

МЕТОДИКА ВЫДЕЛЕНИЯ PAENIBACILLUS LARVAE

Райчинец Ю.А.¹, Феоктистова Н.А.¹, Лыдина М.А.¹, Бадаев Р.Р.², Васильев Д.А.¹,
Васильева Ю.Б.¹, Мерчина С.В.¹, Швиденко И.Г.³

¹ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина», Ульяновск, Россия (432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1), grant-ugsha@yandex.ru

²Московский финансово-юридический университет, Москва, Россия (117447, г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, д. 17а, стр. 6), vidagon@mail.ru

³ФГБОУ ВПО «Саратовский аграрный университет им. Н.И. Вавилова», Саратов, Россия (410012, г. Саратов, Театральная площадь, 1)

Гнильцовые заболевания пчел относятся к особо опасным инфекционным заболеваниям в пчеловодстве многих стран мира. Они внесены в список международного эпизоотического бюро (список МЭБ) как наиболее распространенные, высоко контагиозные, карантинные заболевания пчел. К возбудителю американского и европейского гнильцов восприимчивы пчелы практически всех пород одинаково. Споры возбудителя американского гнильца годами сохраняются на почве, растениях, на многих пасеках, не проявив признаков заболевания. В статье представлены результаты исследований по выделению возбудителя американского гнильца из трупов медоносных пчел (европейской темной (среднерусской) - *Apis mellifera mellifera*), полученных с частных пасек Ульяновской и Самарской областей и изучению биологических свойств выделенных штаммов бактерий. Для культивирования возбудителя американского гнильца в настоящее время применяют среду накопления, содержащую гидролизат казеина с содержанием аминокислот азота 140-150 мг%, 5% NaOH, агара «Дифко» - 15 г/л (рН 7,0-7,2). Изучение биологических свойств выделенных штаммов бактерий проводили по методике Смирнова В.В. в модификациях Васильева Д.А. и дополненных тестами Сидорова М.А. Из 88 проб, полученных на территории Приволжского ФО и Южного ФО, нами было выделено 59 штаммов бактерий, которые мы дифференцировали по методике Смирнова. Нами выделены и идентифицированы по биохимическим свойствам 7 штаммов энтомопатогенных бактерий *Paenibacillus larvae* из трупов пчел, полученных на территории Приволжского ФО (Самарская, Ульяновская, Пензенская, Оренбургская и Саратовская области) и 5 штаммов из трупов пчел, полученных на территории Южного ФО (Краснодарский край, Ростовская и Волгоградская область).

Ключевые слова: американский гнилец пчел, биохимические тесты, *Paenibacillus larvae*.

THE METHOD OF ALLOCATION OF PAENIBACILLUS LARVAE

Raichynets Y.A.¹, Feoktistova N.A.¹, Lydia M.A.¹, Badaev R.R.², Vasilyev D.A.¹,
Vasilyeva Y.B.¹, Merchina S.V.¹, Shvidenko I.G.³

¹FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin", Ulyanovsk, Russia (432017, Russia, Ulyanovsk, Boulevard New Crown-1), grant-ugsha@yandex.ru

²Research financial law University, Moscow, Russia (117447, Moscow, street Carmustine, da, P6), vidagon@mail.ru

³FSBEI HPE "Saratov agrarian University named after N.I. Vavilov", Saratov, Russia, 410012, Saratov, Theatre square, 1)

Hilcove diseases of bees are particularly dangerous infectious diseases in beekeeping in many countries of the world. They are included in the list of OIE (OIE-listed) as the most common, highly contagious, quarantine diseases of bees. The causative agent of American and European gilzow susceptible bees almost all breeds equally. Spores of the pathogen American hnilica years remain on the soil, plants, many apiaries without showing signs of disease. The article presents the research results on the allocation of the pathogen American hnilica of dead honey bees (European dark (Central Russian) - *Apis mellifera mellifera*), obtained from private apiaries Ulyanovsk and Samara regions and the study of the biological properties of the isolated strains of bacteria. For the cultivation of the causative agent of American hnilica currently used environment accumulation containing casein hydrolysate with the content of amino nitrogen 140-150 mg%, 5% NaOH, agar "Difco" - 15 g/l (pH 7.0 to 7.2). The study of the biological properties of the isolated strains of bacteria was performed according to the method Smirnova V.V. modifications Vasilyev D.A. and added tests Sidorova M.A. Of the 88 samples obtained in the territory of the Volga Federal district southern Federal district, we selected 59 strains of bacteria that we were differentiated by the method of Smirnov. We have isolated and identified by biochemical properties of 7 strains of entomopathogenic bacteria *Paenibacillus larvae* of bee corpses obtained in the territory of the Volga Federal district (Samara, Ulyanovsk, Penza, Orenburg and Saratov region) and 5 strains of bee corpses, obtained in the territory of the southern Federal district Krasnodar territory, Rostov and Volgograd region).

