

АКАДЕМИЯ НАУК УЗБЕКСКОЙ ССР  
Институт зоологии и паразитологии

На правах рукописи

ФЕДОРОВА Светлана Хановна

УДК 595.734:632.616-091.8:632.937.14

ПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ И ГРИБЫ - РЕГУЛЯТОРЫ  
ЧИСЛЕННОСТИ КЛЕЩЕЙ *ARGAS PERSICUS* OKEN, 1818

(03.00.19 - паразитология)

А в т о р е ф е р а т  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Ташкент - 1983



Работа выполнена в Институте биологии Академии наук Киргизской ССР.

Научный руководитель: доктор биологических наук РОМАШЕВА Л.Ф.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук КУСОВ В.Н.,  
кандидат биологических наук ЩЕРБАК В.П.

Ведущая организация: Всесоюзный научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии.

Защита состоится " \_\_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 1983 г. в \_\_\_\_\_ часо.  
на заседании специализированного совета К 015.10.01 по присуждению  
ученой степени кандидата биологических наук в Институте зоологии  
и паразитологии Академии наук Узбекской ССР по адресу:  
700095, г.Ташкент, ул. Ниязова, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института зоологии  
и паразитологии АН УзССР.

Автореферат разослан " \_\_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 1983 г.

Ученый секретарь  
специализированного совета,  
кандидат биологических наук

*В. Тегин* — ГЕХТИН В.И.

А 1985  
13655

3

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Регуляция численности насекомых и клещей, наносящих ущерб сельскому хозяйству, является важным резервом увеличения производства наиболее ценных продуктов питания, что составляет важную государственную задачу, сформулированную XXVI съездом КПСС и майским (1982 г.) Пленумом ЦК КПСС.

Существенный экономический ущерб отрасли птицеводства наносят клещи *Argas persicus* — широко распространенные в Киргизии эктопаразиты домашних птиц. В результате их паразитирования яйценоскость кур снижается до 70%, живая масса одной птицы уменьшается в среднем на 250 г (Чирикашвили, 1972). Эти клещи являются хранителями и переносчиками возбудителей листериоза, спирохетоза, бруцеллеза и других опасных заболеваний (Пустовая, 1971; Грубенюк и др., 1972; Глухов, 1974).

Химические методы защиты животных и растений от паразитов и вредителей привели к кумуляции ядов в природе и нежелательным генетическим последствиям, в связи с чем назрела необходимость хотя бы частичной замены ядохимикатов высокоэффективными и безвредными для окружающей среды биологическими агентами ограничения численности вредных членистоногих. В этом отношении особый интерес представляют кристаллообразующие бациллы группы *Bac.thuringiensis* Berliner, 1915, а также несовершенные грибы *Beauveria bassiana* и *Faecilomyces fumoso-roseus*.

*Bac.thuringiensis* — один из немногих микроорганизмов широкого спектра действия, одновременно избирательных и экологически безвредных. Доказана перспективность использования кристаллообразующих бацилл в борьбе с вредными членистоногими (Лаврентьев, Сальников, 1966; Лескова, 1968; Тонконоженко, 1968; Ромашева и соавторы, 1975; и др.). Действие *Bac.thuringiensis* на клещей *A.persicus* изучали Л.Ф.Ромашева, В.П.Щербак (1970), А.В.Балыкин (1973). Некоторые изоляты несовершенных грибов против аргасовых клещей испытаны В.Н.Крыловой (1972, 1973). Однако многие важные стороны взаимоотношений патогенных микроорганизмов с клещами еще не раскрыты.

Не изучены, в частности, преобладающие факторы патогенности *Bac.thuringiensis* для клещей *A.persicus*, роль внутренней среды в патогенезе болезни клещей. Потенциал кристаллообразующих бацилл



в программе интегрированной борьбы с кровососами очень высок и должен быть полностью реализован. Для этого нужно определить возможности их использования в сочетании с химическими и другими микробиологическими агентами в целях повышения эффективности борьбы с вредителями.

Как регуляторы численности вредных членистоногих перспективны также патогенные грибы, широко применяющиеся в борьбе с вредителями растений. Механизм их действия на клещей *A. persicus* не изучен. Нет сведений и о возможности сочетания бактериальных и грибных культур для ограничения численности аргасовых клещей.

Отсутствие исчерпывающей информации по этой важной проблеме определило направление наших исследований.

Наша работа связана с одной из программ по решению важнейших научно-технических проблем ГКНТ, Госплана СССР и АН СССР - О.51.09 "Разработать и внедрить новые методы и средства, обеспечивающие стойкое ветеринарное благополучие сельскохозяйственных животных, охрану населения от болезней, общих для человека и животных, высокое санитарное качество продуктов и сырья животного происхождения".

Цель и задачи исследований. Цель работы заключалась в выявлении путей ограничения численности клещей *A. persicus* с помощью безвредных для окружающей среды агентов. Перед нами стояли следующие задачи:

- 1) выявление новых высоковирулентных штаммов *Bac. thuringiensis* - продуцентов бактериальных препаратов, специфичных против аргасовых клещей и пригодных для дальнейшего изучения действия на клещей сочетаний бактериальных и грибных культур;
- 2) установление акарицидной активности новых бактериальных препаратов и их смесей с сублетальной дозой хлорофоса;
- 3) изучение факторов патогенности *Bac. thuringiensis* по отношению к *A. persicus* и закономерностей вызываемого кристаллообразующими бациллами патологического процесса;
- 4) исследование патогенности несовершенных грибов для клещей *A. persicus*, выявление высоковирулентных штаммов их;
- 5) изучение механизма действия патогенных грибов на аргасовых клещей;
- 6) изучение механизма действия бактериальных и грибных культур при совместном их действии на клещей;
- 7) производственная проверка действия на клещей *A. persicus*

микробиологических препаратов.

