

7. Методика опытного дела в овощеводстве и бахчеводстве / под ред. В. Ф. Белика. – М. : Агропромиздат, 1992.

8. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследования) / Б. А. Доспехов. – М. : Агропромиздат, 1985. – 351 с.

APPLICATION EFFICIENCY OF BIOPESTICIDE “BACTAVEN” TO CONTROL ROOT ROTS OF GREENHOUSE TOMATO

*A. V. SVIRIDOV¹, E. G. SHINKARENKO¹, V. A. POTSEPEY²,
V. N. KUPTSOV³, M. N. MANDRYK-LITVINKOVICH³, E. I. KALAMIYETS³*

¹*Grodno state agrarian University, Grodno, Belarus, sviridov@ggau.by*

²*Grodno vegetable factory, Grodno, Belarus, vegetablefactory_grodno@tut.by*

³*Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus, kuptsov@hotmail.com*

Laboratory and field trials of the pesticide “Bactaven” have shown that this preparation is characterized by high biological and economic efficiency against root rot pathogens of tomato grown in small-scale hydroponic culture. The biological counter-disease efficacy of the biopesticide during vegetation season equaled 52.4 %. “Bactaven” application resulted in extra harvest yield of 1.22 kg/m².

Поступила в редакцию 11.05.2020

УДК 619:638.154.4-084

АНАЛИЗ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ «АПИПРО» ПРИ НОЗЕМАТОЗЕ И АСКОСФЕРОЗЕ ПЧЕЛ

*Т. М. СКУДНАЯ¹, И. М. ЛОЙКО¹, А. Г. ЩЕПЕТКОВА¹,
Н. А. СТАРИКОВА¹, Л. В. РОМАНОВА², Р. А. СТЕПАНЯН²*

¹*Гродненский государственный аграрный университет,
Гродно, Беларусь, ggau@ggau.by*

²*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
microbio@mbio.bas-net.by*

Проведенные садковые исследования показали, что пробиотическая кормовая добавка «Апипро» не предотвращает заражение пчел спорами *Nosema apis*, в связи с чем не рекомендуется ее применение при нозематозе пчел.

В ходе исследований установлено, что культура спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* проявляет антагонистическую активность в отношении гриба *Ascosphaera apis*, вызывая зону задержки роста в среднем $11,26 \pm 0,27$ мм. Применение пробиотической кормовой добавки «Апипро» сдерживает развитие аскофероза и увеличивает печатный расплод в среднем до $5600 \pm 396,86$ ячеек расплода на одну семью.

Введение. В системе ведения сельского хозяйства и экономике страны в целом пчеловодство играет важную роль, поскольку является источником получения уникальных целебных продуктов питания для населения и незаменимого сырья для промышленности, а также способствует повышению урожайности энтомофильных растений в результате организации их насыщенного опыления пчелами. Пчеловодство занимает важную стратегическую позицию, обеспечивая и способствуя развитию таких отраслей, как растениеводство и животноводство. В настоящее время состояние отрасли пчеловодства в Беларуси характеризуется как критическое. Несмотря на рост численности пчелиных семей за последнее десятилетие на 17 %, имеющийся в стране ресурс пчел значительно отстает от нормы, необходимой для насыщенного опыления культур в растениеводстве [2].

При изменении климатических, экологических, биологических условий окружающей среды ослабевает иммунная защита пчел, повышается восприимчивость к болезням, паразитам и физическим воздействиям, что в конечном итоге может привести пчелиную семью к гибели. Однако наиболее вероятной причиной гибели пчел считают широкое распространение вирусных, бактериальных и грибковых инфекций [7].

Экологическое сельское хозяйство активно развивается в мире и, как следствие, интерес вызывает органическое пчеловодство, направленное на получение экологически безопасной продукции. В отличие от индустриального, при органическом пчеловодстве пасеки размещаются в отдалении от источников загрязнений, полей с генномодифицированными культурами, при этом исключается пагубное воздействие агрохимии. Лечение пчел проводится с помощью натуральных средств: эфирных масел, органических кислот, разрешенных бактериальных препаратов [3]. В рамках органического пчеловодства особое внимание уделяется

пробиотическим препаратам, которые улучшают работу кишечника пчел и его микробиоценоз, что приводит к укреплению их иммунитета [5].

Исследования многих ученых показали благоприятное влияние пробиотических препаратов на основе бактерий родов *Lactobacillus* и *Bacillus* на хозяйственно полезные признаки пчелиных семей и снижение заболеваемости пчел нозематозом [1, 8].

Среди микозов наибольшее распространение на пасаках Республики Беларусь имеет аскофероз, вызывающий ослабление пчелосемей, снижение способности пчел к медосбору и опылению, иногда их гибель [6].

