

АПРОБАЦИЯ СХЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ АМЕРИКАНСКОГО ГНИЛЬЦА ПЧЕЛ

М.А. Лыдина, кандидат биологических наук, ст. преподаватель

тел. 8(8422)55-95-47, feokna@yandex.ru

Е.И. Климушкин, аспирант

тел. 8(8422)55-95-47, evgeniy.klim@yandex.ru

Ю.А. Райчинец, аспирант

тел. 8(8422)55-95-47, rajchinec@gmail.com

К.В. Кудряшова, аспирант

тел. 8(8422)55-95-47, kudryashova_91@list.ru

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Б.И. Шморгун, кандидат ветеринарных наук

ФГБУ «ВГНКИ»,

тел. 7 (499) 253-14-68, dav_ul@mail.ru

Ключевые слова: бактерии, возбудитель, пчелы, гибель, американский гнилец, штаммы, пробы, биохимические свойства, методика, тест.

Работа посвящена апробации схемы выделения возбудителя американского гнильца пчел - *Raenibacillus larvae*. При проведении исследований нами выделены и идентифицированы по биохимическим свойствам 18 энтомопатогенных бактерий *Raenibacillus larvae* из трупов пчел. Установлено, что уровень контаминации в среднем составляет 16,2 % от 107 исследованных проб. Данный показатель, изучаемый по конкретному региону, дает следующую картину – Сибирский ФО – уровень контаминации 25%, Южный ФО – 15,6 % и Приволжский ФО – 13,7 %.

Введение. Возбудитель американского гнильца пчел - спорообразующая бактерия *Raenibacillus larvae*. В одной погибшей личинке за короткое время накапливается более миллиарда спор, которые устойчивы к высокой температуре и химическим средствам. Во внешней среде (пустых ульях) споры сохраняются десятки лет. Заражение личинок происходит только спорами бактерий [17].

Болезнь характеризуется массовой гибелью запечатанного расплода, достигающей 30 %. Продуктивность пчелиных семей снижается до 40-70 %. По литературным данным в Центральном регионе Российской Федерации болезнь клинически проявляется в июне-июле, в южных районах - в мае-июне. Болезнь представляет большую опасность для пчеловодства, и ее относят в ветеринарии к карантинным. Заболевание распространено во всем мире [18].

Целью наших исследований было выделение возбудителя американского гнильца из трупов медоносных пчел (европейской темной (среднерусской) - *Apis mellifera mellifera*), полученных с частных пасек Сибирского, Южного и Приволжского округов Российской Федерации.

Задачи исследования:

- выделение возбудителя американского гнильца из трупов медоносных пчел на среде накопления Сибирского (Омская область, Томская область, Кемеровская область, Новосибирская область, Красноярский край), Южного (Краснодарский край, Ростовская и Волгоградская области) и Приволжского (Ульяновская, Самарская, Пензенская, Оренбургская и Саратовская области) Федерального округов Российской Федерации;
- изучение биологических свойств выделенных штаммов бактерий.

Материалы и методы исследований.

Объекты исследований. 51 проба – трупы пчел, полученные из Приволжского Федерального округа Российской Федерации. 32 пробы – трупы пчел, полученные из Южного Федерального округа Российской Федерации. 24 пробы – трупы пчел, полученные из Сибирского Федерального округов Российской Федерации.

Методы: для выделения бактерий *Raenibacillus larvae* использовали схему дифференциации бактерий рода *Raenibacillus* [7-8, 18]. Изучение морфологических, культуральных, биохимических свойств выделенных бактерий проводили по методам, реко-

Таблица 1 – Сводные данные об основных свойствах родов *Bacillus* и *Paenibacillus*, используемых для дифференциации

Вид	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. mycooides</i>	<i>B. mesentericus</i>	<i>P. larvae</i>
Признаки						
Рост в присутствии лизоцима	+	x	-	+	x	±
Анаэробный рост	+	-	-	+	-	+
Каталаза	+	+	+	+	+	-
Тест Фогес-Проскауера	+	+	-	+	+	-
Утилизация цитрата	+	+	-	x	+	-
Расщепление тирозина	+	-	+	x	-	-
Фенилаланин дезаминаза	-	-	+	-	-	-
Летичиназа	+	-	x	x	-	-
Редукция нитратов до нитритов	+	+	x	+	-	-
Гидролиз						
Казеина	+	+	-	+	+	+
Желатина	+	+	x	+	+	+
Крахмала	+	+	+	+	-	-
Образование кислоты из						
D-глюкозы	+	+	+	+	+	+
L-арабинозы	-	+	x	-	+	-
D-ксилозы	-	+	x	-	+	-
D-маннита	-	+	x	-	+	±
Газ из глюкозы	-	-	-	-	-	-

