

## ВЫДЕЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ АСКОСФЕРОЗА ПЧЕЛ И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

**Шевченко Е.В.**

*ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», аспирант, Омск, Россия (644122, г. Омск, ул. Октяб́рская, 92), e-mail: eli.v.karnyushina@mail.ru*

Автором проведены экспериментальные исследования по выделению культуры гриба *Ascospaera apis*. Гифы мицелия гриба – разветвленные, септированные, бесцветные, многоядерные клетки. Мицелий в местах соприкосновения выпускает короткие боковые гифы, на которых образуются многоядерные структуры гаметангии (половые органы), не дифференцированные на гаметы (половые клетки). Каждый из гаметангиев отделяется от гиф перегородкой. Женский и мужской гаметангии различаются по величине: мужской меньше, он переливает свое содержимое (ядра и протоплазму) в более крупный (женский). После слияния содержимого гаметангиев происходит кариогамия (слияние ядер), за этим следует множественное деление копуляционных ядер. В нутриците, являющемся главной, быстрорастущей питательной частью женского гаметангия, вокруг образовавшихся ядер происходит формирование большого числа спор, склеенных в компактные массы – споровые шары, которых иногда называют асками или сумками. Зрелый нутрицит (капсула сферической формы) называется цистой или спороцистой, со споровыми шарами имеет темно-коричневый или оливково-коричневый цвет, с возрастом чернеет.

Установлены размеры споровых цист и спор, также установлен подвид гриба *Ascospaera apis*: *Ascospaera apis* var. *apis*.

Ключевые слова: культура *Ascospaera apis*, споровые цисты, микрофотосъемка.

## ALLOCATION ORIGINATOR ASKOSFEROZ BEES AND HIS STUDYING KULTURALNO - MORPHOLOGICAL PROPERTIES

**Shevchenko E.V.**

*FGBOU VPO Omsk State Agrarian University, P.A. Stolypin, Omsk, Russia (644122, Omsk, ul. October, 92), e-mail: eli.v.karnyushina@mail.ru*

Author carried out pilot studies on allocation culture a mushroom *Ascospaera apis*. Hyphas mycelium mushroom – branched-out, septirovanny, colourless, multinuclear cells. Mycelium in places contact lets out short lateral hyphas on which multinuclear structures gametangiya (genitals) which have not been differentiated on gametes (sex cells) are formed. Each gametangiya separates from hypha septum. Female and a man's gametangiya differ on size: man's it is less, it pours contents (cores and protoplasm) in larger (female). After contents merge gametangiya there is karyogamy (merge kernels), it is followed by multiple division kopulyatsionny kernels. In нутриците, being the main, fast-growing nutritious part female gametangiya, round the formed kernels occurs formation large number spores which have been stuck together in compact masses – sporous balls which sometimes call expert-kami or bags. Mature (capsule spherical form) is called as tsisty or sporotsi-stand, with sporous balls has dark brown olive-brown color, with age blackens.

Sizes sporous tsist and dispute are established, subspecies mushroom *Ascospaera apis* are also established: *Ascospaera apis* var. *apis*.

Key words: culture *Ascospaera apis*, sporous tsist, microphotographing.

**Введение.** Благодаря хорошей приспособляемости к различным условиям внешней среды микроскопические грибы успешно выдерживают конкуренцию с другими микроорганизмами и часто вытесняют их с того или иного субстрата. На данный момент известно более 500 тысяч видов микроскопических грибов, большинство которых представлено сапрофитами. Около 50 видов являются патогенными. Патогенные грибы многочисленны, а вызываемые ими заболевания человека, животных и насекомых

разнообразны. Патогенными для медоносной пчелы являются грибы родов *Ascosphaera*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*.

Стрессовые факторы, физические, химические, биологические, экстремальные температуры и высокая влажность, загрязнение окружающей среды, отравление пестицидами, неконтролируемое применение антибиотиков, паразитарные инвазии – вызывают снижение резистентности организма насекомого к микозам, нарушая иммунную систему, защитные барьеры оболочек тела, пищеварительного тракта, трахей и способствуя развитию грибковой инфекции [1; 2].

Из микозов, патогенных для пчел, значительное распространение повсеместно получил известковый расплод – аскофероз. В пятидесятых годах прошлого столетия аскофероз был зарегистрирован в США и Канаде на пчелах – листорезах и одиночных пчелах *Anthophora rasilica*, а уже через десять лет имел широкое распространение на пасеках мира.

Заболевание чаще наблюдается в активный период жизнедеятельности пчелосемьи, при наличии расплода. Заражение пчел грибами начинается с прорастания спор. Инвазивная гифа проникает через кутикулу механически и энзиматически, попадает в гемоцель, где быстро развивается и прорастает. Иногда заражение может начинаться от заглоченных спор грибов, которые прорастают в кишечнике. Вначале поражаются трутневые личинки. Из спор прорастает мицелий, который постепенно поражает все органы и ткани насекомого, прорастает на поверхность, покрывая головной конец личинки войлочным налетом [2; 3; 5].

