

*На правах рукописи*



**ДУБНИКОВА АННА АЛЕКСАНДРОВНА**

**ИЗЫСКАНИЕ НОВЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫХ  
СРЕДСТВ И МЕТОДОВ БОРЬБЫ С АСПЕРГИЛЛЕЗОМ ПЧЁЛ**

16.00.06 – Ветеринарная санитария, экология, зоогиена и  
ветеринарно-санитарная экспертиза

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2007

Работа выполнена в лаборатории ветеринарной санитарии в пчеловодстве Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН (ВНИИВСГЭ).

- Научный руководитель:** Кандидат биологических наук Ключко Раиса Тимофеевна (ВНИИВСГЭ)
- Официальные оппоненты:** 1. Доктор ветеринарных наук, профессор Аббасов Тофик Гусейнович (ВНИИВСГЭ);  
2. Кандидат биологических наук Сотников Анатолий Николаевич (ВИЭВ).
- Ведущая организация:** Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина

Защита состоится 28 03 2007 г. в 10<sup>00</sup> на заседании диссертационного совета Д 006.008.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, д. 5).

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

Автореферат разослан «16» 02 2007 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Е.С. Майстренко

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 1.1. Актуальность проблемы

Комплекс климатических и экологических изменений окружающей среды, как в результате глобального потепления климата, так и в результате усиливающегося антропогенного воздействия вызывает непредсказуемые последствия в мире переносчиков и возбудителей опасных инфекционных заболеваний, в том числе микозов. В результате таких процессов возникают новые варианты заболеваний с широкими адаптационными возможностями, способные привести к масштабным вспышкам в регионах, ранее благополучных по ним. Такая ситуация возникла и с аспергиллёзом пчёл, развитие которого происходит в настоящее время на фоне аскоферозной инфекции.

Среди микозов аспергиллёз занимает особое место. Грибы рода *Aspergillus* распространены повсеместно, их можно встретить на поверхности растений, в почве, кормах, воздухе. В настоящем, очевидно, в силу общих предрасполагающих факторов аспергиллёз протекает чаще совместно с аскоферозом. Несмотря на то, что наукой и практикой накоплен определённый опыт в области изучения аспергиллёза пчёл, многие проблемы остаются открытыми.

### 1.2. Цель работы

Целью работы являлось изыскание новых экологически безопасных средств и методов борьбы с аспергиллёзом как самостоятельной инфекцией, так и на фоне аскофероза пчёл.

### 1.3. Задачи исследования

1. Изучить особенности и формы проявления аспергиллёза как самостоятельной инфекции, так и на фоне аскофероза пчёл.
2. Провести научное изыскание лечебных средств, эффективных при аспергиллёзе и аскоферозе пчёл.
3. Изыскать средства и режимы дезинфекции ульев и пчеловодного инвентаря при аспергиллёзе пчёл.

#### 1.4. Научная новизна

Определена степень природной устойчивости пчелиной семьи по активности «гигиенического поведения» пчёл, которое направлено на удаление источника возбудителя (заболевших личинок) из семьи.

Доказана фунгицидная активность и эффективность применения препарата апиаск-полоски при аспергиллёзе и аскоферозе пчёл. Изучено влияние препарата апиаск-полоски на пчёл, а также динамика накопления действующего вещества в мёде обрабатываемых семей пчёл.

#### 1.5. Практическая значимость

На основании проведённых исследований в соавторстве с сотрудниками лаборатории ветеринарной санитарии в пчеловодстве ВНИИВСГЭ разработаны инструкция по применению препарата апиаск-полоски для борьбы с аспергиллёзом и аскоферозом пчёл (утверждено Россельхознадзором, 2006 г.) и технические условия на препарат апиаск-полоски СТО 45027172-0017-2006 от 14.11.2006 г. Предложен способ термической обработки ульев и инвентаря термофеном.

#### 1.6. Апробация работы

Материалы диссертации доложены: на пятой международной выставке и конференции «Интермёд-2004» (Выставочный комплекс «Экспострой на Нахимовском», г. Москва, 02.09.2004 г.); на шестой международной выставке и конференции «Интермёд-2005» (ВВЦ, г. Москва, 22.04.2005 г.); на международной конференции «40 лет систематического изучения карпатских пчёл» (г. Мукачево, Закарпатская обл., Украина, 16.09.2006 г.); на межлабораторном совещании ВНИИВСГЭ (г. Москва, 18.12.2006).

На защиту выносятся следующие положения:

- некоторые эпизоотологические и биологические особенности аспергиллёзного поражения пчёл на фоне аскофероза;
- значимость стимуляции активности «гигиенического поведения» пчёл при аспергиллёзе биологическими препаратами на примере ковитсана;

- эффективность препарата апиаск-полоски при аспергиллёзе пчёл на фоне аскоферозной инфекции;
- токсикологическая характеристика препарата апиаск-полоски;
- методы и способы дезинфекции ульев и пчеловодного инвентаря при аспергиллёзе пчёл;

### 1.7. Публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 работы.

### 1.8. Структура и объём диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических предложений, списка использованной литературы и приложений. Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста и содержит 20 таблиц, 3 рисунка и 5 диаграмм. Список литературы включает 206 источников отечественных и зарубежных авторов.

## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### 2.1. Материалы и методы исследований

Экспериментальную часть исследований проводили в период 2003–2006 г.г. в лаборатории ветеринарной санитарии в пчеловодстве и на экспериментальной пасеке ВНИИВСГЭ, а также на пасеках Московской, Тамбовской областей и Краснодарского края. Всего на 45 пасеках, где проводили исследования, содержалось более 1350 пчелиных семей, из них было клинически обследовано более 300, в лаборатории исследовано 163 образца патологического материала (печатного и открытого расплода, погибших пчёл, сотового мёда и перги) от больных и условно здоровых пчелиных семей.

Работу проводили согласно общепринятым нормативным документам:

- Основные методические требования к постановке экспериментов в пчеловодстве. Современные методы исследования патологии пчёл (утв. РАСХН, 2000);
- Методические рекомендации по изучению и разработке способов профилактики и борьбы с аспергиллёзом пчёл (утв. ВАСХНИЛ, 1987);

- Методические рекомендации по оценке действия и потенциальной опасности пестицидов для медоносных пчёл (утв. РАСХН, 2000);
- Методы испытаний дезинфекционных средств для оценки их безопасности и эффективности (М., 1998 г., ч. 2);
- Методические указания о порядке испытания новых дезинфицирующих средств для ветеринарной практики (утверждены ГУВ Госагропрома СССР, 1987).

Комплексную оценку исследуемых препаратов проводили в соответствии с Федеральным законом о лекарственных средствах РФ.

В экспериментах использовали производственные штаммы грибов: *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus niger* Tieghem, *Aspergillus fumigatus* Fres и *Ascospaera apis*, предоставленные лабораторией микотоксикологии ВНИИВСГЭ, а также выделенные из патологического материала, полученного с неблагополучных по микозам пасек России.

Материал обработан вариационно-статистическими методами программой STRAZ-2000; расчёт параметров ( $M \pm m$ ;  $td$ ) проведен на ЭВМ согласно методической программе специально для пчеловодства.

При проведении собственных эпизоотологических исследований учитывали производственное направление пасеки, природно-климатические условия и технологию содержания пчёл, санитарное состояние и силу развития пчелиных семей, для чего использовали общепринятые в ветеринарии методы эпизоотологических исследований. Одновременно проводили сбор эпизоотологических данных (сроки появления клинических признаков заболевания и условия их появления, количество больных пчелиных семей и характерные клинические признаки; учитывали схему применяемых на пасеке противомикозных обработок, проведение плановых дезинфекций, профилактические обработки в прошлом и текущем сезоне).

Предварительные диагностические исследования на наличие аспергиллёза проводили методом клинического осмотра пчелиного гнезда (учитывали силу развития, количество печатного расплода и наличие клинических признаков заболевания). Одновременно устанавливали степень контаминации его возбудителями заболевания по отобраным образцам сотового мёда и перги.

Влияние препаратов на репродуктивные свойства пчелиных маток определяли по количеству печатного расплода в пчелиных семьях. Учёт печатного расплода производили через 12 дней после первого использования препарата с помощью измерительной рамки-сетки со сторонами квадратов 5×5 см, вмещающих по 100 пчелиных ячеек.

Активность «гигиенического поведения» пчёл изучали методом, предложенным М. Spivak (2001).

Для проведения лабораторных исследований проводили отбор патологического материала. Отдельно отбирали соты с печатным и открытым расплодом с погибшими, а иногда уже и мумифицированными личинками, соты с мёдом и пергой, погибших пчёл со дна улья. Отобранные образцы исследовали в соответствии с разработанной схемой:

1. Визуальный осмотр.

2. Приготовление препаратов и их микроскопия.

3. Подготовка материала для выделения возбудителя (готовили диагностические смывы грибного налёта с погибших пчёл и поражённых личинок, разрезали на кусочки трупы насекомых);

- 3.1. микологические исследования – посев патматериала на питательную среду с целью выделения чистых культур грибов рода *Aspergillus* и *Ascosphaera apis*;

- 3.2. изучение культурально-морфологических свойств чистых культур выделенных возбудителей.

Определение чувствительности грибов к фунгицидам проводили методом диффузии в агар (Вашков, 1977) с использованием дисков. Для оценки фунгицидной активности испытуемых веществ измеряли зону задержки роста грибов.

Антифунгальные свойства испытуемых веществ изучали методом последовательных разведений. Для каждого разведения подбирали контроль. Наблюдение за результатами опыта проводили в течение 10 дней, учитывая при этом концентрацию препарата (мкг/мл), ингибирующую рост мицелия возбудителя аспергиллёза пчёл на питательной среде.

При проведении биохимических испытаний были исследованы следующие показатели:

- гемолимфоформула пчёл (по методу Гробова);
- степень развития жирового тела пчёл (по методу Мауриццо);
- общее количество липидов в гемолимфе пчёл (по методу Свана);
- содержание глюкозы в гемолимфе пчёл (по методу Шомоши-Нильсона).

Оценку токсичности для пчёл препарата апиаск-полоски проводили методом скармливания и топикального нанесения.

Определение остатков клотримазола в мёде осуществляли методом ВЭЖХ.

Для изучения активности дезинфицирующих веществ в качестве тест-культур использовали споры возбудителей аспергиллёза.