Пробиотические бактерии *B. subtilis*, содержащиеся в препарате «Апиврач», проявляют антагонистическую активность в отношении гриба *A. apis*, подавляя его рост [4].

Учитывая вышеизложенное, научный и практический интерес представляет изучение возможности использования пробиотической кормовой добавки «Апипро» при нозематозе и аскоферозе пчел.

Материалы и методы. Определение эффективности влияния пробиотической кормовой добавки «Апипро» на *N. apis* проводили в садковом опыте по общепринятой методике. По принципу аналогов подбирали пчел серой горной кавказской породы, изолированных от здоровых семей, которых помещали в энтомологические садки по 250 ± 7 особей в каждой. Энтомологические садки с пчелами содержали в термостате при температуре 25–28 °С и относительной влажности 70–80 %.

1-е сут пчелы получали чистый сахарный сироп по 10 мг на садок. На 2-й день производили заражение пчел спорами *N. apis*. Инвазирование нозематозом осуществляли путем скармливания вместе с сиропом суспензии со спорами.

С целью получения суспензии для заражения от больных нозематозом семей отбирали по 50 пчел. Живых насекомых усыпляли, извлекали кишечник, который тщательно гомогенизировали в стерильной фарфоровой ступке в физрастворе (1 мл физраствора на 1 пчелу). Для определения количества спор в пчеле использовали счетную камеру Горяева. При микроскопировании суспензии из кишечника пчел подсчитывали общее количество

ство спор ноземы в пяти полях зрения микроскопа (400×), расположенных на разных участках предметного стекла, и умножали на 50 000. В результате получали количество спор паразита в 1 мл суспензии, т. е. в кишечнике одной пчелы. Для концентрации спор полученную суспензию фильтровали и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 15 мин. Отбирали средний слой осадка, где концентрация спор ноземы была максимальной. Полученные споры *N. apis* добавляли в сахарный сироп (1,0:1,5) в конечной концентрации $(3,0-3,5) \times 10^6$ спор/мл.

Для последующего заражения было сформировано две группы пчел: контрольная и опытная по четыре энтомологических садка в каждой. На 3-и сут опыта пчелам контрольной группы продолжали давать сахарный сироп, насекомым опытной группы совместно с сиропом вводили пробиотическую добавку «Апипро» в соотношении 10:1 (сироп : пробиотический компонент).

С целью определения эффективности влияния пробиотической кормовой добавки «Апипро» на *A. apis* проводили выделение культуры гриба рода *Ascosphaera* из сотов с погибшими муцифицированными личинками. Пораженных личинок извлекали из ячеек сотов, помещали в стерильную ступку, измельчали и готовили суспензию на физрастворе. Затем делали посев на среду Сабуро методом штриха. Культивирование проводили в термостате при температуре 28 °С. За ростом культуры наблюдали в течение 5 дн. На 3-и сут на поверхности среды появлялись белые и серовато-белые пушистые колонии. При микроскопии обнаружили многоклеточный септированный мицелий с многоядерными клетками, ветвистые гифы, споровые цисты со споровыми шарами, заполненными мелкими гладкими эллиптическими спорами.

Антагонистические взаимоотношения пробиотика «Апипро» на основе спорообразующих бактерий *B. subtilis* и культуры гриба рода *Ascosphaera* определяли методом лунок в среде Сабуро по диаметру зон лизиса вокруг колоний.

С этой целью готовили суспензию из пятисуточных культур штаммов грибов *A. apis* в стерильном физиологическом растворе, которую в количестве 1 мл наносили на поверхность среды Сабуро и подсушивали в течение 30 мин при 28 °С. В слое

засеянной среды вырезали лунки диаметром 6 мм, в которые помещали кормовую добавку «Апипро», приготовленную из расчета 1 г добавки на 10 мл дистиллированной воды. В контрольных чашках Петри в лунки вносили дистиллированную воду и выдерживали в термостате при 28 °С в течение 4 сут.

Определение профилактической эффективности пробиотической кормовой добавки «Апипро» на аскофероз пчел проводили в условиях научно-учебной пасеки Гродненского государственного аграрного университета. Из пчелиных семей, в которых была выделена и идентифицирована культура гриба *A. apis*, отобрали рамки и сформировали 8 пчелосемей, равных по силе, количеству расплода, качеству кормовых запасов, происхождению и возрасту маток, в нуклеусах, рассчитанных на четыре стандартные рамки. Пчелосемьи разделили на две группы (контрольная и опытная) по четыре пчелосемьи в каждой.

Семьи контрольной группы получали только 50%-ный сахарный сироп, в углеводную подкормку пчелосемьям опытной группы вводили пробиотическую кормовую добавку из расчета 1 г добавки на 1 л сиропа.

Сироп скармливали пчелам по 100–150 мл в зависимости от силы пчелосемьи через 1 день в течение 2 нед. При этом разовая доза пробиотической кормовой добавки в готовом сиропе составляла 0,1 г на улочку.

