учение о болезни как о процессе включающая этиологию (см.), патогенез (см.) и вытекающей из них систематизации (классификации) и номенклатуры болезней.

**Нуклеиновые кислоты** — сложные биогенные полимеры, полинуклеотиды, структурными мономерами (составными единицами) которых являются нуклеотиды, определяющие их принадлежность к рибонуклеиновой (РНК) или дезоксирибонуклеиновой (ДНК) кислоте. Оба типа входят в состав всех живых организмов, кроме вирусов, которые могут содержать только одну из них. У разных видов организмов ДНК имеют отличительные особенности: варьирует соотношение молярного содержания суммы гуанина + цитозина и аденина + тимина и величина отношения первой пары ко второй (у тутового шелкопряда эта величина составляет 0,79); это отношение характеризует все возможные различия организма, определяемые нуклеотидным составом ДНК. В макромолекуле полинуклеотидной цепочки ДНК расположен код — «сокращенная запись» наследуемых свойств организма. В ядрах клеток этот полимер образует особое вещество — хроматин в виде хромосом — гигантского комплекса из молекул ДНК и белка, а в бактериальных клетках — в виде нуклеотидов цитоплазмы. Генетическая функция ДНК осуществляется, во-первых, благодаря способности ее полинуклеотидной цепочки к редупликации (см.), в результате чего потомство получает от родителей копию их нуклеиновых кислот и, во-вторых, воздействием через посредство белкового синтеза на обмен веществ в клетках и, в конечном счете, — на структурные особенности развивающегося организма, его физиологические функции. На всю сумму биологических особенностей каждого индивидуума.

**Нуклеоид** (от лат. *нуклеус* — ядро) — сердцевина вириона (см.), состоящая главным образом из нуклеиновой кислоты и частично связанного с ней протеина.

**Нуклеотиды** — соединения, входящие в состав нуклеиновых кислот и состоящие из пуринового или пиримидинового основания, остатка фосфорной кислоты и одного из сахаров: рибозы или дезоксирибозы; наличие того или иного сахара определяет тип нуклеиновой кислоты: РНК или ДНК.

**Облигатные паразиты** (от лат. *облигатус* — обязательный, неизменный) — организмы, ведущие только паразитический образ жизни и неспособные к сапрофитному питанию.

**Пассаж микроорганизмов** — проведение возбудителя болезни через восприимчивый организм или питательную среду.

**Патоген** — возбудитель болезни.

**Патогенез** (от греч. *патос* — страдание, болезнь и *генезис* — происхождение) — механизм развития патологического (болезненного) процесса.

**Патология** — учение о болезнях; в отличие от нозологии (см.) чаще имеется в виду учение о патологическом состоянии организма и его проявлении как статического явления (весьма условное разграничение).

**Пелликула** (лат. *пелликула* — шкурка, кожица) — тонкая оболочка у некоторых простейших; прочное и эластичное производное наружного слоя протоплазмы.

**Перитэции** (от греч. *пери* — вокруг и *теке* — вместилище, сумка) — плодовое тело сумчатых грибов, внутри которого помещаются сумки со спорами.

**Полиэдры** (от греч. *полис* — много и *эдра* — грань) — многогранные кристаллоподобные тельца, образующиеся в результате деятельности особой группы энтомопатогенных вирусов, поражающих главным образом личиночную и куколичную стадии бабочек и содержащих в себе зрелую стадию вируса (вирионов).

**Преципитация** (от лат. *преципитацио* — стремительное падение вниз) — реакция осаждения белков, токсинов, вирусов и фильтрата культуры микроорганизмов, не содержащего микробных клеток. Одна из серологических реакций широкого применения, особенно в вирусологии.

**Профаг** — неинфекционная симбиотическая форма умеренного фага (см.), в лизогенных популяциях бактерий, нуклеиновая кислота которого ассоциирована (объединена) с ДНК бактерии, они делятся вместе с делением бактериальной клетки; может существовать в лизогенной бактерии, не вызывая ее гибели, до тех пор пока соответствующими воздействиями на лизогенную культуру профага не будет превращен в зрелого фага, который лизирует бактерию.

**Рабдо́риум** — наружный слой эпителиальных клеток, ограничивающий их от полости кишечника и состоящий из сомкнутого «частогокола» плазматических трубок, похожих на микроворсинки или мерцательные реснички.

