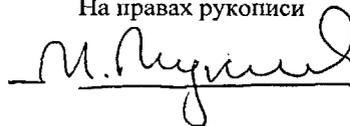


На правах рукописи



**МУКМИНОВ МАЛИК НИЛОВИЧ**

**ИНТЕГРИРОВАННАЯ СИСТЕМА  
ПРОФИЛАКТИКИ И БОРЬБЫ С ОСНОВНЫМИ  
МИКОЗАМИ ПЧЕЛ**

16.00.06 – ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и  
ветеринарно-санитарная экспертиза

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва-2006

Работа выполнена в лаборатории ветеринарной санитарии в пчеловодстве Государственного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН) и лаборатории контроля и индикации возбудителей вирусных и хламидийных инфекций в объектах ветеринарного надзора Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института (ВНИВИ г. Казань).

Научный консультант: доктор ветеринарных наук, профессор,  
Заслуженный деятель науки РФ,  
академик РАСХН  
**Смирнов Анатолий Михайлович**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
**Туктаров Варис Рафкатович**

доктор биологических наук, профессор  
**Масленникова Валерия Ивановна**

доктор биологических наук, профессор  
**Павлова Инна Борисовна**

Ведущая организация: ГНУ Научно-исследовательский институт пчеловодства (НИИП) РАСХН.

Защита состоится «27» сентября 2006 г. в 10<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 006.008.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной санитарии, гигиены и экологии по адресу: 123002, Москва, Звенигородское шоссе, д. 5, ВНИИВСГЭ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии.

Автореферат разослан «11» октября 2006 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета



Е.С. Майстренко

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Пчеловодство играет чрезвычайно важную роль в охране природы и среды обитания человека. Эта роль определяется тем, что пчелы производят ценнейший продукт питания - мед и незаменимое для многих отраслей промышленности сырьё – воск натуральный, а также биологически активные продукты: пыльцу, прополис, пчелиный яд, маточное молочко, являющиеся сырьём для производства лекарственных средств. Медоносные пчелы опыляют энтомофильные сельскохозяйственные культуры, повышают их урожайность, улучшают качество плодов и семян, а так же опыляют дикорастущие травянистые, кустарниковые и древесные энтомофильные растения, способствуя устойчивому сохранению естественно сформировавшихся биоценозов.

Со времен Петра I, который даже освободил пчеловодов от уплаты налогов, Россия всегда считалась медовой державой. Да и сейчас наша страна входит в первую пятерку стран с развитым пчеловодством и занимает второе место в мире по количеству пчелиных семей. (Н.И. Кривцов и сотр., 2001).

Однако, по мнению авторов, в последние годы в связи с вхождением сельскохозяйственного производства в рыночную экономику в отрасли наметились определенные негативные тенденции. Так за 1993-1998 гг. численность пчелиных семей уменьшилась более чем на 25 % (с 4,7 до 3,5 млн.) и этот процесс продолжается. По данным Госкомстата (В.А. Роднова, 2002, 2004.) если численность пчелиных семей в Российской Федерации по состоянию на 1.01.2002 г. составила 3441,4 тыс., что на 56,1 тыс. меньше, чем в 2001 году, то на 01.01 2004 данный показатель составлял уже 3298,8 тыс.

В личных хозяйствах населения страны (по состоянию на 1.01.2002 г.) содержалось 2914,9 тыс. (84,7%) пчелиных семей, число которых сократилось по сравнению с 2001 годом на 27,1 тыс., а на 1.01.2004 мы имеем в частном секторе уже 2901 тыс. семей. Производство продовольственного меда до недавнего времени, на протяжении последних десяти лет

поддерживалось на уровне около 50 тыс.т. в год, но в последние два года наблюдается существенное снижение данного показателя. Как следствие, мы имеем среднегодовое потребление меда в России на уровне 350-400 г на человека, в то время как в развитых странах – 2-3 кг. Приведенные данные наглядно демонстрируют существенное снижение мировых позиций российского пчеловодства, вызванное общим кризисом отрасли. К главным факторам подобного положения дел наряду с общими экономическими проблемами страны: высокой инфляцией, снижения реальных доходов населения, низкой эластичности продовольственного рынка, нарушения ценовых пропорций между продукцией сельского хозяйства и материально - техническими ресурсами АПК, можно отнести проблему ветеринарно-санитарного и зоогигиенического обслуживания пчеловодства.

К числу наиболее опасных инфекционных заболеваний пчел, причины, возникновения которых напрямую связаны с несоблюдением норм содержания, неполноценным кормлением, а также с недостаточным количеством эффективных ветеринарно-санитарных мер борьбы, относятся микозы – грибковые заболевания.

Расширение ареала распространения микозов на пасеках страны в последние несколько лет, по мнению большинства исследователей, связано с нарушением равновесия нормальной микрофлоры в пчелиной семье, вызванным бесконтрольным применением антибиотиков и других химиотерапевтических препаратов. Предрасполагающими факторами в развитии заболеваний являются резкие колебания температуры и повышенная влажность воздуха в гнездах пчел (А.М. Смирнов и сотр., 2000).

Как показывает практика пчеловодства, успех лечения, профилактики инфекционных болезней пчел, наряду с грамотным, научно-обоснованным применением лекарственных препаратов, а чаще в большей степени зависит от санитарного состояния ульев, сотов, инвентаря, пасечных построек и самой территории пасеки (А.М. Смирнов, 1980).

В связи с вышеизложенным очевидно, что особую актуальность на современном этапе приобретают вопросы диагностики, всестороннего изучения культурально-морфологических свойств возбудителей микозов пчел, путей их распространения, а так же изыскания эффективных, экологически безопасных средств борьбы и профилактики. Только такое комплексное решение указанных проблем может обеспечить надлежащую профилактику инфекционных заболеваний пчел, позволит успешно проводить оздоровительные мероприятия на неблагополучных пасеках, повысить продуктивность пчелиных семей и получать продукты пчеловодства высокого санитарного качества.

**Целью настоящей работы** явилось решение ряда теоретических и прикладных вопросов разработки интегрированной системы профилактики и борьбы с основными микозами пчел: аскофероза, аспергиллеза, меланоза и кандидамикоза, которая включает: диагностику, комплекс ветеринарно-санитарных мер, систему лечебных мероприятий.

**В задачи исследований входило:**

- изучить биологические особенности возбудителей основных микозов пчел, определить чувствительность выделенных штаммов к фунгицидным препаратам, применяемым в пчеловодстве;
- разработать способы ускоренной диагностики микозов пчел методом ИЦР;
- испытать и изучить фунгицидные свойства препаратов из различных классов химических соединений и отобрать эффективные при микозах пчел;
- изыскать и разработать средства и режимы дезинфекции ульев, соторамок, пчеловодного инвентаря и оборудования при грибковых заболеваниях пчел;
- изучить токсичность предложенных препаратов на организм пчел и теплокровных животных;

- изучить роль паразитов медоносных пчел в распространении возбудителей микозов;

- изучить влияние биологически активных добавок и стимуляторов на физиологическое состояние и гигиеническое поведение пчел в комплексе противомикозных мероприятий;

- апробировать интегрированную систему мер борьбы с аскоферозом и аспергиллезом пчел в производственных условиях.

**Научная новизна.** Научно обоснована и внедрена в практику пчеловодства интегрированная система мер профилактики и борьбы с микозами пчел.

Проведен и теоретически обоснован комплекс ветеринарно-санитарных мероприятий на пасеках при микозах пчел с применением современных, высокопроизводительных, экономически выгодных способов дезинфекции ульев, сотов, инвентаря и оборудования.

Внедрена система применения лечебных и стимулирующих для развития пчел препаратов, позволяющих вести профилактику грибковых болезней.

Впервые разработана методика ускоренной индикации и идентификации возбудителей аспергиллеза пчел методом ПЦР с выделением ДНК и компьютерным дизайном праймеров специфичных определенным участкам геномов возбудителей.

Установлена высокая фунгицидная и дезинфицирующая активность электрохимически активированных растворов (препарат йодохлорин) и препаратов глуфар и натамин в отношении возбудителей микозов пчел.

Эффективность препарата йодохлорин подтверждена электронно-микроскопическими исследованиями структуры конидий возбудителей микозов.

Изучена и установлена высокая эффективность применения биологически активных добавок (препарат ВЭСП) для повышения

резистентности пчел в комплексе ветеринарно-санитарных мероприятий при микозах.

Впервые установлено, что ухвертки и муравьи могут являться механическими переносчиками возбудителей микозов. Показано сапрофитическое взаимоотношение гриба *Ascosphaera apis* в организме ухверток и муравьев, что свидетельствует о резервуарной роли этих насекомых.

Новизна прикладных разработок подкрепляется тем, что три предложения по способу получения и изучению фунгицидных и фунгистатических свойств ряда четвертично – аммониевых соединений защищены тремя патентами РФ на изобретение (в соавторстве): - № 2216535 от 20.11.2003; № 2221773 от 20.01.2004; № 2221776 от 20.01.2004 (см. приложения).

**Практическая ценность.** Данные, полученные в результате проведенных исследований, легли в основу разработки комплексной интегрированной системы профилактики и борьбы с грибковыми заболеваниями пчел: - аскосферозом, аспергиллезом, меланозом и кандидамикозом, позволяющей обеспечивать эпизоотологическое благополучие по микозам пчел на пасеках.

Для проведения лечебно-профилактических мероприятий предложены препараты йодохлорин, натамин и глуфар, разработаны режимы и технологии их применения.

Для повышения резистентности, гигиенической способности и стимуляции развития пчелиных семей в комплексе противомикозных мероприятий предложен препарат ВЭСП. Разработаны способ и режимы применения данного препарата (в соавторстве).