Примечание – « + » - более 85% штаммов, исследованных Сидоровым(1975) положительны,
 « - » - более 85% штаммов отрицательны,
 « x » - варибельный признак.

мендованным А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной [15].

Для культивирования возбудителя американского гнильца в настоящее время применяли среду накопления, содержащую гидролизат казеина с содержанием аминного азота 140-150 мг%, 5%, агара «Дифко» - 15 г/л (рН 7,0-7,2).

Результаты исследований и их обсуждение.

Исследуемые пробы (трупы пчел) вносили в стерильный физиологический раствор и прогревали на водяной бане в течение 30 минут при 75 °С. Затем производили посев на среду накопления, посева культивировали в термостате 20 часов при 37 °С.

Методика приготовления среды накопления: в колбу вносили гидролизат казеина, полученный путем разбавления дистиллированной водой до содержания аминного азота 140-150 мг%, кипятили при перемешивании 5 минут; добавляли 5% NaOH и доводили рН 7,8-8,0; добавляли агара «Дифко» - 15 г/л; смесь вновь кипятили при перемешивании 5 минут; доводили рН 7,2-7,4 с помощью 20% HCl; за-

тем среду фильтровали и стерилизовали при 121°С 20 минут.

Изолированные колонии со среды накопления пересеивали на мясо-пептонный бульон и культивировали 20 часов при 37 °С для выделения чистой культуры.

Из 107 проб, полученных для исследований, нами было выделено 65 штаммов бактерий (рис. 1), которые мы подвергли дифференциации по основным биохимическим свойствам, согласно данных Смирнова [13-14].

Редукцию нитратов определили после роста культуры на бульоне с нитратами в течение 24-72 ч. В каждую пробирку с засеянным нитратным бульоном прибавляли по 1 мл реактива. Если нитрат восстановлен в нитрит, то получалось темно-синее окрашивание.

Гидролиз казеина изучали на молочном агаре. Культуру засеивали на среду штрихом, инкубировали в термостате при 37 °С. Наблюдали за появлением прозрачных зон гидролиза.

Гидролиз крахмала наблюдали на картофельном агаре. Чашки Петри с засеянным картофельным

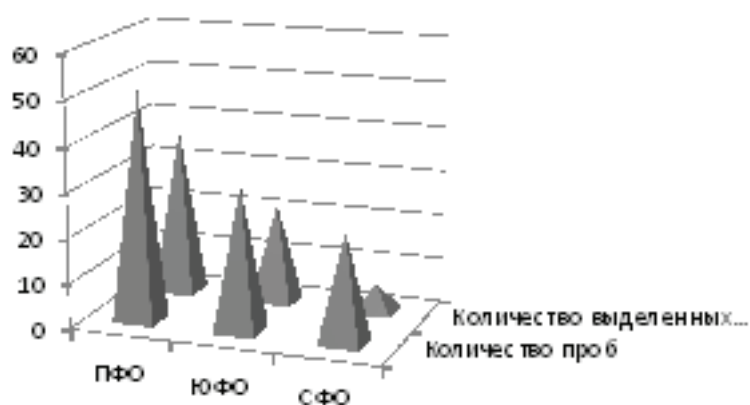


Рисунок 1 – Уровень контаминации исследованных проб бактериями родов *Bacillus* и *Paenibacillus*

