УДК 638.121:591.113:612.017

СТУПАК Л. П.
МАСЛІЙ І. Г., канд. вет. наук
НЄМКОВА С. М., канд. біол. наук
ДЕСЯТНИКОВА О. В.
ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

ФАКТОРИ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ГЕМОЛІМФИ БДЖІЛ ПІД ВПЛИВОМ *L. PLANTARUM* ТА ПОЛІПЕПТИДНОЇ СУБСТАНЦІЇ

У роботі наведені результати впливу L. plantarum та поліпептидної субстанції (бактерицину L. lactis) на фактори неспецифічної резистентності у бджіл. Зразки гемолімфи відбирали через 7, 14, 21 добу і визначали активність лізоциму та фагоцитозу, а також бактерицидний фактор. За результатами досліджень на 21 добу у гемолімфі бджіл І-ї дослідної групи встановлено збільшення активності лізоциму в 1,7 рази, фагоцитозу в 1,1 рази, бактерицидного фактору в 2,0 рази, у гемолімфі бджіл ІІ-ї групи реєстрували збільшення активності лізоциму в 1,7 рази, фагоцитозу в 1,1 рази, бактерицидного фактору в 2 рази.

Ключові слова: *бджоли, гемолімфа, неспецифічна резистентність, поліпептидна субстанція.*

Вступ. Опірність організму бджіл до патогенів залежить від повноцінності поживних речовин, що потрапляють з кормом, особливо білковим, бо складовими ферментів і речовин, які відповідають за резистентність, є амінокислоти і поліпептиди.

До факторів неспецифічної резистентності бджіл відносять клітини гемолімфи, жирового тіла (клітинний імунітет), а також антимікробні рідини (гуморальний імунітет) організму. Гемолімфа виконує захисні функції завдяки наявності в ній таких клітин і рідин. Характерно, що активність клітинних факторів захисту залежить від гуморальних. Процес фагоцитозу в значній мірі активується за допомогою лізоциму, мікроцинів та опсоніну. Вони підвищують швидкість фагоцитозу. Лізоцим, який адсорбується на мукопептидній клітинній стінці мікроорганізму, розщеплює її. У результаті цього порушується осмотична рівновага і починається гідроліз мікробної клітини [1, 2].

Лізоцим комах є відносно невеликою білковою молекулою (близько 15 кДа) та представником групи справжніх лізоцимів. Концентрація його у гемолімфі личинок та імаго знаходиться у межах від 5 мг/мл до 25 мг/мл, а у лялечок – до 10 мг/мл. Антибактеріальна відповідь здійснюється шляхом підвищення активності лізоциму. В процесі інфікування концентрація лізоциму у гемолімфі збільшується у личинок майже у 100 разів (до 1300 мг/мл), у льотних бджіл – вдвічі (40 мг/мл) [3,4].

Нормальна мікрофлора кишечнику бджіл, окрім лізоциму, продукує також антибіотикоподібні мікробні поліпептидні субстанції – мікроцини з широким спектром антибактеріальної активності, які теж впливають на неспецифічну резистентність бджіл [5, 6, 7].

Так, продукти життєдіяльності лактобацил, представників корисної мікрофлори кишечнику хазяїна, сприяють підвищенню комплексу факторів неспецифічної резистентності: вмісту лізоциму, фагоцитарної та бактерицидної активності гемолімфи бджіл [7].

Мета роботи – вивчити вплив *L. plantarum* та поліпептидної субстанції (бактерицину *L. lactis*) на фактори неспецифічної резистентності бджіл: бактерицидну та фагоцитарну активність гемолімфи, в цілому, та зокрема активність лізоциму.

Матеріали і методи дослідження. Для визначення впливу лактобацил та поліпептидної субстанції (бактерицину *L. lactis*) на організм імаго бджіл дослідження проводили у бджолиних сім'ях. Для цього формували дві дослідні та одну контрольну групи сімей бджіл. Сім'ям І-ї дослідної групи додавали в корм поліпептидну субстанцію, ІІ-ї групи – культуру *L. plantarum*, контрольним – чистий цукровий сироп (1:2). У бджіл перед дослідом відбирали гемолімфу. В процесі досліду зразки гемолімфи відбирали через 7, 14, 21 добу та визначали активність лізоциму, фагоцитозу та бактерицидності гемолімфи.