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены на 37 Международном конгрессе Алимондия – 2001 (Дурбан ЮАР, 2001); Международной конференции ветеринарных фармакологов и токсикологов

посвященной 125 - летию Н.А. Сошественского (Казань, 2001); Всероссийской конференции по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии (Казань, 2002); научно-практической конференции по актуальным проблемам АПК (Казань, 2003); 38 Международном конгрессе Алимондия 2003 (Любляна, Словения, 2003); 5 Международной научно – практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно – санитарного контроля и биологической безопасности» посвященной 75 – летию МГУПБ (Москва, 2004); XI научно – практической конференции «Апитерапия – XXI век» (Рыбное, 2004); Международной научно – практической конференции «Состояние и проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии в животноводстве» (Чебоксары, 2004); научно – практической конференции «Экологические аспекты производства, переработки и использования продуктов пчеловодства» (Рыбное, 2004); VI республиканской научной конференции «Актуальные экологические проблемы Республики Татарстан» (Казань, 2004); 39 Международном конгрессе Алимондия – 2005 (Дублин, Ирландия, 2005); Международной научно – практической конференции «70 лет на службе охраны здоровья населения и животных», посвященной 70-летию ГНУ ВНИИВСГЭ.

**Публикации.** Основные материалы диссертации изложены в 32 печатных работах, в том числе в 9 публикациях в изданиях, определенных перечнем ВАК РФ. Проведенные исследования и полученные результаты позволяют вынести на защиту следующие основные положения диссертационной работы:

культурально-морфологические свойства культур грибов рода *Aspergillus*, адгезия конидий гриба в кишечнике и на поверхности личинок пчел;

диагностика микозов пчел с использованием полимеразной цепной реакции;

лечебно – профилактические и дезинфицирующие свойства препаратов йодохлорин, глуфар и натамин при микозах пчел, электронная микроскопия конидий возбудителя аспергиллеза при воздействии йодохлорина;

токсикологическая характеристика предложенных препаратов;

стимулирующее действие йодохлорина на организм пчел и влияние его на основные полезно – хозяйственные показатели семей пчел;

роль паразитов пчелиных семей (уховертки, муравьи) в распространении возбудителей микозов;

эффективность применения биологически активной добавки ВЭСП для повышения резистентности и гигиенической активности семей пчел при микозах;

ветеринарно–санитарная оценка продуктов пчеловодства, полученных от опытных семей пчел;

интегрированная система мер профилактики и борьбы с основными микозами пчел.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 264 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения, выводов, практических предложений, списка использованной литературы и приложений. Работа содержит 40 таблицы, 22 рисунка и 6 диаграмм. Список литературы включает 376 источников, из них 144 зарубежных авторов.

## **СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2. Материалы и методы исследований**

Работа выполнена в лаборатории ветеринарной санитарии в пчеловодстве Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, лаборатории контроля и индикации возбудителей вирусных и хламидийных инфекций в объектах ветеринарного надзора Всероссийского научно-исследовательского

ветеринарного института (г. Казань), а так же на кафедре зоологии Казанского государственного педагогического университета в 1998-2006 гг. Производственные испытания дезинфицирующих и лечебно-профилактических препаратов проводили на пасаках различных зон Приволжского федерального округа.

Работу проводили согласно общепринятым нормативным документам:

- Основные методические требования к постановке экспериментов в пчеловодстве. Современные методы исследования патологии пчел (утв. РАСХН, 2000).

- Методические рекомендации по изучению и разработке способов профилактики борьбы с аскоферозом пчел (утв. ВАСХНИЛ, 1987).

- Методика по дезинфекции и санитарии в пчеловодстве (утв. ВАСХНИЛ, 1971).

- Методические рекомендации по изучению токсического действия пестицидов и биопрепаратов на пчел (утв. ВАСХНИЛ, 1989).

- Методические указания по исследованию влияния акарицидных препаратов на пчел и клеща Варроа (утв. ВАСХНИЛ, 1982).

- Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (Москва, 1995).

Комплексную оценку исследуемых препаратов проводили в соответствии с требованиями Фармакологического Совета Департамента ветеринарии МСХ РФ. В процессе выполнения работы были использованы:

а) производственные штаммы грибов: 1. Aspergillus niger Tieghem, 2. *A. flavus* Link, 3. *A. fumigatus* Fres, 4. *Ascospaera apis*, 5. *Aureobasidium pullulans*, 6. *Candida albicans*, выделенные нами из патологического материала, полученного с неблагополучных по микозам пасек Республики Татарстан, обладающие характерными культуральными и морфологическими свойствами.

б) паспортизированные музейные штаммы *Ascosphaera apis* № № ВКМ F-3421 и ВКМ F-3422 и производственные штаммы аспергилл, предоставленные нам ведущим научным сотрудником лаборатории микотоксикологии ВНИИВСГЭ Л.С.Малиновской: 7. *A. flavus* (Link.), 8. *A. fumigatus* (Fres.), 9. *A. niger* (v. Tiegh), 10. *A. nidulans* (Eidam, Wint.), 11. *A. terreus* (Thom), 12. *A. ochraceus* (Wilhelm), 13. *A. sulphureus* (Fres. Thom et Church), 14. *A. candidus* (Link), 15. *A. wentii* (Wehmer), 16. *A. clevatus* (Desm), 17. *A. giganteus* (Wehmer),

в) питательные среды: среда Чапека, сусло – агар, среда Сабуро (плотная и жидкая), картофельный агар с глюкозой.

г) взрослые пчелы и расплод

д) воск и мед

е) лабораторные животные: белые мыши, кролики, белые крысы.

Выделение культуры грибов рода *Aspergillus* проводили из материалов (трупы пчел, соты с погибшими личинками, размером 10x10 см), полученных с неблагополучных по грибковым заболеваниям пчел.

Исследования по определению устойчивости спорообразующих микроорганизмов к текучему пару проведены общепринятыми методами. В опыте использовали 10-суточные культуры производственных штаммов грибов *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus* и *Ascosphaera apis*.

Изучение развития гриба в кишечнике и адгезии конидий *Aspergillus niger* на поверхности личинок проводили при помощи световой микроскопии (Н.В. Блинов, 2002).

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием реактивов производства НПО "СибЭнзим". При постановке ПЦР соблюдали регламент, нормы и требования, предъявляемые к лабораториям ПЦР – анализа согласно «Методических рекомендаций по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод ПЦР» (Москва, 1995).

Испытания лечебно-профилактических свойств йодохлорина были проведены на пчелосемьях, подобранных по принципу аналогов. Обработку пчелосемей осуществляли в безвзяточный период путем скармливания лечебного сиропа, а также путем опрыскивания соторамок с пчелами при помощи распылителя типа "Росинка".

Изучение ультраструктуры конидий *Aspergillus niger*, подвергнутых действию йодохлорина проводили с использованием электронного микроскопа ПЭМ-100 просвечивающего типа с минилинзами при инструментальном увеличении  $\times 15000$ . Электронно-микроскопические исследования были проведены совместно с кандидатом биологических наук Хуспудтиновой Л.С. и кандидатом ветеринарных наук Матвеевой Е. Л.

Изучение влияния йодохлорина на организм пчел проводили методом дозированного скармливания в лабораторных условиях согласно "Методическим рекомендациям по изучению препаратов и способов борьбы с варроозом пчел". Состояние и поведение пчел, их активность и количество погибших особей учитывали в течение периода, когда в садке оставалась половина пчел, первоначально отобранных для опыта, и сравнивали с показателями контрольных групп.

Для определения влияния йодохлорина на организм пчелы нами были проведены биохимические исследования следующих показателей: - активность каталазы (манганометрическим методом по В.М. Мерцшеву); - общий белок (по методу Лоури); - степень развития жирового тела (по методу Маурицио); - общее количество липидов в гемолимфе пчел (по методу Свана); - содержание глюкозы в гемолимфе пчел (по методу Шомопьи-Нильсона).

Стимулирующее действие йодохлорина изучали по влиянию его на основные полезно-хозяйственные показатели пчелиных семей: - сила, летная активность, медовая продуктивность и репродуктивная активность пчелиных маток.

Определение чувствительности отобранных штаммов возбудителей микозов к наиболее перспективным фунгицидным препаратам в лабораторных условиях проводили методом диффузии в агар с применением дисков, по общепринятой методике (В.Я. Антонов и сотр., 1971).

Разработку режимов дезинфекции объектов пчеловодства проводили общепринятыми методами (А.М. Смирнов, 1971). Для инфицирования тест-объектов использовали свежеприготовленную взвесь конидий гриба *Aspergillus niger* Tieghem выделенный с неблагополучной по микозам пасеки Республики Татарстан в концентрации  $20 \times 10^4$  кл/мл. Опыты по разработке режимов дезинфекции с использованием обеззараживающих агентов проводили на тестах (10 x 10) из дерева (имитация материала ульев); металла (имитация медогонок и др. металлического инвентаря) и сотов (5 x 5). В полупроизводственных и производственных опытах по разработке режимов дезинфекции использовали инфицированные указанным возбудителем ульи, соты и инвентарь.

Для изучения влияния естественных загрязнений пчелиного гнезда на дезинфицирующий эффект при воздействии различных дезинфектантов, в качестве тестобъектов использовали кусочки стерильной бязи размером 1 x 1 см, инфицированные общепринятыми методами. В качестве биологической защиты использовали мед натуральный (ГОСТ 19792 – 01) и воск пчелиный (ГОСТ – 21179 – 90). Пергу, прополис, фекалии пчел, трупную массу личинок пчел отбирали из пчелиной семьи непосредственно перед опытом.

Исследования по изучению продолжительности жизни пчел в продезинфицированных садках, проводили по методике А.М. Смирнова (1980).

Токсикологические исследования предложенных дезинфектантов: натамина и глуфара проводили на теплокровных животных по следующим параметрам: - оценка острой токсичности; - изучение местно-раздражающего

действия, действия на слизистые оболочки глаз и кожно-резорбтивное действие.

Остаточные количества йода и его активно-действующих соединений в меде определяли кинетическим роданидно-нитритным методом по Г.Ф. Проскуряковой (И.Г. Важенин, 1974). Определение хлористого натрия в меде проводили согласно аргентометрического метода Мора (Л.Ф. Соловьёва, 1995). Качественную реакцию на аммиак и соли аммония проводили с помощью реактива Несслера.

Изучение резистентности и гигиенической активности пчел и сравнение по этому признаку при применении в комплексе борьбы и профилактики заболеваний пчел грибковой этиологии препаратов ВЭСП и СГОЛ-1-40 было проведено, с учетом способности рабочих пчел удалять замороженный расплод по модифицированной методике С.Р. Milne (1982).

