

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Национальный исследовательский Томский государственный университет»

На правах рукописи



Голубева Евгения Павловна

ЗАРАЖЕННОСТЬ МЕДОНОСНЫХ ПЧЁЛ
МИКРОСПОРИДИЯМИ РОДА *NOSEMA* В ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

03.02.04 – Зоология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат биологических наук, доцент
Островерхова Надежда Васильевна

Томск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. МИКРОСПОРИДИИ р. <i>NOSEMA</i> У МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ: ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ПАРАЗИТО-ХОЗЯИННЫЕ ОТНОШЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	12
1.1. Морфологические, генетические и экологические особенности микроспоридий р. <i>Nosema</i>	13
1.2. Паразито-хозяйинные отношения «медоносная пчела – микроспоридии р. <i>Nosema</i> ».....	17
1.3. Распространение микроспоридий р. <i>Nosema</i> в популяциях медоносной пчелы <i>A. mellifera</i>	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1. Регион исследования.....	43
2.2. Алгоритм исследования.....	45
2.3. Материал исследования.....	47
2.4. Методы исследования.....	52
ГЛАВА 3. ЗАРАЖЕННОСТЬ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ МИКРОСПОРИДИЯМИ р. <i>NOSEMA</i> НА ПАСЕКАХ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ	56
3.1. Характеристика эпизоотологической обстановки на пасеках области.....	57
3.2. Распространение двух видов микроспоридий <i>N. apis</i> и <i>N. ceranae</i> у медоносных пчел на пасеках Томской области.....	64
3.3. Исследование зараженности медоносных пчел паразитами и патогенами и оценка сочетаемости нозематоза с изученными болезнями.....	72
ГЛАВА 4. МНОГОЛЕТНЯЯ И СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ЗАРАЖЕННОСТИ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ МИКРОСПОРИДИЯМИ р. <i>NOSEMA</i> НА ПАСЕКАХ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ.....	81
4.1. Многолетняя динамика зараженности пасек микроспоридиями <i>N. apis</i> и <i>N. ceranae</i> за период 2012–2017 гг.....	81

4.2. Сезонная динамика зараженности пчелиных семей разными видами <i>Nosema</i>	87
4.3. Оценка информативности микроскопического и молекулярно-генетического методов для анализа зараженности медоносных пчел микроспоридиями р. <i>Nosema</i>	93
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	100
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....	108
СПИСОК ТЕРМИНОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЙ.....	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	110
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	134

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Медоносные пчелы поражаются различными патогенами и паразитами. Возбудители болезней способствуют ослаблению здоровья колонии, зачастую приводя к развитию вторичных инфекций и гибели семьи (Гробов и др., 1987). Одними из наиболее опасных паразитов являются микроспоридии р. *Nosema* (Naegeli, 1857), вызывающие у медоносных пчел заболевание нозематоз.

Нозематоз – опасное инвазионное заболевание медоносной пчелы, широко распространенное во всем мире, периодически вызывающее массовую гибель пчел и пчелиных семей на пасеках и как следствие, ведущее к снижению продуктивности меда на пасеках (Гробов и др., 1987; Higes et al., 2006; Bourgeois et al., 2010).

В настоящее время у медоносных пчел, обитающих на территории Евразии, описано два вида микроспоридий р. *Nosema*, патогенных для пчел – *Nosema apis* Zander, 1909 (вызывает нозематоз типа А) и *Nosema ceranae* Fries, 1996 (вызывает нозематоз типа С). Микроспоридия *N. apis*, описанная Цандером в 1909 году (Zander, 1909), долгое время считалась единственным паразитом, вызывающим нозематоз у европейских медоносных пчел. Однако в 1996 году у *Apis mellifera* был выявлен новый (Fries et al., 1996) вид микроспоридии этого же рода – *N. ceranae*, который, как оказалось, широко распространен в популяциях медоносных пчел на всех континентах (Chen et al., 2008; Williams et al., 2008; Giersch et al., 2009; Invernizzi et al., 2009; Tapasztai et al., 2009; Bacandritsos et al., 2010; Chen, Huang, 2010; Fries et al., 2010; Santrac et al., 2010; Yoshiyama, Kimura, 2011; Nabian et al., 2011; Botias et al., 2012a; Chaimanee et al., 2012). В отличие от *N. apis* авторы отмечают более агрессивное воздействие микроспоридии *N. ceranae*, как на организм отдельных особей (Higes et al., 2007; Paxton et al., 2007; Williams et al., 2014), так и на пчелиную семью в целом (Higes et al., 2010a; Khoury et al., 2011; Martin-Hernández et al., 2011; Wolf et al., 2014).

В начале XXI века микроспоридии *N. ceranae* рассматривались как основная причина коллапса медоносных пчел в мире, однако в последнее время ведущая роль этого паразита в массовой гибели пчелиных семей после зимовки на пасеках в странах Европы и США остается спорной (Klee et al., 2007; Martin-Hernandes et al., 2007; Chen et al., 2008–2010; Fries, 2010; Gisder et al., 2010, 2017; Higes et al., 2010a; Neumann, Carreck, 2010; Paxton, 2010; Hedtke et al., 2011; Stevanovic et al., 2011; Dainat et al., 2012c; Razmaraii et al., 2013; Natsopoulou et al., 2015, 2016).

На территории России исследования зараженности микроспоридиями рода *Nosema* пчелиных семей и пасек относительно немногочисленны (Угрюмова и др., 2004; Морева и др., 2008; Домацкая и др., 2010; Макаров, 2010; Токарев и др., 2010; Непейвода и др., 2012; Пашаян, 2012; Чернышев, 2012; Зинатуллина и др., 2011, 2013; Ильина, Аладдина, 2014; Колбина и др., 2015; Зинатуллина, 2016, 2017). Вместе с тем, исследователями показано широкое распространение обоих видов возбудителей на пасеках большинства изученных ими районов. Первый случай заражения медоносных пчел на пасеках Сибири зарегистрирован в 2009 году на территории Тюменской области (Зинатуллина и др., 2011).

На территории Томской области систематические исследования зараженности медоносных пчел возбудителями нозематоза ранее не проводились, а имеющиеся данные фрагментарны и не дают целостного представления о распространении микроспоридий у медоносных пчел на пасеках Томской области (Конусова и др., 2012). Диагностика болезней пчел, включая нозематоз, осуществляется ОГБУ «Томской областной ветеринарной лабораторией» и районными ветеринарными лабораториями преимущественно при паспортизации пасек. Количества проводимых исследований недостаточно для корректной оценки эпизоотологической на пасеках области и характеристики распространенности возбудителей нозематоза в разных районах. Наконец, диагностика нозематоза проводится с использованием только световой микроскопии. До 2012 года нозематоз на пасеках Томской области диагностировали исключительно как нозематоз типа А. Поэтому весьма актуальными являются исследования зараженности пчелиных семей и пасек на

территории Томской области разными видами микроспоридий, относящихся к роду *Nosema*, а также определение эпизоотологической обстановки в отношении нозематоза и проведение анализа паразито-хозяйственных и межвидовых отношений.

Цель диссертационной работы – изучить зараженность разными видами микроспоридий р. *Nosema* медоносных пчел на пасеках Томской области.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи исследования:**

1. Изучить зараженность микроспоридиями р. *Nosema* медоносных пчел с пасек разных районов Томской области.
2. Выявить видовой состав паразитов р. *Nosema* и их распространение на территории Томской области.
3. Оценить влияние на развитие нозематоза других паразитов и патогенов, присутствующих в пчелиных семьях.
4. Изучить многолетнюю и сезонную динамику зараженности пчелиных семей и пасек микроспоридиями р. *Nosema*.
5. Оценить информативность микроскопического и молекулярно-генетического методов исследования для идентификации возбудителей нозематоза.

Объектом исследования являются микроспоридии рода *Nosema*, медоносная пчела, пчелиные семьи, пасеки.

Предметом исследования является зараженность медоносных пчел спорами *Nosema* на пасеках Томской области.

Научная новизна. В работе впервые с использованием молекулярно-генетических методов изучено распространение двух видов микроспоридий – *N. apis* и *N. ceranae* – у медоносных пчел на пасеках Томской области. Впервые идентифицирован возбудитель *N. ceranae* на территории Томской области с использованием метода ПЦР. Впервые в России проведен поиск ассоциаций зараженности пчел микроспоридиями р. *Nosema* с другими патогенами и паразитами медоносной пчелы с использованием молекулярно-генетических методов.

Теоретическая значимость. Работа вносит вклад в изучение эпизоотологии болезней *Apis mellifera* и паразито-хозяйинных отношений «микроспоридии – медоносная пчела», а также «микроспоридии – другие возбудители болезней медоносной пчелы».

В диссертации рассмотрены вопросы идентификации микроспоридий р. *Nosema* у медоносной пчелы, а именно информативность разных методов исследования (микроскопический, молекулярно-генетические); обобщены данные о распространении и видовом составе микроспоридий р. *Nosema* у медоносных пчел, обитающих на территории Томской области, с учетом географической локализации пасек; описаны особенности взаимодействия микроспоридий *N. apis* и *N. ceranae* согласно данным многолетней и сезонной динамики зараженности медоносных пчел спорами *Nosema*.