Научная новизна работы. Выявлена группа высоковирулентных для клещей *A. persicus* штаммов *Bac. thuringiensis*, рекомендуемых в качестве продуцентов эффективных микробиологических препаратов. Гистологическими исследованиями установлено, что в патогенезе болезни клещей, вызываемой кристаллообразующими бациллами, ведущую роль играют кристаллические включения. Впервые показано, что септицемия у клещей, зараженных комплексом спор и кристаллов *Bac. thuringiensis*, развивается лишь при наличии в организме благоприятной среды, возникающей в результате интоксикации эндотоксином. Доказана роль pH содержимого средней кишки клещей в восприимчивости их к *Bac. thuringiensis*.

Гистологическими методами продемонстрирована способность несовершенных грибов *B. bassiana* и *P. fumoso-roseus* проникать в организм клещей как через наружные покровы, так и перорально. Изучены закономерности действия патогенных грибов на клещей, установлена корреляция между вирулентностью и токсигенностью патогенных грибов.

На клещах *A. persicus* впервые апробированы бактериально-грибные смеси. В результате изучения взаимоотношений патогенных микроорганизмов с клещами предложен новый метод ограничения численности аргасовых клещей последовательным воздействием на них грибными и бактериальными культурами. Этот метод дает хорошие результаты без добавления сублетальных доз акарицидов. Оригинальными являются сведения о механизме синергического действия грибных и бактериальных культур при последовательном воздействии их на клещей.

Практическая ценность работы. Выявлены высоковирулентные штаммы кристаллообразующих бацилл и несовершенных грибов, которые рекомендуются в качестве продуцентов микробиологических препаратов, специфичных против аргасовых клещей. Установлены концентрации микробиологических препаратов, целесообразные для подавления численности аргасовых клещей в птичниках. Разработаны новые методы ограничения численности аргасовых клещей с помощью экологически безвредных средств. Производству даны научно обоснованные рекомендации по применению микробиологических препаратов в борьбе с аргасовыми клещами.

Реализация работы. Рекомендации по применению бактериальных препаратов группы *Bac. thuringiensis* в борьбе с актопара-



витами домашних птиц используются по линии МСХ Киргизской ССР в птицеводческих хозяйствах.

Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 5 работ.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы докладывались на конференциях молодых ученых АН КиргССР (1980, 1982 гг.), заседании Киргизского отделения ВЭО (1983 г.), расширенном заседании лаборатории биологических методов борьбы с паразитами животных АН Киргизской ССР.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 179 страницах машинописного текста, состоит из 8 глав, введения, заключения, выводов и практических предложений. Текст иллюстрирован 21 таблицей и 30 фотографиями. Список использованной литературы включает 260 источников, в том числе 109 зарубежных.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в лаборатории биологических методов борьбы с паразитами животных Института биологии АН Киргизской ССР в период обучения в аспирантуре (1978-1981 гг.).

Объектом исследований служили клещи *Argas persicus* Oken, 1818, собранные в птицеводческих хозяйствах Чуйской долины Киргизии.

Для оценки патогенности бактериальных, грибных культур и промышленных микробиологических препаратов поставлено 780 опытов с использованием около 60 тыс. клещей, изготовлено 440 гистологических препаратов. Изучено действие на клещей *A. persicus* 11 штаммов *Bac. thuringiensis* пяти серотипов, в том числе H<sub>3</sub> и H<sub>8</sub>, ранее не исследовавшихся в качестве патогенов аргасовых клещей; 13 штаммов патогенных грибов *V. bauxiana* и *P. fumoso-roseus*; 7 бактериальных препаратов, грибной препарат боверин и хлорофос. В опытах использованы следующие микробиологические препараты: энтобактерин-3, дендробациллин, инсектин, БИП, турингин, токообактерин, Берлинер (эктопаразитин), опытная партия которого изготовлена заводом "Прогресс" на основе штамма 4, выделенного в

х) Штаммы *Bac. thuringiensis* выделены в 1976-1980 гг. младшим научным сотрудником лаборатории биометода У.Б. Уадиновым от диких птиц, аргасовых клещей, из почвы; штаммы несовершенных грибов изолированы кандидатом биологических наук В.Н. Крыловой из кровососущих клещей и растительноядных насекомых.

лаборатории биологических методов борьбы с паразитами животных Института биологии АН Киргизской ССР.

Эксперименты по изучению действия микробиологических агентов на клещей *A. persicus* проводили в нескольких вариантах. Клещей заражали:

а) водными суспензиями культур *Bac. thuringiensis* и патогенных грибов в титрах  $5 \cdot 10^8$ ;  $10^9$ ;  $5 \cdot 10^9$  м.к. бактерий и спор грибов на 1 мл;

б) *Bac. thuringiensis* в различных дозах с помощью микроинъектора;

в) бактериально-грибными смесями;

г) последовательно штаммами патогенных грибов и кристаллообразующих бацилл.