Цифровой материал был обработан статистически по методу вариационной статистики с учетом достоверности по формулам с применением показателя достоверности  $P$ , устанавливаемого по таблице Стьюдента. (Г.Ф. Лакин, 1990, Н.А. Плехинский 1970).

### **3. Результаты исследований**

#### **3.1. Эпизоотологическая ситуация по микозам пчел на пасеках регионов Приволжского федерального округа**

Анализ полученных данных показал, что наибольшее распространение на пасеках обследованных районов получили аскофероз и аспергиллез пчел.

На исследованных пасеках Кировской области процент пораженных аскоферозом пчелосемей находился в среднем на уровне 28 %, аспергиллезом - 5% с незначительными колебаниями. Более неблагоприятная ситуация в этом отношении в Удмуртии, где уровень пораженности аскоферозом на пасеках республики достигал 30% (1999, 2003). На эти же годы, по нашим данным приходится и максимальные значения по аспергиллезу. В Республике Татарстан степень поражения семей

аскосферозом в течение контрольного периода на пасеках, подвергшихся исследованиям, находилась на уровне 15-20%, аспергиллеза – 3-5% соответственно, пики заболеваемости приходились на 1998, 1999 и 2003 г.г.

Стабильный уровень заболеваемости микозами наблюдался на пасеках республик Башкортостан и Марий Эл. Степень поражения аскосферозом семей пчел в этих регионах составляет в среднем 14%, на долю аспергиллеза приходилось не более 3% семей.

Меланоз и кандидамикоз экспериментальным путем диагностировался в ряде случаев на пасеках Республики Татарстан (Верхнеуслонский и Апастовский районы), Кировской области (Малмыжский район) и Республики Башкортостан (Аскинский район). В других регионах отмечаются спорадические случаи этого заболевания маток на основании данных анкетирования пчеловодов и ветеринарных специалистов.

### **3.2.1. Культурально-морфологические свойства гриба *Aspergillus niger*, выделенного с неблагополучных пасек**

В ходе микологических и микроскопических исследований нами из патологического материала, отобранного из семей пчел, имеющих признаки заболеваний грибковой этиологии, был выделен и идентифицирован штамм гриба *Aspergillus niger* Tieghem, являющийся одним из основных возбудителей аспергиллеза пчел (Гробов О.Ф. и сопр., 1987). Родовую и видовую принадлежность данного возбудителя подтверждают следующие показатели – на агаре Чапека колонии гриба появились на 3-и сутки культивирования, диаметр которых составил в среднем 2,5-3 см; цвет субстратного мицелия – белый. В дальнейшем на 7-8-е сутки колонии приобрели черновато-коричневую окраску. Высота конидиеносцев варьировала от 1,5 до 3 мм, ширина – 13-20 мкм с гладкими оболочками толщиной 2-2,5 мкм. Цвет конидиеносцев в нижней части желтоватый, в верхней – коричневый. Апикальное расширение шаровидное, диаметр его в

среднем составил 55-75 мкм. Стеригмы, в основном, двухярусные, размеры базального яруса 30-40 x 5-6 мкм, второго яруса – 6-9 x 3-3,5 мкм. Конидии – шаровидные, диаметром 3-6 мкм, темно-коричневого цвета: поверхность их как гладкая, так и шероховатая или шиповатая с четкими полосами пигмента. Отбор и исследования проб патологического материала с других неблагополучных по аспергиллезу пасек показал преобладание возбудителей, обладающих аналогичными культурально-морфологическими свойствами.

### 3.2.2. Устойчивость грибов рода *Aspergillus* и *Ascosphaera apis* к текучему пару

Наряду с культурально-морфологическими свойствами, в контексте разработки средств профилактики и борьбы с грибковыми заболеваниями пчел, важнейшей характеристикой возбудителей микозов является устойчивость последних к текучему пару. Испытаниям были подвергнуты изоляты *Aspergillus niger* Tieghem, *A. flavus* Link, *A. fumigatus* Fres и *Ascosphaera apis*, выделенные с пасек Верхнеуслонского и Сабинского районов Республики Татарстан.

При рассмотрении паростойчивости отобранных производственных штаммов возбудителей микозов пчел (табл.1) наиболее высокую устойчивость по отношению к текучему пару (100<sup>0</sup>С) проявили споры гриба *Ascosphaera apis* – 10 мин. и *Aspergillus niger* – 6 мин. Наименьшая устойчивость зафиксирована у спор *Aspergillus flavus* и *Aspergillus fumigatus*, которая составляла 5 мин соответственно.

Таким образом, споры указанных штаммов грибов, которые выдерживали действие текучего пара более 5 минут, в соответствии с требованиями по дезинфекции были в дальнейшем использованы для разработки режимов дезинфекции объектов пчеловодства.

Таблица 1.

Данные по устойчивости к текучему пару выделенных штаммов грибов *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus* и *Ascospaera apis*

Штаммы возбудителей	№ № штамма	Устойчивость штаммов к текучему пару, мин.
<i>Aspergillus niger</i>	1	6
<i>Aspergillus flavus</i>	2	5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3	5
<i>Ascospaera apis</i>	4	10

### 3.2.3. Адгезия конидий *Aspergillus niger* в кишечнике и на поверхности личинок пчел

В результате проведенных исследований было установлено, что проникновение конидий возбудителя аспергиллеза в кишечник опытных личинок происходит на 4-ые сутки после искусственной контаминации расплода пчел. В опытных препаратах среднего участка кишечника через 2 ч. после попадания аспергилл, на поверхности слизистой было обнаружено скопление конидий без следов повреждения эпителия. Однако через 10 ч. нами было зафиксировано интенсивное развитие гриба, сопровождающееся началом деструктивных процессов эпителиальных клеток слизистой кишечника. Контрольные препараты кишечника личинок показали здоровую неповрежденную структуру слизистой оболочки средней кишки.

При изучении процесса колонизации на поверхности личинок пчел было установлено, что уже через 15 ч. после искусственной контаминации наблюдалось образование локальных колоний *Aspergillus niger*, а в дальнейшем и мицелиальных форм гриба.

#### 3.3.1. Выбор и компьютерный дизайн праймеров, специфичных определенным участкам геномов возбудителей аспергиллеза

Проведенные исследования позволили отобрать две пары специфичных праймеров, при этом, с использованием одной из них оказалось возможным проводить экспресс-обнаружение микроскопического гриба *Aspergillus flavus*

в культурах и в патологическом материале методом ПЦР, а другая пара оказалась специфичной в отношении генома штамма *Aspergillus fumigatus*. Данные праймеры были синтезированы в НПО «СибЭнзим» на ДНК-синтезаторе ASM-800 пр-ва фирмы «Биоссет».

Пара праймеров AFL1-AFL2 (5'-3': - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G; TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) специфически выявляла ДНК гриба *A. flavus* как из музейной культуры так и в материале, полученном с пасеки, диагноз "Аспергиллез, вызванный *A. flavus* " на которой был в последующем установлен микробиологическим методом. В результате ПЦР в реакционной смеси, где присутствовала ДНК *A. flavus*, выделенная из патоматериала, из чистой или из смешанной грибной культуры, образовывался специфический фрагмент длиной 250 пар оснований.

Вторая пара праймеров, условно названная нами AFU1-AFU2 и имеющая следующую последовательность (5'-3'): AFU1 CGCCGAAGACCC, AFU2 TAAAGTTGGGTGTCGGCTGGC, специфически выявляла ДНК гриба *A. fumigatus* (Fres.) с образованием фрагмента длиной 380 пар оснований.

### **3.4.1. Терапевтическая эффективность препарата йодохлорин при аспергиллезе пчел**

Учеными Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института в течение ряда лет проводились исследования по изучению биологической активности электроактивированных растворов (А.С. СССР 230699; А.С. СССР 1467814; А.С. СССР 321943). Наиболее эффективным в отношении основных возбудителей микозов пчел из ряда исследованных нами электроактивированных растворов, является препарат йодохлорин, представляющий собой электроактивированный раствор солей йодида калия и хлорида натрия с концентрацией исходных компонентов 0,3% - 0,9% и 0,6%-1,8% соответственно. При изучении лечебно-профилактических свойств препарата йодохлорин предпочтение было отдано препарату, содержащему в исходном водно-солевом растворе 0,3 % йодистого калия и

0,9 % хлористого натрия, который в ходе лабораторных исследований показал высокую фунгицидную активность по отношению и возбудителю каменного расплода – грибу *Aspergillus niger*. Данный препарат готовили согласно «Наставлению по применению препарата йодохлорин для санации воздушной среды и организма животных», утв. ГУВ МСХ СССР 31 октября 1991г. (п.1.2.). При применении препарата йодохлорин путем скармливания с сахарным сиропом эффективность обработки при соотношении препарата к корму 1:5 (20%) составила 57,7%; при 1:4 (25%) – 61,1; при 1:3 (30%) – 73%. Увеличение соотношения до 1:2 (50%) привело к незначительному росту эффективности - 74,3%, что говорит о том, что оптимальной является соотношение 1:3 или 30% препарата йодохлорин в сахарном сиропе. В процессе изучения лечебных свойств йодохлорина путем опрыскивания соторамок водным раствором препарата было установлено, что при соотношении 1:5 (20%), процент снижения уровня грибковой инфекции составлял 65,5%. При повышении содержания йодохлорина в растворе до 1:4 (25%) и 1:3 (30%) эффективность обработок составила 71,2 и 84% соответственно. Обработка пчелиных семей второй контрольной группы препаратом унисан, широко применяемым для лечения аскофероза и аспергиллез пчел, показала снижение уровня грибковой инфекции в гнездах пчел на 78% (скармливание с сахарным сиропом) и 85% (опрыскивание соторамок)

#### **3.4.2. Чувствительность производственных штаммов грибов *Aspergillus niger* и *Ascosphaera apis* к противогрибковым препаратам**

Анализ результатов опытов по определению чувствительности выделенных штаммов возбудителей основных микозов пчел, представленных в табл.2, позволяет выделить из спектра отобранных препаратов следующие микоциды: - унисан; ПАГП; аскостат и йодохлорин.