В целом, в итоге 6-летних исследований впервые приведены обобщенные данные по современному состоянию заболеваемости медоносных пчел нозематозом на территории Сибири, включающему оценку эпизоотологической ситуации на пасеках разной географической локализации.

Практическая значимость работы состоит в том, что значительно расширены сведения о распространении микроспоридий на пасеках Томской области. Выявлен видовой состав паразитов, встречающихся у медоносных пчел на территории Томской области. На основе данных по зараженности медоносных пчел и пчелиных семей микроспоридиями р. *Nosema*, а также другими паразитами и патогенами на территории Томской области составлены карты распространения основных болезней на пасеках разных районов области. Выявлены наиболее проблемные районы – очаги заболеваемости (распространение нескольких опасных болезней), где в первую очередь необходимо проведение мониторинговых исследований.

Полученные результаты являются основой разработки ежегодного плана противоэпизоотических мероприятий на пасеках, с учетом распространения возбудителей болезней в каждом конкретном районе Томской области.

Методология и методы исследования. Основной методологический подход – анализ зараженности медоносных пчел на разных уровнях (особь, пчелиная семья, пасека). Медоносная пчела – это биологическая и функциональная единица пчелиной семьи (Алпатов, 1948; Еськов, 1990; Кривцов, Гранкин, 2004). Несмотря на это, иммунитет отдельных особей пчел и пчелиной семьи, в целом, может отличаться. Отмечается ряд причин, способных препятствовать развитию болезней (например, породный состав как пчелосемьи в целом, так и генетические особенности отдельных особей).

Для характеристики видовой принадлежности микроспоридий кроме классического метода исследования (метод световой микроскопии) использован молекулярно-генетический метод.

Положения, выносимые на защиту:

1. Увеличение экстенсивности заражения медоносных пчел нозематозом по данным многолетних наблюдений (2012–2017 гг.) связано с распространением «ко-инвазии» двух видов микроспоридий.

2. Пик инвазии медоносных пчел микроспоридиями рода *Nosema* наблюдается в июне, низкий уровень зараженности весной (май) и осенью (сентябрь).

Апробация работы. Основные материалы диссертационной работы представлены и обсуждены на 4 научных конференциях, в том числе: IV Международная конференция «Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных» (Томск, 2015), V Межрегиональная конференция «Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке» (Новосибирск, 2015), II Международная конференция «Популяционная экология животных», посвященная памяти академика И.А. Шилова (Томск, 2016), XV съезд Русского энтомологического общества (Новосибирск, 2017).

Степень достоверности результатов исследований. Достоверность полученных результатов и выводов определяется прежде всего объемом исследованного материала (около 450 пчелиных семей и 2500 особей). Кроме

того, 6-летние исследования зараженности медоносных пчел микроспоридиями р. *Nosema* проводились на обширной территории Томской области (расстояние между крайними исследованными точками составляет 410 км), а также широкой географической представленностью объектов исследования (более 100 пасек, 80 населенных пунктов различных районов Томской области). Изучены северные и южные районы области, районы с хорошо развитым пчеловодством и изолированные пасеки.

При обработке первичных данных использованы стандартные методы исследования. Все молекулярно-генетические исследования проведены на поверенном оборудовании в лаборатории молекулярно-генетических исследований кафедры зоологии беспозвоночных БИ ТГУ (выделение ДНК, ПЦР). Выявление паразитов и патогенов, а также первичное исследование материала методом световой микроскопии проведено на базе бактериологического и вирусологического отделов ОГБУ «Томская областная ветеринарная лаборатория» (диагностика варраотоза, бактериальной и грибковой инфекции, обнаружение спор ноземы).

Полученные данные подтверждались результатами статистической обработки данных, с применением стандартных статистических методик.

Конкурсная поддержка работы. Исследования были поддержаны грантом РФФИ №13-04-98116р-а «Генетическая структура популяций медоносной пчелы в Томской области: исследование митохондриального генома и микросателлитный анализ» (2013–2015 гг.) (исполнитель); грантом РФФИ №16-44-700902р-а «Распространение болезней медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) на пасеках Томской области: генетический аспект» (2016–2018 гг.) (исполнитель).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ. Основные научные результаты диссертации представлены в 5 научных публикациях, изданных в рецензируемых научных журналах, в том числе 4 статьи в журналах из списка ВАК РФ, одна из которых опубликована в издании, включенном в международную базу Scopus.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов и обсуждения, заключения и выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 143 страницах, проиллюстрирована 29 таблицами и 16 рисунками, включая 4 таблицы Приложения А. Список литературы включает 213 источников, в том числе 155 работ зарубежных авторов.

Личный вклад автора. Работа выполнена на кафедре зоологии беспозвоночных Биологического института Национального исследовательского Томского государственного университета в период 2012–2018 гг., а также некоторые экспериментальные процедуры (микологические, паразитологические и бактериологические исследования) – на базе ОГБУ «Томская областная ветеринарная лаборатория» (ОГБУ ТОВЛ) (руководитель С. А. Татарина).

Общая концепция диссертации, ее структура, основные результаты, положения, выносимые на защиту, и выводы сформулированы лично автором и отражают его творческий вклад и точку зрения на рассматриваемую проблематику. Автором лично проведена основная часть экспериментальных исследований (в том числе микроскопических, паразитологических и молекулярно-генетических) и анализ полученных данных диссертации. Все совместно выполненные по теме диссертации исследования проведены под руководством кандидата биологических наук Н. В. Островерховой и касались таких аспектов, как постановка задач, обработка материала, систематизация, интерпретация и обобщение полученных результатов, написание публикаций и представление результатов исследования на научных конференциях. Личный вклад автора в исследование составляет более 90%.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю кандидату биологических наук, доценту Н. В. Островерховой за постоянное внимание, консультации при выполнении настоящей работы и помощь при оформлении диссертации, старшему преподавателю кафедры зоологии беспозвоночных О. Л. Конусовой за неоценимые советы и участие в обсуждении полученных результатов, всем сотрудникам кафедры зоологии

беспозвоночных ТГУ и её руководителю доктору биологических наук, профессору В. Н. Романенко за ценные советы и поддержку в процессе работы над диссертацией, С. А. Россейкиной, Д. В. Козлову и всем пчеловодам Томской области, обеспечившим подготовку и сбор материала на пасеках, О. В. Барсуковой, ведущему ветеринарному врачу бактериологического отдела ОГБУ «ТОВЛ» за консультацию и помощь в проведении микологических и бактериологических исследований.

ГЛАВА 1. МИКРОСПОРИДИИ р. *NOSEMA* У МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ: ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ПАРАЗИТО-ХОЗЯИННЫЕ ОТНОШЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Микроспоридии являются внутриклеточными облигатными, родственными грибам, паразитами, освоившими широкий круг хозяев от протистов до млекопитающих. Особый интерес представляют энтомопатогенные микроспоридии, с одной стороны, как агенты биологических методов борьбы с вредными видами, с другой как паразиты хозяйственно-значимых насекомых, вызывающие серьезные заболевания и наносящие урон пчеловодству и шелководству (Исси, 1986, 2002; Симакова, Панкова, 2008; Симакова и др., 2011; Лукьянцев, Симакова, 2014; Andreadis et al., 2012). К таким энтомопатогенным паразитам относятся микроспоридии рода *Nosema*.

В настоящее время род *Nosema* насчитывает более 80 видов (Kirk et al., 2008), которые паразитируют у животных разного систематического положения, но наиболее широко распространены у наземных насекомых (Sokolov, Issi, 1997).

Трудами многочисленных авторов у медоносной пчелы *Apis mellifera* идентифицировано несколько видов микроспоридий рода *Nosema*, вызывающих заболевание нозематоз. Первый вид *Nosema apis* был описан Цандером более 100 лет назад и до последнего времени считался единственным специфическим паразитом медоносной пчелы (Zander, 1909). Однако в 1996 году у *A. mellifera* был выявлен другой вид рода *Nosema* – микроспоридия *Nosema ceranae* (Fries et al., 1996). Возбудитель *N. apis* вызывает у пчел нозематоз типа А, тогда как *N. ceranae* характеризуется более агрессивным воздействием на пчел по сравнению с *N. apis* и вызывает нозематоз типа С, который отличается по ряду признаков (Higes et al., 2006, 2010b; Klee et al., 2007; Paxton et al., 2007; Huang, Solter, 2013). В 2017 году у медоносных пчел, обитающих на территории Уганды (Восточная Африка), был идентифицирован еще один вид ноземы – *N. neumannii* n. sp. (Chemurot et al., 2017).

1.1. Морфологические, генетические и экологические особенности микроспоридий р. *Nosema*

Морфологическая характеристика видов *Nosema*, паразитирующих у пчел. Виды микроспоридий р. *Nosema* характеризуются следующими морфологическими особенностями (рисунок 1).