Визначення активності лізоциму у гемолімфі проводили турбідіметричним методом. Культуру *Micrococcus lysodeikticus* готували на фосфатному буфері, збірні проби гемолімфи розводили в 10 разів фізіологічним розчином. Досліджували одночасно дослідні та контрольні проби. Кількість лізоциму у пробі гемолімфи розраховували за калібрувальною кривою у мкг/мл [8].

Показник активності фагоцитозу клітин гемолімфи визначали за методом В. М. Берман [8]. Оцінку завершеного фагоцитозу проводили шляхом визначення кількості клітин, у яких завершено фагоцитоз (реєструються фрагменти зруйнованих клітин) на 100 клітин, що приймали участь у процесі фагоцитозу.

Бактерицидну активність гемолімфи досліджували методом дифузії в агар. У якості тест-культур використовували патогенні для бджіл мікроорганізми – збудники гнильців: американського, європейського, парагнильцю та непатогенні – кишкової палички. На поверхню агару у чашку Петрі вносили культуру мікроорганізму у концентрації 1 млрд. клітин/см^3. Чашки витримували у термостаті за температури 37 ^{0}С протягом 2 год. Маркером робили лунки діаметром (3–4) мм, у які вносили зразки гемолімфи. Облік результатів реакції проводили через 24, 48, 72 год. [8].

Результати досліджень та їх обговорення. В процесі вивчення впливу поліпептидної субстанції та лактобактерій на організм бджіл було встановлено підвищення активності лізоциму гемолімфи (табл. 1).

Таблиця 1

Активність лізоциму гемолімфи бджіл (n=30)

Групи бджіл	Строк відбору, доба	Активність лізоциму, мкг/мл
I дослідна (поліпептидна субстанція)	7	51,9 ± 3,8[1)]
	14	54,2 ± 4,1[1)]
	21	60,7 ± 4,1[1)]
II дослідна (культура *L. plantarum)*	7	52,6±0,3[1)]
	14	57,7 ± 0,8[1)]
	21	62,7±1,2[1)]
контроль (цукровий сироп)	7	36,1 ± 1,4
	14	36,4 ± 1,5
	21	36,2 ± 1,5
до початку досліду	-	36,4 ± 1,5

Примітка: [1)] – $p<0,05$, різниця результатів вірогідна у порівнянні з результатами до початку підгодівлі та контрольною групою

Із даних таблиці 1 видно, що активність лізоциму у гемолімфі бджіл I групи була більше в 1,4 рази через 7 діб після згодовування суміші цукрового сиропу з поліпептидною субстанцією, через 21 добу – в 1,7 рази більше ніж у контролі. Активність лізоциму у гемолімфі бджіл II групи була більше в 1,5 рази через 7 діб після згодовування культури *L. plantarum*, через 21 добу – в 1,7 рази більше ніж у контролі. Активність лізоциму у гемолімфі бджіл I та II групи через 7 діб після закінчення підгодівлі була більше на 43,8 % та 45,7 % відповідно в порівнянні з контролем.

Через 21 добу ця різниця складала для першої групи 66,7 %, другої – 73,2 % у порівнянні з контрольною групою сімей бджіл. Активність лізоциму у бджіл з контрольних сімей не збільшувалась упродовж досліду.

Бактерицидну активність та фагоцитарний індекс гемолімфи бджіл визначали у пробах, що були відібрані до початку досліду та через 21 добу після закінчення підгодівлі (табл. 2).

Таблиця 2

Бактерицидна активність та фагоцитарний індекс гемолімфи бджіл

Групи бджіл (n=30)	*P. larvae*		*M. pluton*		*P.alvei*	
	Бактерицидний фактор (год.)	Фагоцитарний індекс	Бактерицидний фактор (год.)	Фагоцитарний індекс	Бактерицидний фактор (год.)	Фагоцитарний індекс
До початку досліду	6	2,82±0,12	6	2,82 ±0,12	6	2,82±0,12
I	12	3,16±0,15	12	3,24±0,1	12	3,12±0,11
II	12	3,11 ± 0,11	12	3,14 ± 0,13	12	3,17 ± 0,17
Контроль	6	2,94 ± 0,12	6	2,9 ± 0,12	6	2,97 ± 0,12

З даних таблиці 2 видно, що гемолімфа бджіл дослідних груп – першої, що отримувала з цукровим сиропом поліпептидну субстанцію, та другої, якій згодовували культуру *L. plantarum*, викликала затримку росту всіх тест-культур (*P. larvae*, *M. Pluton*, *P.alvei)* упродовж 12 год. Фагоцитарний індекс гемолімфи бджіл обох піддослідних груп був більше, ніж у контролі.