Таблица 2

Чувствительность производственных штаммов *Ascosphaera apis* и *Aspergillus niger* к противогрибковым препаратам

Препарат	Концентрация (%)	Зона задержки роста (мм)	
		<i>Ascosphaera apis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
нистатин	0,01	16 ± 0,8	14 ± 0,7
унисан	0,05	24 ± 1,2	22 ± 1,3
дикобин	0,04	14 ± 1,4	14 ± 1,6
ПАГП	0,01	20 ± 0,7	20 ± 1,2
аскостат	0,01	21 ± 1,0	20 ± 1,3
йодохлорин	нативный	23 ± 0,5	21 ± 1,4
контроль	-	0	0

Наивысшую эффективность в отношении спор *Ascosphaera apis* при поверхностном культивировании гриба показали препараты йодохлорин и унисан, на 3-е сутки зона задержки роста гриба соответственно составляла  $23 \pm 0,5$  и  $24 \pm 1,2$  мм. При испытании нистатина и дикобина, которые так же достаточно часто применяются при лечении микозов пчел, зона подавления роста гриба была в пределах  $16 \pm 0,8$  и  $14 \pm 1,4$  мм. Штамм гриба *Aspergillus niger* по отношению к испытуемым препаратам проявил более высокую устойчивость при аналогичном качественном соотношении показателей эффективности. На основании результатов наших исследований, наиболее перспективными являются препараты: йодохлорин (зона задержки роста  $21 \pm 1,4$  мм); унисан ( $22 \pm 1,3$  мм); ПАГП ( $20 \pm 1,2$  мм) и аскостат ( $20 \pm 1,3$  мм), в то время как активность нистатина и дикобина не превышала  $14 \pm 0,7$  мм и  $14 \pm 1,6$  мм соответственно.

### 3.5.1. Влияние препарата йодохлорин на продолжительность жизни и биохимические показатели пчел

Учитывая требования, предъявляемые к препаратам для борьбы с заболеваниями пчел, нами были проведены исследования (садковые опыты) по изучению влияния препарата йодохлорин (0,3 – 0,9 %), отобранного в качестве лечебно-профилактического средства при аспергиллезе, на продолжительность жизни пчел. Результаты исследований показали, что

при получении пчелами корма, содержащего определенную дозу препарата йодохлорин с соотношением йодида калия и хлорида натрия 0,3-0,9% (1:5, 1:4, 1:3, препарата и корма), продолжительность жизни составила  $30 \pm 1,3$  суток, что соответствовало контрольным значениям  $30 \pm 1,4$  суток. Важным этапом изучения токсикологических свойств препарата йодохлорин являлось биохимическое исследование ферментативной активности каталазы контрольных и опытных пчел. В ходе изучения данного вопроса было установлено, что в процессе потребления пчелами корма, содержащего йодохлорин, заметных отклонений индекса активности каталазы от показателей контрольных пчел не наблюдается. Индекс активности каталазы в средней кишке у опытных пчел на первые сутки был равен  $0,031 \pm 0,001$ , в прямой кишке –  $0,5 \pm 0,003$ , в то время как в контроле аналогичные показатели составляли  $0,030 \pm 0,001$  и  $0,052 \pm 0,003$ .

При определении содержания общего белка методом Лоури установлено, что при скармливании пчелам опытной группы сахарного сиропа содержащего йодохлорин, количество белка в гемолимфе указанных пчел (6,53-6,71 г%) практически не отличалось от показателей, полученных в контроле (6,61-6,69 г%).

При количественном определении глюкозы методом Шомпьи-Нильсона не установлено какого-либо изменения уровня данного сахара в гемолимфе опытных пчел, потреблявших йодохлорин.

Степень развития жирового тела (3,21-3,31 балла), а так же уровень липидов в гемолимфе (0,980-0,989 г %) опытных пчел в ходе эксперимента фактически не отличались от контрольных показателей 3,23-3,30 балла и 0,974-0,987 г % соответственно и находились в пределах физиологической нормы (Н.М Акопян 1978).

### 3.5.2. Стимулирующее действие йодохлорина на силу, летную активность, медовую продуктивность семей пчел и репродуктивную способность маток

Первым этапом исследований по изучению влияния йодохлорина на основные хозяйственно полезные показатели было определение силы пчелиных семей подвергшихся обработке предложенным препаратом, с учетом общего количества печатного расплода. Полученные результаты представлены в табл. 3 и 4.

Результаты показывают что, применение йодохлорина оказало явно выраженное стимулирующее влияние на динамику развития пчелиных семей. Сила опытных семей получавших сахарный сироп с йодохлорином, составила в среднем 7 улочек при показателе до постановки опыта - 4,5 улочки, в то время как значение контрольных семей было 6 улочек, при аналогичных исходных показателях. Применение же препарата путем опрыскивания соторамок не привело к значительному росту силы семей, которая оставалась на уровне - 6,5 улочек, заполненных пчелами.

Основополагающим фактором, влияющим на силу семей, является яйценоскость маток. Исходя из этого, следующим этапом исследований было изучение репродуктивной способности пчелиных маток в опытных семьях.

Таблица 3  
Состояние семей пчел обработанных йодохлорином методом дозированного скармливания.

Группа п/с	До опыта		После опыта	
	Сила п/с, улочки	Количество печатного расплода, тыс. ячеек	Сила п/с, улочки	Количество печатного расплода, тыс. ячеек
1	4,5 ± 0,5	9,0 ± 0,5	7,0 ± 0,5	12,5 ± 0,3
2	5,0 ± 0,5	9,3 ± 0,3	7,5 ± 0,5	12,8 ± 0,5
3	4,0 ± 0,5	8,4 ± 0,2	6,5 ± 0,5	11,4 ± 0,4
Контроль	4,5 ± 0,5	9,1 ± 0,3	6,0 ± 0,5	10,7 ± 0,2

Таблица 4

Состояние семей пчел обработанных йодохлорином методом опрыскивания соторамок.

Группа п/с	До опыта		После опыта	
	Сила п/с, улочки	Количество печатного расплода, тыс. ячеек	Сила п/с, улочки	Количество печатного расплода, тыс. ячеек
1	4,0 ± 0,5	8,6 ± 0,5	6,0 ± 0,5	10,8 ± 0,3
2	4,5 ± 0,5	9,1 ± 0,3	6,5 ± 0,5	11,4 ± 0,5
3	5,0 ± 0,5	9,4 ± 0,2	7,0 ± 0,5	12,0 ± 0,4
Контроль	4,5 ± 0,5	9,0 ± 0,3	6,0 ± 0,5	10,7 ± 0,2

При рассмотрении результатов данной фазы эксперимента, которые представлены в табл. 5, четко прослеживается рост уровня данного показателя в семьях подвергшихся влиянию испытуемого препарата.

Таблица 5

Репродуктивная способность пчелиных маток в семьях обработанных йодохлорином

Сутки	Количество печатного расплода (сотни ячеек)		
	Группа 1	Группа 2	Контроль
до опыта	38 ± 2	35 ± 1	36 ± 2
12	136 ± 3	122 ± 2	115 ± 1
13	138 ± 4	124 ± 3	117 ± 2
14	140 ± 1	126 ± 4	119 ± 4
15	144 ± 2	129 ± 3	122 ± 3
16	150 ± 3	135 ± 2	127 ± 2
17	156 ± 4	140 ± 3	132 ± 4
18	161 ± 3	145 ± 2	136 ± 3
19	164 ± 4	147 ± 3	139 ± 2
20	167 ± 5	150 ± 3	142 ± 3
21	170 ± 6	153 ± 2	144 ± 4
M ± m	142 ± 3	127 ± 3	120 ± 3

Среднее количество печатного расплода в первой опытной группе (дозированное скормливание) за весь период наблюдения составило 142 ± 3 сотен ячеек. Результат второй группы семей (топикальное воздействие) – 127 ± 3 сот. ячеек, в то время как показатели контрольных семей оставались на уровне 120 ± 3 сот. ячеек печатного расплода. Полученные результаты

показали, что в подопытных семьях яйценоскость матки была на 5-15% выше по сравнению с контролем, в зависимости от способа внесения препарата.

Изменение уровня яйценоскости маток способствует пропорциональному изменению количества расплода в гнездах и потребности в кормах, что послужило мотивом определения завершающего этапа исследований стимулирующего действия йодохлорина по изучению характера летной деятельности и медовой продуктивности опытных пчел. Групповое разделение семей пчел проводилось аналогично опытам по определению силы семей. Результаты исследований отражены в табл. 6 и 7. Подопытные семьи отличались более высокой медопродуктивностью и летной активностью по сравнению с контролем при одинаковых условиях обеспеченности естественными медоносными ресурсами. Результаты опытов показали, что при применении препарата йодохлорин методом дозированного скармливания, происходит увеличение сбора меда на 16% в опытных семьях на фоне повышения летной активности. При опрыскивании соторамок йодохлорином, показатель роста медовой продуктивности находился на уровне 7%. В контрольных семьях результаты роста 2%.

Таблица 6

Летная активность и медовая продуктивность семей пчел, обработанных йодохлорином методом дозированного скармливания.

Группа п/с	До опыта		После опыта	
	Летная активность, шт. за 3 мин	Количество меда, кг	Летная активность, шт. за 3 мин	Количество меда, кг
1	32,6 ± 0,5	5,1 ± 0,5	46,0 ± 0,4	5,9 ± 0,3
2	34,5 ± 0,4	5,5 ± 0,3	52,5 ± 0,4	6,6 ± 0,5
3	30,0 ± 0,2	4,9 ± 0,2	42,5 ± 0,2	5,8 ± 0,4
Контроль	32,5 ± 0,5	5,0 ± 0,3	35,2 ± 0,3	5,1 ± 0,2

Таблица 7

Летная активность и медовая продуктивность семей пчел, йодохлорином методом опрыскивания соторамок.

