

УДК 591.044:615.37:[638.158.2+638.124.2]

© 2002 г. С. Н. НЕМКОВА

ИЗМЕНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕМОЛИМФЫ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ *APIS MELLIFERA* L. (HYMENOPTERA: APIDAE), ВЫЗВАННЫЕ ПРИМЕНЕНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА «АПИТОНУС» ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПЧЁЛ, ОСЛАБЛЕННЫХ ПАРАЗИТИРОВАНИЕМ КЛЕЩЕЙ РОДА *VARROA OUDEMANS*, 1904

Варрооз, несмотря на существующие современные методы борьбы, относится к опасным заболеваниям вследствие его высокой скорости развития и распространения, а также степени наносимого вреда организму отдельных пчёл и пчелиным семьям в целом.

Клещи для питания гемолимфой предпочитают пчёл определённого возраста. Интенсивность заражения пчёл-кормилиц 14-суточного возраста в 2–3 раза выше по сравнению с заражением старых ульевых особей и возрастает в августе независимо от общего уровня инвазии пчелиных семей в целом (Schneider, 1985). Патогенное влияние клещей проявляется в нарушении клеточного состава гемолимфы, белкового и углеводного обменов взрослых пчёл, а также в снижении активности лизоцима, как основного фактора неспецифической резистентности насекомых (Домацкая, Гробов 1980; Глински, Ярош, 1988; Немкова, Кобзарь, Руденко, 2000). Пчёл-кормилицы, ослабленные паразитированием клещей, испытывают дефицит белковых веществ в организме и не могут выкормить полноценный расплод, поэтому осенью в гнёздах пчёл появляется значительное количество молодых нежизнеспособных особей.

Нарушения физиологического состояния пчёл зимней генерации не могут быть восстановлены только за счёт естественных присутствующих в гнезде кормов. В этот период целесообразно применение искусственных белковых препаратов, которые могут быстро усваиваться в организме пчёл и тем самым повышать их жизнеспособность (Маурицио, 1958).

Поскольку накопление питательных веществ в организме пчёл полностью зависит от уровня белкового питания, нами был изучен состав препарата «Апитонус», полученного путём ферментативного гидролиза сгустков крови крупного рогатого скота и его влияние на биохимические показатели гемолимфы пчёл-кормилиц в осенний период развития семей пчёл.

Материалы и методы. Исследования проводили на изолированной пасеке Института экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН (ИЭКВМ УААН) в августе–сентябре 1999 г. Исследуемым материалом служила гемолимфа пчёл-кормилиц, взятых из пчелиных гнёзд с разным типом подкормки в сентябре. Экстенсивность инвазии в августе составляла в среднем $8,5 \pm 1,0\%$. После проведения летних акарицидных обработок (5–15 августа) численность популяции клещей в семьях пчёл снизилась в среднем до $1,4 \pm 0,5\%$.

Три семьи пчёл получали в качестве подкормки 60 %-ный сахарный сироп, содержащий биологический препарат «Апитонус» (525 мг препарата на 5 дм³ сахарного сиропа), из расчёта 100–150 см³ на «улочку» (в среднем 2000 взрослых особей) с пчёлами 4 раза с интервалом 5–6 суток. Три другие семьи пчёл подкармливали только 60 %-ным сахарным сиропом. Естественное поступление цветочной пыльцы в гнёзда пчёл не ограничивали, все семьи имели достаточные запасы перги.

От каждой группы семей отбирали в садки по 100–150 особей с рамок с открытым расплодом, где находилось наибольшее количество пчёл-кормилиц 5–10-суточного возраста. Отбор и исследование сборных проб гемолимфы пчёл от каждой группы проводили в 6 повторностях через 7, 14 и 21 сутки после курса подкормки.

Содержание общего белка в гемолимфе определяли по методу Лоури, (Биохимические методы исследования ..., 1969). Количество остаточного азота – калориметрическим методом в модификации Н. М. Климова и А. Г. Малахова (Васильева, 1974).

Определение активности лизоцима проводили турбидиметрическим методом совместно с лабораторией биохимии ИЭКВМ УААН, для чего использовали стандартный порошок лиофилизированной культуры *Micrococcus lysodeikticus* (Лабинская, 1978).

Для изучения титров неспецифических агглютининов готовили 1 %-ную суспензию эритроцитов крови белых крыс. Эритроциты крови трижды отмывали физиологическим раствором, центрифугируя при 1500 об./мин в течение 10 мин, затем суспензировали в физиологическом растворе. Постановку

реакции агглютинации проводили по общепринятой методике, в объёме компонентов реакции – 0,1 см³ (Jurenka, Manfredi, Napner, 1982).