За всеми пчелиными семьями осуществляли единый зоотехнический уход, в процессе исследований вели визуальные наблюдения за состоянием пчел, поведением пчелиных семей и воспитанием расплода. Продолжительность опыта составила 56 дн.

Результаты и обсуждение. Возбудитель нозематоза микроспоридия *N. apis* локализуется в эпителиальных клетках средней кишки пчел, разрушая их. С целью определения эффективности влияния пробиотической кормовой добавки «Апипро» на *N. apis* после заражения пчел, изолированных в энтомологических садках, на 7-, 14- и 21-е сут определяли интенсивность инфекции: среднее число спор микроспоридий в пробах пчел.

В процессе исследований определяли динамику заражения пчел спорами ноземы и влияние пробиотика на этот процесс. Полученные данные приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Влияние пробиотической добавки «Апипро» на число спор *N. apis* в кишечнике пчел

Группа	Среднее число спор <i>N. apis</i> на 1 пчелу, 10 ⁶ клеток/мл		
	7-й день	14-й день	21-й день
Контрольная	1,15 ± 0,08	12,22 ± 0,56	35,19 ± 0,68
Опытная	3,31 ± 0,25	23,42 ± 0,68	79,01 ± 1,59

В опытной группе, пчелы которой в составе сахарного сиропа получали кормовую добавку, количество спор на пчелу на 7-й день опыта составляло $3,31 \times 10^6$ клеток/мл, что в 2,9 раз больше, чем у пчел контрольной группы. В последующем в двух группах отмечалось нарастание интенсивности инфекции, что подтверждается подсчетом числа спор на 14- и 21-е сут опыта, но показатели опытной группы превышали контрольные данные на 99,5 и 99,6 % соответственно.

В результате определено, что пробиотическая кормовая добавка «Апипро» не только не предотвращает заражение пчел нозематозом, но и стимулирует данный процесс. Микроспоридии являются внутриклеточными паразитами и, по всей видимости, используют бактериальные клетки для размножения и питания, тем самым усиливая интенсивность инвазии. В связи с полученными результатами садковых исследований посчитали нецелесообразным проведение производственного опыта на пасеке.

Аскосфероз поражает открытый расплод медоносных пчел. Возбудители грибковых заболеваний пчел обладают исключительно высокой степенью устойчивости во внешней среде к физическим и химическим факторам. В настоящее время перспективным направлением является разработка безопасных и эффективных биологических средств борьбы с патогенными грибами, которая предполагает широкое применение препаратов на основе бактерий-антагонистов и их метаболитов, проявляющих активность против широкого спектра грибных патогенов. Особое внимание с этой точки зрения привлекают спорообразующие бактерии рода *Bacillus*, которые являются продуцентами широкого спектра биологически активных веществ, в том числе ферментов, липопептидных и других антибиотиков.

Результаты опыта по определению эффективности влияния пробиотической кормовой добавки «Апипро» на *A. apis* в лабораторных условиях учитывали по зонам задержки роста тест-культуры на 12-е сут культивирования.

В результате проведенных исследований *in vitro* был выявлен антагонистический потенциал культуры спорообразующих бактерий *B. subtilis*, входящей в состав пробиотической кормовой добавки «Апипро», в отношении культуры гриба *A. apis*.

Ингибирующую способность штамма определяли как величину усредненного (по результатам шести разнонаправленных измерений) диаметра зоны задержки роста в миллиметрах на поверхности питательной среды в чашке Петри. Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что штамм *B. subtilis*, входящий в состав «Апипро», проявляет антагонистическую активность в отношении гриба *A. apis* – зона задержки роста в среднем составила $11,26 \pm 0,27$ мм.

В период проведения исследований по определению профилактической эффективности пробиотической кормовой добавки «Апипро» на аскосфероз пчел наблюдали усиление гигиенического поведения у пчел обеих групп, но по силе и развитию опытные семьи превосходили пчелосемьи контрольных групп. В пчелосемьях, получающих пробиотическую кормовую добавку «Апипро», отмечалось повышение активности пчел, матки работали не прекращая яйцекладку.

В пчелиных семьях контрольной группы болезнь постепенно прогрессировала, нарастали клинические признаки болезни и к середине опыта на отдельных рамках регистрировался аскосфероз 1-й степени (от 2 до 5 пораженных личинок) (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Динамика образования мумифицированных личинок

Группа	Количество мумифицированных личинок, шт./рамку		
	1-й день	30-й день	56-й день
Контрольная	0	3	14
Опытная	0	1*	2*

* Мумифицированные личинки были обнаружены на дне нуклеуса.