При световой микроскопии споры *N. apis* овальные, широкие, сильно преломляют свет и имеют размер $4,3\text{--}5,5 \times 2,2\text{--}3,5$ мкм (рисунок 1, С). Оболочка гладкая или слегка волокнистая, трехслойная, толщиной 0,2–0,3 мкм (Гробов и др., 1997; Зинатуллина и др., 2013). У одного полюса споры различают зонтикоподобный пластинчатый поляропласт (Paxton, 2010).

Споры *N. ceranae* узкие, овальные, стержневидные, довольно однородными по форме, имеют средний размер $4,24 \times 2,16$ мкм (рисунок 1, В), некоторые споры с заостренным концом (Зинатуллина и др., 2013; Chen et al., 2009, 2010).

Споры *N. neumannii* овальной формы, несколько меньших размеров по сравнению с *N. apis* и *N. ceranae* (рисунок 1, А). Их длина составляет $2,36 \pm 0,14$ мкм, ширина – $1,78 \pm 0,06$ мкм (Chemurot et al., 2017).

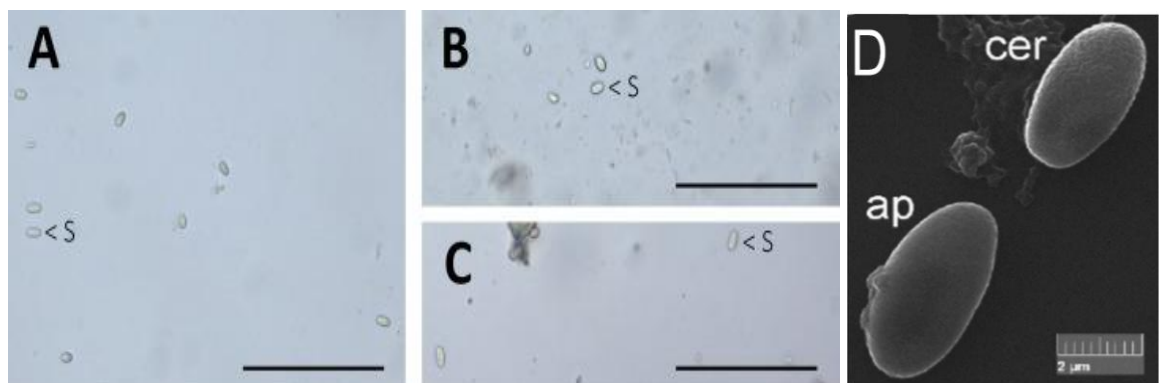


Рисунок 1 – Споры микроспоридий (S) р. *Nosema* при световой (А–С) и сканирующей электронной микроскопии (D): А – *Nosema neumannii* n. sp., В – *Nosema ceranae* и С – *Nosema apis*; ap – *N. apis*; cer – *N. ceranae* (из Ptasińska et al., 2014; Chemurot et al., 2017)

В отличие от *N. apis* споры *N. ceranae* выглядят более рельефными при исследовании с помощью электронного микроскопа (рисунок 2). Отличительными особенностями этих видов микроспоридий являются ширина борозд,

расположенных на поверхности спор (35,50 и 28,06 нм, соответственно), а также расстояние между ними (114,54 и 83,62 нм, соответственно) (Ptaszyńska et al., 2014). Количество витков полярной трубки у *N. apis* 33–34, тогда как у *N. ceranae* количество витков варьирует от 18 до 23 (Гробов и др., 1997; Fries et al., 1996; Chen et al., 2009). Для спор *N. neumannii* характерно наименьшее количество витков – 10–12 (Chemurot et al., 2017).

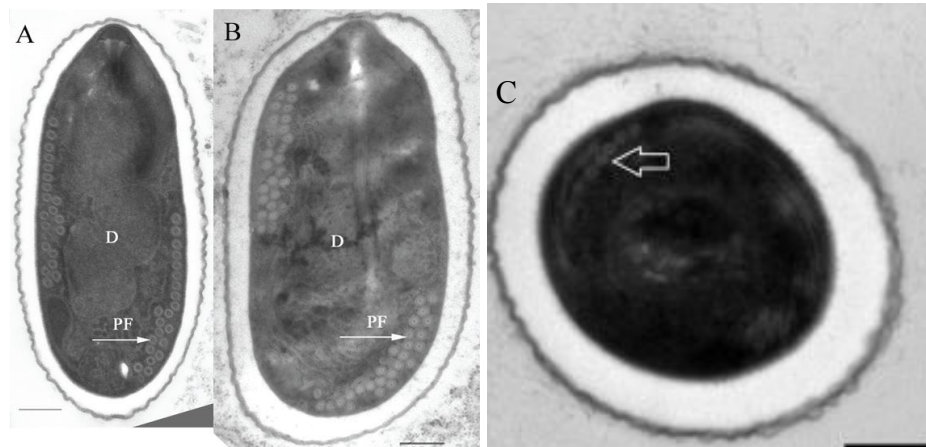


Рисунок 2 – Споры микроспоридий р. *Nosema* под электронным микроскопом: А – *Nosema ceranae*; В – *Nosema apis*; С – *Nosema neumannii* n. sp. Примечание. D – диплокария; PF – витки полярной нити (указаны стрелками); Ex – экзоспор; En – эндоспор. Указан масштаб – 500 нм (из Paxton, 2010; Chemurot et al., 2017)

Таким образом, определение видовой принадлежности спор *Nosema* на основании данных световой микроскопии является сложным, так как крупные споры *N. ceranae* и *N. neumannii* могут соответствовать размерам спор *N. apis*. Диагностическим признаком, наиболее информативным при определении различных видов р. *Nosema*, является количество витков полярной нити, что идентифицируется только методом электронной микроскопии (Burges et al., 1974).

Генетические особенности видов *N. apis* и *N. ceranae*. Сравнительный геномный анализ двух видов микроспоридий – *N. apis* и *N. ceranae*, проведенный рядом авторов, показал значительное структурное сходство геномов, например, идентифицировано большое число ортологичных генов и белков. Вместе с тем, у двух видов микроспоридий выявлены различия по ключевым белкам, участвующим в некоторых биологических (энергетических, регуляционных,

реакциях врожденного иммунитета) процессах в клетках хозяина. В связи с этим предполагается, что генетические особенности *N. ceranae* обуславливают более агрессивное поведение возбудителя по отношению к хозяину, что способствует благоприятному развитию паразита и может приводить к гибели медоносной пчелы (Cornman et al., 2009; Chen et al., 2013; Vidau et al., 2014).

При оценке внутривидовой генетической изменчивости *N. ceranae* выявлен высокий уровень внутривидового полиморфизма. Авторами описан широкий спектр гаплотипов паразита, что объясняет существование различных штаммов *N. ceranae*, заражающих пчелиные семьи (Gomez-Moracho et al., 2014; Van der Zee et al., 2014). Так, гаплотипы *N. ceranae*, обнаруженные в США, Канаде, Южной Америке, Турции и на Гавайских островах, отличаются от найденных в Испании, Германии и Китае, и вероятно, штаммы паразита могут отличаться по степени вирулентности (Williams et al., 2008; Branchiccela et al., 2017). Вместе с тем, некоторые авторы считают, что никаких патологоанатомических различий у медоносной пчелы, вызываемых разными штаммами *N. ceranae*, не выявляется, а выживаемость инфицированных пчелиных семей отличается незначительно (Van der Zee et al., 2014).

Устойчивость микроспоридий к факторам окружающей среды. Факторы окружающей среды оказывают огромное влияние на развитие, распространение и жизненные циклы различных видов организмов, в том числе и паразитов (Bush et al., 2001). Несмотря на то, что для микроспоридий, в частности, относящихся к р. *Nosema*, показана способность сохранять свою выживаемость, жизнедеятельность и инфекционность в различных условиях (например, отмечена способность вида *N. ceranae* сохранять споры целый год) (Kasprzak, Topolska, 2007; Chaimanee et al., 2012; Higes et al., 2013), выявлена зависимость жизнедеятельности паразита от среднегодовой температуры и влажности окружающей среды (Malone et al., 2001; Fenoy et al., 2009; Nabian et al., 2011; Chen et al., 2012). Кроме того, исследователями отмечается влияние температуры на жизненный цикл микроспоридий р. *Nosema*. Так, оба паразита *N. apis* и *N. ceranae* хорошо развивались и проходили полный цикл развития при температуре 33,0°C,

а изменение температуры неблагоприятно сказывалось на развитии обоих видов. Вместе с тем, только возбудитель *N. ceranae* был способен завершить свой жизненный цикл при температуре 37,2°C, тогда как развитие *N. apis* в клетках хозяина было подавлено (Martín-Hernández et al., 2009; Higes et al., 2010b). Кроме того, культивирование спор *N. ceranae* в течение 6 часов при температуре 60°C не влияло значительно на жизнеспособность спор, выживаемость которых составила около 90%, тогда как споры *N. apis* погибли в этих условиях в течение 15 минут. Наконец, выдерживание спор *N. ceranae* в сухой воздушной среде при 40–49°C в течение периода от 12 часов до одной недели не изменяло жизнеспособность паразита (Fenoy et al., 2009), тогда как жизнеспособность спор *N. apis* значительно снижалась в сухой воздушной среде в течение 3,5 дней (Malone et al., 2001).