**Реакция Фельгена** — гистохимический метод обнаружения ДНК, которая для этого частично гидролизуетея соляной кислотой с освобождением альдегидов; последние с реактивом Шиффа (основным фукеином, бесцветным сернистой кислотой) дают, в результате восстановления ими фукуина, красно-фиолетовое окрашивание.

**Редупликация ДНК** (от лат. *редупликацио* — удвоение) — процесс удвоения молекул ДНК, начинающийся с того, что исходная (родительская) спираль макромолекулы ДНК, состоящая из комплементарных (см.), дополняющих друг друга цепей, продольно разъединяется и расходится. Затем каждая из двух разошедшихся полинуклеотидных цепей служит матрицей для сборки на ней из нуклеотидов новообразованной дочерней, двойной спирали ДНК, являющейся точной копией родительской. Процесс протекает с помощью фермента полимеразы и является основным звеном воспроизведения генома (см.) нового поколения вирусов.

**Резистентность** (от лат. *резистенция* — сопротивление, упругость) — устойчивость микроорганизмов к химическим средствам, к антибиотикам, к лизирующему действию фагов и вирусов.

**Рентгеновский структурный анализ** — способ установления внутренней структуры материи (мицеллярной, кристаллической), формы и размеров кристаллов на основании изменения углов отражения рентгеновских лучей при просвечивании ими исследуемого объекта.

**Репродукция** (от лат. *ре* — снова и *продукцио* — производство) — воспроизведение организмами себе подобных; употребляется для обозначения размножения у вирусов, вследствие принципиального отличия их от организмов, в основе воспроизводства которых лежит деление клетки.

**Репликация** (от англ. *репликацион* — копирование) — самовоспроизведение молекул.

**Рецепторы** (от лат. *рецептор* — принимающий) — воспринимающие участки биологических структур, например, окончания нервных волокон, воспринимающие внешние раздражения и преобразующие их энергию в нервное возбуждение, или клеточные рецепторы (см. детерминанты), с которыми соединяются активные центры соответствующих им антител (см.).

**Риккетсии** — самостоятельный отряд бактериоподобных, граматрицательных, полиморфных организмов, многие из которых меньше самых маленьких бактерий. Широко распространены среди симбионтов и паразитов членистоногих, болезнетворны для теплокровных (сыпной тиф у человека). Подобно вирусам, не культивируются на микробиологических питательных средах.

**Ростковая трубочка** — трубочка, образуемая прорастающей спорой, у которой эндоспорий (внутренний слой оболочки) во время этого процесса вытягивается в длинную трубку, выполняющую функцию инфекционной гифы и внедряющуюся в покровные ткани заражаемого организма.

**Сапрофиты** — (от греч. *сапрос* — гнилой и *фитон* — растение) — растительные организмы, в том числе микроорганизмы, питающиеся мертвым органическим веществом, усваивающие вещество отмерших тканей.

**Септицемия** (от греч. *сепсис* — гниение и *хайма* — кровь) — гнилокровие, возникающее в результате массового размножения бактерий в общей полости насекомого и их ферментативной, главным образом протеолитической деятельности; септицемия обычно завершается общим (генерализованным) сепсисом — прижизненным гнилостным разрушением органов и тканей.

**Серологическая реакция** (от лат. *серум* — сыворотка крови) — сывороточные реакции иммунитета, с сывороткой крови, взятой от иммунизированных или больных животных: агглютинация, преципитация, связывание комплемента, лизис и т.д.

**Серотип** — группа особей с общими антигенами (серологическими) характеристиками, ограниченная чаще всего пределами одного вида, разновидности или штамма.

**Симптом** (от греч. *симптома* — совпадение, признак) — отдельные проявления (признаки) болезни.

**Синдром** (от греч. *синдрома* — скопление, стечение) — совокупность признаков болезни, ее общая картина.

**Спиральный (геликоидный) тип симметрии строения** — присущ палочковидным вирусам, вирионы которых имеют форму полого цилиндра, стенка которого собрана

из спирально уложенных капсомер (см.), а по внутренней стороне стенки, следуя за витками этой спирали, уложены нити нуклеиновой кислоты.

