

УДК 619:616.391:638.157:638.1

© 2000 г. С. Н. НЕМКОВА, А. И. КОБЗАРЬ, Е. П. РУДЕНКО

**ВЛИЯНИЕ ВАРРОАТОЗНОЙ ИНВАЗИИ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
ОРГАНИЗМА МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ (*APIS MELLIFERA* L.)**

Проблема варроатоза, несмотря на успехи в борьбе с этим заболеванием, в настоящее время не решена и по-прежнему требует значительных затрат в пчеловодстве. Клещи *Varroa jacobsoni* Oud., питаясь гемолимфой пчел, вызывают глубокие изменения в работе защитных механизмов организма пчелы. Исследования гемолимфы пчёл, инвазированных клещом, свидетельствуют о том, что даже при отсутствии видимых нарушений в поведении и жизнедеятельности насекомых, уже происходят изменения в их организме на биохимическом уровне, затрагивающие процессы обмена веществ (Смирнов, Шатрова, 1993). Показателями степени отрицательного воздействия варроатозной инвазии на гуморальные факторы гемолимфы пчелы являются снижение уровня общего белка на 15–30% и других белков с низкой молекулярной массой, а также активности лизоцима и агглютининов (Садов, 1978; Глински, Ярош, 1988).

Лизоцим, являясь одним из основных факторов неспецифического иммунитета насекомых, обладает широким спектром бактерицидной активности и функционирует в рамках защитных механизмов организма пчёл, а под влиянием паразитирования клеща происходит снижение его активности (Glinski, Jarosz, 1995; Нагорная и др., 1996).

Поражение взрослых пчёл клещом приводит к нарушению энергетического обмена в их организме, на что указывают изменения в содержании углеводов и отдельных свободных аминокислот в гемолимфе. Отмечается ускоренное старение клеток гемолимфы у инвазированных рабочих пчёл, а также появление большого числа незрелых гемоцитов, увеличение возрастного коэффициента гемолимфы (Домацкая, Гробов, 1980; Abroi, 1996).

Настоящая работа проведена с целью изучения содержания общего белка и остаточного азота, некоторых свободных аминокислот; уровня глюкозы и фруктозы, активности лизоцима в гемолимфе взрослых рабочих пчел, пораженных варроатозом.

Материалы и методы

Исследования проводились на опытной пасеке Института экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН.

Для изучения влияния клещей Варроа, в пчелосемьях проводилось определение степени варроатозной инвазии печатного расплода рабочих пчёл в динамике с целью подбора их в опыт. Контрольной группой служили пчелосемьи со степенью заклещенности – 0,96–1,00% и подвергнутые всем плановым обработкам против варроатоза; в опытной группе степень инвазии составляла – 15,6% (на 5–10 августа 1998 г.).

Для отбора гемолимфы из каждой группы пчелосемей производили три выборки взрослых пчел в количестве 100–150 особей. Гемолимфу отбирали стерильным стеклянным капилляром, путем прокалывания кутикулы между 3–4 брюшными тергитами, и готовили среднюю пробу.

Содержание общего белка в гемолимфе определяли по методу Лоури (Биохимические методы исследования ..., 1969: С. 62–63) со стандартным реактивом Фолина. Расчеты проводили с помощью калибровочного графика, построенного по стандартному бычьему сывороточному альбумину. Определение остаточного азота проводили путём сжигания проб гемолимфы в колбе Кьельдаля и последующего добавления реактива Неслера для развития цветной реакции. Для расчетов использовали калибровочный график, построенный по стандартному раствору сернокислого аммония (Биохимические методы исследования ..., 1969: С. 79–83). Определение активности лизоцима проводили в лаборатории биохимии Института экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН турбидиметрическим методом с использованием ацетонового порошка *Micrococcus lysodeikticus* (Лабинская, 1978).

Количество свободных аминокислот в гемолимфе взрослых пчёл изучали в лаборатории биохимии Института терапии АМН Украины на аналитическом аминокислотном анализаторе 339А. Для этого гемолимфу центрифугировали 10 минут с добавлением гепарина, при 3000 об./мин. Супернатант доводили буфером с рН=2,2 до объема 0,5 мл и добавляли

кристаллическую сульфосалициловую кислоту в соотношении 30 мг на 1 мл надосадочной жидкости, встряхивали и центрифугировали 15 минут при 3000 об./мин. Затем 1 мл раствора фильтровали через шприц и 50 мкл фильтрата вводили в аминокислотный анализатор. Количество отдельных свободных аминокислот в гемолимфе определяли в сравнении со стандартными растворами этих аминокислот по площадям их пиков на хроматограммах по формуле:

$$C_{\text{ак}} = \frac{400 \cdot S_{\text{ак}} \cdot C_{\text{станд}}}{S_{\text{станд}}}$$

где: $C_{\text{ак}}$ – концентрация аминокислоты в образце гемолимфы,
 $S_{\text{ак}}$ – площадь пика аминокислоты в образце гемолимфы на хроматограмме,
 $S_{\text{станд}}$ – площадь пика стандарта аминокислоты,
 $C_{\text{станд}}$ – концентрация стандарта аминокислоты,
 400 – поправочный коэффициент с учётом разведения.