Количественное содержание свободных аминокислот в препарате «Апитонус», цветочной пыльце и в гемолимфе пчёл определяли в лаборатории биохимии Института терапии АМН Украины на аналитическом аминокислотном анализаторе Т 339 А, совместно с кандидатом биологических наук А. И. Кобзарём по методике, описанной в работе С. Н. Немковой с соавт. (2000).

Уровень глюкозы в гемолимфе определяли по методу Гультмана с ортотолуидиновым реактивом, а фруктозы – методом Роя (Биохимические методы контроля..., 1990) в модификации лаборатории токсикологии ИЭКВМ УААН.

Результаты и обсуждение. Сравнительный анализ состава «Апитонуса» и цветочной пыльцы показал, что предложенный препарат по качественному составу аминокислот соответствует естественному источнику белкового корма для пчёл. Большинство незаменимых аминокислот для насекомых в препарате находятся в свободном состоянии, тогда как в цветочной пыльце – преимущественно в связанном в белковые молекулы (рис.). В связи с этими отличиями питательная ценность «Апитонуса» состоит в том, что его компоненты не требуют дополнительных затрат энергии пчёл на переработку и легко усваиваются.

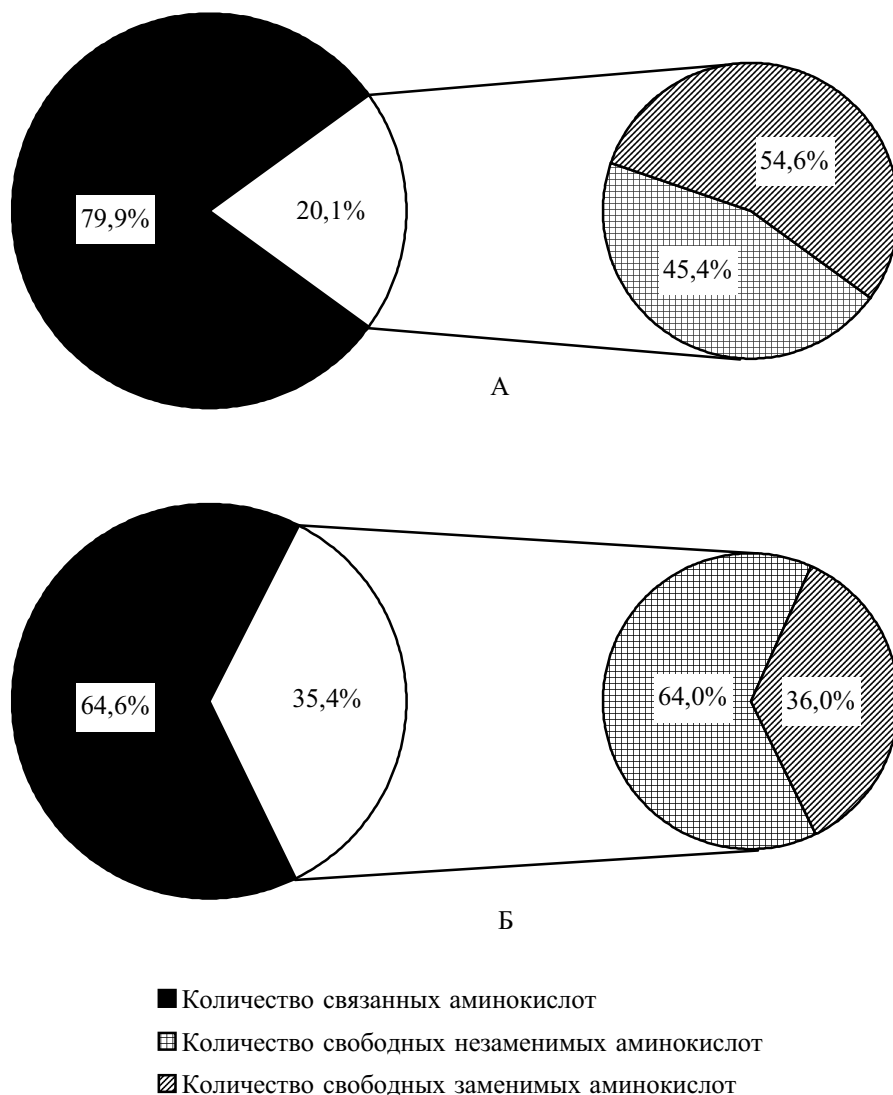


Рис. Соотношение количества свободных и связанных аминокислот:
 А – в цветочной пыльце, Б – в препарате «Апитонус».