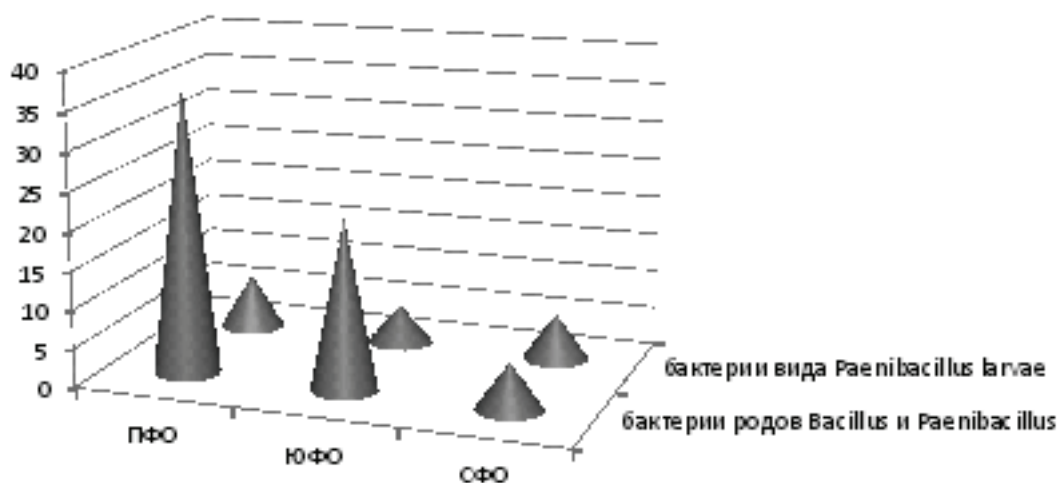


Рисунок 2 - Уровень контаминации исследованных проб бактериями вида *Paenibacillus larvae* – возбудителями американского гнильца пчел

агаром через 24-48 ч. заливали раствором Люголя. Светлые зоны вокруг посевов свидетельствовали о гидролизе крахмала.

Для изучения продукции каталазы чашечную культуру заливали 10 % H_2O_2 . Образовавшие пузырьки газа свидетельствовали о наличии каталазы.

С помощью реакции Фогес-Проскауэра устанавливали в среде ацетон, промежуточный продукт, образующийся при распаде глюкозы. Для постановки реакции Фогес-Проскауэра (в модификации Барита) культуры выращивали на среде Кларка 1-3 суток при 37 °С. Затем 1 мл культуральной жидкости переносили в пробирку и прибавляли 0,6 мл α – нафтола (5% раствор в абсолютном спирте) и 0,2 мл 40% КОН, взбалтывали. При положительной реакции через 2-5 мин наблюдали розовое окрашивание. У штаммов,

дающих сильную реакцию, окраска становится интенсивной и через 30 мин, а через 1 час переходит в малиновую. В случае отрицательной реакции розового окрашивания не наблюдается, и раствор принимает цвет меди.

Для определения утилизации углеводов культуры засеивали на полужидкую среду Омелянского с углеводами. При образовании кислоты из углеводов цвет среды изменяется с зеленого на желтый.

О кислотообразовании культур при росте на лакмусовом молоке судили по изменению цвета молока до розового (красного).

Рост в анаэробных условиях изучали на анаэробном агаре. Петлю суточной бульонной культуры засеивали уколом в столбик среды. Рост культуры по всей длине укола свидетельствовал об анаэробном росте.

Таблица 2 – Изучение уровня контаминации объектов исследований

Исследованный параметр	Сибирский ФО	Южный ФО	Приволжский ФО	Итого
Количество проб	24	32	51	107
Выделено культур родов <i>Bacillus</i> и <i>Paenibacillus</i>	6	22	37	65
Выделено штаммов вида <i>Paenibacillus larvae</i>	6	5	7	18

Нами выделены и идентифицированы по биохимическим свойствам 18 энтомопатогенных бактерий *Paenibacillus larvae* из трупов пчел (рис. 2).

Установлено, что уровень контаминации в среднем составляет 16,2 % от количества исследованных проб. Данный показатель, изучаемый по конкретному региону, дает следующую картину – Сибирский ФО – уровень контаминации 25%, Южный ФО – 15,6 % и Приволжский ФО – 13,7 %.

Заключение. В нашей стране отсутствуют отечественные диагностические тесты на наличие инфекционных агентов данных заболеваний.

Пчеловоды занимаются диагностикой и профилактикой инфекций по методикам 50-ти летней давности. Однако, предлагаемые вышеуказанной фирмой Vita-Test тесты диагностики имеют характерные для всех серологических тестов недостатки - возможные неспецифические реакции на различные присутствующие антигенные детерминанты, что дает ложно положительные реакции. Этим и обусловлена актуальность разработки и внедрения разрабатываемых нами фаговых биопрепаратов, для индикации и идентификации патогенных для людей, животных и насекомых микроорганизмов [1-6, 9-14].