Противоположная картина наблюдалась в экспериментах, проводимых при низких температурах, включая даже кратковременное замораживание, когда резко снижалась жизнеспособность спор *N. ceranae* (Fenoy et al., 2009; Fries et al., 2010). Так, после воздействия низких температур (+4°C) в течение 4-х дней количество спор *N. apis*, способных к прорастанию, составило 80%, тогда как спор *N. ceranae* – менее 10%. Кроме того, небольшое количество спор *N. ceranae* имело слишком короткие выброшенные полярные трубки, то есть были неспособны продолжить жизненный цикл (Gisder et al., 2010). В связи с этим предполагается, что во время зимовки возможна передача спор *N. apis* внутри пчелиной семьи, тогда как распространение спор *N. ceranae* между членами семьи может быть ограничено из-за низких температур вне клуба (Gisder et al., 2010).

Таким образом, выявлена разная чувствительность спор двух видов микроспоридий при различных температурах. Считается, что возбудитель *N. ceranae*, сохраняющий жизнеспособность при высоких температурах и обладающий лучшими адаптациями для завершения своего жизненного цикла при разных температурах, характеризуется бóльшим биотическим потенциалом по сравнению с *N. apis* и может быть отнесен к эвритермному виду в отличие от stenотермного вида *N. apis* (Martín-Hernández et al., 2009; Higes et al., 2010b; Gisder et al., 2017).

1.2. Паразито-хозяйинные отношения

«медоносная пчела – микроспоридии *p. Nosema*»

Жизненный цикл микроспоридий *p. Nosema*. Как отмечалось выше, жизненный цикл микроспоридий, являющихся внутриклеточными паразитами, полностью проходит в клетках хозяина, при этом поражаются различные органы и ткани. Единственной стадией, способной находиться во внешней среде и сохранять жизнеспособность, является спора. Как отмечает И. В. Исси и В. Н. Воронин (2007), из окружающей среды инфекционные споры заглатываются хозяином, затем прорастают путем экстружии полярной нити, при этом полярные трубки паразита пробивают стенки клетки хозяина и по ним вводят содержимое спор (спороплазмы) в клетки средней кишки (рисунок 3).

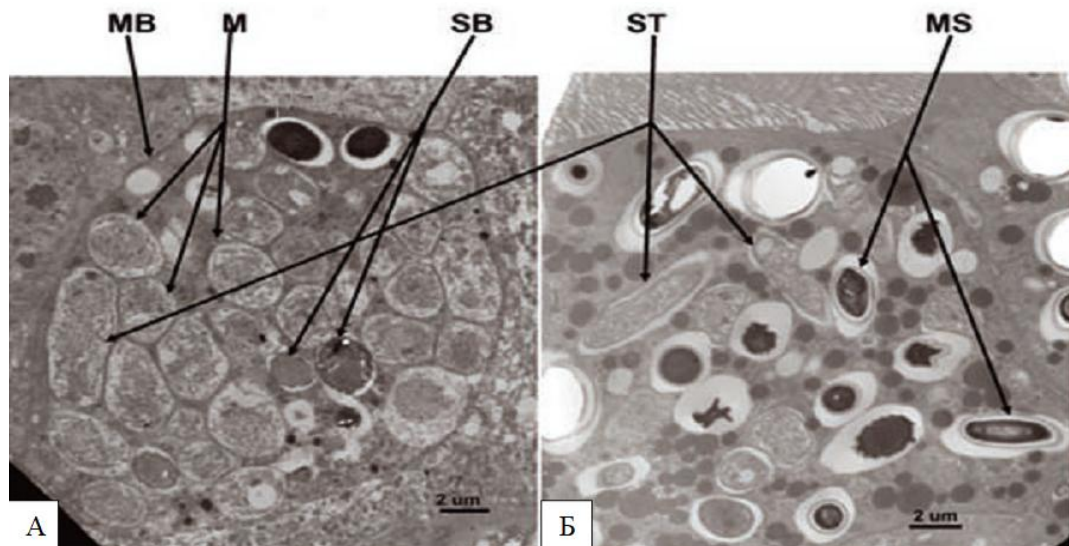


Рисунок 3 – Микроспоридии *N. ceranae* на разных стадиях жизненного цикла (электронная микроскопия). Показаны две эпителиальные клетки (А, Б) средней кишки зараженной медоносной пчелы (из Chen et al., 2010). Примечание. М – меронт, ST – споронт, SB – споробласт, MS – зрелые споры, MB – мембрана клетки хозяина.

Наиболее хорошо изучен жизненный цикл *N. apis*, который протекает в течение 48–72 часов (рисунок 4) (Гробов и др., 1987). После попадания спор ноземы в кишечник пчел через 2–3 часа происходит адгезия единичных спор *N. apis* на поверхности слизистой оболочки средней кишки пчел. Затем начинается

процесс проникновения микроспоридий в эпителиальные клетки слизистой оболочки кишечника и интенсивное развитие в них паразита. Через 72 часа после заражения происходит разрушение ворсинок средней кишки и выход новых спор *N. apis* в просвет кишечника.

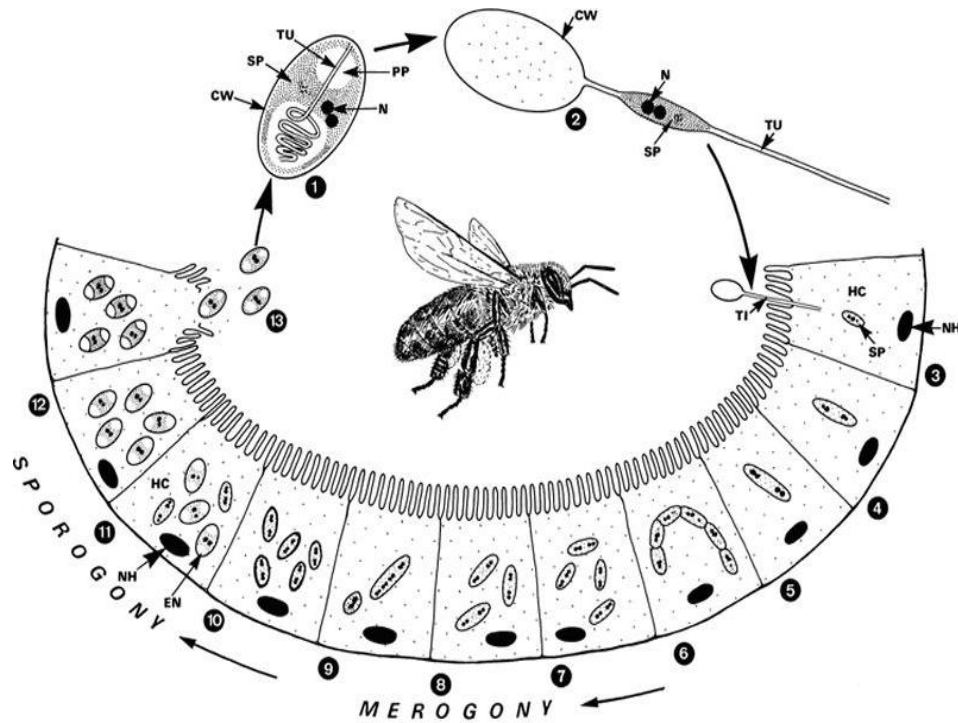


Рисунок 4 – Схема жизненного цикла *N. apis* (из Mehlhorn, 2001): 1 – инвазионная спора с диплокарионом; 2, 3 – после заглатывания споры в кишечнике пчелы полярная трубка выстреливает и пробивает перитрофическую мембрану и плазмалемму клетки кишечника, спороплазма впрыскивается в клетку хозяина сквозь полярную трубку; 4–10 – мерогония: спороплазма растет и делится, проходя четырехъядерную стадию; 11–12 – спорогония: последнее деление приводит к диплокариотической стадии (10), и начинается инцистирование, которое инициирует формирование спор; 13 – зрелые споры: инвазионные споры выходят из разрушенной клетки хозяина в пространство кишки. После нескольких циклов все органы пчелы оказываются пораженными паразитом. Примечание. EN – инцистирование, HC – клетка хозяина, PP – поляропласт, TU – полярная трубка, SP – спороплазма, CW – стенка споры, N – ядро паразита, NH – ядро клетки хозяина.

По сравнению с *N. apis*, жизненный цикл *N. ceranae* недостаточно изучен. Известно, что развитие возбудителя осуществляется примерно в течение четырех дней, затем паразит начинает воспроизведение дочерних спор. В итоге зараженная клетка разрывается, и из нее выходит большое количество спор (Higes et al., 2007).

Микроспоридии р. *Nosema* поражают наименее защищенные эпителиальные клетки задней части средней кишки, вызывая деструктивные изменения клеток (отслаивается перитрофическая мембрана) и тканей кишки, что ухудшает способность переваривать и усваивать пищу хозяином (Higes et al., 2007; Fries, 2010; Dussaubat et al., 2012).