Группа п/с	До опыта		После опыта	
	Летная активность, шт. за 3 мин	Количество меда, кг	Летная активность, шт. за 3 мин	Количество меда, кг
1	30,1 ± 0,5	4,8 ± 0,5	36,0 ± 0,4	5,2 ± 0,3
2	32,5 ± 0,4	5,1 ± 0,3	42,5 ± 0,4	5,5 ± 0,5
3	35,0 ± 0,2	5,4 ± 0,2	47,5 ± 0,2	5,8 ± 0,4
Контроль	32,3 ± 0,5	5,0 ± 0,3	35,8 ± 0,3	5,1 ± 0,2

Таким образом, результаты исследований показали, что препарат йодохлорин с заданным соотношением исходных компонентов, обладает выраженными стимулирующими свойствами, улучшающими основные – хозяйственно полезные показатели пчел, что в определенной степени можно объяснить наличием в составе данного ЭХА раствора ионов йода.

### 3.6.1. Влияния различных видов загрязнений, встречающихся на объектах пчеловодства, на обеззараживающий эффект

При обследовании пасек было установлено, что характер загрязнений имеет специфические особенности для определенного вида объектов пчеловодства. Так, стенки ульев и рамки покрыты воском, прополисом, фекалиями пчел; ячейки сотов – прополисом, а так же содержат остатки меда, перги, фекалий пчел и восковой моли, трупную массу личинок пчел; медогонки часто бывают покрыты тонким слоем меда, а воскопрессы – воском. В ходе определения уровня загрязненности объектов пчеловодства, путем взвешивания 180 проб загрязнений взятых со 100 см<sup>2</sup> площади ульев, медогонки и воскопрессов установили (табл.8), что на благополучных и неблагополучных по микозам пасеках в каждом квадрате улья (100 см<sup>2</sup>) присутствует до 55-60 мг загрязнений, а после механической очистки этот показатель снижается до 15-20 мг. На благополучных по нозематозу пасеках до очистки – 90 - 95 мг, а после по 10-15 мг соответственно.

Таблица 8

Количественное соотношение загрязнений на объектах пчеловодства.

Пасеки, с которых взяты пробы	Объекты пчеловодства	Количество проб	Количество загрязнений со 100 см <sup>2</sup> (мг)	
			до механической очистки	после механической очистки
Благополучные пасеки	Ульи	50	56,3 ± 0,3	16,2 ± 0,1
	Медогонки	5	102,6 ± 1,8	23,6 ± 1,4
	Воскопрессы	5	265,4 ± 10,3	26,4 ± 1,3
Неблагополучные по микозам пасеки	Ульи	50	62,4 ± 0,2	18,1 ± 0,2
	Медогонки	5	104,3 ± 1,6	22,3 ± 1,3
	Воскопрессы	5	261,4 ± 10,3	28,4 ± 1,0
Неблагополучные пасеки по нозематозу	Ульи	50	94,7 ± 0,5	12,2 ± 0,3
	Медогонки	5	109,6 ± 1,8	24,4 ± 1,1
	Воскопрессы	5	271,4 ± 10,1	25,9 ± 1,3

Примечание: Во всех случаях  $P \leq 0,001$

В условном квадрате площади медогонки после откачивания меда остается в среднем 100 - 110 мг меда, а на аналогичной площади воскопресса до 260 -270 мг. При обращении к данным табл. 8 видно, что количество загрязнений со 100 см<sup>2</sup> ульев, медогонок и воскопрессов после механической очистки значительно ниже, чем до нее. Кроме того, уровень загрязненности ульев с неблагополучных по микозам и особенно по нозематозу пасек, значительно выше аналогичных показателей благополучных в ветеринарно-санитарном отношении пасек.

Таким образом, при постановке опытов по разработке режимов дезинфекции, необходимо учитывать наличие в гнезде пчел специфической биологической защиты в виде различных загрязнений.

Учеными Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института (г. Казань) и института органической и физической химии Казанского научного центра Российской академии наук (В.С. Угрюмова, А.З. Равилов, П.С. Фахретдинов и др.) разработаны новые дезинфицирующие препараты натамин и глуфар, созданные на основе четвертичных аммониевых соединений. Данные дезинфектанты прошли успешные испытания и предложены в качестве дезинфицирующих средства для дезинфекции птицеводческих помещений при борьбе и профилактики инфекционных болезней птиц бактериальной и микозной этиологии (И.Г.Гатиатуллин 2002, Зарипов М.Р. 2004). В дальнейшем эти препараты были использованы нами при разработке средств дезинфекции обьсктов пчеловодства при микозах пчел.

Исследования влияния различных видов естественных загрязнений пчелиных гнезд на дезинфицирующие свойства препаратов показали, что обеззараживание спор *Aspergillus niger* на бязевых тестах, без биологической защиты, происходит за более короткий отрезок времени и при меньшей концентрации. Все испытанные виды защиты по их влиянию можно разделить на три группы: 1 группа – углеводистые вещества – мед, защитные

свойства которого по отношению к дезинфектантам незначительны, особенно в растворах, так как он достаточно быстро растворяется в воде; 2 группа – жирополидные вещества – воск и прополис. Эти виды защиты в значительной степени препятствуют проникновению дезинфекционного агента в микробную клетку, связывают дезинфицирующее вещество и снижают его активность. При испытании препаратов глүфар и натамин, полное обеззараживание бязевых тестов, защищенных воском и прополисом, происходит при экспозиции 3 и 5 часов соответственно в 3-х % концентрации, в то время как другие виды загрязнений утрачивают защитные свойства при экспозиции указанных дезсредств 50 мин и концентрации 2%. Третья группа – белковые вещества (перга), фекалии пчел, трупная масса личинок пчел, по своим защитным свойствам занимают промежуточное положение между первой и третьей, что обусловлено тем, что они в меньшей степени связывают дезинфицирующее вещество.

### **3.6.2. Токсичность препаратов натамин и глүфар для теплокровных животных**

В соответствии с требованиями, предъявляемыми к дезинфектантам, наряду с высокими дезинфицирующими свойствами они не должны оказывать вредного воздействия на организм животного и человека. Учитывая это, нами совместно с сотрудниками ВНИВИ: профессором, доктором ветеринарных наук В.С.Угрюмовой и кандидатом биологических наук Л.С. Хуснутдиновой. было проведено изучение общетоксических свойств препаратов натамина и глүфара, проявивших высокую дезинфицирующую активность при обеззараживании объектов птицеводства и пчеловодства. Максимально переносимая доза натамина для белых мышей составила 600 мг/кг; 100%-ную гибель мышей вызывает доза 1100 мг/кг ( $LD_{100}$ ); ( $LD_{50}$ ) -780 мг/кг. Аналогичные показатели препарата глүфар составляли 600 мг/кг (МПД); 1600 мг/кг ( $LD_{100}$ ) и 820 мг/кг ( $LD_{50}$ ) соответственно. Полученные результаты позволяют отнести данные

дезинфектанты к среднетоксичным веществам что соответствует, согласно ГОСТа 12.007-76 III классу токсичности.

### 3.6.3. Результаты лабораторных опытов изучения дезинфицирующих свойств препаратов йодохлорин (0,6 – 1,8 %), глугфар и натамин

На основании результатов проведенных ранее лабораторных исследований по изучению фунгицидных свойств веществ из различных классов химических соединений, были отобраны новые препараты глугфар и натамин, а так же электроактивированный раствор йодида калия и хлорида натрия (йодохлорин) с исходной концентрацией компонентов 0,6 – 1,8%.

Из данных, представленных в таблице 9 видно, что препарат йодохлорин при экспозиции 6 ч обеззараживает только 25% деревянных тестобъектов, а 100% -ное обеззараживание зафиксировано при экспозиции 24 ч. Применение данного препарата при экспозиции 6, 12 и 24 ч обеззараживает 30, 90 и 100% тестов изготовленных из участков сотов и оцинкованного железа.

Таблица 9

Результаты обеззараживания тестобъектов, инфицированных грибом *Aspergillus niger*, йодохлорином (0,6 – 1,8 %).

Тестобъекты	Концентрация, (%)	Экспозиция, (час)	Количество тестов, (шт.)	Результаты обеззараживания	
				обеззаражено	не обеззаражено
Дерево	нативный	6	20	5	15
		12	20	17	3
		24	20	20	0
	контроль	24	4	0	4
Соты	нативный	6	20	6	14
		12	20	18	2
		24	20	20	0
	контроль	24	4	0	4
Оцинкованное железо	нативный	6	20	6	14
		12	20	18	2
		24	20	20	0
	контроль	24	4	0	4

Таблица 10

Результаты обеззараживания тестобъектов, инфицированных грибом *Aspergillus niger*, препаратом натамин.

Тестобъекты	Концентрация, (%)	Экспозиция, (час)	Количество тестов, (шт.)	Результаты обеззараживания	
				обеззаражено	не обеззаражено
Дерево	1	2	20	0	20
	2	2	20	2	18
	3	3	20	8	12
	4	3	20	16	4
	5	3	20	18	2
	5	4	20	20	0
	контроль	4	4	0	4
Оцинкованное железо	1	2	20	0	20
	2	2	20	2	18
	3	3	20	6	14
	4	3	20	9	11
	5	4	20	18	2
	5	5	20	20	0
	контроль	5	4	0	4

Препарат натамин, созданный на основе композиции четвертично-аммониевого соединения и едкого натра (1:5) в концентрации раствора 2% при экспозиции 2 ч обеспечивает обеззараживание только 10%, обработанных тестобъектов, вне зависимости от материала изготовления последних (табл.10). Оптимальная концентрация данного препарата, при которой наблюдается полное обеззараживание всех тестобъектов, составила 5%, при этом рабочая экспозиция для дерева – 4 ч, а для металлических тестов соответственно – 5 ч, тесты, изготовленные из сотов, не были задействованы в опытах по испытанию дезинфицирующей активности натамина по вследствие омыления ячеек.

Испытание препарата глюфар, представляющего собой композицию четвертично-аммониевого соединения и глутарового альдегида показало (табл. 11), что он является высокоактивным дезинфектантом в отношении *Aspergillus niger*. При значениях концентрации (3%) и экспозиции (3 ч)

зафиксировано полное обеззараживание деревянных, сотовых и металлических тестобъектов.

