

ИЗОЛИРОВАННЫЕ ИЗ КЛЕЩА ВАРРОА ДЕСТРУКТОВ МИКРООРГАНИЗМЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ ПАТОГЕННОСТИ

Я. ХРАБАК, ЧЕХИЯ

J. HRABÁK

Luční 255, 338 28 Radnice, CZECH REPUBLIC, E-mail: hrabakj@seznam.cz

Аннотация

Наше исследование сосредоточено на обнаружении одного клеща Варроа деструктор с патогенными симптомами и на изолировании его микроорганизмов. Погибшие клещи собраны с пластинок улья и экзаминированы с помощью стереомикроскопа. Клещи, о которых предполагали, что погибли из-за патологического процесса экзаминированы бактериологическими и микологическими методами. Патогенность изолированных микроорганизмов проверена тестами, которые описаны в данной работе. Во время экзаминирования нами обнаружены самки с черными пятнами в кишечной зоне и с белым грибок на илиозоме. Бактерии *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus albus haemolyticus* и грибки *Aspergillus flavus*, *Penicillium multicolor* и *P. simplicissimum* изолированы от особей с черными пятнами, а бактерии *Enterobacter cloacae* и грибки *Mucor ramosissimus*, *M. indicus* и *M. hiemalis* от клещей с микозами. Лабораторные тесты для установления патогенности изолированных микроорганизмов проведены в лабораторных клетках с 40 пчелами и 15 самками Варроа деструктор. Лабораторные клетки с пчелами, инфицированными Варроа деструктор опрыскивали инокулом и стерильным соевым раствором (контрольные клетки). Эксперименты проведены при температуре 35 °С. Лабораторные тесты доказали патогенность только у бактерии *Enterobacter cloacae*, которая вызвала гибель 77,4% клещей в лабораторных клетках. Гибель клещей в контрольных клетках составляла в среднем 15,9%. При тестировании других микроорганизмов не установлены достоверные различия с контрольными клетками. Инфицированные *Enterobacter cloacae* клещи погибли, показывая характерные патологические изменения мальпигиевых сосудов, а оболочка между генитальным и стернальным щитами обычно была разрушенной. Но в наших лабораторных тестах не отмечены черные пятна.

Введение

Исследования по идентифицированию новых средств биологической борьбы с Варроа деструктор концентрируются на:

1. Тестировании микроорганизмов с патогенностью, доказанной для другого вида клещей.
2. Применении клещей грабителей для нападения на другие, находящиеся в кормовых запасах пчел.
3. Обнаружении клещей с симптомами инфекции в улье. Нами уделено особое внимание обнаружению клещей с патологическими и инфекционными симптомами, обитающих в ульевом мусоре и около личинок пчел. Следует отметить, что мы ограничивались только исследованием бактериальных и грибковых патогенных агентов.

Патогенные микроорганизмы, описанные и в случае других клещей (*Laelapidae*, *Iphiopsidae*) и клещей *Ixodia*, *Holothyridia* могут быть тестированы как агенты биологической борьбы с варроатозом, так как они родственны с клещами *Varroidae*.

Исследования сконцентрированы на обычного хозяина *Varroa jacobsoni* – *Apis cerana*, но исследования АНДЕРСОНА и ТРУМАНА (Д.Л. ФНДЕРСОН с сотр., 2000) доказали, что *Varroa jacobsoni* особый вид, чем *Varroa destructor*, инфицируя семьи медоносной пчелы *Apis mellifera*. Этот факт подчеркивает необходимость изыскания патогенных агентов, которые поражают определенные виды *Varroa*.

Перспективные для *Varroa destructor* патогенные агенты можно разделять на группы, согласно таксономии микроорганизмов: нематоды, протозоа, вирусы, риккетсии и грибки. Мы будем касаться только патогенных агентов с наиважнейшим потенциалом из литературы по специальности.

Вирусы могут быть выгодными агентами, так как они, обычно, инвазируют стандартные группы идентичных клеток. Первым недостатком вопроса вирусов является их трудное культивирование в больших количествах. Большинство вирусов культивированы *in vivo*. Для членистоногих специфичными агентами являются *Polydnviridae*, *Ascoviridae*, *Baculoviridae* (Д. ЧАНДЛЕР с сотр., 2001). Бакуловирусы являются характерной группой для биологической борьбы (М.Е.МАРТИНЬОНИ, 1984). Они инфицируют кишку и проникают через эпителиальные клетки в организм. Подобные вирусам частицы обнаружены в жировом теле клещей, инфицирующих семьи *Apis mellifera*, но тесты переноса этих частиц дали неудачные результаты. Клещи, инфицированные такими частицами, подобными вирусам, вызывали изменения черного цвета в ткани и жировом теле кишки (Р.Г.КЛИСПИС, 2000).