Патологоанатомические изменения кишки включают следующие процессы: изменение размера ядра клетки, дистрофию эпителиальных клеток желудка, нарушение клеточных мембран, наличие вакуоли в цитоплазме и др. (Higes et al., 2007, 2009; Chen et al., 2009; García-Palencia et al., 2010). При этом отмечается способность микроспоридий подавлять защитные реакции хозяина путём выработки специфических белков (Тимофеев и др., 2016). Постепенно пораженные клетки отторгаются в просвет кишечника, скорость разрушения значительно превосходит восстановление эпителия.

В настоящее время отсутствуют доказательства того, что микроспоридии р. *Nosema* могут завершить полный жизненный цикл за пределами кишечника пчелы. Это следует из того, что различные стадии развития микроспоридий *N. apis* и *N. ceranae* обнаруживаются только в эпителиальных клетках кишечника (Martín-Hernández et al., 2009; Bourgeois et al., 2012; Huang, Solter, 2013). Вместе с тем, споры возбудителя были выявлены не только в тканях средней кишки, но и в других органах, например, в мальпигиевых сосудах, жировом теле, гипофарингеальных и слюнных железах рабочих пчел (Chen et al., 2009; Copley et al., 2012; Ptaszynska et al., 2012), однако количество паразитов в различных тканях и железах зараженной пчелы варьирует (Chen et al., 2009). Вместе с тем, выявлены различия в локализации двух видов микроспоридий *Nosema* в организме хозяина. Так, возбудитель *N. apis* регистрируется преимущественно в кишечнике, вызывая изменения в эпителиальных клетках средней кишки (Токарев и др., 2010; Fries, 1988; de Graaf, Jacobs, 1991; Gisder et al., 2010). В органах репродуктивной системы трутней различных возрастов не обнаружено каких-либо морфологических признаков инфекции, но методом ПЦР идентифицирована ДНК *N. apis*, причем споры *N. apis* обнаружены в эякуляте трутней только пожилых

возрастов, что может быть связано либо фекальным загрязнением эндофаллуса, либо с кровотечением после повреждения ткани (Peng et al., 2015).

В отличие от *N. apis*, микроспоридии *N. ceranae* поражают бóльший спектр органов и тканей и обнаруживаются в гипофарингиальных и слюнных железах, мальпигиевых сосудах, жировом теле, головном мозге, груди, семяприемниках, яичниках и яйцах (Chen et al., 2009; Gisder et al., 2010). ДНК микроспоридии *N. ceranae* обнаружена во всех исследованных тканях и органах маток различных возрастов, включая личинок, только что вылупившихся и спарившихся маток (Traver, Fell, 2012). Так, после заражения маток во время процесса спаривания с инфицированными трутнями, споры *N. ceranae* обнаруживались впоследствии во многих тканях, тогда как распространение спор *N. apis* было ограничено только кишечником (Roberts et al., 2015).

Таким образом, жизненные циклы микроспоридий достаточно сложные, особенно цикл развития *N. ceranae*, о чем свидетельствует локализация спор паразита в различных органах и тканях медоносной пчелы. Кроме того, на цикл развития паразита могут оказывать влияние факторы окружающей среды, изменяя течение нозематозного процесса.

Пути передачи паразита и восприимчивость пчел к инвазии. Источником распространения нозематоза, как считают О. Ф. Гробов, А. К. Лихотин (1989) и А. Б. Сохликов (1994) являются больные пчелы, которые заражают мед, пергу, соты и воду спорами ноземы, выделяя их наружу с испражнениями. Заражение происходит при контакте с больными пчелами как своей семьи, так и других семей, с инфицированным материалом улья и окружающей среды, например, через общие поилки и пыльцу растений, при блуждании зараженных пчел, а также через пчеловодческий недезинфицированный инвентарь (Fries, Camazine, 2001; Higes et al., 2008). Внутри семьи здоровые пчелы заражаются микроспоридиями перорально при употреблении меда и перги, содержащих споры, или при очистке ячеек сотов, загрязненных испражнениями больных пчел (Smith, 2012). ДНК паразита *N. ceranae* обнаружена в маточном молочке (Traver, Fell, 2012), то есть при

вскармливании личинок может происходить естественный путь передачи возбудителя (Huang, 1991).

Установлено, что передача спор микроспоридий может проходить половым путем при спаривании матки с зараженным трутнем, а также при искусственном оплодотворении зараженной спермой. Так, ДНК микроспоридий *Nosema* в образцах спермы обнаружена у 69% трутней, исследованных на зараженность возбудителями нозематозом (Roberts et al., 2015), причем, как указывалось выше, споры *N. apis* выявлялись у трутней старшего возраста (20–25 дней), но не регистрировались в образцах более молодых особей (9, 13 и 15 суток) (Peng et al., 2015). Вместе с тем, семенная жидкость трутней содержит ряд иммунных белков, обладающих противогрибковой активностью в отношении спор *N. apis* (Baer et al., 2009). Белковая фракция семенной жидкости вызывает внеклеточное прорастание спор, что нарушает жизненный цикл *N. apis*, в результате чего риск передачи заболевания во время спаривания снижается (Peng et al., 2016).

Нозематозом заражаются как взрослые члены семьи, так и личинки и предкуколки, причем наибольшей устойчивостью обладают трутни и матки (Гробов и др., 1987; Traver, Fell, 2011, 2012; Daren et al., 2015; Eiri et al., 2015). В свите матки, как и на расплоде, преобладают здоровые особи, однако, чем выше степень поражения рабочих пчел, тем выше риск передачи спор матке (Higes et al., 2009). Матки младших возрастов более восприимчивы к *N. ceranae*, что связано с иммунным ответом, который меняется с возрастом у маток (Chaimanee et al., 2014). Поэтому количество маток, зараженных *N. ceranae*, было выше, чем число маток, зараженных *N. apis*. Количество ДНК микроспоридий *Nosema*, выделенной из зараженных маток, превысило исходное количество ДНК возбудителя, полученной из семенной жидкости при осеменении, что может указывать на успешное размножение микроспоридий в хозяине (Roberts et al., 2015). Инвазия яичников и семяприемников позволяет предположить возможность вертикальной передачи *N. ceranae* (Traver, Fell, 2012). Вместе с тем, при исследовании 400 яиц, отложенных матками, искусственно оплодотворенными зараженной спермой, возбудители нозематоза выявлены не были (Roberts et al., 2015).

При нозематозе типа А, вызываемом *N. apis*, пчелы старших возрастов более предрасположены к заражению, чем молодые. Такая же картина наблюдается и при нозематозе типа С, а именно отмечается небольшое количество спор *N. ceranae* в пчелах отводка по сравнению с остальными пчелами семьи. Вероятно, это связано с тем, что в отводке преобладают молодые особи, а в семье со старой маткой остаются пчелы старших возрастов (Зинатуллина, 2017).

Интенсивность заражения спорами *N. ceranae* не отличается между молодыми пчелами, только что вышедшими из ячейки, и пчелами, выполняющими работу в улье (Traver et al., 2012), тогда как у пчел-фуражиров она самая высокая (Higes et al., 2008; Meana et al., 2010; Botías et al., 2012; Martín-Hernández et al., 2012; Smart, Sheppard, 2012). Зараженные пчелы-фуражиры распространяют споры на продукты медосбора, которые в дальнейшем доставляются в улей, и потребляется пчелиной семьей, что способствует распространению инвазии.

Таким образом, тесное общение пчел между собой в улье может способствовать быстрой передаче возбудителя нозематоза. Вместе с тем, существует ряд факторов, препятствующих распространению инфекции внутри семьи. К таким факторам относятся иммунитет как отдельно взятой пчелы, так и семьи, в целом, генетические особенности пчел (различные подвиды пчел характеризуются различной естественной устойчивостью к нозематозу) и др. (Харитонов и др., 2006, 2012).

Влияние микроспоридий на жизнедеятельность пчелиной семьи и поведение медоносных пчел. Медоносные пчелы являются общественными насекомыми, поэтому воздействие микроспоридий *p. Nosema* на отдельные особи будет отражаться на жизнедеятельности пчелиной семьи в целом. С одной стороны, предполагается значительное влияние обоих видов микроспоридий *p. Nosema* на жизнеспособность пчелиных семей, а с другой стороны, только возбудитель *N. ceranae* рассматривается одним из потенциальных кандидатов (наряду с клещом *Varroa destructor*, вирусами и бактериями), вовлекаемых в массовую гибель пчелиных семей во время и после зимовки (Сохликов, 1994;

Сохликов и др., 2005; Higes et al., 2007; Klee et al., 2007; Martín-Hernández et al., 2007; Higes et al., 2008, 2009; Bacandritsos et al., 2010; Borneck et al., 2010; Neumann, Carreck, 2010; Hatjina et al., 2011; Invernizzi et al., 2011; Soroker et al., 2011). Так, высокий уровень вирулентности *N. ceranae* отмечен у пчел в зараженных семьях на территории Испании (Higes et al., 2008), хотя высокая смертность медоносных пчел регистрировалась не на всех пасеках (Cox-Foster et al., 2007; Pajuelo et al., 2008; Invernizzi et al., 2009). Наконец, некоторыми исследователями отрицается связь между массовой гибелью пчелиных семей и нозематозом. Так, согласно многолетним наблюдениям, проведенным на пасеках Германии, не установлено никаких существенных различий между показателями смертности незараженных и зараженных нозематозом пчелиных семей (Gisder et al., 2010, 2017). Таким образом, паразитическое воздействие микроспоридий на медоносную пчелу до конца не выяснено, и роль *N. ceranae* в массовой гибели пчелиных семей остается спорной (Genersch et al., 2010; Gisder et al., 2010; Stevanovic et al., 2011; Dainat et al., 2012a, b).