Установлено достоверное повышение содержания общего белка в гемолимфе пчёл-кормилиц через 7 суток после курса подкормки «Апитонусом» в 1,2 раза ($p < 0,025$), через 14 и 21 сутки – соответственно в 1,5 и 1,9 раза ($p < 0,001$) (табл. 1), на фоне снижения количества остаточного азота ($p < 0,001$) в течение всего периода исследования по сравнению с этими показателями в гемолимфе пчёл с подкормкой

сахарным сиропом. Повышение содержания общего белка в гемолимфе пчёл, которым скармливали «Апитонус», сопровождалось достоверным увеличением активности антибактериальных белков (лизоцима и агглютининов), выполняющих защитные функции в организме. Так, активность лизоцима в гемолимфе пчёл находилась на высоком уровне в течение двух недель ($p < 0,05$) после скармливания биопрепарата, через 21 сутки – снизилась и соответствовала его активности в гемолимфе пчёл с углеводной подкормкой (табл. 1). Гемолимфа пчёл из группы с подкормкой биопрепаратом, агглютинировала эритроциты крови белых крыс в титрах 1:8 и 1:16, а подкармливаемых сахарным сиропом – 1:4 (табл. 1).

Таблица 1. Биохимические показатели гемолимфы пчёл-кормилиц при различных типах подкормки

Показатели гемолимфы пчёл	Группы семей пчёл			
	после подкормки сахарным сиропом	после подкормки «Апитонусом», суток		
		7	14	21
Общий белок, г/дм ³	33,20±2,1	39,74±1,29, $p < 0,025$	49,52±3,35, $p < 0,005$	62,87±5,62, $p < 0,001$
Остаточный азот, мг/см ³	617,83±20,64	321,5±25,33, $p < 0,001$	307,89±31,18, $p < 0,001$	254,22±15,11, $p < 0,001$
Лизоцим, мкг/см ³	50,3±2,16	72,7±4,11, $p < 0,01$	64,0±4,08, $p < 0,05$	51,85±3,79, $p < 0,05$
Титры агглютининов	1:2–1:4	1:8–1:16	1:8–1:16	1:8–1:16
Свободные аминокислоты, ммоль/см ³	79,06±12,68	60,82±9,51, $p > 0,05$	52,18±8,86, $p > 0,05$	58,34±7,94, $p > 0,05$
Глюкоза, ммоль/дм ³	139,15±9,03	152,32±3,74, $p < 0,05$	165,72±5,98, $p < 0,01$	141,17±4,77, $p < 0,05$
Фруктоза, ммоль/дм ³	14,12±1,85	35,08±2,30, $p < 0,001$	31,70±4,60, $p < 0,005$	24,04±2,81, $p < 0,001$

При исследовании гемолимфы пчёл-кормилиц нами была отмечена тенденция к снижению общего количества свободных аминокислот, а также достоверное снижение концентрации некоторых незаменимых аминокислот (агринина – в 1,9 раза, гистидина – 3,3 раза, лизина – 3,5 раза, фенилаланина – 4,0 раза, а также треонина и валина – 1,5 раза) у особей после подкормки «Апитонусом» по сравнению с их содержанием в гемолимфе пчёл с углеводной подкормкой (табл. 1, 2).

Таблица 2. Состав и количество свободных аминокислот (ммоль/см³) в гемолимфе пчёл-кормилиц при различном типе подкормки

Названия аминокислот	Группы семей пчёл	
	с подкормкой сахарным сиропом	с подкормкой «Апитонусом»
Таурин	2,59±0,18	2,32±0,77
Треонин*	2,67±0,34	1,78±0,37
Серин	5,71±0,49	1,88±0,40**
Аспарагин	0,64±0,15	0,56±0,26
Глютаминовая кислота	3,02±0,75	2,50±0,36
Глютамин	следовые количества	следовые количества
Пролин	32,00±4,05	24,60±3,84
Глицин	2,18±0,50	1,44±0,26
Валин*	1,78±0,67	1,20±0,28
Метионин*	следовые количества	следовые количества
Изолейцин*	0,40±0,09	0,48±0,10
Лейцин*	1,63±0,48	1,40±0,16
Лизин*	7,53±1,03	2,13±0,13**
Гидроксипролин	6,39±1,33	6,00±1,13
Фенилаланин*	1,58±0,35	0,40±0,08**
Гистидин*	3,85±0,73	1,15±0,23**
Аргинин*	5,28±1,06	2,74±0,17**
Аланин	1,81±0,48	1,60±0,32

Примечание. * – незаменимые аминокислоты, ** – $p < 0,05$.

