



ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «АПИВРАЧ» НА ПОКАЗАТЕЛИ РОСТА *ASCOSPHERA APIS* И ДРУГИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

¹Дряхлова Д.О., ¹Мушталёва Е.Д., ¹Михеева Е.А., ²Колбина Л.М., ¹Воробьева С.Л.

¹ФГБОУ ВО Ижевская государственная сельскохозяйственная академия
426069, Удмуртская Республика, г. Ижевск, ул. Студенческая, д. 11, e-mail: Mikhkatia@yandex.ru

²Удмуртский НИИСХ – структурное подразделение ФГБУН Удмуртского федерального
исследовательского центра Уральского отделения РАН,

426008, Удмуртская Республика, Завьяловский район, с. Первомайский, ул. Ленина, д. 1, e-mail: lidakolbina@yandex.ru

Резюме

Комплекс пробиотических бактерий *Bacillus subtilis*, содержащийся в препарате «Апиврач», проявляет антагонистическую активность в отношении гриба *Ascospheera apis*, подавляя его рост на 50% при дозе препарата 15 мкл. Препарат обладает выраженной конкуренцией *B.subtilis* с патогенной кишечной палочкой и менее выраженной – с патогенным стафилококком. При обработке поверхности улья при экспозиции 2 ч препарат не оказывает значительного влияния на не патогенные бациллы, присутствующие на внутренней поверхности улья.

Ключевые слова: «Апиврач», *Ascospheera apis*, *Bacillus subtilis*, патогенные микроорганизмы

Цитирование: Дряхлова Д.О., Мушталёва Е.Д., Михеева Е.А., Колбина Л.М., Воробьева С.Л. Влияние препарата «Апиврач» на показатели роста *Ascospheera apis* и других микроорганизмов // Биомика. 2019. Т.11(2). С. 202 – 205. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-19

THE INFLUENCE OF «APIVRACH» ON THE GROWTH OF *ASCOSPHERA APIS* AND OTHER MICROORGANISMS

¹Drjahlova D.O., ¹Mushtaleva E.D., ¹Mikheeva E.A., ²Kolbina, L.M., ¹Vorobyeva S.L.

¹Izhevsk State Agricultural Academy, 11 Studencheskaya str. Izhevsk,
Udmurt Republic, 426069, Russia, e-mail: Mikhkatia@yandex.ru

²Udmurt Research Institute of Agricultural Federal - Branch of the Federal State Budgetary Institution of Science
Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, st., 1, Lenina, 4260081,
Pervomayskii s., Zavalovskii district, Udmurt Republic, Russia, e-mail: lidakolbina@yandex.ru

Resume

The complex of probiotic bacteria *Bacillus subtilis* contained in the preparation "Apivrach" shows antagonistic activity against the fungus *Ascospheera apis*, suppressing its growth by 50 % at a concentration of 15 µl. The drug has a strong competition *Bacillus subtilis* with pathogenic *E. coli* and less pronounced – with pathogenic *Staphylococcus*. When processing the surface of the hive at an exposure of 2 h, the drug does not have a significant effect on non-pathogenic bacilli present on the inner surface of the hive.

Keywords: «Apivrach», *Ascospheera apis*, *Bacillus subtilis*, pathogens

Citation: Drjahlova D.O., Mushtaleva E.D., Mikheeva E.A., Kolbina, L.M., Vorobyeva S.L. The influence of «Apivrach» on the growth of *Ascospheera apis* and other microorganisms. *Biomics*. 2019. V.11(2). P. 202 – 205. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-19 (In Russian)

Введение

В последние годы в пчеловодстве используют пробиотические микроорганизмы или отдельные группы микроорганизмов, способных оказывать благотворное влияние на повышение устойчивости пчел к различным патогенам, стимулировать активизацию их иммунологической защиты [Бармина (Barmina), 2011]. Пробиотические препараты в пчеловодстве применяются как для комплексного воздействия на организм пчелы и профилактики инфекционных и инвазионных болезней, так и с целью борьбы с конкретными заболеваниями [Чаусова и др. (Chausova et al.), 1991; Ляпунов (Lyapunov), 2008; Ноздрин и др. (Nozdrin et al.), 2010].