**Споруляция** — спорообразование.

**Супернатант** (англ. *супернатант* — всплывающий, плавающий на поверхности) — всплывающий слой жидкости, который может быть декантирован (сцезен, слит с поверхности) и отделен от остальной, отстаивающейся части взвеси.

**Таксономия** (от греч. *таксис* — расположение и *номос* — закон) — учение о принципах классификации представителей живой природы; *таксон* — систематическая единица: вид, род, семейство и т.д.

**Тест-объекты** в санитарно-бактериологической практике — зараженные предметы, на которых испытывается эффективность дезинфекции — см. Бактериологический контроль.

**Трансвариальная инфекция** (от лат. *транс* — через и *оват* — яйцо) — инфекция, передаваемая следующему поколению через яйцо.

**Ультрацентрифуга** (лат. *ультра* — сверх) — прибор для разделения частиц, взвешенных или растворенных в жидкости. Ротор центрифуги вращается со скоростью до 60—80 тыс. об/мин и создает центробежное поле с ускорением, в  $10^4$ — $10^5$  раз превышающим ускорение силы тяжести. Используют два типа роторов — для препаративных и аналитических работ, с охлаждением, поддерживающим необходимую низкую температуру для нестойких биологических объектов (например, митохондрий). Имеет оптическое устройство для графической или фотографической регистрации процесса седиментации (осаждения взвеси), определения количества фракций, относительной концентрации осаждаемых частиц, их молекулярной массы (после определения константы диффузии.).

**Умеренный фаг** — фаг, который, размножаясь в бактериальной клетке, переходит в состояние профага (см.).

**Фагоциты** (греч. *фагос* — есть, пожирать и *китос* — оболочка, сосуд) — защитные клетки крови и некоторых внутренних тканей мезодермального происхождения (среднего зародышевого листка), обладающие способностью поглощать микроорганизмы и другие чужеродные твердые частицы.

**Хламидоспоры** (от греч. *хламис* — плащ, мантия) — споры вегетативного происхождения некоторых грибов, покрытые твердой оболочкой; содержат запасы питательных веществ и способны сохраняться в неблагоприятных условиях среды.

**Целлюлярная теория иммунитета** (от лат. *целлюла* — клетка) — теория, объясняющая явления иммунитета защитной деятельностью клеточных элементов — фагоцитов.

**Целомическая полость, гемоцель** — вторичная полость тела между его стенкой и внутренними органами у насекомых и ряда низших животных, заполненная кровью (гемолимфой).

**Цитопатические явления** — патологические изменения, происходящие в клетке, доступные оптическим и другим средствам обнаружения.

**Шизогония** (от греч. *шизо* — разделяю, расщепляю) — множественное вегетативное размножение простейшим путем деления материнской особи (шизонта), которая дает начало многочисленному потомству.

**Шизозойт** — поколение простейшего, полученное в результате шизогонии.

**Шизонт** — стадия простейшего, размножающаяся шизогонией.

**Штамм** — выделенная культура микроорганизма, которая при последующем размножении является исходной; наиболее узкая систематическая единица в пределах вида или даже разновидности и варьитета, идентифицируемая у бактерий, микроскопических грибов и вирусов. Отводки штамма, помимо своего видового названия, сохраняют условные обозначения оригинала выделенной культуры (штамма) в виде литерного шифра, нумерации и т.п. Не выходя за пределы характеристики вида, штамм, помимо источника выделения, должен иметь какие-нибудь свои особенности, чаще всего выраженные количественно.

**Экзотоксины** (от греч. *εξω* — снаружи, *токсин* — яд) — токсины, выделяемые микробами в окружающую среду в процессе их жизнедеятельности.

**Эклипс-фаза** (от англ. *эклипсе* — затемнение, затмение) — ранняя фаза взаимодействия вируса с заражаемой им клеткой, когда его присутствие не удается обнаружить различными методами исследования; характеризуется тем, что в этот период завершается депротеинизация вириона и освобождение вирусной нуклеиновой кислоты, а в деятельности клетки происходит замена клеточной информации (руководства, внутриклеточными процессами) на вирусную.

**Элективные питательные среды** (от франц. *электив* — избранный) — специальные питательные среды, создающие особо благоприятные условия для развития определенных групп микроорганизмов.