Отже, отримані результати вказують на те, що згодовування *L. plantarum* та комплексу поліпептидної субстанції сприяє підвищенню факторів неспецифічної резистентності організму бджіл.

Висновки та перспективи подальших досліджень.

1. Згодовування поліпептидної субстанції та *L. plantarum* сприяє підвищенню факторів неспецифічної резистентності організму бджіл (активності лізоциму в 1,4, 1,7 рази, фагоцитозу в 1,1 рази, бактерицидного фактору гемолімфи – в 2,0 рази).

2. Бактерицин *L. lactis* та корисна мікрофлора в подальшому будуть випробувані для профілактики гнильцевих хвороб бджіл.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Таранов Г. Ф. Кровь и кровообращение. Состав гемолимфы. Функции гемолимфы / Г. Ф. Таранов // Анатомия и физиология медоносных пчел. – М.: Колос, 1968. – С. 115-137.

2. Головко В. А. Механизмы противоинфекционной резистентности у насекомых / В. А. Головко [и др.] // Проблемы неспецифической устойчивости тутового шелкопряда. Физиологические, генетические, иммунологические аспекты / Х.: РИП Оригинал, 1996. – С. 76–93.

3. Glinski Z. Infektion and immunity in the honey bee Apis mellifera / Z. Glinski., Z. Jarosz // Apiakta. – 2001. – Vol. 36, № 1. – P. 12–24.

4. Evans Jay D. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae) / Jay D. Evans , Dawn L. Lopez // J. econ. entomol. – 2004. – Vol. 97, N 3. – P. 752–756.

5. Хорошилова Н. В. Иммуномодулирующее и лечебное действие пробиотиков / Н. В. Хорошилова // Иммунология. – 2003. – № 6. – С. 352–356.

6. Drobnikova V. Mikroflora a traveni pszczol / V. Drobnikova // Vcelarstvi. – 1990. – Т. 2. – С. 28–29.

7. Горская Е. М. Связывание лактобацилл с некоторыми растворимыми белками и лектинами / Е. М. Горская [и др.] // Журн. микробиол. – 1994 – № 1. – С. 11–14.

8. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская. – М.: Медицина, 1978. – 394 с.

ФАКТОРЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ГЕМОЛИМФЫ ПЧЕЛ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ *L. PLANTARUM* И ПОЛИПЕПТИДНОЙ СУБСТАНЦИИ (БАКТЕРИЦИНА *L. LACTIS*) / Ступак Л. П., Маслий И. Г., Немкова С. Н., Десятникова Е. В.

Представлены результаты влияния L. plantarum и полипептидной субстанции (бактерицина L. lactis) на факторы неспецифической резистентности пчел. Образцы гемолимфы отбирали на 7, 14, 21 сутки и определяли активность лизоцима, фагоцитарный индекс и бактерицидную активность гемолимфы. За результатами опыта на 21 сутки у пчел I-й групы регистрировали увеличение активности лизоцима в 1,7 раза, фагоцитоза в 1,1 раза, бактерицидного фактора в 2 раза, у пчёл II -й групы увеличение активности лизоцима в 1,7 раза, фагоцитоза в 1,1 раза, бактерицидного фактора в 2 раза.

Ключевые слова: *пчёлы, гемолимфа, неспецифическая резистентность, полипептидная субстанция.*

NONSPECIFIC RESISTANCE FACTORS IN BEE HAEMOLYMPH UNDER THE INFLUENCE OF *L. PLANTARUM* AND POLYPEPTIDE SUBSTANCE (BACTERIOCIN *L. LACTIS*) / Stupak L. P., Maslii I. G., Niemkova S. N. , Desiatnykova O. V.

Results of the influence of L. plantarum and polypeptide substance (bacteriocin *L. Lactis) on the factors of bee nonspecific resistance are presented. Haemolymph samples were selected on the 7th, 14th, and 21st days. Lysozyme activity, phagocytic index and bactericidal activity of haemolymph were determined. As a result of the experiment on the 21st day there was registered in bees of the first group 1,7 times increase of lysozyme activity, 1,1 times increase of phagocytosis, 2 times increase of bactericidal factor; in bees of the second group – 1,7 times increase of lysozyme activity, 1,1 times increase of phagocytosis and 2 times increase of bactericidal factor.*

***Key woods**: bees, hemolymph, nonspecific resistance, the polypeptide substance.*