Таблица 11

Результаты обеззараживания тестобъектов, инфицированных грибом *Aspergillus niger*, препаратом глэфар

Тестобъекты	Концентрация, (%)	Экспозиция, (час)	Количество тестов, (шт.)	Результаты обеззараживания	
				обеззаражено	не обеззаражено
Дерево	1	2	20	0	20
	2	2	20	3	17
	2	3	20	8	12
	3	2	20	16	4
	3	3	20	20	0
	контроль	3	4	0	4
Соты	1	2	20	0	20
	2	2	20	2	18
	2	3	20	8	12
	3	2	20	16	4
	3	3	20	20	0
	контроль	3	4	0	4
Оцинкованное железо	1	2	20	0	20
	2	2	20	2	18
	2	3	20	10	10
	3	2	20	18	2
	3	3	20	20	0
	контроль	3	4	0	4

Перед испытанием дезинфицирующих свойств, отобранных в ходе лабораторных исследований препаратов, нами было проведено изучение характера распределения аэрозолей дезсредств при помощи баллона «Росинка» на стенках и дне улья, а также на плоскостях соторамок.

Оптимальный способ введения дезсредства это раздельная обработка ульев и сотов, когда аэрозоль распыляли сверху улья, предварительно сняв крышку и закрыв все летки, направляя факел во внутрь улья, непосредственно на дно и стенки. При этом длина факела достигала  $170 \pm 3$  см, что позволяет ему, с учетом высоты внутреннего пространства 12-ти рамочного улья и лежака в 35-40 см, а многокорпусного – 115-140 см, свободно достигать дна и стенок. В ходе нашего опыта установлено, что при

направленном введении  $200 \pm 5$  мл окрашенного аэрозоля дезраствора сверху в 12-ти рамочный улей аэрозольные частицы равномерно покрывают всю поверхность дна и стенок. Полученные результаты позволили нам рассчитать необходимое количество дезраствора в зависимости от типа ульев, площадь и объем внутреннего пространства (табл. 12.)

Таблица 12

Площадь и объем использованных в опытах ульев.

Тип улья	Площадь внутреннего пространства ( $m^2$ )	Объем внутреннего пространства ( $m^3$ )
многокорпусный (4 корпуса)	1,8	0,17
лежак (24 рамки)	1,4	0,13
12-ти рамочный	0,8	0,07
12-ти рамочный (с магазинной надставкой)	1,0	0,09

При разработке режимов дезинфекции соторамок установлено, что обеззараживание происходит при аэрозольной обработке с обеих сторон с расстояния 25-30 см с расходом на гнездовую рамку по 100-150 мл, а на магазинную соответственно 50-75 мл. После чего соторамки помещали в обработанные ульи, заполняя весь объем, накрывали их крышками и выдерживали заданную экспозицию (от 1 до 36 часов). В общей сложности было поставлено 32 серии опытов с использованием 250 тестобъектов. Согласно данным табл. 13, экспозиция, при которой наблюдается высокая обеззараживающая активность препарата йодохлорин, содержащего в исходном растворе 0,6% йодида калия и 1,8% хлорида натрия для ульев и соторамок составила 24 часа. Обеззараживающий эффект при обработке ульев и соторамок препаратом глугфар (3%) достигается при экспозиции 3 часа. Высокую дезинфицирующую активность проявил также препарат натамин (5%) обнаруживший обеззараживающий эффект на ульях и деревянных планках рамок от сотов при экспозиции 4 часа.

Таблица 13

Эффективные режимы дезинфекции ульев и сотов при микозах пчел  
с использованием баллона «Росинка».

Дезинфицирующее средство	Концентрация, (%)	Экспозиция, (час)	Расход дезраствора (мл)					
			Ульи				Соторамки (на одну шт)	
			12-ти рамочный	12-ти рамочный с надставкой	Лежак (24рамки)	Многокорпусный (4 корпуса)	Гнездовые	Магазинные
Йодохлорин	Нативный	24	400	500	700	900	150	75
Натамин	5	4	300	400	500	600	-	-
Глуфар	3	3	300	400	500	600	100	50

Примечание: Во всех опытах – отсутствие роста *Aspergillus niger*, при росте в контроле.

### 3.6.4. Продолжительность жизни пчел в садках, после их обеззараживания йодохлорином (0,6-1,8%), глуфаром и натамином

Результаты наших исследований по изучению продолжительности жизни пчел (табл. 14) показали, что обработка садков препаратами йодохлорин, глуфар и натамин с последующим проветриванием и промыванием не оказало отрицательного влияния на поведение и продолжительность жизни пчел.

Таблица 14

Влияние продезинфицированных препаратами йодохлорин (0,6-1,8%) глуфар и натамин энтомологических садков на продолжительность жизни пчел.

Препарат	Садки, №-№	Количество пчел	Продолжительность жизни, пчел (сут)	
			без промывания $M \pm m$	с промыванием водой $M \pm m$
йодохлорин	1 - 6	300	$32 \pm 1,3$	$32 \pm 1,3$
глуфар	7 - 12	300	$27 \pm 0,8$	$32 \pm 1,2$
натамин	13 - 18	300	$28 \pm 0,9$	$32 \pm 1,4$
контроль	19 - 24	300	$32 \pm 1,1$	$32 \pm 1,1$

Показатели продолжительности жизни в контрольных садках составили 32 дня. В садках, подвергнутых обработке дезинфектантами, созданными на основе ЧАС, но не промытых водой отмечена повышенная смертность пчел: - при применении глуфара продолжительность жизни снижена на  $5 \pm 0,3$  сут; а натамина соответственно на  $4 \pm 0,2$  сут.

Обработка садков йодохлорином даже без последующего промывания, не привела к снижению уровня продолжительности жизни опытных пчел, которая оставалась во всех опытах  $32 \pm 1,3$  сут.

### 3.6.5. Остаточные количества дезинфектантов в продуктах пчеловодства

В ходе исследований проб меда, отобранных от пчелиных семей, пересаженных в ульи на соты, обеззараженные соответственно препаратами йодохлорин и глуфар, после их промывания водой, следов йода и его соединений, хлористого натрия, аммиака и солей аммония, а также и

глутарового альдегида не обнаружено. При определении йодного числа в образцах пчелиного воска данный показатель для опытной группы составил 9 при 7,8 в контроле, что соответствует требованиям ГОСТа 21179-90 на пчелиный воск.

### **3.7.1. Роль уховертков и муравьев в распространении грибковых болезней пчел**

Для изучения возможных путей передачи возбудителей микозов пчел, в частности аскофероза нами были проведены микологические исследования насекомых – паразитов медоносных пчел (уховертки и муравьи), как потенциальных переносчиков инфекции. В эксперименте было задействовано 5 семей пчел средней и сильной степени пораженности аскоферозом (20 и более больных личинок на сот), в которых было обнаружено большое количество уховертков и муравьев. В посевах из смывов 5-ти проб муравьев гриб *Ascosphaera apis* выделен в 5-ти пробах (100%), а в пробах растертых муравьев рост данного гриба зафиксирован только в трех случаях (60 %).

Схожая картина наблюдалась при рассмотрении результатов посевов проб уховертков. В смывах с поверхности этих насекомых, гриб *Ascosphaera apis* обнаружен во всех 5-ти пробах, а посеvy суспензированной фракции показали рост возбудителя в 4-ех пробирках из 5-ти.

Таким образом, черные муравьи и уховертки собранные с неблагополучных по аскоферозу семей пчел, как на поверхности своего тела, так и внутри в основном содержат жизнеспособного возбудителя данного заболевания, что даст основание считать этих насекомых механическими переносчиками грибковой инфекции и что особенно опасно – биологическими резервентами спор возбудителей микозов пчел. Исходя из этого, важным элементом комплекса противомикозных мероприятий является профилактика и борьба с паразитами пчелиных гнезд, которые включают в себя: - содержание ульев на сухих местах, свободных от

муравейников; - регулярное скашивание травы около ульев; смазывание ножек подставок минеральными маслами; - содержание утепляющего материала ульев в сухом виде.

### **3.8.1. Влияние препарата ВЭСП и ферментативной молочной сыворотки (СГОЛ-1-40) на резистентность и гигиеническую активность пчел.**

На возможность возникновения и проявления грибкового заболевания влияет число особей в семье, а также скорость и полнота очистки улья, так как пчелы активно реагируют не только на погибший расплод, но и на больных особей, удаляя их из гнезда. В комплексе мероприятий по разработке стимуляторов гигиенической активности пчелиных семей нами были испытаны препарат ВЭСП, и ферментированная молочная сыворотка СГОЛ-1-40.

Результаты наших исследований по изучению уровня гигиенической активности пчел и сравнение по этому признаку при применении в комплексе борьбы и профилактики микозов препаратов ВЭСП и СГОЛ-1-40 показали, что уровень снижения времени, затраченного на удаление погибших личинок пчел потреблявших с кормом ВЭСП, из 5, 10, 15 и 20 ячеек составил 19,3%; 13,3%; 27,5% и 22% соответственно. При обращении к результатам изучения гигиенической активности пчел, получавших с сахарным сиропом СГОЛ-1-40, видно, что активизация данного показателя по сравнению с контрольными группами пчел незначительная. Среднее значение времени вскрытия 50% ячеек составляло 18,1 часа при контрольных показателях 19 ч.

### **3.9.1. Интегрированная система профилактики и борьбы с основными микозами пчел: аскоферозом, аспергиллезом, меланозом и кандидамикозом**

Результаты нашей работы позволили разработать и внедрить в практику интегрированную систему профилактики и борьбы с основными микозами пчел, основанной на осуществлении комплекса мер: - организационно-хозяйственных; - установление диагноза и определение

чувствительности местных штаммов возбудителей к лечебным препаратам, изъятии из гнезд зараженных сотов с погибшим расплодом, медом и пергой, инкубации расплода в семьях-изоляторах; - сортировки соторамок, при этом соты с черными стенками, с паличим в ячейках погибшего расплода, заплесневевшей пергой, сильно загрязненные фекалиями пчел и поврежденные грызунами, выбраковываются для дальнейшей перетопки на воск. - текущей дезинфекции всех инфицированных объектов на пасеке; - составлении гнезд из продезинфицированных ульев и сотов; - перегона больных на составленные гнезда; - дачи лечебного сиропа и стимулирующих подкормок; - заключительной дезинфекции перед снятием карантина.