Библиографический список:

1. Васильев, Д.А. Разработка параметров постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *Bacillus mesentericus* в объектах санитарного надзора / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2012. - № 3. - С. 69-73.
2. Васильев, Д.А. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Д.А. Васильев, Д.А., Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 1. - С. 79-83.
3. Васильев, Д.А. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 4 (24). - С. 36-43.
4. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, 2013. - С. 211-225.
5. Петрукова, Н.А. Биоиндикация содержания бактерий *Bacillus megaterium* в молоке и молочных продуктах / Н.А. Петрукова, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // «Экология родного края: проблемы и пути их решения»: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Киров, 2014. - С. 375-377.
6. Садеева, Н.Т. Выделение фагов бактерий вида *Bacillus cereus* / Н.Т. Садеева, Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина [и др.] // В сборнике: Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии: материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. – Ульяновск: ГСХА, 2012. - С. 14-17.
7. Райчинец, Ю.А. Методика выделения *Paenibacillus larvae* / Ю.А. Райчинец, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина [и др.] // Современные проблемы науки и образования. - 2014. - № 5. - С. 599.
8. Райчинец, Ю.А. Перспективы применения бактериофагов для биоиндикации возбудителя американского гнильца пчел / Ю.А. Райчинец, Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина [и др.] // «Экология родного края: проблемы и пути их решения»: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Киров, 2014. - С. 344-345.
9. Романова, Н.А. Сравнительная эффективность методов выделения фагов бактерий *Bacillus megaterium* / Н.А. Романова, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин [и др.] // Вестник ветеринарии. - 2013. - № 1 (64). - С. 26-27.
10. Феоктистова, Н.А. Перспективы применения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, М.А. Юдина [и др.] // В сборнике: Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности Научно-практический семинар с международным участием. – Ульяновск: УлГУ, 2011. - С. 136-139.

-
11. Феоктистова, Н.А. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* / Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, А.Х. Мустафин // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2011. - Т. 4. - № 32-1. - С. 288-290.
 12. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения / автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. Саратов, 2006. – С. 6.
 13. Феоктистова, Н.А. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 1 (25). - С. 68-76.
 14. Феоктистова, Н.А. Методы выделения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, В.А. Макеев, М.А. Юдина [и др.] // Вестник ветеринарии. - 2011. - Т. 59. - № 4. - С. 88-89.
 15. Юдина, М.А. Разработка фагового препарата *Bacillus mesentericus* и область его практического применения/ автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. Саратов, 2012. – С. 5.
 16. Forsgren, E. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus* larvae in honey bee larvae / E. Forsgren, T. C. Olofsson, A. Vásquez, and I. Fries // Sergio Salla Apidologie, vol. 41, 2010. – P. 99–108.
 17. Russenova, N. European foulbrood disease-aetiology, diagnostics and control // N. Russenova, P. Parvanov // Trakia Journal of Sciences, vol. 3, no. 2, 2005. – P.10-16.
 18. Slepecky, R.A. The Genus *Bacillus*-Nonmedical / R.A. Slepecky, H.T. Hemphill // Prokaryotes. – 2006. - № 4. – P. 530–562.

APPROBATION OF THE SCHEME OF ALLOCATION OF THE ACTIVATOR AMERICAN ROTTENNESS OF BEES

M. A. Lydina, E.I. Klimushkin, Yu.A. Raychinets, K.V. Kudryashova, B. I. Shmorgun

Key words: *bacteria, activator, bees, death, American gnilets, strains, tests, biochemical properties, technique, test.*

Work is devoted to approbation of the scheme of a vydleleniye of the activator American rottenness of bees - Paenibacillus larvae. When carrying out we allocated and identified on biochemical properties 18 the entomopatogennykh of bacteria of Paenibacillus larvae from corpses of bees. It is established that the level of a kontamination averages 16,2% of 107 studied tests. This indicator studied on the concrete region gives the following picture – Siberian Federal District – the level of a kontamination of 25%, Southern Federal District – 15,6% and the Volga Federal District – 13,7%.