Изучение средств и методов дезинфекции ульев и пчеловодного инвентаря проводили в лабораторных и пасечных условиях. Разработку режимов дезинфекции проводили согласно "Методикам по дезинфекции и санитарии в пчеловодстве", разработанным А.М. Смирновым (1971). В качестве тест-объектов испытывали материалы, которые обычно применяются при изготовлении пасечного инвентаря и оборудования (дерево, металл). Дезинфицирующее действие растворов в пасечных условиях изучали на сотах различных сроков использования (от 1 года до 5 лет) и на тест-объектах, изготовленных из них, размерами 5×5 см. В качестве тест-культур использовали споры возбудителей аспергиллёза и аскофероза. После дезинфекции объекты промывали водой, после чего просушивали.

## 2.2. Результаты исследований

### 2.2.1. Эпизоотологический мониторинг

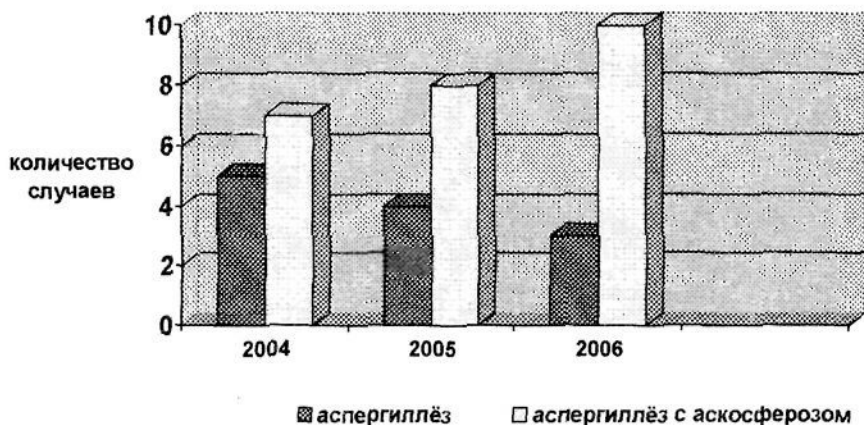
Успешная разработка и внедрение эффективной комплексной системы профилактики и борьбы с аспергиллёзом пчёл невозможны без глубокого знания эпизоотической ситуации. На основе этих данных можно реально определить основные тенденции и пути распространения заболевания, форму его проявления и разработать определённую стратегию борьбы с ним. В этой связи одной из основных задач нашей работы стало изучение закономерностей распространения аспергиллёза пчёл на территории России. Изучение проводили в Московской, Тамбовской областях и Краснодарском



крае. Данные результатов эпизоотологического обследования пчел представлены в диаграмме 1.

Диаграмма 1.

### Результаты эпизоотологического обследования пчел в 2004–2006 г.г.



Из диаграммы 1 видно, что аспергиллёз как моноинфекция встречается реже, чем сочетанная форма – аспергиллёз на фоне аскофероза. Анализ полученных результатов эпизоотологических обследований в Тамбовской, Московской областях и Краснодарском крае в 2004–2006 г.г. показал тенденцию к увеличению числа случаев проявления микозов пчёл в смешанном виде. Проявление аспергиллёза за исследуемый период уменьшилось с 42% до 21%, а проявление в виде смешанной инфекции с аскоферозом увеличилось с 58% до 79%.

При изучении этиологии смешанных форм микозов пчёл преимущественно были выявлены *Aspergillus flavus* и *Ascospaera apis*, которые одновременно выделялись из погибших личинок в 63% случаев.

Для изучения контаминации корма возбудителями микозов в больных и условно здоровых пчелиных семьях было отобрано по 15 проб сотового мёда и перги. Во всех случаях при выделении возбудителей микозов из мёда и перги в 2 раза больше проб было контаминировано грибом *A. flavus*.

### 2.2.2. Факторы, влияющие на интенсивность эпизоотического процесса при аспергиллёзе пчёл

При изучении влияния силы пчелиной семьи, активности «гигиенического поведения» пчёл и степени контаминации корма (мёда и перги) спорами возбудителей аспергиллёза на развитие и интенсивность проявления эпизоотического процесса при микозах пчёл было установлено, что эпизоотический процесс на обследованных пасеках проявлялся неодинаково. Многие факторы оказывали влияние на сроки появления клинических признаков и формы проявления инфекционной болезни в пчелиной семье. Развитие аспергиллёза возникало при заражении личинок пчёл грибом из внешней среды. Личинка содержала споры возбудителя аспергиллёза, а рядом располагались восприимчивые особи – другие разновозрастные личинки пчёл. Здесь же в гнезде присутствовал фактор передачи – контаминированный спорами корм, а механизм передачи осуществлялся непосредственно пчёлами-кормилицами. Таким образом, происходило формирование эпизоотической цепи из последовательных циклов заражения и гибели личинок пчёл и постепенное развитие эпизоотического процесса на уровне пчелосемьи.

Наибольший контакт с больными и погибшими личинками имели внутриульевые молодые пчёлы в возрасте 1–12 дней, которые осуществляли чистку ячеек и кормление расплода. Когда расплод и корм размещались на одном соте, и этот корм использовался для вскармливания личинок, создавались условия, в которых степень контаминации мёда и перги возбудителями аспергиллёза оказывала влияние на скорость возникновения и развития эпизоотического процесса. При этом вся пчелиная семья как целостная биологическая единица являлась источником инфекции.

Дальнейшее развитие эпизоотического процесса всегда характеризовалось выраженным клиническим проявлением заболевания и общим ослаблением пчелиной семьи. В этом случае без проведения специальных ветеринарно-санитарных мероприятий пчелиная семья погибала непосредственно от заболевания или от общего ослабления и слёта пчёл.