Разработка данной системы (рис.1) проведена по аналогии со схемой оздоровления пчелиных семей при гнильцовых болезнях пчел (А.М. Смирнов, 1980).

I) На крупных (промышленных) пасеках организационно-хозяйственные мероприятия включают: подготовку помещения недоступного для пчел для дезинфекции сотов, оборудование бетонированной площадки, обеспечивающей сток промывных вод и дезраствора в яму с плотной крышкой; установку котла для подогрева воды; поставку необходимых дезинфицирующих средств, по заявке, составленной ветврачом; подготовку необходимой дезинфекционной техники (гидропульта типа ГШ-2, машин ЛСД, ВДМ или ДУК); обеспечение персонала средствами безопасности (респираторы, резиновые перчатки и сапоги).

II) На любительских пасеках: подготовку площадки для очистки и дезинфекции ульев и инвентаря, помещения для дезинфекции сотов, приобретение дезсредств, лечебных препаратов и беспропеллентных баллонов типа «Росника».

В ходе производственных испытаний интегрированной системы установлено, что все опытные пчелиные семьи, пересаженные в обеззараженные гнезда и получавшие лечебный сироп, хорошо развивались и осваивали гнезда.

## СХЕМА

Рис.1.

### ОЗДОРОВЛЕНИЯ ПЧЕЛИНЫХ СЕМЕЙ ПРИ ГРИБКОВЫХ БОЛЕЗНЯХ ПЧЕЛ



Засев матками ячеек, воспитание и развитие расплода проходило без отклонений от нормы. К началу зимовки опытные семьи имели по 7-10 улочек пчел и по 15 - 20 кг меда и перги. При клиническом осмотре этих семей признаки микозов не обнаружены, в то время как в контрольных семьях пчел установлено поражение расплода микозами.

Зимовка опытных пчелиных семей прошла в норме, отхода семей не зафиксировано. Подмора во всех опытных семьях было по 100-150 граммов в каждой семье, в то время как в контрольных – по 500-600 гр.

### **3.9.2. Экономическая эффективность интегрированной системы профилактики и борьбы с основными микозами пчел**

Определяющим показателем внедрения новых научно-технических разработок в технологию производства является получение дополнительной прибыли.

В течение двух лет (2004 – 2005 гг.) нами были проведены исследования по определению экономической эффективности предложенной интегрированной системы по оздоровлению пчелиных семей от микозов на трех пасеках пчеловодного хозяйства «Сабинский мед» Сабинского района Республики Татарстан с общей численностью 320 пчелиных семей пчел. Расчет экономической эффективности проводили в соответствии с «Инструкцией по определению годового экономического эффекта, получаемого в сельскохозяйственном производстве в результате внедрения законченных научно-исследовательских работ и новой техники» (М., 1972) и «Методикой определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий».

При рассмотрении полученных результатов наблюдается значительный рост валовой продуктивности опытных семей пчел после внедрения интегрированной системы оздоровления при микозах пчел. Выход меда от каждой пчелиной семьи вырос в среднем на 15 кг, а воска, пыльцы и прополиса – на 0,7; 0,4 и 0,15 кг соответственно.

Внедрение предлагаемой интегрированной системы борьбы и профилактики микозов пчел на неблагополучных по микозам пасеках (общее количество пчелосемей 320) позволило оздоровить пчелиные семьи и получить годовой экономический эффект в сумме 798720 руб, при этом на 1 вложенный рубль получено 5 руб прибыли.

#### 4. ВЫВОДЫ.

1. Анализ эпизоотологической ситуации на пасеках республик и областей Приволжского федерального округа и собственные исследования в период 1998-2006 г.г показали, что распространение микозов пчел носит угрожающий характер. Заболеваниями микозной этиологии - аскоферозом, аспергиллезом, меланозом и кандидамикозом поражено до 28% семей пчел.
2. Изучены основные пути проникновения возбудителей микозов в организм пчел: непосредственно через внешние покровы и при попадании в пищеварительный тракт. Установлена адгезия и колонизация патогенных грибов рода *Aspergillus* на поверхности и в кишечнике личинок пчел.
3. Определена пароустойчивость производственных штаммов грибов *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus* и *Ascosphaera apis*, споры которых выдерживали действие текучего пара 100°C более 5 мин. и были использованы нами для разработки режимов дезинфекции объектов пчеловодства.
4. Проведенные исследования по изучению возможности использования метода ПЦР-анализа для диагностики микозов пчел позволили отобрать две пары специфичных праймеров AFL1-AFL2 и AFU1-AFU2, с помощью которых возможно проводить экспресс-обнаружение грибов *Aspergillus flavus* и *Aspergillus fumigatus* в культурах и в патологическом материале.
5. Для лечения пчелиных семей при микозах пчел разработаны режимы применения препарата йодохлорин с исходной концентрацией 0,3% - 0,9%. Установлен высокий терапевтический эффект (81%) препарата при аэрозольной обработке соторамок в концентрации 30%, при расходе 100 мл

на 1 улочку или дачи лечебного сиропа в количестве 150 мл на 1 улочку пчел с эффективностью 73%.

6. Показано, что йодохлорин не оказывает влияния на продолжительность жизни и на основные биохимические показатели организма пчел: - активность каталазы; общее количество белка, липидов, глюкозы в гемолимфе; степень развития жирового тела. Установлено стимулирующее действие препарата на развитие семей пчел: - увеличение репродуктивной способности пчелиных маток на 5-15%; повышение летной активности на 15-26% и медовой продуктивности на 5-14%.

7. Разработана технология проведения дезинфекции объектов пчеловодства при аспергиллезе и аскоферозе препаратом йодохлорин с исходной концентрацией 0,6% - 1,8%. Расход препарата составил 400 мл на один 12-ти рамочный улей и 150 мл на одну гнездовую соторамку при экспозиции 24 часа.

8. Препараты натамин в 5% - ой и глуфар - 3% - ой концентрациях в течение 4 и 3 часов соответственно надежно обеззараживают объекты пчеловодства, загрязненные возбудителями микозов, при расходе 300 мл на один 12-ти рамочный улей ( $0,8 \text{ м}^2 - 1 \text{ м}^2$ ) и 100 мл на одну гнездовую соторамку.

9. Результаты, полученные в опытах на лабораторных животных в условиях действия доз, позволяют отнести натамин и глуфар к среднетоксичным веществам, что соответствует, согласно ГОСТа 12.007 - 76, III классу токсичности. Средняя летальная доза препаратов составила 780 мг/кг и 820 мг/кг соответственно, при умеренном кожно-резорбтивном и местнораздражающем действии.

10. В пробах меда, отобранных от пчелиных семей, пересаженных в ульи на соты, обеззараженные препаратами йодохлорин и глуфар, следов йода, хлористого натрия, аммиака и солей аммония, а также глutarового альдегида не обнаружено. Исследуемый мед, по органолептическим, биохимическим и физико-химическим показателям не отличался от меда, полученного от

контрольных семей, находящихся в условиях идентичной кормовой базы и соответствовал ГОСТу 19.792-2001. Содержание элементного йода в пчелином воске соответствует установленным для данного микроэлемента требованиям  $\leq 7,0-15,0$  г йода/100 г.

11. Надежное обеззараживание объектов пчеловодства при аскоферозе и аспергиллезе пчел под покрытием пленки ПК-4 достигается применением биоцидного газа бромистого метила в дозе  $0,75 \text{ кг/м}^3$  при плотности загрузки на  $1 \text{ м}^3$  трех двенадцатрамочных ульев с надставками и 72 сотов в них при экспозиции 10 суток, колебаниях температуры от 10 до  $30^\circ\text{C}$  и относительной влажности 60-90%, с последующей пассивной дегазацией после снятия пленки в течение 5 – 7 суток, при температуре окружающего воздуха от 10 до  $25^\circ\text{C}$  и относительной влажности от 60 до 85%. В сотах, подвергшихся дезинфекции концентрация бромидов составила  $5,8 \pm 2,4 \text{ мг/кг}$ , что ниже допустимых санитарно-гигиенических норм остатков бромидов в пищевых продуктах, а в пробах меда и перги, отобранных из обработанных бромистым метилом сотов, следы бромидов не обнаружены.

12. Установлено, что черные муравьи (*Formicidae*) и уховертки (*Dermaptera*) являются механическими переносчиками микозной инфекции и биологическими резервентами возбудителей аскофероза и аспергиллеза пчел. Предложены меры борьбы с этими насекомыми-паразитами пчелиных гнезд.

13. Препарат ВЭСП при внесении 0,1 г в 100 мл сахарного сиропа способствует стимуляции развития и повышению резистентности пчелиных семей, при этом способность пчел к вскрытию ячеек и удалению пораженного расплода повышается на 15-20 %. Мед, полученный от пчелиных семей потреблявших корм, пригоден к потреблению без ограничений.

14. На основании проведенных исследований разработана и апробирована в производственных опытах интегрированная система профилактики и борьбы

с основными микозами пчел – аспергиллезом и аскофферозом, основанная на осуществлении комплекса организационно-хозяйственных, дезинфекционных и лечебных мероприятий.

15. Внедрение предлагаемой интегрированной системы борьбы и профилактики микозов пчел на неблагополучных по микозам пасеках (общее количество пчелосемей – 320) позволило оздоровить пчелиные семьи и получить годовой экономический эффект в сумме 798720 руб, при этом на 1 вложенный рубль получено 5 руб прибыли.

## **5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.**

В результате проведенных исследований разработаны:

1. Наставление по применению препарата ВЭСП для стимуляции развития, повышения резистентности и продуктивности пчел /Утверждено департаментом ветеринарии МСХ РФ 14.04.2000/. (Совместно с в.п.с. Института общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, доктором биологических наук Какпаковым В.Т.).
2. Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации отдельных представителей рода *Aspergillus* – возбудителей аспергиллеза пчел методом ПЦР (Рассмотрены и одобрены секцией «Ветеринарная санитария, гигиена и экология отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии» протокол № 2/2 от 7 июня 2005 г., утверждены 10 июня 2005 г.)
3. Методические рекомендации по применению электрохимически активированного раствора иодида калия и хлорида натрия (йодохлорин), получаемого на установке СТЭЛ для дезинфекции ульев и соторамок при аспергиллезе пчел. (Рассмотрены и одобрены секцией «Ветеринарная санитария, гигиена и экология отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии» протокол №2/2 от 7 июня 2005 г., утверждены 9 июня 2005 г.)