Уменьшение содержания свободных аминокислот, в том числе незаменимых, связано с их включением в синтез новых белковых молекул, о чём свидетельствует высокое содержание общего белка в гемолимфе пчёл.

Наряду с нормализацией белкового синтеза, в гемолимфе пчёл с подкормкой биопрепаратом наблюдалось увеличение показателей углеводного обмена. Содержание глюкозы в гемолимфе пчёл было наибольшим через 14 суток после скармливания «Апитонуса» (165,72±5,98 ммоль/дм³), фруктозы – через 7 суток (35,08±2,30 ммоль/дм³), а в гемолимфе пчёл с подкормкой сахарным сиропом соответственно 139,15±6,03 ммоль/дм³ и 14,12±1,85 ммоль/дм³.

Выводы. 1. Достоверное увеличение активности лизоцима и титров агглютининов в гемолимфе пчёл-кормилиц свидетельствует о том, что скармливание пчелиным семьям биологического препарата животного происхождения («Апитонус») способствует повышению иммунного статуса организма пчелы.

2. Повышение содержания общего белка и углеводов на фоне снижения количества остаточного азота и свободных аминокислот в гемолимфе пчёл-кормилиц указывает на то, что применение «Апитонуса» в осенний период приводит к нормализации метаболизма пчёл, ослабленных варроозом, и накоплению в их организме питательных резервных веществ необходимых для благоприятного течения зимовки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Биохимические методы исследования в клинике: Справочник** / Под ред. А. А. Покровского. – М.: Медицина, 1969. – С. 62–63.
Васильева Е. В. Определение остаточного азота по методу Климова Н. М. и Малахова А. Г. // Клиническая биохимия сельскохозяйственных животных. – М.: Россельхозиздат, 1974. – С. 146–148.
Глински З., Ярош Е. Вредное воздействие клеща *Varroa jacobsoni* на медоносную пчелу // Апиакта. – 1988. – Т. 23, № 2. – С. 41–51.
Домацкая Т. Ф., Гробов О. Ф. Гемолимфа пчёл при варроатозе // Пчеловодство. – 1980. – № 7. – С. 18–19.
Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1978. – С. 155–156.
Маурицио А. Кормление пыльцой и жизненные процессы у медоносной пчелы // Новое в пчеловодстве. – М.: Сельхозиздат, 1958. – С. 372–445.
Немкова С. Н., Кобзарь А. И., Руденко Е. П. Влияние варроатозной инвазии на биохимические показатели организма медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) // Изв. Харьков. энтомол. о-ва. – 2000. – Т. VIII, вып. 1. – С. 153–156.
Сурай П. Ф., Ионов И. А. Биохимические методы контроля метаболизма и их витаминной обеспеченности: Методические рекомендации. – Х.: Укр. НИИ птицеводства, 1990. – С. 85–86.
Jurenka K., Manfredi K., Napner K. D. Haemagglutinin activity in Acrididae (grasshopper) haemolymph // J. Insect. Physiol. – 1982. – Vol. 28, № 2. – P. 177–182.
Schneider P. Befall von Sammlerinnen, Stockbienen, Flugdrohnen und Stockdrohnen mit *Varroa jacobsoni* // Apidologie. – 1985. – Vol. 16, № 3. – P. 209–211.

Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН

Поступила 15.09.2001

UDC 591.044:615.37:[638.158.2+638.124.2]

S. N. NEMKOVA

CHANGES OF BIOCHEMICAL PARAMETERS OF HAEMOLYMPH OF THE HONEYBEE, *APIS MELLIFERA* L. (HYMENOPTERA: APIDAE), OBSERVED AFTER ADMINISTRATION OF BIOACTIVE PREPARATION 'APITONUS' AS A RESTORATIVE FOR BEES, WHICH ARE PARASITIZED BY MITES OF THE GENUS *VARROA* OUDEMANS, 1904

Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences

SUMMARY

Administration of a syrup preparation of 'Apitonus' is shown to increase protein concentration, lysozyme activity, titres of agglutinins, levels of free aminoacids, and glucose and fructose concentrations in haemolymph of adult honey bee after the treatment against *Varroa jacobsoni*. The changes of these biochemical parameters suggest a normalization of metabolism and, in particular, of the process of reserve accumulation needed for hibernation.

2 tabs, 1 fig., 10 refs.