Заражение клещей осуществляли: перкутанно - погружением их в водные суспензии с определенным количеством инфекционных единиц возбудителя (при заражении клещей патогенными грибами применяли также опыливание спорами гриба), и перорально - кормлением на птице, обработанной водными суспензиями патогенных культур или препаратов по методике, разработанной Л.Ф. Ромашевой с соавторами (1976).

Особенности строения ротового аппарата клещей *A. persicus* позволили осуществить индивидуальное дозированное заражение известным количеством микробных клеток *Bac. thuringiensis*, получаемым методом последовательных разведений, с контрольным высевом на пластинчатый агар. Каждой особи в предротовую полость микроинъектором вводили 0,001 мл бактериальной суспензии, содержащей от  $8 \cdot 10$  до  $8 \cdot 10^5 - 10^6$  м.к.

Гистологические исследования проводили по методикам Б. Ромейса (1953), Г.И. Роскина, Л.Б. Левинсона (1959), Г.А. Меркулова (1969), Р. Дилли (1971) с некоторыми модификациями. Промежуточными средами перед заливкой в парафин служили гвоздичное масло или целлоидин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином по Эрлиху. Реакции среды содержимого средней кишки устанавливали по методике А. Иногамова (1935).

При изучении механизма действия и факторов патогенности кристаллообразующих бацилл для клещей *A. persicus* параллельно с гистологическими исследованиями и измерением pH содержимого кишечника готовили мазки содержимого средней кишки с целью обнаружения вегетативной формы *Bac. thuringiensis*.



Токсигенные и антибиотические свойства грибов изучали по методикам West, Briggs (1968), А.А.Евлаховой, Л.Г.Тарасова (1970).

При фотосъемке гистологических препаратов использовали универсальный микроскоп МБИ-15 (пленка "Микрат-200").

Производственную проверку действия бактериального препарата Берлинер (эктопаразитин) проводили на птицефермах колхоза "Красная заря" Сокулукского района Киргизской ССР.

#### ДЕЙСТВИЕ НА КЛЕЩЕЙ ШТАММОВ КРИСТАЛЛООБРАЗУЮЩИХ БАЦИЛЛ ГРУППЫ *VAC. THURINGIENSIS* И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Для разработки новых микробиологических препаратов и совершенствования существующих необходим постоянный отбор высоковирулентных штаммов патогенных микроорганизмов, выделяемых из природных объектов.

Мы изучили вирулентность выделенных в 1977-1980 гг. штаммов *Vac.thuringiensis*, относящихся к пяти разновидностям, в том числе *Vac.thuringiensis var.alesti* и *Vac.thuringiensis var.morrisoni*. Эти штаммы представляли интерес как возможные продуценты специфичных против аргасовых клещей бактериальных препаратов, а также как материал для исследования различных бактериально-грибных сочетаний.

В вариантах с перкутаным заражением *A.persicus* оказались слабо восприимчивыми к кристаллообразующим бациллам, что согласуется с данными А.В.Балыкина (1973). В данном случае при титре 5 млрд м.к./мл эффективность штаммов не превышала 32,5%. Гибель основной массы клещей отмечалась на 3-4-е сутки. С повышением титра спор и кристаллов *Vac.thuringiensis* смертность эктопаразитов возрастала незначительно.

Полученные нами результаты, а также данные литературы свидетельствовали о необходимости поиска способов преодоления устойчивости клещей к кристаллообразующим бациллам при воздействии через наружные покровы.

При заражении клещей методом кормления на обработанной птице их гибель достигала 67,0-75,0%. Наибольшую эффективность проявили штаммы I-ар, 30-ар, IO-сж, 83, выделенные из аргасовых клещей, органов диких птиц и почвы. Установлена зависимость смертности эктопаразитов от инфекционной нагрузки. Гибель основной

массы их происходила на 2-3 сутки после заражения.

С целью тестирования изучаемых штаммов по признаку вирулентности, определения заражающих доз *Vac.thuringiensis*, а также выяснения гистологической картины болезни клещей мы применили метод индивидуального дозированного заражения с помощью микроинъектора. Клещи получали 8-IO, 80-IOO, 800-IOO,  $8 \cdot 10^3$ -IO<sup>4</sup>,  $8 \cdot 10^5$ -IO<sup>6</sup> м.к.

Введение в организм IO<sup>6</sup> м.к. *Vac.thuringiensis* любого штамма вызвало 100% гибель клещей. При уменьшении дозы возбудителя в IO раз в некоторых случаях смертность паразитов снижалась до 90%. Доза  $8 \cdot 10^3$ -IO<sup>4</sup> м.к. обеспечивала гибель 50-100% клещей, полученные данные позволяли судить об акарицидной активности изучаемых штаммов. К группе высоковирулентных отнесены штаммы 83, 6, 4-био, IO-сж, 30-ар, I-ар, вызывавшие в дозе  $8 \cdot 10^3$ -IO<sup>4</sup> м.к. 100%-ную гибель клещей. Активность перечисленных штаммов отмечалась и при заражении во время питания на обработанной птице.

При индивидуальном введении 800-1000 м.к. *Vac.thuringiensis* наблюдалась 40-70% гибель клещей, что достоверно превышало соответствующий показатель контроля. Гибель клещей, получавших 80-100 и 8-IO м.к. возбудителя, близка к контрольным показателям. На основании полученных данных мы пришли к выводу, что 800-1000 м.к. *Vac.thuringiensis* является минимальной дозой, способной вызвать гибель клещей при пероральной инокуляции.