**Элюирование** — вымывание фракций, полученных в препаративных сорбционных операциях.

**Эндотоксины** (от греч. *эндон* — внутри и *токсин* — яд) — токсины, освобождающиеся после разрушения микробной клетки.

**Эндемия** (от греч. *эндemos* — местный) — постоянно возникающая в данной местности болезнь, но на сравнительно низком количественном уровне, обусловливаемая благоприятными для нее природными, социальными и бытовыми факторами; в отличие от *эндемий* (греч. *демос* — народ), эпизоотии такого же характера обозначаются словом *энзоотия*, а зона их проявления — *энзоотическим очагом*.

**Энергия** (от греч. *энергос* — действующий) — функциональная единица клетки, т.е. ядро с прилегающей к нему цитоплазматической зоной, которая находится в сфере его непосредственного физиологического влияния. Исходя из этого, клетки с одним ядром называют *моноэнергидными*, а со многими ядрами — *полиэнергидными*; они могут объединять в себе два или несколько диплоидных или гаплоидных ядра.

**Этиология** (от греч. *этия* — причина) — учение о причине, вызывающей заболевание.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение . . . . .	3
<b>ГЛАВА 1. НЕКОТОРЫЕ ПОНЯТИЯ ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ</b>	
1.1. Инфекция . . . . .	9
1.2. Иммуитет . . . . .	11
Противоинфекционная защита насекомых (11). Гуморальный иммунитет насекомых (15).	
<b>ГЛАВА 2. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ</b>	
2.1. Коротко о бактериях . . . . .	19
Морфология бактерий (19). Принципы систематики (19). Распространение в природе (20). Бактериозы насекомых (20).	
2.2. Фляшерия (мертвенность) . . . . .	21
Признаки болезни (21). Поиск возбудителя фляшерии (22). Патофизиология фляшерии (23). Кондиционализм и проблема происхождения фляшерии (24). Кризис унитарной теории происхождения фляшерии (26). Что такое фляшерия (мертвенность)? (26).	
2.3. Септицемия . . . . .	27
Симптомы (27). Бактерии как этиологический фактор (27). Противоинфекционная защита целомической полости (29). Условия возникновения септицемии (31).	
2.4. Кишечный бациллярный токсикоз . . . . .	32
История открытия патогена (32). Систематика энтомопатогенных кристаллофоров (34). Токсины как фактор патогенности (38). Ферменты патогенности (39). Параспоральные кристаллы и их образование (40). Инсектицидные свойства параспоральных кристаллов (42). Лецитиназа бактерии тюрингиензис (45). Термостабильный токсин бактерии тюрингиензис (47).	
2.5. Чахлость (стрептококковый энтерит шелковичных червей) . . . . .	49
Симптомы и течение болезни (49). Стрептококки шелкопряда (50). Реакция организма гусениц на стрептококковую инфекцию (52). Патогенез чахлости (53).	

<b>2.6. Диагностика бактериозов</b> . . . . .	<b>56</b>
Принципы дифференциальной диагностики (56). Изучение состава возбудителей бактериозов в эндемических очагах (57). Серологическая диагностика (58). Определение серотипа бактерии тюрингензис (59).	