Предполагаемый иридовирус изолирован от клещей *Varroa* из семей медоносных пчел в США, но их патогенность по отношению к клещам не доказана (С. КАМАЗИН с сотр., 1998).

Риккетсии в высоких концентрациях обнаружены в клещах; они могут быть опасными для человека и других позвоночных. Недостатком для работы с ними является затруднительное

массивное произведение и поэтому их не надо классифицировать как категорию потенциальных патологических агентов, как в случае вирусов.

Неидентифицированные организмы, подобные риккетсиям обнаружены в прямой кишке клещей *Varroa* (Т.П.ЛИУ с сотр., 1988). Эти организмы обнаружены во всех стадиях развития.

Бактерии – категория патогенных агентов насекомых. Характерные семьи энтомопатогенов представлены *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*. Патогенный эффект *Bacillaceae*, вызван, обычно, синтезом токсина, который создается при споруляции микробов. *Bacillus thuringiensis* широко применяется для биологической борьбы. Например, в пчеловодстве он применяется для борьбы с *Galleria mellonella*. От эффекта *Bacillus thuringiensis* погибло много взрослых особей и личинок тетраницидов (И.М. ГАЛЛ с сотр., 1971), а также ряд видов *Mesostigmata* и *Prostigmata* (Д. ЧАНДЛЕР с сотр., 2001). Штаммы *Bacillus thuringiensis* изолированы из кишки *Varroa destructor*, но пока еще их патогенность не установлена (З.Ф. ГЛИНСКИ с сотр., 1990). Следует отметить, что, все же, бактерии не являются характерными патогенными агентами для клещей, а их культивирование осуществляется при 30-35 °С, что характерно для условий выращивания расплода. Влажность из пчелиных семей также благоприятна для развития бактерий.

Грибки описаны как один из первых патогенных агентов членистоногих. Оптимальная температура их развития – выше 25 °С (С. БИРХЕР с сотр., 1990). Они могут быть полезными для применения в пчелиных семьях во время зимовки. Только небольшое число видов располагает оптимальной для развития температурой (выше 35 °С), но уделяется реальное внимание их патогенности для человека (пример - *Aspergillus*).

Гибель от грибковых инфекций вызвана механическим разрушением тканей, испарением воды и активностью грибкотоксинов (С. БИРХЕР с сотр., 1990). Грибки *Beauveria bassiana* использовались как грибкопестициды для борьбы против более 700 видов членистоногих (М.С. ГЕТТЕЛ с сотр., 1992). Другим важным для насекомых патогенным грибом является *Metarhizium anisopliae*, а также другие виды рода *Metarhizium*. Максимальная температура их развития – 38 °С.

Преимущество применения грибов в биологической борьбе – их нетрудное культивирование в массивных количествах. Однако, *B. bassiana*, *M. anisopliae* могут вызывать инфекции в лабораторных условиях, но инфицирование ими пчелы пока еще не обнаружена (Д. ЧАНДЛЕР с сотр., 2001; Д. ВЕЙСЕР, 1966).

Hirsutella thompsonii и *Metarhizium anisopliae* были оценены в лаборатории и контрольных ульях, а результаты были достоверно положительными (КАНГА с сотр., 2002).

Паразитоиды. Использование клещей нападателей зависит от влажности и температуры окружающей среды. Они поражают взрослых особей, разные стадии развития и яйца. Применение нападателей включает высокий потенциальный риск для яиц пчел, так как они охотно их съедают.

Материал и методика

Идентифицирование патогенных агентов

Сбор клещей

Клещи *Varroa destructor* собраны еще в 1999 году с пасек, размещенных в Раднице (Западная Чехия). Ульи (семьи *Apis mellifica* L.) имели на дне пластинки, марлю (Ø 10 мм) и отдельно другую марлю (Ø 3 мм) (рис. 1). Погибшие самки остались на дне, пчелы их не удалили. Погибших клещей исследовали стереомикроскопом. Патологические изменения у клещей выражены темным цветом или развитием грибами на теле.