Группу высоковирулентных штаммов, выявленных методом индивидуального дозированного заражения, мы использовали при изучении совместного действия на клещей бактериальных и грибных культур.

Для сравнительной оценки эффективности новых бактериальных препаратов и их смесей с хлорофосом по отношению к клещам *A.persicus* и для установления гистологической картины болезни в опыты были включены препараты БИП, токсобактерин, турингин, Берлинер (эктопаразитин), а также изучавшиеся на аргасовых клещах А.В. Балыкиным (1973), Л.Ф.Ромашевой, А.В.Балыкиным и др. (1976) антобактерин-3, дендробациллин, инсектин. При пероральной инокуляции эффективность бактериальных препаратов против клещей *A.persicus* не превышала 55%. При заражении через кутикулу их смертность колебалась в пределах 25,0-27,5%.

С целью повышения эффективности биологических препаратов против аргасовых клещей при воздействии через кутикулу нами апро-



ированы смеси бактериальных препаратов БИП, Берлинер, турингин, токообактерин с сублетальной дозой хлорофоса. Эффективность бактериально-акарицидных смесей достигала 100%. Наиболее действенной оказалась смесь 0,1% хлорофоса с препаратом Берлинер (актопаразитин) в 1,5% концентрации. Хлорофос в концентрации 0,1% вызывал гибель 53,3% клещей.

Задача наших дальнейших исследований состояла в разработке экологически безвредных методов усиления действия кристаллообразующих бактерий как регуляторов численности аргасовых клещей.

#### ДЕЙСТВИЕ НА КЛЕЩЕЙ *A. PERSICUS* ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Мы испытывали на патогенность по отношению к клещам *A. persicus* 11 штаммов *Beauveria bassiana* и 2 штамма *Paecilomyces fumoso-roseus*.

Результаты исследований показали, что большинство изученных штаммов обладают достаточно выраженной патогенностью для клещей *A. persicus* как при пероральном, так и при перкутанном заражении, что позволяет включить их в ряд наиболее перспективных регуляторов численности этих паразитов.

Сравнение штаммов по признаку вирулентности проводили при заражении клещей водными суспензиями грибных культур в титре  $5 \cdot 10^9$  спор/мл. При этом выявлены группы высоко-, средне- и слабовирулентных штаммов. Установлена зависимость смертности клещей от инфекционной нагрузки (табл. I).

При опыливание спорами грибов (массированная инфекционная нагрузка порядка  $10^{10}$  спор/особь) летальность паразитов достигала 70,0–93,3%. Изучена динамика гибели клещей как при пероральном, так и при перкутанном заражении. В вариантах с высоковирулентными штаммами (865, 404, 46I и др.) микоз длился 8–12 суток, со слабовирулентными (72, 163 и др.) — до 40. Установлено, что увеличение инфекционной нагрузки сокращает сроки гибели клещей. Длительный инфекционный период свидетельствует о замедленном развитии патогена в организме членистоногого вследствие низкого уровня метаболизма. Период массовой гибели клещей был выражен лишь при заражении высоковирулентными штаммами и регистрировался на 8–10-е сутки.

Таким образом, изученные штаммы грибов можно считать акарипатогенными.

Т а б л и ц а I

Гибель клещей при заражении патогенными грибами, %

Штаммы	Заражение методом погружения		Заражение методом кормления на обработанной птице	
	$1 \cdot 10^9$ оп/мл	$5 \cdot 10^9$ оп/мл	$1 \cdot 10^9$ оп/мл	$5 \cdot 10^9$ оп/мл
453	42,85±3,24	53,50±2,88	41,87±4,02	60,83±3,02
446	66,42±2,83	78,50±2,88	32,50±4,30	32,50±4,13
И-40	32,14±4,16	50,50±2,88	41,25±4,26	64,10±2,01
408	35,00±3,77	69,20±1,66	41,25±2,39	50,00±1,82
404	57,85±2,85	73,50±2,88	78,00±3,31	72,50±4,42
К-75	42,14±2,64	52,17±1,66	51,25±4,26	69,16±2,80
965	52,14±5,65	67,80±3,33	51,00±5,09	74,16±1,14
46I	97,85±3,42	91,40±3,33	52,50±3,65	65,00±3,41
182	27,14±3,75	36,40±3,33	68,53±3,66	86,66±2,10
72	32,14±2,85	35,70±2,88	33,75±4,72	38,33±2,47
163	24,28±3,35	30,00±2,88	45,00±2,88	59,16±0,81
ВК-4	76,42±3,40	92,80±3,33	31,25±3,14	39,16±2,10
Рг	35,71±3,35	42,10±3,33	35,83±3,74	35,83±3,74
Контроль	0	0	0	0

#### СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ НА КЛЕЩЕЙ *A. PERSICUS* БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ГРИБНЫХ КУЛЬТУР

С целью повышения процента гибели клещей и сокращения длительности болезни мы заражали их бактериально-грибными смесями. В опытах были использованы все изучаемые штаммы патогенных грибов и высоковирулентные штаммы *Bac. thuringiensis*. В таблице 2 продемонстрированы полученные результаты на примере сочетания различных штаммов грибов с бактериальным штаммом 83 (серотип Н<sub>5</sub>) — одним из высоковирулентных штаммов *Bac. thuringiensis*. Здесь же для сравнения приведены результаты заражения клещей только грибами в том же титре, что и в смеси. Штамм 83 при заражении через наружные покровы вызывал гибель 16,6% клещей, при пероральном заражении — 50,0%.

