

ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ АПИПРО ПРИ АСКОСФЕРОЗЕ ПЧЕЛ**Т.М. Скудная, И.М. Лойко, А.Г. Щепеткова, Н.В. Халько, Н.А. Старикова**

УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно,

Республика Беларусь

E-mail: ggau@ggau.by

Аннотация. Показано, что культура спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* БИМ В-454Д 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.

Ключевые слова: аскофероз, *Ascosphaera apis*, пробиотик, *Bacillus subtilis*, пчелиные семьи, печатный расплод.

Введение. Пчеловодство в Республике Беларусь является важной отраслью сельского хозяйства, поскольку является источником получения уникальных целебных продуктов питания для населения, незаменимого сырья для промышленности, а также способствует повышению урожайности энтомофильных растений [1].

Однако в последнее время серьезным препятствием в развитии пчеловодства являются инфекционные и инвазионные болезни пчел – варрооз, нозематоз, гнильцы, вирозы и микозы. Среди последних наибольшее распространение имеет аскофероз, обуславливающий ослабление пчелиных семей, снижение способности пчел к медосбору и опылению, иногда гибель пчел. Заболевание наносит существенный экономический ущерб отрасли. Возбудитель аскофероза распространён на пасеках Республики Беларусь и является основным микозным заболеванием. [4,5].

В последнее время в пчеловодстве актуальным является использование пробиотических микроорганизмов или отдельных групп микроорганизмов, способных оказывать благотворное влияние на повышение устойчивости пчел к различным патогенам, стимулировать активизацию их иммунологической защиты [3].

Спорообразующие бактерии рода *Bacillus* являются продуцентами

широкого спектра биологически активных веществ (БАВ), в том числе ферментов, липопептидных и других антибиотиков, спектр которых зависит от географического происхождения изолятов [6, 9]. Продукция БАВ обуславливает высокую бактерицидную и бактериостатическую активность *Bacillus spp.* в отношении патогенных грамположительных (*Clostridium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных (*Treponema pallidum*, *Neisseria meningitis*) бактерий [2], а также фунгицидную (фунгистатическую) активность в отношении фитопатогенных грибов – *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* [7, 8]. Таким образом, представители рода *Bacillus* обладают бактерицидной и фунгицидной активностью и рассматриваются как биологические агенты для создания противомикробных препаратов.

Цель работы – определить профилактическую эффективность пробиотической кормовой добавки Апипро при микозной инвазии пчел.

Материал и методика исследований. Исследования по определению профилактической эффективности пробиотической кормовой добавки Апипро на аскосфероз пчел проводился в условиях кафедры микробиологии и эпизоотологии и научно-учебной пасеки УО «ГГАУ».

Выделение культуры гриба рода *Ascosphaera* проводили из сотов с погибшими мумифицированными 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 дней. Рост на среде Сабуро отмечался на 3 сутки. При этом на поверхности среды появлялись белые и серовато-белые пушистые колонии. При микроскопии мицелия, выращенного на питательных средах, обнаружили многоклеточный септированный мицелий с многоядерными клетками, ветвистые гифы, споровые цисты со споровыми шарами, заполненными мелкими гладкими эллиптическими спорами.

Антагонистические взаимоотношения пробиотика Апипро, содержащего культуру спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* БИМ В-454Д и культуры гриба рода *Ascosphaera* определяли методом лунок в

среде Сабуро по диаметру зон лизиса вокруг колоний.

С этой целью готовили суспензию из 5-суточных культур штаммов грибов *Ascosphaera apis* в стерильном физиологическом растворе, которую в количестве 1 мл наносили на поверхность среды Сабуро и подсушивали в течение 30 минут при 28 °С. В слое засеянной среды, вырезали лунки диаметром 6 мм, в которые помещали кормовую добавку Апипро из расчета 1 г добавки на 10 мл дистиллированной воды. В контрольных чашках Петри в лунки вносили дистиллированную воду. Чашки Петри выдерживали в термостате при 28 °С 4 суток.

Для проведения дальнейших исследований от больных и подозреваемых в заражении аскоферозом пчелиных семей взяты смывы с внутренних поверхностей ульев и сотовых рамок. Из пчелиных семей, в которых была выделена и идентифицирована культура гриба *Ascosphaera apis*, отобрали рамки и в условиях научно-учебной пасеки УО «ГГАУ» сформировали 8 пчелиных семей, равных по силе, количеству расплода, качеству кормовых запасов, происхождению и возрасту маток, в нуклеусах, рассчитанных на 4 стандартные рамки. Пчелиные семьи разделили на 2 группы (контрольная и опытная) по 4 семьи в каждой.

Семьи контрольной группы получали только 50 %-ный сахарный сироп, в углеводную подкормку пчелиным семьям 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 семьи через 1 день в течение 2 недель. 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, воспитанием расплода в пчелиных семьях. Продолжительность опыта составила 56 дней.

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты антагонистических взаимоотношений учитывали по зонам задержки роста тест-культур на 12-е сутки культивирования. Отсутствие зон задержки роста свидетельствовало об отсутствии антагонизма между

исследуемыми микроорганизмами.