Реакция пчёл на погибших личинок и скорость удаления их пчёлами из ячеек – это один из механизмов природной устойчивости пчелиной семьи к инфекционным болезням. Активность «гигиенического поведения», по результатам наших наблюдений, зависела от общей силы пчелиной семьи и от соотношения пчёл разного возраста, в первую очередь числа пчёл в возрасте 1–12 дней. Результаты эпизоотологических исследований свидетельствуют, что в пчелиных семьях слабой и средней силы смешанные формы проявления аспергиллёза регистрировались в 5–8 раз чаще, чем в сильных пчелиных семьях.

Природная устойчивость пчелиной семьи как целостной биологической единицы существенно влияла на интенсивность проявления эпизоотического процесса при аспергиллёзе пчёл. Активность «гигиенического поведения» пчёл определяет природную устойчивость всей пчелиной семьи и направлена на удаление источника возбудителя (заболевших личинок) из пчелиной семьи.

Нами были выделены отличия в активности «гигиенического поведения» пчёл разных пород. В опытах использовали большие семьи с явными клиническими признаками микозов пчёл. Показатели гигиенической активности пчёл различных пород представлены в диаграмме 2.

### Показатели гигиенической активности пчёл различных пород



Как видно из диаграммы 2, в больных семьях с явными клиническими признаками микозов начало чистки ячеек было зарегистрировано через 3 часа у пчёл кавказской, через 4 часа – карпатской и через 6 часов – среднерусской пород. Полное удаление (100%) погибших личинок в пчелиных семьях кавказской породы отмечали через 20 часов, через 22 часа – карпатской и через 24 часа – среднерусской. Результаты исследований показали, что пчелы кавказской породы всегда значительно быстрее начинали на сотах очистку ячеек от погибших личинок.

Зависимость активности «гигиенического поведения» пчелиной семьи от её силы изучали в опытах с использованием стимулирующего препарата ковитсан.

Ковитсан содержит необходимый для пчёл кобальт и минерально-витаминный комплекс, стимулирует биологическую активность пчёл и репродуктивную способность пчелиных маток.

Изучение зависимости активности «гигиенического поведения» пчёл от силы пчелиных семей проводили в опытах по сравнению действия ковитсана и обычной белковой подкормки (пыльцы) на общее развитие пчелиной семьи весной (табл. 1).

Таблица 1.

Активность удаления погибших личинок в пчелиных семьях при использовании ковитсана ( $M \pm m$ ).

Показатели		Хозяйство		
		I	II	III
Ковитсан	Сила семьи, улочек	9,5±0,6	10,3±0,6	10,03±0,4
	Ячеек печатного расплода, шт.	6850±103	7180±256	6800±242
	Ячеек открытого расплода, шт.	3600±303	4050±373	3720±327
	Активность удаления погибших личинок (100%), час.	22,9±2,0	21,5±1,7	23,7±0,8
Цветочная пыльца (контроль)	Сила семьи, улочек	8,8±0,3	9,2±0,3	9,0±0,8
	Ячеек печатного расплода, шт.	6200±179	6650±197	6160±234
	Ячеек открытого расплода, шт.	2950±278	3550±150	3460±176
	Активность удаления погибших личинок (100%), час.	20,1±0,4	19,0±1,3	21,5±0,6

Примечания:

I – учебно-опытная пасека ВНИВСГО и пасеки Московской области (карпатская порода пчёл).

II – товарные пасеки Краснодарского края (кавказская порода пчёл).

III – товарные пасеки Тамбовской области (среднерусская порода пчёл).

Из таблицы 1 видно, что пчелиные семьи во всех группах, обработанных ковитсаном, имели большее количество улочек с пчёлами и большее количество разновозрастного расплода в сравнении с контролем, что естественно обеспечивало и большее количество молодых внутриульевых пчёл. В этих пчелиных семьях активность «гигиенического поведения» была более выражена. Семьи, обработанные ковитсаном, примерно на 2 часа быстрее очищали ячейки с погибшим расплодом. Таким образом, активность «гигиенического поведения» имаго пчёл как фактор при-

родной резистентности напрямую зависит от силы пчелиной семьи и существенно может влиять на интенсивность проявления эпизоотического процесса при аспергиллёзе пчёл.

### 2.2.3. Дифференциальная диагностика аспергиллёза пчёл

Для проведения противоаспергиллёзных мероприятий на пасеках, где были зарегистрированы смешанные формы упомянутых микозов, важным моментом является постановка точного диагноза. Выделяли главные отличительные особенности аспергиллёза от аскофероза пчёл. С этой целью при визуальном осмотре отобранных образцов патологического материала в первую очередь изучали состояние расплода.

Личинки, пораженные аскоферозом, в начале заболевания становились светло-жёлтыми, мягкими и тестообразными. Личинки теряли эластичность, превращались в известково-белые с сероватым оттенком твердые комочки. Они свободно лежали в открытых или распечатанных пчёлами ячейках. Крышечки на соте иногда были провалены. Мумифицированные личинки легко удалялись из ячеек. На дне улья и предлетковой площадке скапливалось большое количество выброшенных пчёлами трупов.