Мы пришли к выводу, что эффективность бактериально-грибных смесей обычно не превышает сумму эффективностей каждого из пато-



генов в отдельности. Следовательно, активность бактериально-грибных смесей обусловлена независимым действием на клещей каждого компонента смеси, т.е. наблюдается аддитивный эффект за счет суммации их действия.

Т а б л и ц а 2

Гибель клещей при заражении их бактериально-грибными смесями в титре  $1 \cdot 10^9$  спор/мл и  $1 \cdot 10^9$  м.к. штамма 83 *Bac.thuringiensis*, %

Штаммы грибов	Заражение через наружные покровы		Пероральное заражение	
	Грибы	Грибы + <i>Bac.thuringiensis</i>	Грибы	Грибы + <i>Bac.thuringiensis</i>
453	42,85±3,24	63,33±3,33	41,87±4,02	66,66±4,41
446	6,42±2,83	66,66±3,33	32,50±4,30	43,33±3,33
И-40	32,14±4,16	56,66±3,33	41,25±4,26	63,33±3,33
408	33,00±3,77	66,66±3,33	41,25±2,39	60,00±0,00
404	57,85±2,85	70,00±0,00	78,00±3,31	70,00±0,00
К-75	42,14±2,64	56,66±3,33	51,25±4,26	60,00±4,80
143	31,42±3,89	46,66±3,33	58,75±1,25	73,33±3,33
965	52,14±5,65	63,33±3,33	51,00±5,09	80,00±0,00
461	97,85±3,42	83,33±3,33	52,50±3,65	66,66±3,33
182	27,14±3,75	36,66±3,33	68,53±3,66	76,66±3,33
174	38,57±5,20	36,66±3,33	41,00±3,31	63,33±3,33
72	32,14±2,85	40,00±0,00	33,75±4,72	53,44±7,30
163	24,28±3,75	36,66±3,33	45,00±2,88	43,33±3,33
ВК-4	46,42±3,40	46,66±3,33	31,25±3,14	56,66±3,33
Рг	35,71±3,50	46,66±3,33	19,16±5,22	50,00±5,40
Контроль	0	0	0	0

Особо следует выделить сочетания грибных штаммов 965, 461, 446, 404 со штаммами *Bac.thuringiensis* 30-ар, 1-ар, 83, 6, вызывавшие 80-90% гибели клещей.

При изучении динамики гибели клещей, зараженных бактериально-грибными смесями, установлено, что основная масса их гибнет на 13-16-е сутки. Начало гибели регистрируется на 1-4-е сутки.

Бактериально-грибные смеси эффективны как при пероральном, так и при перкутанном заражении.

Для преодоления устойчивости аргасовых клещей к кристаллообразующим бациллам при воздействии через наружные покровы мы разработали метод последовательного заражения паразитов вначале спорами гриба, а через 7-10 суток - бактериями группы *Bac.thuringiensis*. Опыты проводили в нескольких вариантах. Клещей заражали: а) через наружные покровы патогенными грибами, затем перорально - *Bac.thuringiensis*; б) перорально грибами, а затем бактериями; в) через наружные покровы в той же последовательности.

В опытах были использованы все изучаемые штаммы грибов в сочетании с высоковирулентными штаммами *Bac.thuringiensis*. В таблице 3 продемонстрированы полученные результаты на примере сочетания различных штаммов патогенных грибов со штаммом 10-сж *Bac.thuringiensis* (одно из наиболее эффективных сочетаний).

Т а б л и ц а 3

Гибель клещей при последовательном заражении патогенными грибами и *Bac.thuringiensis* (штамм 10-сж), %

Штаммы грибов	Перкутанное заражение грибами и пероральное - <i>Bac.thuringiensis</i>	Последовательное заражение через кутикулу грибами и <i>Bac.thuringiensis</i>	Последовательное пероральное заражение грибами и <i>Bac.thuringiensis</i>
ВК-4	96,66±3,33	89,16±2,37	68,33±4,37
461	98,33±1,66	86,66±2,47	76,66±4,37
446	96,66±1,66	90,00±1,82	70,00±2,88
404	98,33±1,66	87,50±2,14	98,33±1,66
965	98,33±3,33	65,83±2,38	86,66±9,38
К-75	98,33±1,66	67,50±2,81	73,33±6,03
453	78,33±4,41	53,83±3,39	80,00±2,88
И-40	83,33±4,41	58,33±2,47	55,00±2,88
182	80,00±2,88	49,16±2,38	81,66±5,13
72	76,66±1,66	46,66±2,10	61,66±4,37
408	75,00±2,88	48,33±1,66	65,00±2,88
163	70,00±2,88	55,38±2,38	56,66±1,66
Рг	80,00±2,88	53,33±2,41	70,00±4,07
Контроль	0	0	0

При последовательном заражении клещей грибными и бактериальными культурами мы добились практически полной их гибели.



Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что эффективность последовательного заражения превышает сумму эффективностей каждого из патогенов в отдельности (явление синергизма).

#### ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ В ОРГАНИЗМЕ КЛЕЩЕЙ *A. persicus* БАКТЕРИЯМИ ГРУППЫ *Bac. thuringiensis*

Клещи *A. persicus* слабо восприимчивы к заражению *Bac. thuringiensis* через наружные покровы, что объясняется главным образом гистологическими и гистохимическими особенностями кутикулы. Однако в отдельных случаях заражение все-таки происходит, что доказывают результаты гистологических и микробиологических исследований. Вегетативные клетки *Bac. thuringiensis* обнаруживаются в гемолимфе и жировом теле паразитов к концу первых суток после погружения в водные суспензии спор и кристаллов. Отмечены вакуолизация клеток гиподермы, пикноз ядер жирового тела, некробиоз мальпигиевых сосудов.

При погружении клещей в бактериально-акарицидные смеси симптомы интоксикации выражены сильнее.

Патологический процесс в организме клещей при пероральной инокуляции мы изучали после введения определенных доз *Bac. thuringiensis* в форме спор и кристаллов микроинъектором. Это позволило проследить зависимость проявления симптомов болезни от инфекционной нагрузки.

В вариантах с индивидуальным заражением клещей кристаллообразующими бактериями в дозе 80-100 м.к. иногда обнаруживались вакуолизация эпителия средней кишки, слущивание отдельных клеток. В большинстве случаев эти изменения являются обратимыми и восстанавливаются за счет резервных клеток эпителия.

Доза 800-1000 м.к. *Bac. thuringiensis* вызывала гибель 40-70% клещей. Через 6-12 ч после инокуляции в средней кишки фиксировалось усиление секреторной активности эпителия, проявлявшееся в увеличении количества секреторных клеток в пищевых массах. Через 12-18 ч начиналось слущивание эпителиальных клеток. На 2-е сутки в содержимом средней кишки отмечалось размножение бактерий. Следует указать, что большинство клещей погибали за счет интоксикации, до развития септицемии. Поэтому в гистопрепаратах, изготовленных из свежелогибших клещей, вегетативные клетки *Bac. thuringiensis* встречались сравнительно редко.

При увеличении инфицирующей дозы *Bac. thuringiensis* до  $8 \cdot 10^3$ - $10^4$  м.к. течение патологического процесса ускорялось. Картина болезни была ярко выражена, что позволяло изучать симптомы интоксикации и септицемии клещей. В начальный период болезни несколько усиливалась секреторная активность эпителия кишечника, в полость средней кишки отделялось большое количество пищеварительных клеток, где они разрушались с освобождением секрета (протеолитические ферменты). Здесь эндотоксин, содержащийся в кристаллах *Bac. thuringiensis*, подвергался действию кишечных протеаз, что сопровождалось образованием активного токсина. Растворению кристаллов способствовала высокая щелочность содержимого средней кишки. Вокруг некоторая активизация секреторной деятельности эпителия сменялась ее угнетением, начиналось слущивание клеток. По мере протеолиза кристаллического эндотоксина постепенно повышалась концентрация активного токсина в содержимом кишечника, о чем свидетельствовала гистологическая картина патологических изменений.

Вследствие интоксикации, обусловленной действием эндотоксина, щелочность содержимого средней кишки снижалась до 7,1-7,4 при 8,9 в норме, что позволяло спорам *Bac. thuringiensis* участвовать в патологическом процессе. Бактерии обнаруживались в пищевых массах через 18-24 ч после заражения комплексом спор и кристаллов *Bac. thuringiensis*. Они концентрировались вблизи эпителиальных клеток. В местах скопления бактерий ускорялся лизис клеточных оболочек, эпителий средней кишки превращался в некротизированную массу. Через разрушенную базальную мембрану бактерии проникали в полость тела, вызывая септицемию.

Генерализованное распространение бактерий в организме клещей наблюдалось редко, так как инокулированные паразиты обычно погибали за счет интоксикации. Следовательно, основным фактором патогенности кристаллообразующих бактерий для клещей *A. persicus* является кристаллический эндотоксин, действие которого создает условия для размножения бактерий в полости тела.

Детальный исход наступает в зависимости от полученной дозы *Bac. thuringiensis* и специфической чувствительности клещей к определенному штамму возбудителя.



ПАТОГЕНЕЗ МИКОЗА КЛЕЩЕЙ *A. persicus*, ВЫЗЫВАЕМОГО  
АКАРИПАТОГЕННЫМИ ГРИБАМИ

Гистологическими исследованиями доказана возможность проникновения грибов *B. bassiana* и *P. fumoso-roseus* в организм клещей как через наружные покровы, так и перорально.

Проникновение гиф в кутикулу зафиксировано на 3-4-е сутки после погружения членистоногих в водные суспензии культур патогенных грибов. Проникнув в гемоцель, грибы образуют одноклеточные фрагменты мицелия, гифальные тела, которые размножаются в гемолимфе делением и почкованием. На этой стадии микоза в гемолимфу выделяются токсические метаболиты, вызывающие иногда паралич и гибель клещей до прорастания гиф. На следующем этапе развития болезни в местах прикрепления гифальных тел образуются многоклеточные гифы, при прорастании которых происходит лизис окружающих тканей выделяемыми грибом ферментами. Патогенные грибы - продуценты хитиназ, липаз, протеаз (Павлюшин, 1979), обеспечивающих патогену питательные вещества в организме пораженного членистоногого.