Уровень глюкозы в гемолимфе определяли с орто-толуидиновым реактивом (Биохимические методы контроля ..., 1990), фруктозы – методом Роя (Биохимические методы исследования ..., 1969: С. 226–227) с добавлением спиртового реактива резорцина и железоаммиачных квасцов.

Результаты и обсуждение

В ходе изучения содержания общего белка и остаточного азота в гемолимфе инвазированных взрослых пчёл отмечено снижение количества общего белка и резкое увеличение уровня остаточного азота (табл. 1).

Таблица 1

Показатели белкового обмена у здоровых пчёл и инвазированных клещом Варроа

Группы пчел	Общий белок, г/л	Остаточный азот, мг/%	Лизоцим, мкг/мл
Больные	29,30±1,53	975,00±50,91	40,00±1,15
Здоровые	37,70±0,59	650,00±10,17	52,00±0,81

Приведенные в таблице данные о снижении содержания общего белка в гемолимфе больных пчёл свидетельствуют о нарушении белкового обмена в их организме ($P_{\text{б/з}} < 0,05$). Резкое снижение этого показателя в гемолимфе больных пчёл отмечалось при степени варроатозной инвазии свыше 15%.

Установлено, что в гемолимфе больных взрослых пчёл снижена активность лизоцима до 40,00±1,15 мкг/мл, в сравнении со здоровыми пчёлами ($P_{\text{б/з}} < 0,05$).

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными (Садов, 1978; Домацкая, 1980) и свидетельствуют о том, что под влиянием паразитирующего действия клеща Варроа в организме пчёл происходит интенсивный распад белковых веществ, а также нарушается синтез новых белковых молекул. Свидетельство этому – снижение активности лизоцима в гемолимфе инвазированных пчёл, что приводит к ослаблению иммунитета и снижению общей устойчивости пчелосемьи к инфекционным заболеваниям.

Исследование гемолимфы пчёл на аминокислотном анализаторе позволило установить количественное содержание некоторых жизненно важных свободных аминокислот (табл. 2).

Результаты, представленные в таблице 2, указывают, что в гемолимфе пчёл, пораженных клещом Варроа, происходит увеличение количества всех основных свободных аминокислот, за исключением серина и гидроксипролина. Эти изменения содержания аминокислот также связаны с нарушением белкового обмена под влиянием паразитирования клеща. Это подтверждается показателями остаточного азота в гемолимфе больных пчёл (табл. 1), увеличение которых указывает на нарушение белкового обмена.

Повышение в гемолимфе содержания глютаминовой кислоты и аланина до 6,240 мкмоль/мл и 5,120 мкмоль/мл соответственно (у здоровых – 0,940 мкмоль/мл и 1,780 мкмоль/мл), связано с нарушением аминокислотного метаболизма при варроатозе, так как глютаминовая кислота является основным донором в реакциях переаминирования (Левченко, 1972).

Увеличение количества пролина, треонина, аспарагина, глицина, лейцина в гемолимфе больных особей подтверждает данные о том, что паразитирование клеща приводит к серьезным нарушениям обменных процессов. Такие пчёлы не способны летать, ползают возле улья,

наблюдается дрожание крыльев (Shatton–Gadelmayer, Engels, 1988). Значительные количества таурина в гемолимфе инвазированных пчел – 3,460 мкмоль/мл (у здоровых – 2,680 мкмоль/мл) также объясняют снижение двигательной активности пчёл. Из литературных источников (Гуревич, 1986) известно, что таурин стимулирует некоторые ферменты гликолиза и перекисное окисление липидов, что приводит к снижению уровня глюкозы и липидов по сравнению с нормой. Как следствие, начинают распадаться сложные углеводы, снижается количество низкомолекулярных и высокомолекулярных белков, в результате чего наблюдается дегенерация органов пчелы, нарушение интенсивности дыхания и осморегуляции.

Таблица 2

**Количественное содержание свободных аминокислот
в гемолимфе здоровых и инвазированных пчел (мкмоль/мл).**

Название аминокислоты	Инвазированные пчелы	Здоровые пчелы	Название аминокислоты	Инвазированные пчелы	Здоровые пчелы
Цистеиновая кислота	0,600	0,400	Аминоадипиновая кислота	2,200	Следы
Таурин	3,460	2,680	Пролин	40,000	30,000
Фосфоэтаноламин	3,080	2,312	Глицин	2,856	1,920
Гидроксипролин	6,720	8,400	Аланин	5,120	1,780
Треонин	6,400	2,400	Валин	2,104	1,600
Серин	3,748	5,600	Изолейцин	0,748	0,400
Аспарагин	2,592	0,460	Лейцин	2,776	1,400
Глутаминовая кислота	6,240	0,940	Метионин	Следы	Следы
			Глутамин	1,320	Следы

Таким образом, полученные результаты согласуются с данными других авторов о глубоких нарушениях обменных процессов в организме пчел при варроатозе.