В расплоде, пораженном аспергиллёзом, как правило, погибали личинки последних стадий развития, предкуколки и куколки рабочих пчёл, трутней и маток. Крышечки над такими ячейками были вдавлены. Группы личинок морщинистые, меньшие по объёму, боковая поверхность высохшая. Расплод, в зависимости от вида аспергилля, иногда покрывался белым, серым, желтовато-зелёным или чёрным налётом прорастающего гриба. В печатных и частично скрытых ячейках сот находили твёрдые, мумифицированные личинки. Пчелы не всегда удаляли мумифицированных личинок, вместо этого они выгрызали стенки ячеек. В целом поверхность сот была с углублениями, края ячеек неровные, расплод пестрый. Запах отсутствовал. Особое внимание заслуживало поведение взрослых пчёл. При заболевании аспергиллёзом взрослые пчёлы беспокойно себя вели, покидали клуб, становились вялыми, кроме того, теряли способность к полету, брюшко больных насекомых было увеличено и плотное на ощупь.

При обнаружении в ячейках погибших мумифицированных личинок с клиническими признаками аспергиллёза или аскофероза с их поверхностей делали соскоб мицелия и готовили препараты для микроскопических исследований. Микроскопия позволяла по специфическим морфологическим признакам, присущим грибам родов *Aspergillus* и *Ascosphaera*, поставить предварительный диагноз и дифференцировать поражение личинок аспергиллёзом от аскоферозного поражения.

#### 2.2.4. Изучение морфологии возбудителей аспергиллёза и аскофероза пчёл

При проведении микологических исследований проводили первичное выделение возбудителя заболевания. С целью обнаружения характерных признаков грибов рода *Aspergillus* и *Ascosphaera* готовили микропрепараты и исследовали их под микроскопом. При этом в поле зрения микроскопа при аспергиллёзе среди мицелия наблюдали характерную форму и строение конидий аспергиллов, а при аскоферозе – споровые цисты, споровые шары и споры аскоферы.

Полученные данные о культуральных и морфологических признаках, а также морфометрических характеристиках дали основание отнести выделенные изоляты к определённым родам и видам возбудителей микозов. При этом *A. flavus* выявляли в 56% случаев, *A. niger* – в 32% и *A. fumigatus* – в 12%. В 60% случаев одновременно с аспергиллами обнаруживали возбудителя аскофероза – гриб *Ascosphaera apis*. В этом случае проводили наблюдение за совместным ростом грибов *Aspergillus* и *Ascosphaera*. Наблюдения показали, что грибы не являются антагонистами и не задерживают рост друг друга, что объясняет лёгкость и частоту совместного течения этих микозов.

#### 2.2.5. Изучение фунгицидной активности препарата апиаск-полоски в лабораторных условиях

Для выявления фунгицидов, эффективных в борьбе с аспергиллёзом пчёл, были проведены предварительные испытания 18 различных препаратов, имеющихся на вооружении современной ветеринарии. Поиск химических веществ, обладающих специфической активностью в отношении возбудителя аспергиллёза пчёл, привёл к

разработке рецептуры препарата апиаск-полоски, действующим веществом которого является клотримазол.

В результате проведенных испытаний было установлено, что 0,01–0,005% растворы клотримазола как в форме химической субстанции, так и в форме лекарственного препарата апиаск-полоски вызывали задержку зоны роста грибов. Задержка апиаск-полосками зоны роста грибов рода *Aspergillus* составляла от 55 до 85 мм, а гриба *Ascospaera apis* от 51 до 80 мм, что указывает на его хорошо выраженную высокую фунгистатическую активность.

#### 2.2.6. Изучение эффективности препарата апиаск-полоски при микозах пчёл в условиях пасеки

Изучение эффективности препарата апиаск-полоски при микозах пчёл в условиях пасеки проводили в течение 2004–2006 г.г. в периоды максимального развития грибковой инфекции в пчелиных семьях до наступления главного медосбора на неблагоприятных пасеках Тамбовской области.

Препарат применяли при появлении клинических признаков заболевания во время отсутствия товарного взятка. Во избежание воровства лечение проводили во второй половине дня после окончания основного лёта пчёл. Улей, который необходимо было обработать, отставляли назад, а на его место ставили чистый дезинфицированный. Перед началом лечения рамки с сильно поражённым расплодом из гнезда удаляли, семьи перегоняли в чистые продезинфицированные ульи. Перед использованием на одном из концов полоски пилом проделывали отверстие (1 см от края), через которое продевали металлическую шпильку и фиксировали полоску вертикально в центре межрамочного пространства улья. Полоску оставляли в семьях на срок от 6 до 7 суток или до их полного разрушения пчёлами. Препарат применяли из расчёта 2 полоски на 7–8 гнездовых рамок: одна полоска между 3 и 4, вторая – между 5 и 6 рамками. Лечебные обработки повторяли 3–4 раза с интервалом 6–7 дней.