Keywords: American foulbrood of bees, biochemical tests, *Paenibacillus larvae*.

Гнильцовые заболевания пчел относятся к особо опасным инфекционным заболеваниям в пчеловодстве многих стран мира. Они внесены в список международного эпизоотического бюро (список МЭБ) как наиболее распространенные, высоко контагиозные, карантинные заболевания пчел [8].

Наибольшую опасность среди инфекций пчел несут возбудители американского гнильца (*Paenibacillus larvae*) и европейского гнильца (*Strept. pluton*, *Paenibacillus alvei*, *Bacillus orpheus*, *Strept. apis*, *Enterococcus faecalis*). Эти бактериальные болезни пчелиных семей, сопровождающиеся гибелью взрослых личинок и предкуколок (печатного расплода), проявляются летом, реже весной [9; 10].

Основной источник инфекции – медоносные растения, почва, содержащая споры инфекционного агента, пыльца растений, контаминированная инфекционными агентами, карантинные зоны, инфекции, трупы личинок, пчел. Инфекционный агент передается через медоносные растения из почвы, далее контактным путем через пыльцу и пергу, рамки с расплодом, ульи, соты, вошину, мед, пыльцу и пергу, пчеловодный инвентарь, включая руки самого пчеловода. Обворовывание больных пчелиных семей здоровыми приводит последних к заражению. Возбудитель может распространяться при пересылке пчелиных семей, пакетов и маток с пасек, неблагополучных по гнильцовым заболеваниям, паразитами - восковой молью, осами, мухами, муравьями, а также различными клещами, особенно Варроа. На переболевших пасаках, являющихся очагом инфекции, спустя несколько лет может возникнуть вновь заболевание в ослабленных семьях и под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды, при нарушениях условий содержания, кормления, под влиянием ряда других заболеваний (варроатоза, нозематоза, аскосфероза и др.), что указывает на очаговость инфекции, характерную для всех бацилл (например, сибирская язва) [8; 9].

К возбудителю американского и европейского гнильцов пчел восприимчивы пчелы практически всех пород одинаково. Споры возбудителя американского гнильца годами сохраняются на почве, растениях, на многих пасаках, не проявив признаков заболевания [2; 3].

Целью наших исследований было выделение возбудителя американского гнильца (бактерий *Paenibacillus larvae*) из трупов медоносных пчел (европейской тёмной (среднерусской) - *Apis mellifera mellifera*), полученных с частных пасек Ульяновской и Самарской областей.

Задачи исследования:

- выделение возбудителя американского гнильца из трупов медоносных пчел на среде накопления;
- изучение биологических свойств выделенных штаммов бактерий.

Для культивирования возбудителя американского гнильца применяли среду

накопления, содержащую гидролизат казеина с содержанием аминного азота 140-150 мг%, 5% NaOH, агара «Дифко» - 15 г/л (рН 7,0-7,2). Изучение биологических свойств выделенных штаммов бактерий проводили по методике Смирнова В.В. [5; 6] в модификациях Васильева Д.А. [1] и дополненных тестами Сидорова [4].

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, посевы культивировали в термостате 20 часов при 37 °С.

Методика приготовления среды накопления: в колбу вносили гидролизат казеина, полученный путем разбавления его дистиллированной водой до содержания аминного азота 140-150 мг%, кипятили при перемешивании 5 минут; затем 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; затем 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 пятидесяти одной пробы, полученной на территории Приволжского ФО (Самарская, Ульяновская, Пензенская, Оренбургская и Саратовская области), нами было выделено 37 штаммов бактерий, которые мы подвергли дифференциации по основным биохимическим свойствам, согласно схеме дифференциации Смирнова [5; 6].

Из тридцати двух проб, полученных на территории Южного ФО (Краснодарский край, Ростовская и Волгоградская область), нами было выделено 22 штамма бактерий, которые мы также дифференцировали по методике Смирнова [5; 6].