Использование пробиотиков в пчеловодстве заслуживает особого внимания. На сегодняшний день к препаратам нового поколения относятся созданные сотрудниками Института экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского (Республика Беларусь) на основе живых бактерий рода *Bacillus* пробиотики «апибакт» и «бактовет». Антибактериальные и антифунгальные свойства препаратов обусловлены способностью входящих в их состав бактерий, подавлять рост и размножение микроорганизмов, вызывающих инфекционные болезни у медоносных пчел [Полторжицкая Р.С. и др. (Poltorzhitskaia R.S. et al.), 2009; 2010].

Пробиотик на основе *B.subtilis* 11 В ВКМ-2218Д при скармливании с сахарным сиропом стимулирует физиологическую активность и жизнедеятельность семей пчел. Исследуемый штамм обладает антагонистической активностью против патогенных для медоносных пчел видов бактерий и грибов, в частности *Paenibacillus larvae* и *Aspergillus niger*, и может использоваться в качестве лечебно-профилактического средства [Туктаров (Tuktarov), 2010].

Новая разработка НВП «БашИнком» препарат «АпиВрач» используется для биологической защиты пчел от заболеваний вирусной, бактериальной, грибковой этиологии (аскосфероз, нозематоз, гнильцы). Служит для повышения иммунитета, ускорения роста и продуктивности пчелиных семей. В связи с этим, целью наших исследований явилось изучение влияния препарата «Апиврач» на показатели роста возбудителя аскофероза пчел и других патогенных микроорганизмов.

Материалы и методы

Исследования проводили на кафедре инфекционных болезней и патанатомии ФГБОУ ВО Ижевская ГСХА. Эффективность влияния препарата на возбудителя аскофероза пчел проводили с использованием лабораторной культуры гриба *A.apis*. Влияние на патогенные штаммы микроорганизмов изучали с использованием патогенных штаммов *E.coli* и *Staphylococcus aureus* (не чувствительного к флорфениколу, энрофлоксацину, амоксициллину, доксициклину), выделенных от белых лабораторных мышей.

Для выращивания колоний грибов использовали среду Чапека (среда для микроорганизмов грибковой природы); для выращивания колоний бактерий – мясо-пептонный агар.

Препарат «АпиВрач» комплекс пробиотических бактерий *B.subtilis* 11 В, 12В, 1К, 3К, 3Н – титр не менее $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл вносили в чашки Петри в количестве 5, 10 и 15 мкл на чашку, засеивали суспензией в количестве 0,5 мл на чашку, содержащей споры гриба в количестве $1 \cdot 10^5$ / 1 мл. Результат оценивали при визуальной оценке роста гриба на агаре Чапека.

Для определения антагонистических отношений с бактериями препарат наносили на стандартные диски с последующим помещением на поверхность агара, на которых предварительно сеяли методом газона исследуемые образцы микроорганизмов.

Для оценки сохранности и эффекта обработки поверхности улья использовали 10 мл препарата «АпиВрач» разведенного в 10 л воды. В контрольной группе обработку проводили с использованием теплой воды из скважины. После экспозиции 2 ч производили смыв с площади 10 см^2 с использованием транспортной среды Эймса. Осуществляли посев на МПА, среду для выделения бифидобактерий (бифидум-среда), элективный солевой агар для выделения стафилококков, агар для выделения клостридий – сульфитный агар (модификация 2). Оценивали характер роста на данных средах.

Результаты и обсуждения

При оценке влияния препарата «АпиВрач» идентифицировали, что разновидности *Bacillus subtilis* в комплексе подавляют рост гриба в дозах препарата на чашку Петри 5 и 10 мкл на 20%, в дозе 15 мкл – на 50% (рис. 1). Тем самым штаммы проявляли высокую антагонистическую активность в отношении тестируемого гриба *A.apis*.



Рис. 1 Влияние препарата «Апиврач» на рост *A. apis* (А – доза 5 мкл, В – 10 мкл, С – 15 мкл на чашку Петри)

Fig. 1. The influence of «Apirvach» on the growth of *A.apis* (A - dose of 5 µl, B – 10 µl, C - 15 µl per Petri dish)

Оценивая способность конкурентного роста *B.subtilis* с патогенными штаммами *E.coli* и *S.aureus*, определили средний диаметр зоны роста бацилл в чашке с *E.Coli* sp., он составил 2,8 см (рис. 2А). В

чашке с *S.aureus*. Зона роста составила 1,9 см (рис. 2В). Это свидетельствует в выраженной конкуренции *B.subtilis* с кишечной палочкой и менее выраженной – со стафилококком.