Выражаю искреннюю благодарность и глубокую признательность моему учителю, доктору ветеринарных наук, профессору, Заслуженному деятелю науки РФ, академику РАСХН СМИРНОВУ АНАТОЛИЮ МИХАЙЛОВИЧУ за большое внимание и постоянные консультации, оказанные при выполнении настоящей работы.

За помощь и поддержку в проведении научно-исследовательской работы благодарю сотрудников Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института и биологического факультета Казанского государственного педагогического университета.

#### **6. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Мукминов М.Н., Угрюмова В.С., Равилов А.З., Угрюмов О.В. Разработка средств лечения и профилактики аспергиллеза пчел.//Тр. 2-го съезда ветеринарных врачей Республики Татарстан, Казань, 2001.С.182-185.
2. Мукминов М.Н., Угрюмова В.С., Равилов А.З., Угрюмов О.В. Development of new means of treatment and prophylaxis of stonebrood in honeybees in Russia.//37 International Apicultural Congress Apimondia 2001, ICC, Durban, South Africa, 2001. P 42.
3. Фахретдинов П.С., Угрюмова В.С., Мизипов И.Р., Романов Г.В., Хуснутдинова Л.С., Мукминов М.Н., Зарипов М.Р. Изучение пенообразующего свойства нового дезинфицирующего средства «Глуфар» // Мат. межрегион. научной прак. конф. Актуальные проблемы диагностики, профилактики и терапии болезней животных в современных экономических условиях. Барнаул, 2001, - С. 48-51.
4. Хуснутдинова Л.С., Угрюмова В.С., Набиуллин Р.А., Мукминов М.Н., Зарипов М.Р. Токсикологическая оценка нового дезинфицирующего средства

“Глуфар” // Мат. межд. конф. ветеринарных фармакологов и токсикологов, посв. 125-летию Н.А. Сошестввенского. Казань, 2001. - С. 108-110.

5. Мукминов М.Н., Угрюмова В.С., Равилов А.З., Угрюмов О.В., Фахретдинов П.С., Изучение фунгицидной активности различных химических соединений на возбудителей аспергиллеза и аскосфероза пчел. // Мат. Всерос. научн. произв. конф. по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии. Казань. 2002. - С. 106-108.

6. Мукминов М.Н., Угрюмова В.С., Равилов А.З., Угрюмов О.В., Изучение фунгицидного действия “Натамина” на возбудителей микозов пчел. // Мат. Всерос. научн. произв. конф. по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии. Казань. 2002. - С. 108-110.

✓ 7. Мукминов М.Н., Угрюмова В.С., Равилов А.З. Йодохлорин при микозах пчел. // Пчеловодство. 2002 г. №8. - С. 21-22.

✓ 8. Мукминов М.Н., Угрюмова В.С., Равилов А.З. Шишко А.А., Матвеева Е.Л. Действие йодохлорина на организм пчел//Пчеловодство 2003 г.№3 С. 31.

9. Какпаков В.Т., Мукминов М.Н. Внедрение нанотехнологий в ветеринарную практику пчеловодства. // Мат. Науч-практич. конф. по акт. проблемам Агропромышленного комплекса. Ч.2. Казань 2003. - С. 321-324.

10. Мукминов М.Н. Current diagnostic techniques of bees' communicable diseases. // 38 Apimondia International Apicultural Congress Ljubljana, Slovenia, August 24-29, 2003. Book of abstracts. P.733.

11. Мукминов М.Н. Эпизоотологическая ситуация по основным заболеваниям медоносных пчел в РТ. // Экологические, морфофизиологические особенности и современные методы исследования живых систем. (сб. материалов КГПУ). Казань 2003. - С. 159 -161.

12. Мукминов М.Н., Курбанов И.В. Морфометрические особенности медоносных пчел Сабинского района РТ.//Актуальные экологические проблемы Республики Татарстан. Сб. материалов. Казань, 2004 г.-С.161-162.

13. Попов А.А., Мукминов М.Н., Салимов Т.М. Аспергиллез медоносных пчел на фоне варроозной инвазии. // Актуальные экологические проблемы Республики Татарстан. Сборник материалов. Казань, 2004 г. - С.192.

14. Мукминов М.Н., Салимов Т.М. Диагностика аспергиллеза медоносных пчел вызванного *Aspergillus fumigatus*. // «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарного контроля и биологической безопасности» Мат.5-ой меж.науч.прак.конф. посв.75-летию МГУПБ, М., 2004 -С.170-171.

15. Мукминов М.Н., Вакилова Д.Г. Оценка фунгицидной активности триодэтиленгликоля в композиции с йодохлорином в отношении возбудителя аспергиллеза пчел. // «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарного контроля и биологической безопасности» Мат.5-ой меж.науч.прак.конф. посв.75-летию МГУПБ, М., 2004. - С.171-172.

16. Мукминов М.Н., Зайнуллин Л.И. Индикация возбудителей аспергиллеза пчел методом ПЦР. Вестник РАСХН, 2004 . №5 - С.61-63.

17. Мукминов М.Н. Безопасность продуктов пчеловодства при использовании электроактивированных растворов. // «Апитерапия сегодня» сб. мат. XI науч. прак. конф. «Апитерапия – XXI» Рыбное, 2004 . - С.177-180.

18. Мукминов М.Н. Влияние сверхнизких количеств биологически-активных веществ растительного происхождения на гигиеническое поведение медоносных пчел. // Состояние и проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии в животноводстве. Сб.науч.трудов мат.межд.науч.практ. конф. Чебоксары 2004. - С.435 – 438.

19. Мукминов М.Н., Вакилова Д.Г. Динамика развития гриба *Aspergillus niger* в кишечнике личинок пчел. // Состояние и проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии в животноводстве. Сб.науч.трудов мат.межд.науч.практ. конф. Чебоксары 2004 - С. 438-440.

20. Мукминов М.Н., Мизипов И.Р. Фунгистатические и фунгицидные свойства ряда функциональнозамещающих аммониевых соединений. // Экологические аспекты производства переработки и использования продуктов пчеловодства. // Мат. науч. практ. конф. 17-19 ноября 2004 г. ч.II. Рыбное, 2005, - С.67-71.
- ✓ 21. Мукминов М.Н., Какпаков В.Т. Препарат ВЭСП и гигиеническое поведение пчел. // Пчеловодство, 2005 . № 2. - С.28-29.
22. Мукминов М.Н. Стимулирующее действие ЭХА растворов. // Пчеловодство, 2005 . №5. - С.28 – 29.
- ✎ 23. Мукминов М.Н. Ультраструктура конидий *Aspergillus niger*. // Ветеринария, 2005 . №6. - С.30-33.
24. Сафиуллин Р.Р., Мукминов М.Н., Стехин С.З., Курбанов И.В. Morphologic features of the tatar population of Middle – Russian bees. // 39 Apimondia International Apicultural Congress Dublin, Ireland, August 21-26, 2005. Book of abstracts. P.102-103.
25. Мукминов М.Н., Салимов Т.М., Вакилова Д.Г. Associated form stonebrood and varroa. // 39 Apimondia International Apicultural Congress Dublin, Ireland , August 21-26, 2005. Book of abstracts. P.170.
26. Мукминов М.Н., Вакилова Д.Г. Development of fungus *Aspergillus niger* in digestive tract of bee larvae. // 39 Apimondia International Apicultural Congress Dublin, Ireland , August 21-26, 2005. Book of abstracts. P.170.
27. Мукминов М.Н. Дезинфекция объектов пчеловодства при аспергиллезе пчел. // Проблемы ветеринарной санитарии гигиены и экологии. Сб. науч. трудов. ВНИИВСГЭ Т.117, М., 2005. - С. 220-223.
28. Мукминов М.Н. Газовая дезинфекция при микозах медоносных пчел. // Проблемы ветеринарной санитарии гигиены и экологии. Сб. науч. трудов. ВНИИВСГЭ Т.117, М., 2005. - С. 224-227.

29. Мукминов М.Н. Смешанная форма аспергиллеза и варрооза медоносных пчел. // Проблемы ветеринарной санитарии гигиены и экологии. Сб. науч. трудов. ВНИИВСГЭ Т.117, М., 2005. С. 266-268.

30. Фахретдинов П.С., Угрюмова В.С., Равилов А.З., Мизипов И.Р., Хуснутдинова Л.С., Матвеева Е.Л., Мукминов М.Н., Романов Г.В., Гагиатуллин И.Г., Вавилова В.В. N-[Алкоксиполи (этиленокси) карбонилметил]аммоний хлориды, обладающие фунгистатической и бактерицидной активностью, и способ их получения.(патент РФ № 2216535, 20.10.2003.) М., 2003, 34 с.

31. Фахретдинов П.С., Угрюмова В.С., Мукминов М.Н., Равилов А.З., Мизипов И.Р., Романов Г.В., Хуснутдинова Л.С., Матвеева Е.Л., Пента [поли(этиленокси) карбонилметил]аммониевые производные трехядерных трифенолов, обладающие фунгистатической, фунгицидной, бактерицидной активностью, и способ их получения. (патент РФ № 2221773, 20.01.2004.) М., 2004, 52 с.

32. Фахретдинов П.С., Угрюмова В.С., Мизипов И.Р., Равилов А.З., Романов Г.В., Мукминов М.Н. N,N-Диметил-N-алкил-N-[Алкоксиполи(этиленокси) карбонилметил]аммоний хлориды, обладающие фунгистатической и бактерицидной активностью, а также свойствами присадок, регулирующих вязкоупругие свойства ассоциированных мульткомпонентных нефтяных систем, и способ их получения. (патент РФ № 2221776, 20.01.2004.) М., 2004, 24 с.



ГНУ ВНИИВСГЭ г.Москва, Звенигородское ш., 5 Заказ 208/3,  
Тираж 100 экз.