В первую очередь инвазируется грибом жировое тело клеща. На 10-14-е сутки после заражения через кутикулу гифы в массовом количестве обнаруживаются в полости тела, в жировой ткани, вокруг мальпигиевых сосудов, кишечной трубки. С появлением гиф в мальпигиевых сосудах границы между клетками эпителия становятся неравными. Прорастающие гифы вызывают лизис эпителия средней кишки. В последнюю очередь поражаются гонады, мышечная и нервная ткань. На 10-25-е сутки (в зависимости от активности штамма) все органы и ткани клеща пронизаны гифами гриба, структура тканей не просматривается. Микоз заканчивается прорастанием гиф через кутикулу с образованием на поверхности тела конидиеносцев с конидиями.

Единичные споры не способны вызвать заболевание и гибель клещей. Пороговой является доза 500 млн спор/мл. В случае массивной инфекционной нагрузки показатели заражаемости и гибели клещей более высокие.

При пероральном заражении клещей патогенными грибами прорастание гиф в содержимом средней кишки отмечено на 3-4-е сутки. Концентрируются они вблизи эпителиальных клеток, вызывая их лизис. В это же время гифы проникают в гемоцель и распространяются

в органах и тканях.

Итак, грибы *B. bassiana* и *P. fumoso-roseus* независимо от способа заражения вызывают необратимые патологические изменения в тканях *A. persicus*.

МЕХАНИЗМ СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ НА КЛЕЩЕЙ  
ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ И ГРИБОВ

Как изложено выше, акарипатогенные грибы могут проникать в организм клещей *A. persicus* как через наружные покровы, так и перорально.

При заражении высоковирулентными штаммами микозы длятся 8-14 суток в связи с особенностями развития патогена в организме хозяина. Бактерии группы *Bac. thuringiensis* быстро вызывают интоксикацию и септицемию клещей, но их способность проникать в организм более ограничена.

Установлено, что сочетание этих микроорганизмов, обладающих уникальными свойствами в качестве патогенов членистоногих, полезно в целях повышения эффективности микробиологической борьбы с аргасовыми клещами.

На 2-е сутки после перорального заражения клещей бактериально-грибными смесями выявлялись вакуолизация и десквамация эпителия средней кишки, пикноз ядер и десквамация эпителия мальпигиевых сосудов, нарушение сетчатости жирового тела, что связано с деятельностью кристаллического эндотоксина *Bac. thuringiensis*. На 7-8-е сутки в содержимом средней кишки обнаруживались гифы гриба. Вегетативная форма *Bac. thuringiensis* не зафиксирована.

При заражении клещей методом погружения в бактериально-грибные смеси на 2-е сутки отмечался пикноз ядер жирового тела и мальпигиевых сосудов, на 3-4-е сутки в гемолимфе обнаруживались гифальные тела, на 7-8-е - гифы гриба.

При последовательном заражении клещей *A. persicus* грибными и бактериальными культурами наблюдалась следующая гистопатологическая картина. К моменту заражения клещей кристаллообразующими бациллами в их организме происходили значительные патологические изменения, вызываемые развивающимся грибом: в гемолимфе обнаруживались гифальные тела и отдельные гифы. У клещей, зараженных перорально, гифы прорастали в содержимом средней кишки.



В местах локализации гиф отмечался лизис тканей вследствие выделения ферментов. Действие *Bac.thuringiensis* на клещей, пораженных микозом, проявлялось в форме интоксикации эндотоксином: происходил пикноз ядер жирового тела и мальпигиевых сосудов. Пероральное введение *Bac.thuringiensis* вызвало десквамацию эпителия средней кишки.

Известно, что в процессе культивирования патогенных грибов на жидкой питательной среде несколько повышается ее щелочность. Аналогичное повышение pH гемолимфы клещей, пораженных микозом и активное выделение грибом протеолитических ферментов ускоряли расщепление кристаллического эндотоксина и переход его в активную форму, с чем был связан синергический эффект последовательного действия на клещей грибных и бактериальных культур. Предварительное воздействие на клещей акаримпатогенными грибами усиливало токсическое действие *Bac.thuringiensis* как при пероральном, так и при перкутанном заражении. Гибель клещей регистрировалась вскоре после заражения их *Bac.thuringiensis* при симптомах микоза и интоксикации эндотоксином. Обсеменение органов бактериями не наблюдалось.

В опытах по изучению возможности ингибирующего действия грибов на прорастание спор *Bac.thuringiensis* установлено, что культуральная жидкость патогенных грибов оказывает на *Bac.thuringiensis* слабое бактериостатическое действие, не препятствуя действию эндотоксина — основного фактора патогенности кристаллообразующих бактерий для аргасовых клещей.

## ВЫВОДЫ

1. Установлены антагонистические взаимоотношения между клещами *Argas persicus* и патогенными бактериями и грибами, что при определенных условиях приводит к гибели клещей.

2. Выявлены высоковирулентные штаммы бактерий группы *Bac.thuringiensis*, которые могут служить продуцентами биологических препаратов, специфичных против аргасовых клещей. При пероральной инокуляции штаммы I-ар, 30-ар, 10-сж, 83, 4-био серотипов N<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, N<sub>5</sub>, выделенные от аргасовых клещей, диких птиц и из почвы, обеспечивали 67,0-75,0% гибель эктопаразитов. Бактериальные препараты БИП, токсобактерин, турингин, Берлинер при пероральном заражении вызывали гибель 42,5-55,0% особей. Заражение

через наружные покровы было менее эффективным (летальность достигала 32,5%).

3. При погружении клещей в смеси бактериальных препаратов с сублетальной дозой хлорофоса (концентрации соответственно 1,5 и 0,1%) летальность эктопаразитов достигала 100%. Особенно эффективен с хлорофосом препарат Берлинер (эктопаразитин).