Вместе с тем, установлены различия в патогенности и вирулентности двух видов возбудителей, а также симптомах болезни при нозематозе типа А и С. Так, микроспоридия *N. apis*, вызывает разрушение клеток кишечника, что приводит к поносу и гибели пчел, а иногда и целых семей (Гробов и др., 1987; Гробов, Лихотин, 1989). Этот возбудитель влияет на продолжительность жизни трутней, причем их смертность значительно возрастает, начиная с 16-дневного возраста, и достигает 80% при их возрасте 24–25 суток, тогда как в группе незараженных трутней старшего возраста процент погибших особей составил около 45% (Peng et al., 2015). Кроме того, инвазированные трутни быстро теряют способность к оплодотворению по сравнению с незараженными.

Возбудитель *N. ceranae* отличается более высоким уровнем патогенности и характеризуется способностью сохранять споры целый год по сравнению с видом *N. apis* (Higes et al., 2010b). В связи с быстрым распространением *N. ceranae* по всему миру, остро встал вопрос о характере влияния этого паразита на европейскую медоносную пчелу *A. mellifera*. Ряд авторов изучили влияние на

разных уровнях – семьи, особи, ткани, клетки, а также на молекулярном уровне (Klee et al., 2007; Martin-Hernández et al., 2007; Chen et al., 2008, 2009; Forsgren, 2009; Gisder et al., 2010; Stevanovic et al., 2011; Razmaraii et al., 2013).

Присутствие в улье микроспоридии *N. ceranae* может негативно влиять на численность особей в пчелиной семье, которая в значительной степени зависит от продолжительности жизни рабочих пчел (Higes et al., 2007, 2008; Paxton et al., 2007; Botías et al., 2010, 2012a; Soroker et al., 2011; Khoury et al., 2011; Martin-Hernández et al., 2011). С одной стороны, снижается численность взрослых особей, с другой – заражение пчел на личиночной стадии приводит к значительному сокращению их жизни (Eiri, 2015). Так, пчелы, зараженные спорами ноземы, начинали преждевременно участвовать в сборе пыльцы и жили примерно на 9 дней меньше по сравнению со здоровыми (Goblirsch et al., 2013). В результате высокой смертности пчел-фуражиров, зараженных *N. ceranae*, молодые пчелы раньше переходили на следующую стадию развития (Amdam, Omholt, 2003; Higes et al., 2008, 2010). Со временем пчелиная семья уже не может справиться с заменой погибших пчел, в результате чего наблюдается уменьшение численности пчелосемьи (Khoury et al., 2011), что является единственным характерным признаком нозематоза типа С, вызываемого *N. ceranae* (Higes et al., 2008; 2011; Botías et al., 2010, 2012a; Eischen et al., 2012).

Кроме того, возбудитель нозематоза *N. ceranae* оказывает негативное воздействие на поведение пчел-фуражиров: возвращение в улей зараженных пчел занимает больше времени, чем здоровых; большое количество зараженных пчел вообще не возвращается в семью (Mayack, Naug, 2009, 2010; Martin-Hernández et al., 2011; Wolf et al., 2014). Предполагается, что такое поведение зараженных особей является адаптивным поведением пчел и способом удаления паразитов и патогенов из пчелиной семьи. В результате, вблизи улья при заражении нозематозом типа С не удастся обнаружить мертвых или ползающих пчел (Higes et al., 2008, 2009, 2010a; Borneck et al., 2010).

При исследовании медоносных пчел, зараженных разными видами микроспоридий в отличие от *N. apis*, для возбудителя *N. ceranae*, выявлена более

высокая степень вирулентности, а также высокая интенсивность воспроизведения спор (Higes et al., 2007; Paxton et al., 2007; Williams et al., 2014). Например, при экспериментальном заражении пчел спорами *N. ceranae* гибель пчел за одну неделю составила более 94%, а на 8 сутки после заражения отмечена гибель всех особей (Higes et al., 2007). Несмотря на более высокую вирулентность микроспоридий *N. ceranae*, количество спор, необходимых для заражения пчелы, примерно одинаковое для двух видов микроспоридий (Forsgren, Fries, 2010).

Как выше указывалось, микроспоридия *N. ceranae* представляет собой более патогенный возбудитель по сравнению с *N. apis* как на индивидуальном уровне, так и на уровне пчелиной семьи в целом (Botías et al., 2013). Одной из причин высокой вирулентности *N. ceranae* рассматривается ее хорошая адаптированность к повышению температур по сравнению с *N. apis*; этим можно объяснить быстрое распространение возбудителя *N. ceranae* (Fenoy et al., 2009; Martín-Hernández et al., 2009). Однако данные по сравнительной характеристике вирулентности двух видов микроспоридий, а также паразито-хозяйинных отношениях и межвидовых взаимоотношениях микроспоридий немногочисленны и противоречивы. Так, в одних экспериментах при заражении пчел двумя видами микроспоридий выявлено преобладание возбудителя *N. ceranae* над микроспоридией *N. apis* (Martín-Hernández et al., 2011; Yoshiyama, Kimura, 2011), тогда как в других – преимущества *N. ceranae* над *N. apis* не отмечалось (Forsgren, Fries, 2010; Milbrath et al., 2015).

На уровне ткани паразит, в первую очередь, воздействует на пищеварительную систему и вызывает перерождение тканей (Losey, Vaughan, 2006; Dussaubat et al., 2012). Кроме того, наблюдается значительное подавление иммунного ответа (Antúnez et al., 2009).

При энергетическом стрессе, вызываемом в пчелосемьях возбудителем *N. ceranae*, происходит снижение уровня сахара в гемолимфе (Mayack, Naug, 2010; Martín-Hernández et al., 2011), что является вероятной причиной укорочения продолжительности жизни пчел и снижения выживаемости пчелиных семей (Mayack, Naug, 2009; Dainat et al., 2012b). При этом в некоторых случаях отмечено

повышение потребления сахарозы зараженными пчелами (Mayack, Naug, 2009; Martín-Hernández et al., 2011), тогда как в других случаях таких изменений не выявлено (Aufauvre et al., 2012; Williams et al., 2014). Кроме того, отмечается снижение содержания белка в гипофарингеальных железах (Suwannapong et al., 2010).

На клеточном уровне на 7 день после заражения пчел зарегистрировано снижение уровня вителлогенина (Antúnez et al., 2009), увеличение концентрации ювенильного гормона (Lin et al., 2009; Higes et al., 2010) и повышение уровня феромона этилолеата (Dussaubat et al., 2010).

На молекулярном уровне у медоносных пчел отмечено влияние *Nosema* spp. на экспрессию генов, в частности генов, участвующих в процессах обмена веществ в тканях жирового тела рабочих пчел, в метаболизме липидов и в формировании структуры мембраны митохондрий (Kralj, Fuchs, 2010; Holt et al., 2013; Toplak et al., 2013).

Таким образом, как в экспериментальных, так и в естественных условиях обитания пчел, микроспоридии, особенно *N. ceranae*, оказывают значительное влияние на жизнедеятельность пчелиной семьи, изменяет поведение пчел, а также физиологию пораженных клеток и тканей (Higes et al., 2013).

Симптоматика и диагностика нозематоза пчел. Характерными признаками нозематоза типа А, вызываемого микроспоридией *N. apis*, является появление поноса, беспокойство и гибель пчел, а иногда и целых семей в зимний период и после зимовки (Гробов и др., 1987; Гробов, Лихотин, 1989). Заболевшие пчелы отрываются от клуба и ползают по гнезду, падают на дно улья и погибают (Смирнов, Сохликов, 2002; Fries, 2010). Во время зимовки в больных семьях наблюдается большое количество подмора. Высохшие испражнения остаются на сотах, на стенках улья и вставной доске в виде сплошных полос или подтеков (Гробов, Лихотин, 1989). В таких пятнах содержится огромное количество спор ноземы. Одним из признаков заболевания служит изменение цвета средней кишки: она становится молочно-белой от скопления большого количества спор (Гробов, Лихотин, 1989).