В результате проведенных исследований *in vitro* был выявлен антагонистический потенциал культуры спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* БИМ В-454Д, входящей в состав пробиотической кормовой добавки Апипро, в отношении культуры гриба *Ascosphaera apis*.

Ингибирующую способность штамма определяли величиной усредненного (по результатам 6-ти 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* БИМ В-454Д проявляет антагонистическую активность в отношении гриба *Ascosphaera apis* - зона задержки роста в среднем составляла $11,26 \pm 0,27$ мм.

В период опыта в условиях научно-учебной пасеки УО «ГГАУ» наблюдали усиление гигиенического поведения у пчёл обеих групп, но по силе и развитию опытные семьи превосходили пчелиные семьи контрольных групп. Результаты исследований показали, что произошло повышение активности пчел, получающих пробиотическую кормовую добавку Апипро. Матки работали, не прекращая яйцекладку.

В пчелиных семьях контрольной группы болезнь постепенно прогрессировала, нарастали клинические признаки аскосфероза и к середине опыта на отдельных рамках появились личинки с признаками аскосфероза первой степени (от 2 до 5 пораженных личинок). К концу опыта во всех пчелиных семьях была зарегистрирована первая и вторая степень поражения расплода – количество мумифицированных личинок колебалось в пределах от 9 до 21 шт. на одну рамку (см. таблицу 1).

Таблица 1

Динамика учета мумифицированных личинок

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

* - мумифицированные личинки были обнаружены на дне улья

В семьях опытной группы регистрировалась скрытая и легкая формы аскосфероза, семьи активно избавлялись от пораженных личинок, так как на сотах их не было, мумифицированные личинки обнаруживались на дне нуклеуса.

Сравнивая результаты двух групп, можно с уверенностью констатировать, что применение пробиотической кормовой добавки Аипро сдерживало развитие аскосфероза и способствовало тому, что в опытной группе пчелиные семьи болели в скрытой и легкой форме. Пчёлы опытных групп, получавших пробиотик Аипро, при выкармливании молодых личинок вместе с кормом передают им бактерии рода *Bacillus subtilis*, которые препятствует развитию спор гриба в их организме.

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

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что пробиотическая кормовая добавка Аипро, содержащая культуру спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* БИМ В-454Д, обладает фунгистатическим эффектом, выражающемся в сдерживании развития аскосфероза, увеличивает количество печатного расплода и может быть использована в комплексе лечебно-профилактических мероприятий при аскосферозе пчел.

Литература

1. Афанасьева Е.Ю. Современное состояние и проблемы развития пчеловодства в Республике Беларусь. — Минск: БГЭУ, 2013. — Т. 1. - С.326-327. – С.326-327.
2. Бала С.С. Антагонистическая активность пробиотиков на основе

аэробных спорообразующих бактерий // Успехи современного естествознания. - 2004. - № 12. - С. 84.

3. Бармина И.Э., Маннапов А.Г., Карпова Г.В. Стимулирующие подкормки для пчелиных семей с добавлением комплексных аминокислотных и пробиотических препаратов // Вестник ОГУ. - 2011. - №12(131). - С. 376-377.

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

5. Черник М.И. Эпизоотическая ситуация по аскоферозу пчел // Современные технологии сельскохозяйственного производства : материалы XV Международной научно-практической конференции (Гродно, 18 мая 2012 года) / Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Учреждение образования "Гродненский государственный аграрный университет". – Гродно, 2012. – Ч. 1: Агронмия. Защита растений. Зоотехния. Ветеринария. – С. 451–453.

6. Balaban N.P., Mardanova A.M., Malikova L.A. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* H2 glutamyl endopeptidase that is secreted in stationary phase of culture growth // *Annals Microbiology*. - 2008. - Vol. 58. - № 4. - P. 697–704.

7. Chebotar V.K., Makarova N.M., Shaposhnikov A.I. Antifungal and phytostimulating characteristics of *Bacillus subtilis* Ch-13 rhizospheric strain, producer of biopreparations // *Appl. Biochem. Microbiol.* - 2009. - № 4. - P. 419–423.

8. Chiou A.L., Wu W.S. Formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* B190 for control of lily grey mould (*Botrytis elliptica*) // *Journal of Phytopathology*. - 2003. - Vol. 151. - № 1. - P. 13–18.

9. Price N.P.J., Rooney A.P. Mass spectrometric analysis of lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations // *FEMS Microbiology Letters*. - 2007. - № 271. - P. 83–89.

PREVENTIVE EFFECTIVENESS OF PROBIOTIC FEED ADDITIVE APIPRO IN BEE ASCOSPHEROSIS

T.M. Skudnaya, I.M. Loiko, A.G. Shchepetkova, N.V. Khalko, N.A. Starikova

Annotation. It was shown that the culture of spore-forming bacteria *Bacillus subtilis* BIM B-454D exhibits antagonistic activity against the fungus *Ascosphaera apis*, causing an average growth inhibition zone of 11.26 ± 0.27 mm. The use of Apipro probiotic feed additive inhibits the development of ascospherosis and increases print brood on average to 5600 ± 396.86 brood cells per family.

Key words: ascospherosis, *Ascosphaera apis*, probiotic, *Bacillus subtilis*, bee colonies, printed brood.