Опыты по изучению углеводного обмена у пчёл показали, что у здоровых взрослых рабочих пчёл уровень глюкозы в гемолимфе составляет $142,2 \pm 5,54$ мкмоль/л, фруктозы – $16,6 \pm 4,05$ мкмоль/л, тогда как при варроатозной инвазии содержание данных углеводов снижается: глюкозы – до $132,4 \pm 5,15$ ммоль/л, фруктозы – $11,29 \pm 0,55$ мкмоль/л ($P_{0,05} < 0,05$).

Полученные результаты указывают на нарушение важнейшей функции клеток жирового тела пчёл в синтезе необходимых веществ белковой и углеводной природы. Глюкоза принимает активное участие в процессе детоксикации химических агентов и доминирует в углеводном обмене пчёл, поэтому снижение её уровня в гемолимфе отрицательно сказывается на физиологическом состоянии их организма, приводит к нарушению двигательной функции и продолжительности жизни пчёл.

Выводы

1. При инвазировании клеща Варроа в организме пчёл происходит нарушение белкового обмена и синтеза белка, что проявляется в снижении показателей общего белка на 22,3%. Количество остаточного азота в гемолимфе больных пчёл увеличивается в 1,5 раза, в сравнение со здоровыми насекомыми.

2. В гемолимфе пораженных варроатозом взрослых пчёл, заметно снижается активность лизоцима ($40,0 \pm 1,15$ мкг/мл – больные, $52 \pm 0,81$ мкг/мл – здоровые, $P_{0,05} < 0,05$).

3. Уровень содержания основных свободных аминокислот в гемолимфе больных пчёл повышен, что указывает на нарушение метаболических процессов в их организме как на клеточном, так и на органном уровне.

4. Снижение содержания глюкозы и фруктозы в гемолимфе пчёл при варроатозной инвазии приводит к нарушению функции синтеза клетками жирового тела веществ углеводной и белковой природы, участвующих в защитных реакциях организма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Биохимические методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. А. А. Покровского. – М.: Медицина, 1969. – 652 с.
 Биохимические методы контроля метаболизма и их витаминной обеспеченности: Метод. реком. – Х.: Укр. НИИ птицеводства, 1990. – С. 85–86.

- Глински З., Ярош Е. Вредное воздействие клеща *Varroa jacobsoni* на медоносную пчелу // Апиакта. – 1988. – Т. 23, № 2. – С. 41–51.
- Гуревич В. С. Таурин и функция возбудимых клеток. – Л.: Наука, 1986. – 112 с.
- 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.
- Левченко И. В. Органная специфичность трансаминазной активности пчёл // Пчеловодство. – 1972. – № 6. – С. 11–13.
- Нагорная И. М., Боднарчук Л. И., Левченко И. А. Лизоцим секретов слюнных желез пчелы // Пчеловодство. – 1996. – № 3. – С. 19–21.
- Садов А. В. Влияние клеща *Varroa jacobsoni* на биохимические показатели пчёл // Ветеринария. – 1978. – № 9. – С. 66–68.
- Смирнов А. М., Шатрова Т. С. Варроатоз и ветеринарно-санитарная оценка акарицидов // Апиакта. – 1993. – Т. 18, № 3–4. – С. 88–90.
- Abrol D. P. Effect of mite parasitosis on blood counts of honey bees *Apis mellifera* L. and *Apis cerana indica* F. // Insect Environment. – 1996. – Vol. 2, № 1. – P. 18–19.
- Glinski Z., Jarosz J. Mechanical and biochemical defences of honey bees // Bee World. – 1995. – Vol. 76, № 3. – P. 110–118.
- Shatton-Gadelmayer K., Engels W. Haemolymphproteine und Körpergewicht frischgrschlupfter, Beinen-Arbeiterinnen nach unterschiedlich starker parasitierung durch Brutmilben // Entomol. Gen. – 1988. – Vol. 14, № 2. – P. 93–101.

*Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины
Украинской Академии Аграрных Наук*

S. N. NEMKOVA, A. I. KOBZAR', Ye. P. RUDENKO

**METABOLISM INDECES IN THE HONEY BEE (*APIS MELLIFERA* L.) ORGANISM
CAUSED BY VARROATOSIS**

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

S U M M A R Y

The content of the whole protein and residual nitrogen, levels of the free aminoacids, glucose and fructose in haemolymph of the honey bee adults caused by varroatosis disease have been studied.

Our investigation showed that some metabolism indeces have been changed greatly under the influence of varroatosis infestation.