**Цель исследований:** выделить чистую культуру гриба *Ascosphaera apis*.

Для этого необходимо:

- изучить и дифференцировать с помощью электронной микроскопии два подвида этого гриба *Ascosphaera apis* var. *apis*, *A. apis* var. *major*, отличающихся размерами споровых цист и спор;

- дифференцировать полученную культуру гриба путем микроскопического и микологического исследований, имея в виду аспергиллез и возможность развития на перге гриба *Battisia alvei* (*Ascosphaera*).

### **Материалы и методы**

При проведении исследований использовались методические указания по лабораторной диагностике аскофероза пчел и выделению возбудителя из пыльцы (перги); утвержденные 9 апреля 1986 года [4].

В исследованиях использовали следующие материалы:

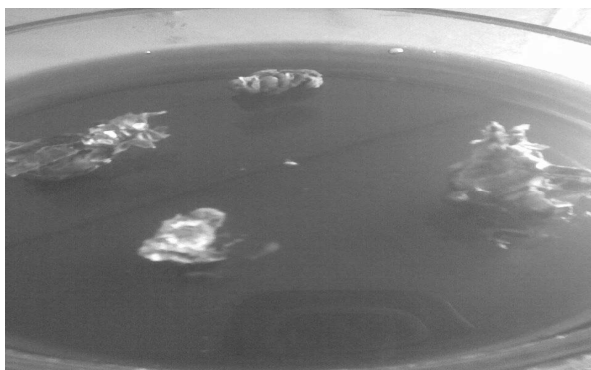
- образцы сотов (соты) размером 10×15 см с больными и погибшими личинками, куколками;

- предметное стекло, 50%-ный водный раствор глицерина для микроскопического исследования. Исследование проводили при малом увеличении микроскопа (7×10);
- питательная среда – агар Сабуро для получения чистой культуры гриба из патологического материала;
- микрофотосъемку гистологических препаратов проводили на микроскопе Axio Scope 40 (Carl Zeiss) и Axio Star (Carl Zeiss) с встроенным TV-адаптером и цифровой видеокамерой Carl Zeiss Imager, A1, окуляр W-PI 10x/23, объективы: Achromplan 20x/0,45, 40x/0,60, 63x/0,80 и 100x/1,25 oil.

Микрофотосъемку гистологических препаратов проводила кандидат ветеринарных наук М.Н. Гонохова. *ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», Омск, Россия (644122, г. Омск, ул. Октябрьская, 92).*

### **Результаты исследований и их обсуждение**

Для получения чистой культуры гриба из патологического материала (1-2 трупов пораженных личинок и 10%-ной эмульсии пыльцы (перги) на стерильном физиологическом растворе) делали посев на питательную среду агар Сабуро.



**Рис. 1. Посев на питательную среду агар Сабуро.**

Перед посевом питательный агар расплавляли в водяной бане и после охлаждения до 45-50 °С добавляли в него антибиотики (пенициллин 50 ЕД и стрептомицин 100 ЕД на 1 мл среды) для подавления сопутствующей бактериальной микрофлоры.

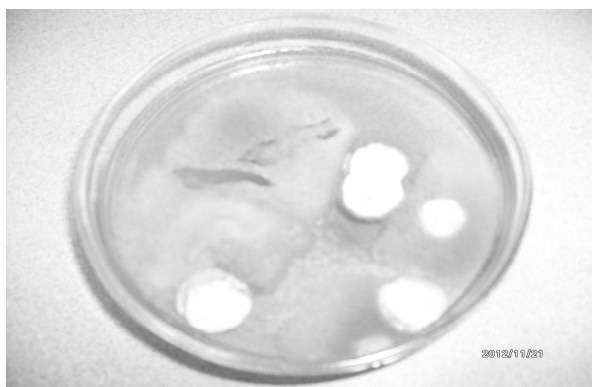
Пораженные личинки извлекали из ячеек, помещали в стерильную чашку Петри, разламывали их с помощью препаровальной иглы. Затем частицы размером не более 1 мм и эмульсию пыльцы помещали при помощи бактериологической петли в чашки Петри с одной из питательных сред в 3-5 точек (по одной частице в каждую точку). Посевы выдерживали при 26-30 °С и наблюдали за ними в течение 10 сут., имея в виду, что в процессе развития

гриба на поверхности среды на 3-5-е сут. появляются белые пушистые колонии, которые в дальнейшем могут приобретать вид зеленовато-серого, войлокообразного налета.



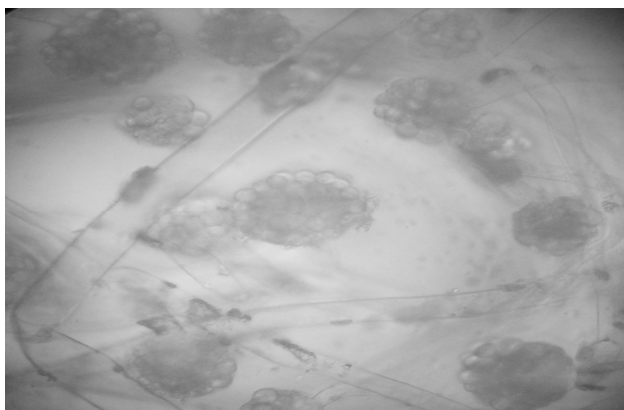
**Рис. 2. Культура гриба *Ascosphaera apis*.**

Чистую культуру гриба *Ascosphaera apis* получили путем дополнительного пересева культуры с периферии колоний, характерных для данного гриба.