**ГЛАВА 3. ВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ**

<b>3.1. Коротко о вирусах</b> . . . . .	<b>68</b>
Открытие вирусов (68). Объект и методы его исследования (70). Вирионы и их строение (77). Систематика вирусов (77). Избирательный характер вирусного поражения (78). Процесс проникновения вируса в клетку (79). Оккупационная и репродукционная деятельность вируса (80).	
<b>3.2. Вирусы насекомых</b> . . . . .	<b>81</b>
Что привело к открытию вирусных болезней насекомых? (81). Вклад биометода в изучение энтомопатогенных вирусов (82). Значимость энтовирологических открытий для шелководства (83).	
<b>3.3. Ядерный полиэдроз</b> . . . . .	<b>84</b>
Из истории изучения болезни (84). Вирионы вируса ядерного полиэдроза и их морфогенез (89). Характеристика полиэдров (90). Процесс заражения шелковичных червей желтухой (93). Трансовариальная инфекция вируса (97). Латентный вирус ядерного полиэдроза (98). Иммунитет к вирусу желтухи (101). Признаки и течение желтухи (103). Очередность поражения вирусом органов и тканей (105). Диагностика желтухи (107). Эпизоотология желтухи (109).	
<b>3.4. Цитоплазматический полиэдроз</b> . . . . .	<b>112</b>
Открытие нового вируса (112). Систематическая характеристика (112). Распространенность среди насекомых (113). Полиэдры ВЦП (113). Характеристика вирионов (114). Пероральное заражение вирусом (115). Проникновение вируса в клетку и его репродукция в ней (116). Симптомы цитоплазматического полиэдроза (117). Диагностика (118). Эпизоотологические особенности заболевания (118).	
<b>3.5. Ядерный полиэдроз кишечника</b> . . . . .	<b>119</b>
Полиэдроз, вызываемый ВЯПК, содержащим ДНК (119). Полиэдроз, вызываемый ВЯПК, содержащим РНК (120).	
<b>3.6. Фляшерия, вызываемая вирусами</b> . . . . .	<b>121</b>
Характеристика фляшерии вирусного происхождения (121). Вирус инфекционной фляшерии (122). Патология вирусной фляшерии (123). Диагностика (125). Эпизоотология вирусной фляшерии (125). Селекция шелкопряда на устойчивость к фляшерии (127). Малые фляшерийные вирусы (128).	
<b>3.7. Другие вирусы, представляющие интерес для шелководства</b> . . . . .	<b>130</b>
Вирус гранулеза (131). Радужный вирус (132). Энтмопокс вирус — вирус оспы насекомых (134). Вирус денсонуклеоза (136).	

**ГЛАВА 4. ГРИБНЫЕ БОЛЕЗНИ**

<b>4.1. Краткая характеристика грибов</b> . . . . .	<b>142</b>
Строение и образ жизни грибов (142). Систематика (143).	
<b>4.2. Грибы — паразиты насекомых</b> . . . . .	<b>145</b>
Фикомицеты (145). Аскомицеты (148). Несовершенные грибы (149). Два типа поражения насекомых микозами (150).	
<b>4.3. Аспергиллезы</b> . . . . .	<b>152</b>
Аспергиллез тутового шелкопряда (153). Факторы патогенности аспергиллуса (154).	
<b>4.4. Белая мускардина, или бовериоз, тутового шелкопряда</b> . . . . .	<b>155</b>
История открытия инфекционной природы мускардины (156). Систематическое описание возбудителя (157).	
<b>4.5. Инфекционная фаза деятельности гриба</b> . . . . .	<b>158</b>
Прединфекционный этап развития гриба (158). Строение кожных покровов насекомого (159). Инфекционный процесс (160).	
<b>4.6. Паразитическая фаза жизни гриба</b> . . . . .	<b>163</b>
Стадия паразитирования в гемолимфе (163). Гемолимфа как среда жизнеобеспечения насекомого (163). Участие форменных элементов крови в противинфекционной защите (164).	
<b>4.7. Формирование факторов патогенности</b> . . . . .	<b>165</b>
Ферменты патогенности гифальных телец (165). Токсины возбудителя бовериоза (166). Токсикозный эффект (167).	
<b>4.8. Заключительная фаза жизнедеятельности гриба в теле насекомого</b> . . . . .	<b>168</b>
Развитие паразита перед переходом его к сапрофитизму (168). Жизнедеятельность гриба в мертвом насекомом (168). Участие антибиотиков в мумификации трупов (170). Двухфазный характер жизнедеятельности гриба и его развития в теле насекомого (171).	
<b>4.9. Признаки и течение мускардины</b> . . . . .	<b>172</b>
Проявление болезни (172). Посмертные изменения насекомого (173).	
<b>4.10. Диагностика мускардины</b> . . . . .	<b>174</b>
Микроскопическое исследование (174). Определение видовой принадлежности возбудителя (175).	

**4.11. Эпизоотология бовериоза . . . . . 175**

Роль внешних источников в формировании очагов поражения (175). Формирование инфекционного очага на выкормке (176). Сохраняемость спор, оставшихся после эпизоотии (178). Влияние на развитие эпизоотии восприимчивости шелкопряда (178).

**ГЛАВА 6. ПЕБРИНА**

**5.1. Из истории изучения пеприны . . . . . 180**

Предшественники Л. Пастера (180). Рождение целлюлярного гренжа (181). Возбудитель пеприны приобретает имя (183). На пороге эры электронной микроскопии (184).