Внешние признаки болезни, характерные для *N. apis*, при поражении микроспорицией *N. ceranae* (нозематоз типа С) отсутствуют, и пчелиные семьи распадаются от болезни без каких-либо видимых проявлений (Fries, 2006). При заражении пчел спорами *N. ceranae* признаки слабости семьи не всегда видны, отсутствие явных симптомов можно объяснить длительным инкубационным периодом, предшествующим гибели семьи (Kasprzak, Topolska, 2007; Higes et al., 2008; Chen et al., 2009). Однако встречается и другая ситуация. Так, на территории Сербии на протяжении нескольких лет в большинстве пчелиных семей (как погибших, так и выживших), зараженных *N. ceranae*, наблюдались симптомы, характерные для нозематоза типа А, вызываемого *N. apis* (Stevanovic et al., 2002). Наконец, необходимо учитывать одновременное присутствие в пчелиной семье обоих видов микроспориций. С одной стороны, может наблюдаться вытеснение одного вида другим в отдельных тканях или же подавление процесса спорообразования вида-конкурента (Solter et al., 2002). С другой стороны, оба вида микроспориций могут присутствовать в ульях, не вызывая симптомов болезни, при этом более 80% пчелиных семей в течение долгого времени остаются жизнеспособными и характеризуются нормальным развитием (Fernandez et al., 2012).

При постановке диагноза «нозематоз» учитываются основные клинические признаки, которые, однако, могут проявляться по-разному в каждом конкретном случае. Часто наблюдается весь спектр симптомов, включающий и незаметные субклинические, и клинические признаки, которые, в итоге, могут привести к гибели пчелиной семьи (Higes et al., 2013). Например, одним из первых признаков заболевания семьи, в том числе нозематоза, является снижение ее продуктивности. Для семей, зараженных *N. apis*, действительно, характерно снижение продуктивности (Fries et al., 1984), что не всегда наблюдается для семей, зараженных *N. ceranae*. Так, в одних случаях обнаружена прямая зависимость уровня заражения и активности медосбора семьи (Botías et al., 2010, 2012), в других – медопроодуктивность семьи не изменялась (Fernández et al., 2012). Предварительное заключение о заболевании медоносных пчел нозематозом

делают на основании осмотра сотов и подмора и описания клинической картины патологического материала. Предположение о заболеваемости пчелиной семьи нозематозом основывается на следующих клинических признаках: темно-коричневые пятна поноса на стенках улья и сотов; вялость и большая гибель насекомых, включая маток, в конце зимы или весной; замедленное развитие семей в активный период; специфический запах из улья.

Если клинические признаки болезни могут быть выявлены при осмотре пчелосемьи, то субклинические признаки – только при лабораторном исследовании. Вместе с тем, для постановки точного диагноза, даже в случае четкой клинической картины заболевания, необходимо проведение микроскопического и/или молекулярно-генетического анализа для определения вида возбудителя.

Перед методами Сезонная динамика микроспоридий р. *Nosema*. Нозематозный процесс характеризуется определенной динамикой и, с одной стороны, определяется различными факторами, например, временем года (сезонностью), а с другой стороны, сам влияет на различные процессы (например, биохимические) в организме хозяина. Первоначально определение «сезонность» подразумевало обнаружение возбудителя или клинических признаков заболевания в определенный период времени. В настоящее время под термином «сезонность» понимают распространенность возбудителя на определенной территории, изменение процента зараженных пчел в семьях и средней концентрации спор в исследуемых образцах в течение определенного времени года (Higes et al., 2008; Fries, 2010; Traver et al., 2011).

Сезонная динамика, типичная для возбудителя *N. apis*, хорошо изучена и описывается следующим образом: 1) низкий уровень инвазии в течение жарких летних месяцев; 2) небольшой пик сильного заражения осенью; 3) медленное нарастание числа зараженных особей в течение зимы; 4) пик весной, с быстрым ростом уровня инвазии из-за ограничения питания во влажных и холодных климатических условиях (Fries, 1993, 2010; Higes et al., 2010b; Retschnig et al., 2017). Считается, что уровень зараженности медоносных пчел возбудителем

N. apis снижается в течение лета из-за естественных механизмов иммунной защиты самой пчелиной семьи (Bailey, 1955). Например, у пчел карпатской породы в условиях Центрального района России, инвазия прогрессировала наиболее остро весной (март, апрель, май) и несколько слабее в начале осени (сентябрь). Как указывает А. Б. Сохликов (1994), оба пика инвазии в течение года совпадали с двумя биологическими периодами жизнедеятельности пчелиной семьи, а именно с интенсивной заменой перезимовавших пчел весенними и летних пчел осенне-зимними. На пасеках Азербайджана в семьях пчел также отмечались характерные вспышки нозематоза в весенний и осенний период, впоследствии часто ведущие к гибели зараженных семей (Ханбекова и др., 2013).

В отличие от *N. apis*, сезонная динамика зараженности пчелиных семей спорами *N. ceranae* недостаточно изучена, а имеющиеся в литературе сведения значительно отличаются в зависимости от географической локализации обследованных пасек. Например, на территории Испании в пчелиных семьях высокий уровень заражения *N. ceranae* отмечен с конца лета до весны с максимумом в течение зимы (Higes et al., 2008). В США и Канаде более высокие уровни заражения пчелиных семей возбудителем *N. ceranae* отмечались летом и в начале осени (Runckel et al., 2011; Copley et al., 2012), а в Сербии и Германии – весной, что указывает на развитие паразита в течение зимы (Stevanovic et al., 2013; Gisder et al., 2017). Таким образом, споры *N. ceranae* обнаруживаются у медоносных пчел, обитающих в различных географических широтах, в разное время на протяжении всего года (Martín-Hernández et al., 2007, 2012; Higes et al., 2008, 2010a; Stevanovic et al., 2011; Traver, Fell, 2011; Whitaker et al., 2011; Botías et al., 2012; Dainat et al., 2012a; Medici et al., 2012; Smart, Sheppard, 2012).

Что касается ко-инвазии *Nosema*, то данные по сезонной динамике зараженности медоносных пчел противоречивы. Например, на территории США и Германии наибольший процент пчел, зараженных обоими видами *Nosema* spp., был выявлен в июне, в течение лета наблюдался постепенный спад и в сентябре регистрировалось наименьшее число больных особей (Gisder et al., 2010; Mulholland et al., 2012). Вместе с тем, авторы предполагают, что присутствие

другого паразита, например, *N. ceranae*, может изменить типичную картину сезонной динамики возбудителя *N. apis*. Ими же показано, что сезонная динамика, характерная для *N. apis*, может не изменяться в течение всего года и в присутствии возбудителя *N. ceranae* (Higes et al., 2008; Martín-Hernández et al., 2012). Хотя могут наблюдаться некоторые изменения в сезонной динамике зараженности медоносных пчел *N. apis* в состоянии ко-инвазии (Runckel et al., 2011). Так, при исследовании зараженности 20 пчелиных семей, обитающих на территории США, разными паразитами и патогенами, включая микроспоридии *Nosema*, действительно, заражение пчел возбудителем *N. apis* отсутствует в течение летних месяцев и появляется в августе и сентябре, но нарастания числа зараженных особей в течение зимы не наблюдается. Максимальный пик заражения медоносных пчел обнаружен в весенний период (апрель–май). Что касается микроспоридии *N. ceranae*, то процент инфицированных пчел, варьировал в течение года (Runckel et al., 2011).

Таким образом, рядом авторов установлена сезонная динамика зараженности медоносных пчел микроспоридиями р. *Nosema*, которая более выраженная для вида *N. apis* в отличие от вида *N. ceranae*, для которого не выявлено никаких закономерностей в протекании нозематозного процесса (Copley et al., 2012).

Методы исследования нозематоза. Лабораторная идентификация возбудителей нозематоза может быть установлена как традиционными, так и современными молекулярно-генетическими методами анализа. К традиционным методам относятся световая микроскопия и морфометрическое исследование окрашенных мазков, полученных из водной суспензии брюшек пчел. К современным методам диагностики нозематоза относится полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для исследования возбудителя нозематоза используется также электронная микроскопия.

В ветеринарных лабораториях страны нозематоз диагностируют в соответствии с официально утвержденными ГУВ МСХ СССР «Методическими указаниями по лабораторным исследованиям на нозематоз медоносных пчел»

(1985 г.). В 2011 году отделением Министерства сельского хозяйства утверждены «Методические наставления по дифференциальной диагностике *Nosema apis* и *Nosema ceranae* у медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.)».

Предполагаемый диагноз на нозематоз подтверждается лабораторными исследованиями. Для этого используют не менее 20 особей погибших или живых пчел; проводят микроскопические исследования патологического материала путем приготовления мазков. При обнаружении спор ноземы ставят окончательный диагноз с учетом эпизоотологической ситуации.

В связи с тем, что микроскопический метод исследования не всегда является информативным (так как не позволяет определить вид *Nosema*), в последние годы в практику пчеловодства активно внедряются молекулярно-генетические методы с целью видовой диагностики микроспоридий (Токарев и др., 2010; Чернышев, 2012; Martín-Hernández et al., 2007; Hamiduzzaman et al., 2010).

Первоначально для идентификации *N. apis* при проведении ПЦР использовались праймеры, специфичные для последовательности гена, кодирующего малую субъединицу рРНК у ряда видов рода *Nosema* (Webster et al., 2004). С описанием у медоносных пчел второго вида микроспоридий – *N. ceranae* – была разработана методика мультиплексной ПЦР (Martín-Hernández et al., 2007; Hamiduzzaman et al., 2010). Суть этой реакции – в одновременном использовании двух наборов праймеров, один из которых является специфичным для *N. apis*, а другой – для *N. ceranae*.