**Рис. 3. Пересев культуры гриба *Ascosphaera apis*.**

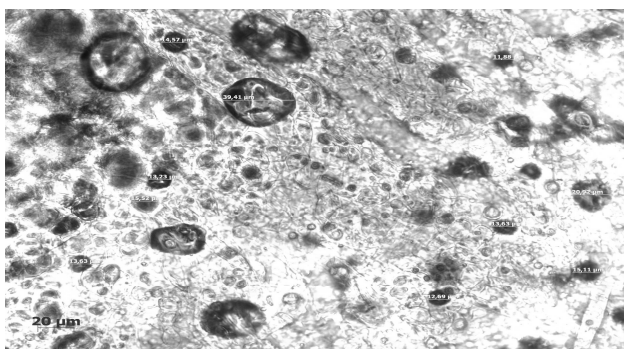
Мазки из культуры исследовали под микроскопом. При положительном результате обнаружили многоклеточный септированный мицелий с многоядерными клетками, ветвистые гифы, споровые шары, которые, в свою очередь, заключены в шаровидную цисту. Споры мелкие, эллиптические, гладкие.



**Рис. 4. В поле зрения гифы, споровые цисты.**

Встречаются два подвида этого гриба: *Ascosphaera apis* var. *apis* и *Ascosphaera apis* var. *major*, отличающиеся размерами споровых цист и спор.

*Ascosphaera apis* var. *apis* имеет размеры спор  $3-3,8 \times 2,3$  мкм и диаметр споровых цист 32–99 мкм (в среднем 65,8 мкм), а *A. apis* var. *major* имеют размеры спор  $3,3-4,2 \times 2,5$  мкм и диаметр споровых цист 88,4–168 мкм (в среднем 128,4 мкм).



**Рис. 5. В поле зрения немногочисленные споровые цисты *Ascosphaera apis* var. *apis*. Размер споровых цист 39,41 мкм.**

Одновременно дифференцировали полученную культуру гриба (аспергиллез) и возможность развития на перге гриба *Battisia alvei* (*Ascosphaera*), отличающегося от возбудителя аскосфероза пчел тем, что он не поражает расплод пчелиных семей, а часто поражает ячейки с пыльцой (пергой) осенью и весной, так как лучше растет при температуре до 20 °С. Гриб *Battisia alvei* не образует внутри спороцисты споровых шаров, и аскоспоры лежат свободно в спороцисте.

Лабораторный диагноз на аскосфероз устанавливали на основании положительных результатов микроскопического и микологического исследований.

Срок лабораторного исследования до 10 дней. При выделении из пыльцы (перги) гриба *Ascosphaera apis* ее нельзя использовать в качестве белковой подкормки пчелиным семьям.

### **Выводы**

Из микозов, патогенных для пчел и наносящих большой ущерб пчеловодству на пасеках Омской области, получил распространение известковый расплод – аскофероз.

В ходе проведенных исследований:

- 1) выделена культура гриба *Ascosphaera apis*;
- 2) изучены и дифференцированы с помощью электронной микроскопии два подвида этого гриба *Ascosphaera apis* var. *apis*, *Ascosphaera apis* var. *major*;
- 3) дифференцирована полученная культура гриба путем микроскопического и микологического исследований (аспергиллез) и возможность развития на перге гриба *Battisia alvei* (*Ascosphaera*).

### **Список литературы**

1. Жуков А.А. Биологические свойства гриба *Ascosphaera apis* и меры борьбы с аскоферозом пчел : автореф. дис. ... канд. биол. наук ; Всерос. науч.-исслед. ин-т ветеринар. санитарии, гигиены и экологии. – М., 1995. – 20 с.

2. Клюев В.А. Распространение некоторых микроэлементов в почвах Белоруссии и их влияние на жизнь животных и человека // Сахаровские чтения 2003 года : экологические проблемы XXI века : материалы междунар. конференции, Минск, 19-20 мая 2003. – Минск, 2003. – С. 224 - 225.

3. Лабораторные исследования в ветеринарии : справочник / Б.И. Антонов, В. Борисова, П.М. Волкова [и др.]. – М. : Агропромиздат, 1986. – 352 с.

4. Шепелев Д.С. Профилактика аскофероза пчел // Экология и охрана пчелиных : сб. науч. докл. II междунар. науч.-практ. конф. – Саранск, 1998. – С. 250-252.

5. Glinski Z. Defense strategies of the honey to fungal infections // *Annales universitatis Mariae Curie – Sklodowska*. – Lublin, 2001. – Vol. 6. – S. 39-47.

### **Рецензенты**

Рудаков Н.В., д.мед.н., профессор, директор Омского научно-исследовательского института природноочаговых инфекций, г. Омск.

Бажин М.А., д.вет.н., профессор Всероссийского НИИ бруцеллеза и туберкулеза животных Россельхозакадемии, г. Омск.