Лечебная эффективность препарата апиаск-полоски при аспергиллёзе и аскоферозе составила соответственно 91 и 88%. В результате было установлено, что препарат обладает выраженным антифузальным эффектом против возбудителей

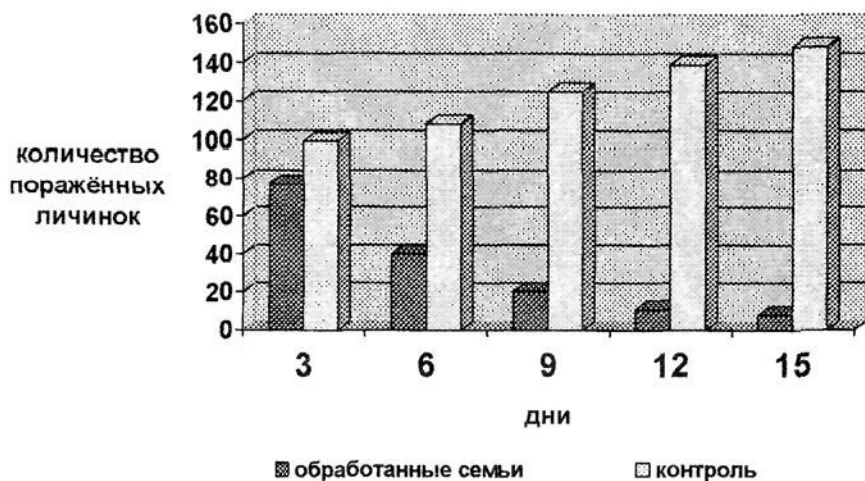


микозов пчёл. Оптимальной дозой препарата являлась одна полоска на 4–5 гнездовых рамок, плотно обсиженных пчёлами.

Данные по эффективности обработки препаратом апиаск-полоски больных аспергиллёзом семей пчёл представлены в диаграмме 3.

Диаграмма 3.

### Эффективность препарата апиаск-полоски при аспергиллёзе пчёл в ходе пасечных испытаний

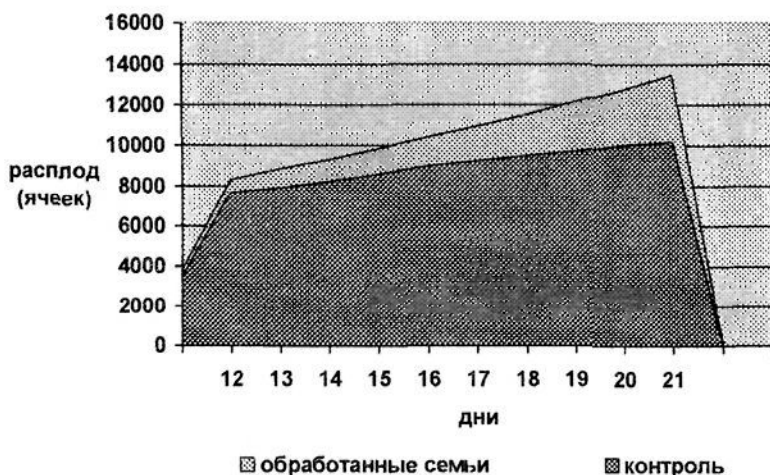


Как видно из диаграммы 3, в обработанных семьях происходило снижение количества поражённых аспергиллёзом личинок, в то время как в больных необработанных семьях болезнь прогрессировала. Полученные результаты позволяют считать, что препарат апиаск-полоски является эффективным и перспективным средством в борьбе с аспергиллёзом пчёл.

#### 2.2.7. Влияние препарата апиаск-полоски на репродуктивные способности пчелиных маток

После обработки пчёл препаратом апиаск-полоски вели также наблюдение за репродуктивной активностью пчелиных маток. При этом было установлено, что препарат увеличивал репродуктивную активность пчелиных маток в опытных семьях пчёл, что можно объяснить лечебным действием препарата (диаграмма 4).

### Влияние препарата апиаск-полоски на репродуктивную активность пчелиных маток



В диаграмме 4 четко прослеживается увеличение репродуктивной активности пчелиных маток в группе обработанных апиаск-полосками пчёл. Случаев гибели пчёл, пчелиных маток, личинок и куколок в опытных семьях выявлено не было.

#### 2.2.8. Токсичность препарата апиаск-полоски и его влияние на биохимические показатели пчёл

Изучение токсичности препарата апиаск-полоски для пчёл проводили методом скармливания и топикального нанесения.

Результаты опытов по изучению среднетоксических доз апиаск-полосок для пчёл учитывали в течение 24 часов. Согласно полученным данным при топикальном нанесении действующего вещества препарата и при скармливании с сахарным сиропом,  $LD_{50}$  составила свыше 100 мкг/пчелу, что позволяет отнести апиаск-полоски к малотоксичным для пчёл препаратам.

При изучении влияния препарата апиаск-полоски использованы следующие показатели: степень развития жирового тела, клеточный состав гемолимфы и её возрастной коэффициент (ВКГ), содержание в гемолимфе липидов и глюкозы. При

этом было установлено, что снижение степени поражения пчёл аспергиллёзом после их лечения препаратом апиаск-полоски повлекло за собой на протяжении опытного периода лишь незначительные изменения их гемоцитарных формул (ВКГ повысился на 0,01–0,03), приближая их к формулам, характеризующим гемолимфу здоровых контрольных пчёл. Величина жирового тела у контрольных больных аспергиллёзом пчёл колебалась от  $1,55 \pm 0,34$  до  $1,85 \pm 0,4$  баллов, в то время как у обработанных апиаск-полосками пчёл после выздоровления величина жирового тела увеличилась от  $1,55 \pm 0,2$  до  $3,2 \pm 0,2$  баллов. По данным Г.А. Акопяна (1978), это является физиологической нормой.

После лечения пчёл препаратом апиаск-полоски и снижения степени их поражения аспергиллёзом количество общих липидов в их гемолимфе возросло от  $600 \pm 16,8$  до  $880 \pm 14,9$  мг%, в то время как в гемолимфе контрольных больных пчёл этот показатель фактически не изменялся, составляя в среднем 580 мг%.