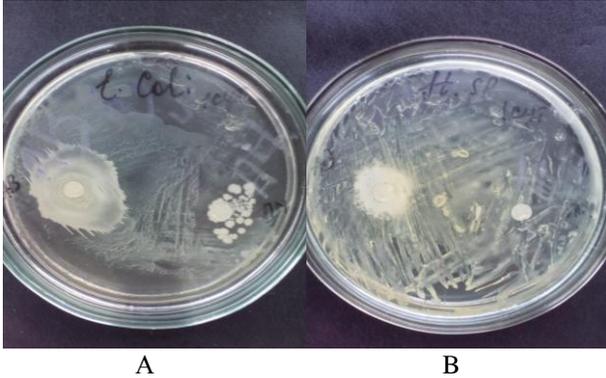


Рис. 2. А - Влияние препарата «Апирач» на рост *E.coli*. 1 сутки. В - Влияние препарата «Апиврач» на рост *S.aureus*. 1 сутки
Fig. 2. А - The influence of «Apivrach» on the growth of *E.coli*. 1 day. В - The influence of «Apivrach» on the growth of *S.aureus*. 1 day

После обработки ульев препаратом «АпиВрач» на сульфитном агаре определяли как поверхностный сплошной рост, так и рост по уколу с формированием характерных карманов. В контроле рост по уколу отсутствовал, определялся сплошной рост на поверхности среды (рис. 3А). При микроскопии в опытной пробирке визуализировали *B.subtilis* и мелкие споровые бациллы. В контрольной пробирке разнообразие форм было более выражено.

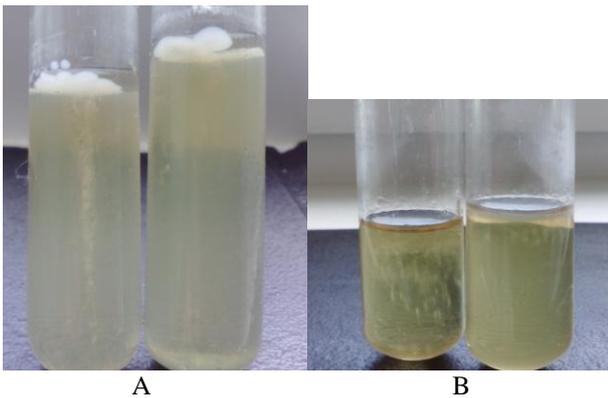


Рис. 3. А - Рост на сульфитном агаре (слева – опыт, справа – контроль). В – Рост на бифидум-среде. (слева – опыт, справа – контроль)
Fig. 3. А - Growth on sulfite agar (left – experience, right – control). В - Growth on bifidum-medium (left – experience, right – control)

Рост на бифидум среде показал в опыте также наличие сенной палочки и мелкие споровые бациллы. Зона роста характеризовалась диффузным помутнением сверху среды и в глубине среды – в виде «комет». Поскольку бифидум среда не является селективной, то в контрольной пробирке выделили микробное многообразие, в частности энтерококки, споровые бациллы, псевдомонады, лактобактерии и

др., то рост на ней характеризовался диффузным помутнением среды, ростом в виде «комет» и поверхностным сплошным ростом в виде узкой полосы (рис. 3В).

На плотных средах (МПА и солевом агаре) в опытном поле определяли рост *B.subtilis*, в зоне контроля – мелкие споровые бациллы.

Заключение

Таким образом, на основании исследований можно заключить, что комплекс пробиотических бактерий *B.subtilis*, содержащийся в препарате «АпиВрач», проявлял высокую антагонистическую активность в отношении тестируемого гриба *A.apis*, тем самым подавляя его рост на 50% при дозе препарата 15 мкл на чашку Петри. Препарат обладал выраженной конкуренцией бацилл с кишечной палочкой и менее выраженной со стафилококком, нечувствительным к флорфениколу, энрофлоксацину, амоксициллину, доксициклину.

При обработке поверхности улья при экспозиции 2 ч препарат не оказывает значительного влияния на непатогенные бациллы, присутствующие на внутренней поверхности улья.