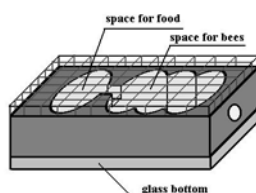


Рис. 1 Лабораторная клетка (схема)
(space for foode = пространство для корма; space for bees
= пространство для пчел; glass bottom = стеклянное дно)

Изолирование

Погибшие самки *Varroa destructor*, подозреваемые в гибели от патологического процесса были обработаны этиловым спиртом (70%) после чего разделены на две части. Одна часть введена в 1 мл соляного раствора, вторая – в пробирку при 4 °С, для последующего экзамирования. Часть клеща

из соляного раствора инкубирована в течение 2 ч. при 36 °С, после чего жидкость инокулирована на чашке Петри и инкубирована при 36 °С. Для бактериальной культуры использован агар Колумбия с 5% SB, а для грибов – агар декстрозы Сабурод.

Экспериментальная часть

Экспериментальные инфекции

Инокулятором, содержащим 1×10^7 ячеек в 1 мм^3 соляного раствора с 5% глюкозы опрыскивали пчел, инфицированных *Varroa destructor* в лабораторных условиях (Рис. 1). Верхняя часть лабораторных клеток состояла из марли ($\varnothing 0,5$), а нижняя была стеклянным дном. В каждую клетку введено по 40 пчел и 15 клещей. Пчел с клещами в лабораторных клетках опрыскивали соляным раствором без бактерий, с 5% глюкозы.

Изолирование

Погибших клещей изымали из лабораторной клетки и дезинфицировали. Затем осуществлена пунктура идиозомы, а полученная жидкость культивирована и экзамирована под микроскопом.

Результаты

Клещи с черными патологическими пятнами на кишках обнаружены в остатках и мусоре улья (Рис. 2). Комплекс кишечных дистальных и боковых дивертикулов были наполнены гомогенным твердым веществом черного цвета. Данное вещество была культивирована по описанным методам.

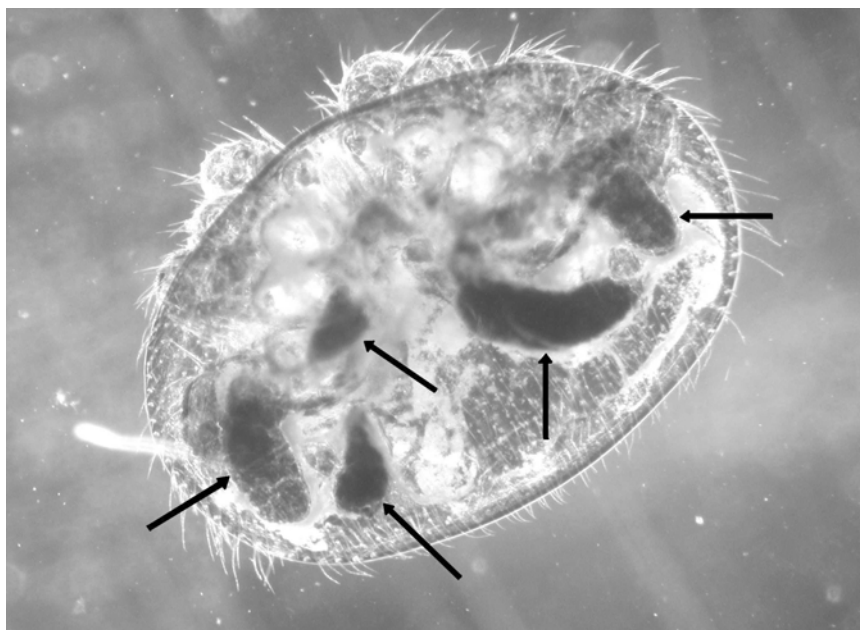


Рис. 2 Клещ *Varroa destructor* с черным твердым веществом в кишечных дивертикулах (оригинальное изготовление, стереомикроскоп, увеличение: 20х).