К концу опыта во всех пчелиных семьях были зарегистрированы 1- и 2-я степени поражения расплода – количество мумифицированных личинок колебалось в пределах от 9 до 21 шт. на одну рамку. В семьях опытной группы фиксировалась скрытая и легкая формы аскофероза, пчелы активно избавлялись от пораженных личинок, так как на сотах их не было. Мумифицированные личинки обнаруживались только на дне нуклеуса.

Сравнивая результаты исследований двух групп, можно с уверенностью констатировать, что применение пробиотической кормовой добавки «Апипро» сдерживало развитие аскофероза. Пчелы опытных групп, получавших пробиотик, при выкармливании молодых личинок вместе с кормом им передают бактерии рода *B. subtilis*, которые препятствуют развитию спор гриба.

За время исследования пчелами было выращено в контрольных семьях в среднем $3400 \pm 380,24$ ячеек расплода на одну семью, в опытных – $5600 \pm 396,86$, т. е. в 1,7 раз больше, чем в контроле. Полученные данные свидетельствуют о том, что применение пробиотической кормовой добавки «Апипро» оказало положительное воздействие на воспроизводительную функцию маток и физиологическое состояние пчел, позволившее им вырастить большее количество потомства.

Заключение. Установлено, что пробиотическая кормовая добавка «Апипро», содержащая культуру спорообразующих бактерий *B. subtilis*, не подавляет развитие нозематоза, но обладает фунгистатическим эффектом, выражающемся в ингибировании развития гриба *A. apis*, увеличивает печатный расплод и может быть использована в комплексе лечебно-профилактических мероприятий только при аскоферозе пчел.

Литература

1. Аглямова, Ч. А. Применение пробиотиков для пчел в Башкирском агропромышленном колледже / Ч. А. Аглямова // Наука и образование: новое время. – 2019. – № 1. – С. 606–611.
2. Афанасьева, Е. Ю. Современное состояние и проблемы развития пчеловодства в Республике Беларусь / Е. Ю. Афанасьева // Экономический рост Республики Беларусь: глобализация, инновационность, устойчивость : материалы VI Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 15–16 мая 2013 г. / М-во образования

Респ. Беларусь, Белорус. гос. эконом. ун-т. ; редкол.: В. Н. Шимов (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2013. – Т. 1. – С. 326–327.

3. Беспалова, Т. С. Органическое пчеловодство и экологические препараты для лечения пчел / Т. С. Беспалова // Пчеловодство. – 2014. – № 3. – С. 25–26.

4. Влияние препарата «Апиврач» на показатели роста *Ascospaeraapis* и других микроорганизмов / Д. О. Дряхлова [и др.] // Биомика. – 2019. – Т. 11 (2). – С. 202–205.

5. Некоторые аспекты практического использования пробиотиков в пчеловодстве / И. М. Лойко [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. – Минск : Беларус. навука, 2018. – Т. 10. – С. 198–209.

6. Черник, М. И. Изучение закономерностей проявления микозных патологий у пчел / М. И. Черник // Актуальные проблемы биотехнологии в аграрно-промышленном комплексе : материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 26–27 нояб. 2015 г. / Ин-т эксперим. ветеринарии им. С. Н. Вышелеского; редкол.: П. А. Красочко [и др.]. – Минск, 2015. – С. 137–144.

7. Bernardi, S. Viral epidemiology of the adult *Apis mellifera* infested by the Varroa destructor mite / S. Bernardi, E. Venturino // Heliyon. – 2016. – Vol. 2 (5). – DOI: 10.1016/j.heliyon.2016.e00101.

8. Audisio, Marcela Carina. Gram-Positive Bacteria with Probiotic Potential for the *Apis mellifera* L. Honey Bee: The Experience in the Northwest of Argentina / Marcela Carina Audisio // Probiotics and Antimicrob. Proteins. – 2016. – Vol. 9. – P. 22–31.

APPLICATION PROSPECTS OF PROBIOTIC FODDER ADDITIVE “APIPRO” IN TREATMENT OF BEE NOSEMATOSIS AND ASCOSPHEROSIS

T. M. SKUDNAYA¹, I. M. LOIKO¹, A. G. SHCHEPETKOVA¹,
N. A. STARIKOVA¹, L. V. RAMANAVA², R. A. STEPANIAN²

¹Grodno State Agrarian University, Grodno, Belarus, ggau@ggau.by

²Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus,
microbio@mbio.bas-net.by

Breeding house studies have shown that probiotic feed supplement “Apro” fails to prevent the infection of bees with *Nosema apis* spores, hence it is not recommended to curb the spread of nosematosis. It was found that sporulating bacterial culture *Bacillus subtilis* displayed antagonistic activity against the fungus *Ascospaera apis*, producing growth inhibition zone of an average diameter 11.26 ± 0.27 mm. “Apro” use restrains progression of ascospherosis and intensifies the proliferation rate to 5600 ± 396.86 cells per bee family.

Поступила в редакцию 31.03.2020