Обработка пчёл апиаск-полосками не снижала уровня содержания глюкозы в их гемолимфе. Напротив, после освобождения от инфекции уровень её повысился с 450,0 до 640,0 мг%, по сравнению с содержанием глюкозы в гемолимфе контрольных поражённых пчёл, который составлял  $400 \pm 22,4$  мг% к концу опыта.

#### 2.2.9. Содержание остаточных количеств клотримазола в мёде

Изучение вопроса содержания остаточных количеств клотримазола (действующего вещества препарата апиаск-полоски) в мёде обрабатываемых семей пчёл проводили в лаборатории ветеринарной санитарии в пчеловодстве, лаборатории токсикологии ВНИИВСГЭ и на пасеках Тамбовской области в весенне-осенний период 2005 года в ходе клинических исследований в условиях пасеки.

Первую группу семей пчёл, большую аспергиллёзом, обрабатывали препаратом апиаск-полоски из расчёта 1 полоска на 8 гнездовых рамок двукратно с интервалом 7 дней, вторую группу (контрольную) – не обрабатывали.

Через 1, 3, 5, 7 и 10 дней после проведённых обработок из пчелиных семей отбирали пробы сотового открытого и печатного мёда.

В образцах мёда, отобранного из опытных семей пчёл, содержание клотримазола постепенно снижалось (от 0,1 до 0,01 мг/кг), через 10 дней остатков клотримазола не было обнаружено.

## 2.2.10. Изыскание средств дезинфекции при аспергиллёзе пчёл

### 2.2.10.1. Исследование дезинфицирующих препаратов

Несмотря на наличие природного «гигиенического поведения» пчёл, направленного на очистку гнезда, в ульях происходит постепенное накопление возбудителей болезни, возрастает общая инфицированность внутренней среды обитания пчёл как восприимчивого объекта, что при наличии других элементов эпизоотической цепи может вызвать развитие заболевания.

Нахождение возбудителей болезни под защитой органической среды снижает эффективность дезинфекции, поэтому при испытании средств дезинфекции необходимо обращать внимание на то, чтобы они могли проникать через органические оболочки и обеззараживать патогенные грибы и их споры.

В связи с этим перед нами была поставлена задача – изучить средства для дезинфекции объектов пчеловодства при аспергиллёзе пчёл.

Для исследования фунгицидной активности были использованы 1–3% растворы глутарового альдегида. При этом установлено, что 2% раствор глутарового альдегида оказывал фунгицидное действие на возбудителей микозов при экспозиции 1,5 часа и расходе 1 л/м<sup>2</sup>. В более низких концентрациях фунгицидное действие при используемой экспозиции не достигалось.

Для снижения концентрации глутарового альдегида были испытаны 0,5–1,5% растворы глутарового альдегида с алкилдиметилбензиламмония хлоридом из расчёта 0,05–0,6%.

В экспериментах показано, что композиционный состав, содержащий 1% глутарового альдегида и 0,2% катамина АБ (алкилдиметилбензиламмония хлорида), был эффективен при экспозиции 1,5 часа и обработке из расчёта 500 мл/м<sup>2</sup>.

Фунгицидная активность апробированного композиционного состава обусловлена эффектом синергизма, в котором катионоактивные ЧАС разрушающе действуют на мембраны клетки гриба, а глутаровый альдегид воздействует на жизненно

важные органоиды клетки, обладает фиксирующим действием, ингибирует РНК и ДНК.

В различных концентрациях было испытано средство бромосепт-50, которое содержит в качестве действующих веществ 50% дилецилдиметиламмония бромида и 40% этанола. Обеззараживание тест-поверхностей средством бромосепт-50 достигалось при использовании 0,1% раствора средства, норма расхода раствора составляла 500 мл/м<sup>2</sup> поверхности при экспозиции 1,5 часа.

Параллельно было изучено действие озона совместно с водным раствором уксусной кислоты. В результате проведённых исследований было установлено, что эффективность данных средств при аспергиллёзе пчёл проявляется в режиме дезинфекции при концентрации 5 мг/л и 1% соответственно (расход 0,25 л/м<sup>2</sup>), при экспозиции не менее 90 минут.

Эффективность отработанных в лабораторных условиях режимов дезинфекции ульев и сотов указанными препаратами, а также их безвредность для пчёл была проверена в производственных условиях на пасеках Тамбовской области.

По результатам ежедневных наблюдений установлено, что пчёлы хорошо принимали продезинфицированные ульи и соты. В сотах отмечался засев ячеек маткой и развитие расплода; существенных расхождений при определении количества печатного расплода и запасов мёда в опытных семьях (29,9±0,16 тыс. ячеек и 9,85±0,03 кг мёда) по сравнению с контрольными (29,4±0,55 тыс. ячеек и 9,84±0,11 кг мёда) не наблюдалось; слётов пчелиных семей с продезинфицированных гнёзд, гибели взрослых пчёл и расплода, а также признаков отравления не было; поведение пчелиных семей было спокойное.