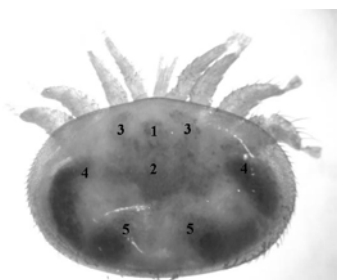


Рис. 3 Вещество черного цвета из пищеварительного тракта и черные частицы из дистального и бокового дивертикулов кишки. 1 – пищевод, 2 – кишечные дивертикулы, 3 – передний мезентер, 4 – боковые кишечные дивертикулы, 5 – дистальные кишечные дивертикулы (оригинальное изготовление, стереомикроскоп, увеличение: 20х).

Из этих клещей изолированы следующие микроорганизмы:

Грибки: *Aspergillus flavus*, *Mucor ramosissimus*, *Mucor indicus*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium multicolor*, *Penicillium simplicissimum*.

Бактерии: *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus albus*.

Опрыскивание пчел инокулятором из изолированных микроорганизмов показали, что *Enterobacter cloacae* является агентом, причиняющим инфекции клещей. Гибель их достигала 70-88,9%. Клещи погибали в интервал 48-72 ч, представляя специфичное повышение идиозомы. Оболочка между генитальным и стернальным щитами была, обычно, разрушенной, выделяя жидкость (Рис. 4). Жидкость взята из нетронутой идиозомы стерильной иглой. Присутствие *Enterobacter cloacae* обнаружено как микроскопически, так и в бактериальной культуре.



Рис. 4 Патологические изменения на мальпигиевом сосуде после искусственного инфицирования, с разрешением оболочки между дорзальным и метаподальным щитами. 1 увеличение правого мальпигиева сосуда, 2 дорзальный щит, 3 метаподальный щит (оригинальное изготовление, стереомикроскоп, увеличение: 20х).

Гибель клещей из лабораторных клеток составляла 0 – 45% (в среднем 15,9%). Гибель из лабораторных клеток при тестировании других изолированных микроорганизмов:

Aspergillus flavus – средняя гибель 22,5%;

Mucor ramosissimus – в среднем 25,2%;

Mucor indicus – в среднем 22,1%;

Mucor hiemalis – в среднем 18,6%;

Penicillium multicolor – в среднем 12,5%;

Penicillium simplicissimum – в среднем 18,6%;

Staphylococcus albus – в среднем 23,8%.

Все результаты обработаны статистически, показывая, что $p > 0,95$.

Enterobacter cloacae развилась 12 ч после инокулирования в агаре Колумбия. Колонии были круглыми, 2-4 мм ширины. Они были темного цвета со слизистой консистенцией. Бактерии были грамм-негативными, размером 0,5-1х1-2 μm . Наши результаты идентифицированы биохимическими тестами и утверждены Чешской коллекцией микроорганизмов (Университет Масарык, Брно).

Enterobacter cloacae очень хорошо развилась на кормительном агаре (1% вытяжки говядины, 1% пептоны, 0,5% хлорного натрия, 2% агара, pH 7,2).

Таблица I

Биохимическая активность *Enterobacter cloacae*

	Стандартные результаты видов <i>Enterobacter cloacae</i>	Результаты линий, изолированных из <i>Varroa destructor</i>
Уреаза	d	+
Индоп	-	-
Фенилаланинаминаза	-	-
H ₂ S	-	-
VP	+	+
Желатин (22 C)	-	-
Малонат	D	+
Дулзит	(d)	-
Рафиноза	+	+
Рамноза	+	+
Трехалоза	+	+
Манитол	+	+
Сахароза	+	+
Глюкоза	+	+

- < 10% положительных линий

(d) 11 to 50% положительных линий

d 51 to 89% положительных линий

+ > 90% положительных линий

Биохимическая активность видов *Enterobacter*

	Аргинингидролаза	Лизиндкарбоксилаза	Орнитиндкарбоксилаза	Адонитол	Сорбитол
<i>E. aerogenes</i>	-	+	+	+	+
<i>E. agglomerans</i>	-	-	-	-	d
<i>E. sakazakii</i>	+	-	+	-	-
<i>E. gergoniae</i>	-	+	+	-	-
<i>E. cloacae</i>	+	-	+	d	+
Линий Varroa	+	-	+	+	-

- < 10% положительных линий
- (d) 11 to 50% положительных линий
- d 51 to 89% положительных линий
- + > 90% положительных линий

Дискуссии

Enterobacter cloacae впервые описана ДЖОРДАНОМ в 1891 г. Д'ХЕРЕЛЛ описал эту бактерию как энтомопатогенную на полуострове Юкатан в 1910 г. Бактерию назвали *Coccobacillus acridiorum*. Данный штамм вызывал эпизоотии саранчи, которые массивно мигрировали с Мексики на Юкатан, а исследователи отметили изменения черного цвета и разложение эпителия органов насекомых и их гибель спустя 8 ч после инфицирования. Вирулентность бактерии возросла (Д'ХЕРЕЛЛ, 1911, 1912).