**5.2. Биология возбудителя пеприны . . . . . 185**

Систематическое положение ноземы шелкопряда (185). Цитоморфология споры (185). Стрекательный аппарат споры (187). Факторы, побуждающие к выбрасыванию стрекательной нити (188). Электронномикроскопическая картина выхода спороплазмы (188). Биологическая функция стрекательной нити (191). Почему спороплазма, а не планонт? (192). Цитологическое описание спороплазмы ноземы тутового шелкопряда (192). Внутриклеточная стадия паразита (194). Бесполое размножение ноземы (194). БинуCLEARный тип строения ноземы шелкопряда (196). Споронты (196). Споробласты (197). Формирование споры (198). Гаметогенез и автотомия (199). Место полового процесса в цикле развития ноземы (200).

**5.3. Паразитическая деятельность ноземы . . . . . 201**

Патологические изменения в клетках, вызванные инфекцией (201). Способ распространения ноземы в теле шелкопряда (202). «Вторично инфицирующая форма» ноземы (203). Последовательность поражения органов и тканей гусеницы (206). Признаки и течение болезни (209).

**5.4. Эпизоотология пеприны . . . . . 210**

Тутовый шелкопряд как источник инфекции (210). Внешняя среда как посредник в распространении пеприны (211). Другие виды бабочек — источники возбудителя пеприны (212). Трансovarиальная и герминативная инфекция ноземы (215). Роль самцов в передаче ноземы следующему поколению (217). Зависимость зараженности яиц в кладке от зараженности бабочки (217). Проявление противонозематозного иммунитета (218).

**5.5. Диагностика пеприны . . . . . 221**

Пепринозные пятна на кожных покровах шелкопряда (221). Патологоанатомические признаки пеприны (223). Микроскопические исследования на присутствие спор пеприны (223). Технические средства и методы микроскопирования, усиливающие контрастность изображения (225). Фазово-контрастная микроскопия (226). Микроскопирование постоянных окрашенных препаратов через иммерсионные объекты (227). Электронная микроскопия (228).

**ГЛАВА 6. СИСТЕМА МЕР БОРЬБЫ С БОЛЕЗНЯМИ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА**

**6.1. Содержание мероприятий . . . . . 229**

**6.2. Дезинфекция . . . . . 230**

Физические средства обеззараживания (231). Химические средства дезинфекции (232). Газообразные средства и аэрозоли (234). Методы установления результативности дезинфекции (236).

**6.3. Обеззараживающие средства, используемые в шелководстве . . . . . 237**

Формалин (238). Хлорамин (241). Хлорная (белильная) известь (242). Негашеная известь (243). Сулема (244).

**6.4. Техника дезинфекции . . . . . 246**

Техника дезинфекции помещений и инвентаря (246). Дезинфекция поверхности грены (248).

**6.5. Целлюлярный гренж как профилактическое мероприятие . . . . . 251**

Из истории перестройки гренжа в интересах борьбы с пеприной (251). Сущность целлюлярного гренжа (252). Варианты отступления от принципов целлюлярного гренжа (255). Причины появления зараженной грены в продукции гренжных заводов (256).

**6.6. Предупредительные санитарно-гигиенические мероприятия во время выкормки . . . . . 260**

Использование противоиnфекционной сопротивляемости организма гусениц (260). Оптимизация экологических условий как средство содействия сопротивляемости инфекции (260). Профилактические мероприятия на многократных выкормках (263).

**6.7. Борьба с заболеваемостью шелковичных червей на выкормках . . . . . 264**

Обнаружение заболевания (264). Диагностика болезни (265). Прогноз развития заболевания и ее исхода (267). Карантинизация пораженных инфекциями выкормок (270). Меры по подавлению развития заболевания на выкормке (271). Избавление выкормки от гусениц — носителей инфекции (272). Удаление зараженной подстилки (274). Текущая дезинфекция выкормки (275). Обеззараживание поверхности тела гусениц (275). Санитарные мероприятия после окончания выкормки (276).

**6.8. Лечебные мероприятия на выкормке . . . . . 277**

Химиотерапия (277). Термотерапия (283).

**6.9. Тактика и стратегия борьбы с болезнями тутового шелкопряда . . . . . 285**

**Словарь специальных терминов . . . . . 287**