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

Для изучения продукции каталазы чашечную культуру заливали 10% H₂O₂. Образовавшиеся 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%-ный

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 свидетельствовали об анаэробном росте. Результаты проведенных исследований представлены нами в таблицах 1-2.

Таблица 1

Данные об основных свойствах выделенных штаммов из проб Приволжского ФО

№	Биохимические свойства	Данные Смирнова (1983)	Название штамма						
			П-1	П-2	П-3	П-4	П-5	П-6	П-7
1	Каталаза	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Реакция Фогес-Проскауера	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Рост в анаэробном агаре	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Рост при 50 °С	-	+	+	+	+	+	+	+
5	Образование кислоты и газа из глюкозы	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Редукция нитратов	±	+	+	-	+	-	+	+
7	Гидролиз крахмала	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Образование кислоты из глюкозы	+	+	+	+	+	+	+	+
9	Гидролиз казеина	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: «+» - положительный результат;
«-» - отрицательный результат;
«±» - вариабельный признак.

Таблица 2

Данные об основных свойствах выделенных штаммов из проб Южного ФО

№	Биохимические свойства	Данные Смирнова (1983)	Название штамма				
			Ю-1	Ю-2	Ю-3	Ю-4	Ю-5
1	Каталаза	-	-	-	-	-	
2	Реакция	-	-	-	-	-	

	Фогес-Проскауера						
3	Рост в анаэробном агаре	+	+	+	+	+	+
4	Рост при 50 °С	-	+	+	+	+	+
5	Образование кислоты и газа из глюкозы	+	+	+	+	+	+
6	Редукция нитратов	±	-	-	+	+	-
7	Гидролиз крахмала	-	-	-	-	-	-
8	Образование кислоты из глюкозы	+	+	+	+	+	+
9	Гидролиз казеина	+	+	+	+	+	+

Примечание: «+» - положительный результат;
«-» - отрицательный результат;
«±» - вариабельный признак.

Нами были выделены и идентифицированы по биохимическим свойствам 7 штаммов энтомопатогенных бактерий *Paenibacillus larvae* из трупов пчел, полученных на территории Приволжского ФО (Самарская, Ульяновская, Пензенская, Оренбургская и Саратовская области), и 5 штаммов из трупов пчел, полученных на территории Южного ФО (Краснодарский край, Ростовская и Волгоградская области).

Список литературы

1. Васильев Д.А. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики / Д.А. Васильев [и др.]. – Ульяновск : НИИЦМиБ, 2013. – С. 76.
2. Райчинец Ю.А. Перспективы применения бактериофагов для биоиндикации возбудителя американского гнильца пчел / Ю.А. Райчинец, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина [и др.] // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Экология родного края: проблемы и пути их решения». – Киров : Вятский ГУУ, 2014. - С. 344-346.
3. Райчинец Ю.А. Разработка антимикробных биопрепаратов на основе специфических бактериофагов / Ю.А. Райчинец, Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Проблемы медицинской микологии. - 2014. – Т. 16, № 2. – С. 139-140.
4. Сидоров М.А. Определитель зоопатогенных микроорганизмов : справочник. – М. : Колос, 1995. – С. 104–112.
5. Смирнов В.В. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, И.Б. Сорокулова. – Киев : Наукова думка, 1983. – С. 51.
6. Смирнов В.В. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, И.А. Василевская. – Киев : Наукова Думка, 1982. – С. 117–120.

- 7.Феоктистова Н.А. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова, А.Х. Мустафин, А.И. Калдыркаев // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2011. - № 4 (32). - С. 288-291.
- 8.Chagas Sergio Salla. Characterization of *Paenibacillus larvae* isolates from Brazil / Sergio Salla Chagas, Rodrigo Almeida Vaucher, Adriano Brandelli // Journal of Cell and Molecular Biology. – 2012. - № 10 (2). – P. 79-83.
- 9.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. - 2010. – Vol. 41. - P. 99–108.
- 10.Russenova N. European foulbrood disease-aetiology, diagnostics and control / N. Russenova, P. Parvanov // Trakia Journal of Sciences. – 2005. - Vol. 3, no. 2. – P. 10-16.

Рецензенты:

Золотухин С.Н., д.б.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина», г. Ульяновск.

Нафеев А.А., д.м.н., заведующий отделением особо опасных инфекций, природно-очаговых инфекций и профилактики туберкулеза ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ульяновской области», г. Ульяновск.