Д'ХЕРЕЛЛ применял бактерию, изолированную им при биологической борьбе с саранчей в Алжире, Аргентине и Тунисе в 1910-1912 гг (Д'ХЕРЕЛЛ, 1911, 1912). В период 1914-1916 гг СЕРЖЕН и д'ЕРИТИЕ обнаружили необходимость образования последовательных проходов, от 12 (по д'ХЕРЕЛЛу) до 50, так, чтобы насекомые погибали за 8 ч после инфицирования. С тех пор ни один штамм такой вирулентности не получен (О. ВАЙСЕР, 1966).

Нами удалось продемонстрировать, что *Enterobacter cloacae* из пищеварительных органов клеща *Varroa destructor* является для него патогенной. До сих пор данная бактерия не отмечена среди агентов биологической борьбы с *Varroa destructor* (Д. ЧАНДЛЕР, 2001).

Таксономически *Enterobacter cloacae* определена как грамм-негативная, аэробная и неспорулирующая. Ее противогенная структура представляет типичную мозаику. Оптимальная температура развития составляет 30-37 °С. Температура в пределах 100 °С уничтожает ее немедленно за 2 мин. Типичная биохимическая активность данного вида отмечена в литературе по специальности.

ЛИТЕРАТУРА

- Anderson D.L., Trueman J.W.H. (2000), *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species, *Experimental and Applied Acarology* 24, 165-189
- Bircher S. et al. (1990), Medical Microbiology, The C.V. Mosby Company, Maning, USA
- Camazine S., Liu T.P. (1998), A putative iridovirus from the honey bee mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans, *Journal of Invertebrate Pathology* 71, 177-178
- Chandler D., Sunderland K.D., Ball B.V., Davidson G. (2001), Prospective Biological Control Agents of *Varroa destructor* n.sp., an Important Pest of the European Honeybee, *Biocontrol Science and Technology* 11, 429-448
- Glinski Z.F., Jarosz J. (1990), Micro-organisms associated fortuitously with *Varroa jacobsoni*, *Microbios* 62, 59-68
- Goettel M.S., Johnson D.L. (1992), Environmental impact and safety of fungal biocontrol agents, in Lomer C.J. (Ed.), Biological control of locusts and grasshoppers, International Wallingford, pp. 356-361
- Hall I.M., Hunter D.K., Arakawa K.Y. (1971), The effect of the β -exotoxin fraction of *Bacillus thuringiensis* on the citrus red mite, *Journal of Invertebrate Pathology* 18, 359-362
- D'Herelle F.H. (1911), Sur une épizootie de nature bactérienne sévissant sur les sauterelles du Mexique, C.R.Acad.Sci. 152, 1413-1415
- D'Herelle F.H. (1912), Sur la propagation dans la République Argentine de l'épizootie des sauterelles, C.R.Acad.Sci. 152, 1413-1415
- Kanga L.H.B., James R.R., Boucias D.G. (2002), *Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potential microbial control agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite, *Journal of Invertebrate Pathology* 81, 175-184
- Kleespies R.G., Radtke J., Bienefeld K. (2000), Virus-like particles found in the ectoparasitic bee mite *Varroa jacobsoni* Oudemans, *Journal of Invertebrate Pathology* 15, 87-90
- Lindberg C.M., Melathopoulos A.P., Winston M.L. (2000), Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite, *Journal of economic entomology* 93(2), 189-198
- Liu T.P., Ritter W. (1988), Morphology of some microorganisms associated with the female mite *Varroa jacobsoni*, a survey by electron microscopy, in Needham E. et al. (Ed.), Africanized honeybees and bee mites, Ellis Horwood, Chichester, pp. 467-474
- Martignoni M.E. (1984), Baculoviruses: an attractive biological alternative, in Burges H.D. (Ed.), Chemical and Biological Controls in Forestry, Seattle Washington, pp. 55-67
- Weiser J.(1966) Nemoci hmyzu, *Academia*, Praha