4. На большом фактическом материале продемонстрирована перспективность патогенных грибов в качестве регуляторов численности аргасовых клещей. Установлено, что грибы *Beauveria bassiana* и *Raecilonucyces fumoso-roseus* проникают в организм клещей как перорально, так и через наружные покровы. Выявлена группа высоковирулентных штаммов, вызывающих смертность 70-90% эктопаразитов как при перкутанном заражении, так и при пероральном.

5. Против клещей *Argas persicus* высокоэффективны бактериально-грибные смеси, вызывающие до 90-100% гибели клещей за счет независимого действия каждого из компонентов смеси.

6. Метод последовательного заражения *A.persicus* грибными и бактериальными культурами позволяет добиться практически полной гибели клещей без применения химических средств. В данном случае наблюдается явление синергизма.

7. Гистологическими исследованиями установлено, что *Bac.thuringiensis* как при пероральном, так и при перкутанном воздействии вызывает нарушения микроструктуры тканей клещей *A.persicus*. При пероральном заражении наиболее выраженные структурные изменения происходят в эпителии средней кишки, при перкутанном — патологическим изменениям подвергаются мальпигиевы сосуды, ткани внутренней среды.

8. Основным фактором патогенности кристаллообразующих бактерий для клещей *A.persicus* является эндотоксин. В результате взаимодействия эндотоксина с пищеварительными ферментами щелочность содержимого средней кишки снижается с 8,9 до 7,1-7,4, что создает благоприятные условия для прорастания спор *Bac.thuringiensis* и возникновения септицемии. Большинство паразитов гибнет в результате интоксикации, до развития септицемии.

9. Методом индивидуального дозированного заражения клещей установлена зависимость интенсивности их поражения от инфекционной нагрузки. Минимальной дозой *Bac.thuringiensis*, вызывающей патологические изменения эпителия средней кишки *A.persicus*, яв-



ляется 800-1000 м.к.

Ю. Проникновение гиф через наружные покровы клещей зафиксировано на 3-4-е сутки после перкутанной инокуляции спорами гриба. В патогенезе микоза важную роль играют токсины, образующиеся в стадии вегетативного размножения патогена в гемолимфе членистоногого. Однако гибель большинства паразитов происходит вследствие генерализованного распространения гриба. Развитие симптомов микоза нарастает с накоплением в организме ферментов и токсинов патогена.

II. В процессе изучения механизма синергического действия на клещей *A. persicus* сочетаний бактериальных и грибных культур установлено, что метаболиты патогенного гриба усиливают действие эндотоксина - основного фактора патогенности кристаллообразующих бацилл для аргасовых клещей.

#### ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для биологической регуляции численности клещей *A. persicus* в птичниках в теплое время года следует применять водные суспензии бактериальных препаратов (в частности, препарат Берлинер на основе местного штамма *Bac. thuringiensis*) в 2,0% концентрации для орошения помещений и птиц.

2. Места локализации клещей необходимо обрабатывать смесью бактериального препарата в 1,5%-ной концентрации с сублетальной дозой хлорофоса (0,1%). Бактериально-акарицидные смеси действуют и при пониженной температуре воздуха.

3. Смесями бактериального и грибного препаратов (например, Берлинер и боверин в 1,5-2,0%-ных концентрациях) рекомендуется орошать как птиц, так и места локализации клещей в помещении.

4. Для сокращения численности клещей *A. persicus* можно применять последовательные обработки птиц и птичника грибным препаратом боверин и бактериальным препаратом в 1,5-2,0%-ных концентрациях. Бактериальный препарат целесообразно применять через 10-14 дней после орошения грибным препаратом.

5. Перед осуществлением оздоровительных мероприятий требуется тщательная подготовка птичника, чтобы места локализации клещей стали доступными для препаратов.

6. Обработку помещений и птиц следует повторить не менее 3 раз с интервалом в 7-10 дней.

7. Расход суспензии препаратов - не менее 700 мл на 1 м<sup>2</sup> и 200-300 мл на одну птицу.

#### Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Федорова С.Ж. Гистологические исследования изменений органов клещей *Argas persicus* под воздействием энтомопатогенных грибов. - В сб.: Проблемы биоэкологии животных и растений и охраны окружающей среды. Фрунзе, 1980, с. 54-55.

2. Федорова С.Ж. Последовательное заражение клещей *A. persicus* энтомопатогенными грибами и бактериями. - В сб.: Проблемы биоэкологии животных и растений и охраны окружающей среды. Фрунзе, 1982, с. 37-39.

3. Федорова С.Ж. Действие на клещей *Argas persicus* бактериально-грибных смесей. - В сб.: Проблемы биоэкологии животных и растений и охраны окружающей среды. Фрунзе, 1982, с. 39-40.

4. Федорова С.Ж. Применение энтомопатогенных грибов в борьбе с клещами *Argas persicus*. - В сб.: Биологические методы борьбы с паразитами животных. Фрунзе, 1982, с. 80-86.

5. Федорова С.Ж. Изучение перорального заражения клещей *Argas persicus* различными дозами бактерий группы *Bac. thuringiensis*. - В сб.: Тезисы докладов молодых ученых АН Киргизской ССР на научной конференции, посвященной 60-летию образования СССР. Фрунзе, 1982, с. 208-209.

*Федорова*