Литература

1. Бармина И.Э., Маннапов А.Г., Карпова Г.В. Стимулирующие подкормки для пчелиных семей с добавлением комплексных аминокислотных и пробиотических препаратов. *Вестник ОГУ. Оренбург*. 2011. №12(131).
2. Ляпунов Я.Э., Кузьев Р.З., Хисматуллин Р.Г., Безгодова О.А. Энтеробактерии кишечника зимующих пчел *Apis mellifera*. *Микробиология*. 2008. Т 77. № 3. С. 421–427.
3. Чаусова Э.В., Холодная Л.С., Левченко И.А. Подкормка для пчел: пат. RU 1822689 С, А01К53/00/ заявитель Киевский государственный университет им Т.Г. Шевченко (SU), Украинский Научно-Исследовательский Технологический Институт Пчеловодства (SU), SU 19914928524. № 4928524/15; заявл. 18.10.1991; опубл. 23.06.1993.
4. Ноздрин Г.А., Плахова А.А., Кашковский В.Г. Способ профилактики вирусных заболеваний пчел и повышения их продуктивности: пат. № 2388219 Рос. Федерация: А01К47/00 /; заявитель и патентообладатель Новособирский государственный аграрный университет. – заявл. 6.05.2008; опубл. 10.05.2010.
5. Полторжицкая Р.С. Оценка эффективности использования живых пробиотических препаратов при моно- и ассоциированной гнильцово-микозной патологии пчел. *Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария: Международный научно-практический журнал*. 2009. №4.
6. Полторжицкая Р.С., Черник М.И., Безнос Т.В., Лемиш Н.А., Якубовский С.М. Пробиотический потенциал бактерий рода *Bacillus* для защиты пчелиного гнезда от патогенов. *Эпизоотология,*

иммунология, фармакология и санитария: *Международный научно-практический журнал*. 2010. №6.

7. Туктаров В.Р., Кузнецова Т.Н., Мишуковская Г.С. и др. Средство для стимуляции физиологических функций у пчел и защиты их от инфекционных заболеваний. *Патент на изобретение 2380406*. – 27.01.2010.

References

1. Barmina I.E., Mannarov A.G., Karpova G.V. Stimuliruyushchie podkormki dlya pchelinyh semej s dobavleniem kompleksnyh aminokislotnyh i probioticheskikh preparatov. *Bulletin of OSU. Orenburg*. 2011. №12(131). (For stimulating feeding of bee colonies with the addition of a complex amino acid and probiotic preparations) [In Russian].
2. Chausova E.V., Holodnaya L.S., Levchenko I.A. Podkormka dlya pchel: *pat. EN 1822689 WITH A01K53/00/ applicant Kiev state University by T. G. Shevchenko (SU), Ukrainian Scientific-Research Technological Institute of Beekeeping (SU), SU 19914928524. No. 4928524/15; application. 18.10.1991; publ. 23.06.1993*. (Feeding for bees) [In Russian].
3. Lyapunov YA.E., Kuzyaev R.Z., Hismatullin R.G., Bezgodova O.A. Enterobakterii kishechnika zimuyushchih pchel Apis Mellifera. *Microbiology*. 2008. V 77. № 3. P. 421–427. (Intestinal enterobacteria of the hibernating Apis Mellifera bees) [In Russian]
4. Nozdrin G.A., Plahova A.A., Kashkovskij V.G. Sposob profilaktiki virusnyh zabolevanij pchel i povysheniya ih produktivnosti: *pat. № 2388219 Grew. Federation: A01K47/00 /; applicant and patent holder Novosibirsk state agrarian University. – declared.6.05.2008; publ.10.05.2010*. (Method of prevention of viral diseases of bees and increase their productivity) [In Russian].
5. Poltorzhickaya R.S. Ocenka effektivnosti ispol'zovaniya zhivyh probioticheskikh preparatov pri mono- i associirovannoj gnil'covo-mikoznoj patologii pchel. *Epizootology, Immunobiology, pharmacology and sanitation: international scientific and practical journal*. 2009. No. 4. (Evaluation of the effectiveness of the use of live probiotic drugs in mono- and associated rot-mycotic pathology of bees) [In Russian].
6. Poltorzhickaya R.S., Chernik M.I., Beznos T.V., Lemish N.A., Yakubovskij S.M. Probioticheskij potencial bakterij roda Bacillus dlya zashchity pchelinoogo gnezda ot patogenov. *Epizootology, Immunobiology, pharmacology and sanitation: international scientific and practical journal*. 2010. No. 6. (Probiotic potential of bacteria of the genus Bacillus to protect the bee nest from pathogens) [In Russian].
7. Tuktarov V.R., Kuznecova T.N., Mishukovskaya G.S. i dr. Sredstvo dlya stimulyacii fiziologicheskikh funkcij u pchel i zashchity ih ot infekcionnyh zabolevanij. *The patent for the invention 2380406*. – 27.01.2010. (Means for stimulation of physiological functions in bees and their protection from infectious diseases) [In Russian].