#### 2.2.10.2. Термическая обработка ульев

Из физических средств дезинфекции в пчеловодстве наибольшее значение имеет высокотемпературная обработка – прокаливание, когда деревянный и металлический инвентарь обжигают. Для термической обработки нами был предложен термофен. Использовали инструмент фирмы Bosch, модель PHG 600-2 SE. Прибор создаёт мощный поток горячего воздуха и работает от электросети. Мощность 930–2300 Вт, температура воздушного потока до 800°C, производительность от 200 до

650 л/мин. Регулировки прибора с учётом особенностей обрабатываемого материала позволяют достичь оптимальной и стабильной температуры воздушной струи в течение всей операции независимо от нагрузки.

Таблица 2.

Результаты опытов по термической обработке ульев при аспергиллёзе пчёл.

Вид обработки	Число ульев	Результаты опыта	
		обеззаражено ульев	% обеззараживания
Паяльная лампа	10	8	80
Термофен	10	10	100

На основании проведенных исследований (табл. 2) установлено, что 100% обеззараживание ульев и пчеловодного инвентаря, инфицированных спорами возбудителей аспергиллёза пчёл, достигается при предварительной механической очистке и последующей термической обработке термофеном. Обработку проводили при температуре 600°C, до равномерного побурения древесины.

Кроме удобства и экономичности, метод обработки термофеном экологически безопасен, прибор не оставляет посторонних запахов горючего, что благоприятно сказывается на приёме пчёлами обработанного инвентаря.

## ВЫВОДЫ

1. Анализ полученных результатов эпизоотологических обследований в Тамбовской, Московской областях и Краснодарском крае в 2004–2006 г.г. показал тенденцию к увеличению числа случаев проявления микозов пчёл в смешанном виде. Проявление чистого аспергиллёза за исследуемый период уменьшилось с 42% до 21%, а его проявление в виде смешанной инфекции с аскоферозом увеличилось с 58% до 79%.
2. Активность «гигиенического поведения» пчёл при аспергиллёзе зависит от общей силы пчелиной семьи и может быть стимулирована применением препаратов, таких как ковитсан. Пчёлы кавказской породы имели более активное

«гигиеническое поведение» в сравнении с пчёлами карпатской и среднерусской породы, что проявлялось в более быстром удалении больных и погибших личинок из гнезда, на 2 и 2,5–3 часа соответственно.

3. Для лечения микозов пчёл разработан препарат апиаск-полоски на основе клотримазола. Препарат апиаск-полоски обладает выраженным фунгистатическим и фунгицидным действием в отношении возбудителей аспергиллёза и аскофероза пчёл (*Aspergillus flavus*, *A. Niger*, *A. fumigatus* и *Ascosphaera apis*). Средний показатель лечебной эффективности апиаск-полосок составляет соответственно 91 и 88%.
4. Анализ гемоцитарной формулы пчёл после лечения пчелосемей препаратом апиаск-полоски показал её приближение к формуле, характеризующей гемолимфу здоровых пчёл. При этом количество общих липидов в гемолимфе возрастает и увеличивается величина жирового тела. Отрицательных последствий обработок данным препаратом на пчёл и пчелиных маток не отмечено.
5. Установлено, что остаточные количества клотримазола в мёде после применения препарата апиаск-полоски на 10 день не обнаруживаются. Вероятность попадания остаточных количеств клотримазола в товарный мёд исключена при соблюдении установленного регламента применения.
6. Фунгицидная активность смеси 1% глутарового альдегида и 0,2% алкилдиметилбензиламмония хлорида при экспозиции 1,5 часа и обработке из расчёта 500 мл/м<sup>2</sup> обусловлена эффектом синергизма, в котором катионоактивные ЧАС разрушающе действуют на мембраны клетки гриба, а глутаровый альдегид воздействует на жизненно важные органоиды клетки.
7. Для дезинфекции ульев и пчеловодного инвентаря при аспергиллёзе пчёл в производственных условиях предложены 0,1% раствор бромосепта-50 при норме расхода раствора 500 мл/м<sup>2</sup> и экспозиции 1,5 часа, а также водная смесь озона с уксусной кислотой (5 мг/л и 1%) при расходе 0,25 л/м<sup>2</sup> и экспозиции 1 час.

8. Установлено, что термическая обработка ульев и пчеловодного инвентаря термифеном при температуре 600°C обеспечивает полное обеззараживание ульев и пчеловодческого инвентаря.

### **ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИКИ**

Результаты проведённых исследований были использованы при подготовке следующих НТД:

1) Инструкция по применению препарата апиаск-полоски для борьбы с аспергиллёзом и аскоферозом пчёл (в соавторстве), утверждена Россельхознадзором 14.11.2006 г.

2) Технические условия на препарат апиаск-полоски СТО 45027172-0017-2006 от 14.11.2006 г.

### **СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ**

1. Дубникова А.А. Эффективность разных способов подсадки маток. // Пчеловодство. 2003, №7 – с.17.

2. Луганский С.Н., Ключко Р.Т., Дубникова А.А. Рекомендуем ковитсан. // Пчеловодство. 2004. – № 2. – с. 39.

3. Ключко Р.Т., Луганский С.Н., Игнатъева Г.И., Дубникова А.А. Аспергиллёз пчёл. // Пчеловодство.– 2004. – № 5. – с. 46–47.

4. Дубникова А.А. Ветеринарно-санитарные мероприятия при аспергиллёзе пчёл. // Пчеловодство. – 2007 - №2 – с. 22-27.



ВНИИВСГЭ

123022 г. Москва, Звенигородское ш., д. 5,

заказ 224/1, тираж 80 экз.