Мультиплексная ПЦР позволяет быстро, в одном эксперименте проводить диагностику двух видов паразитов, вызывающих нозематоз у медоносной пчелы. Кроме того, это – высоко чувствительный метод, идентифицирующий даже небольшое количество спор ноземы у медоносной пчелы, вплоть до 10 спор *Nosema* на одну пчелу. В отличие от микроскопического метода, метод ПЦР является более чувствительным (более чем в 500 раз), что дает возможность проводить диагностику нозематоза у пчел на ранних стадиях развития болезни. Таким образом, мультиплексный метод ПЦР для диагностики нозематоза у медоносной пчелы является высоко специфичным и чувствительным,

относительно простым и быстрым (Martín-Hernández et al., 2007; Fries, 2010; Hamiduzzaman et al., 2010).

Перспективным методом также рассматривается ПЦР-метод в реальном времени (real-time PCR), как наиболее чувствительный для детекции минимального числа спор паразита (1 спора на пчелу) (Сохликов и др., 2012; Чернышев, 2012; Bourgeois et al., 2010; Burgher-MacLellan et al., 2010).

Кроме молекулярно-генетических методов, при исследовании микроспоридий применяется метод электронной микроскопии (Ptaszyńska et al., 2014), а также окрашивание флуоресцирующим агентом ткани средней кишки медоносной пчелы (Snow, 2016). Высокое качество изображения при электронной микроскопии позволяет рассмотреть детали структуры спор, что дает возможность достоверно определить видовую принадлежность микроспоридий и дифференцировать *N. apis* и *N. ceranae*. Так, изучение структуры стенок спор *Nosema* с использованием метода сканирующей электронной микроскопии показало отличия, характерные для каждого вида (Ptaszyńska et al., 2014). При исследовании методом трансмиссионной электронной микроскопии возможно определить количество витков полярной нити (Fries et al., 2006; Chen et al., 2009, 2010).

Вместе с тем, в настоящее время ПЦР-диагностика является наиболее используемым и доступным методом, обеспечивающим эффективную и точную диагностику нозематоза (например, в одном эксперименте провети количественную оценку зараженности пчел) на самых ранних стадиях развития болезни, когда уровень зараженности пчел спорами паразита незначительный, и пчелиная семья внешне выглядит вполне здоровой (Токарев и др., 2010; Зинатуллина и др., 2011; Tapaszti et al., 2009; Bourgeois et al., 2010; Traver, Fell, 2011; Martín-Hernández et al., 2012; Bollan et al., 2013).

1.3. Распространение микроспоридий р. *Nosema* в популяциях медоносной пчелы *A. mellifera*

Первоначально предполагалось, что микроспоридия *N. apis* – единственный возбудитель нозематоза у европейских пчел *A. mellifera*, тогда как паразит *N. ceranae* характерен для азиатской пчелы *Apis ceranae*. Однако в 1996 году возбудитель *N. ceranae* был идентифицирован у больных европейских пчел на Тайване (Fries et al., 1996). Впоследствии микроспоридии *N. ceranae* были выявлены у медоносной пчелы *A. mellifera* в Европе, Америке, Китае, Вьетнаме, то есть, как и *N. apis*, возбудитель *N. ceranae* широко распространен в популяциях медоносной пчелы во всем мире (Fries et al., 2006; Higes et al., 2006, 2010a; Chauzat, 2007; Kasprzak, Topolska, 2007; Klee et al., 2007; Paxton et al., 2007; Chen et al., 2008; Williams et al., 2008; Giersch et al., 2009; Invernizzi et al., 2009; Tapaszti et al., 2009; Bacandritsos et al., 2010; Chen, Huang, 2010; Fries et al., 2010; Santrac et al., 2010; Yoshiyama, Kimura, 2011; Nabian et al., 2011; Botias et al., 2012; Chaimanee et al., 2012). Кроме того, споры *N. ceranae* обнаружены и у других видов азиатских пчел – *A. koschevnikovi*, *A. nigrocincta* и *A. florum* (Botias et al., 2012). Наконец, микроспоридии *N. ceranae* были идентифицированы в музейных образцах африканизированных пчел бразильской популяции, полученных в 1979 году (Teixeira et al., 2013), и пчел мексиканской популяции, собранных в период 1985–1986 гг. (Guerrero-Molina et al., 2016). Эти данные позволяют предположить, что микроспоридия *N. ceranae* перешла от первоначального хозяина (азиатской пчелы *A. ceranae*) на нового хозяина (европейскую медоносную пчелу *A. mellifera*) значительно раньше, чем первоначально считалось (Chen et al., 2008).

Аналогичная картина наблюдается и для азиатской пчелы *A. ceranae*, для которой единственным возбудителем нозематоза считалась микроспоридия *N. ceranae* (Fries et al., 1996). Однако в последнее время выявлено широкое распространение у пчел *A. ceranae* микроспоридии *N. apis*, причем, как и у европейской пчелы *A. mellifera*, часто наблюдается совместная инвазия хозяина обоими видами *Nosema* (Chen et al., 2009). Вместе с тем, согласно

экспериментальным данным установлено, что процесс развития микроспоридии *N. ceranae* в европейской пчеле *A. mellifera* протекает значительно лучше, чем *N. apis* в азиатской пчеле *A. ceranae* (Fries, Feng, 1995; Fries, 1997).

В последние годы количество образцов пчел, содержащих споры *Nosema* spp., значительно увеличилось, так же, как и уровень зараженности взрослых особей возбудителем *N. ceranae* (Botias et al., 2012; Smart, Sheppard, 2012; Bollan et al., 2013; Emsen et al., 2016), причем это относится к пробам медоносных пчел, собранных со всех континентов (Higes et al., 2006; Klee et al., 2007; Tapaszti et al., 2009; Bourgeois et al., 2010; Traver, Fell, 2011; Martín-Hernández et al., 2012).

Зараженность медоносных пчел микроспоридиями р. *Nosema* на территории стран Европы и США. На территории Европы установлено широкое распространение микроспоридий р. *Nosema*, но преобладает возбудитель *N. ceranae* (таблица 1; рисунок 5). Кроме того, отмечается годовая и сезонная динамика зараженности пчелиных семей. Так, в пробах пчел, собранных в течение 1999–2002 гг., отмечалось низкое количество зараженных образцов в течение летних месяцев, что характерно для *N. apis*; тогда как в образцах пчел, полученных за период 2003–2005 гг., сезонной динамики зараженности пчел не выявлено и были описаны случаи депопуляции пчелиных семей, что свидетельствует о распространении *N. ceranae* (Martín-Hernández et al., 2007).

Таблица 1 – Распространение разных видов *Nosema* у медоносных пчел на территории некоторых стран Европы (из Martín-Hernández et al., 2007)

Страна	Всего	Количество исследованных образцов пчел, шт. (%)			
		не заражено <i>Nosema</i>	заражено спорами <i>Nosema</i>		
			<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i>	<i>N. apis</i> и <i>N. ceranae</i>
Испания	149	65 (43,9)	21 (14,1)	52 (34,9)	11 (7,4)
Франция	36	3 (8,3)	0 (0)	27 (75,0)	6 (16,7)
Швейцария	36	12 (33,3)	1 (2,8)	23 (63,9)	0 (0)
Германия	69	8 (11,6)	5 (7,2)	54 (78,3)	2 (2,9)
Всего	290	88 (30,3)	27 (9,3)	156 (53,8)	19 (6,6)



Рисунок 5 – Распространение микроспоридий р. *Nosema* у медоносных пчел в разных географических регионах Европы (по Ильясову и др., 2014).

Результаты дальнейших исследований распространенности двух видов паразитов (*N. apis* и *N. ceranae*) на территории Европы были различными. Так, на территории Венгрии зараженность *N. ceranae* и *N. apis* на протяжении всех сезонов была одинаковой (Csakai et al., 2015). Микроспоридия *N. apis* была более распространенным видом в Германии (Gisder et al., 2010), а *N. ceranae* преобладала на территории Балканских стран (из 273 *Nosema*-позитивных образцов медоносных пчел возбудитель *N. ceranae* выявлен в 272 пробах, тогда как ДНК *N. apis* идентифицирована только в одном образце); вариант ко-инвазии не выявлен. Например, на территории Сербии в течение нескольких лет зарегистрирован высокий уровень зараженности (73–98%) пчелиных семей возбудителем *N. ceranae* (Stevanovic et al., 2013).

Что касается ко-инвазии, то выявлено небольшое количество семей, зараженных обоими видами микроспоридий, при этом в большинстве случаев из двух возбудителей преобладал вид *N. ceranae* (Cornman et al., 2009; Gisder et al., 2010; Bollan et al., 2013; Huang, Solter, 2013; Emsen et al., 2016). Вместе с тем, исследования по зараженности нозематозом медоносных пчел европейских популяций позволили сделать вывод о том, что микроспоридии *N. ceranae*

преобладают (часто являются единственным возбудителем) у медоносных пчел, обитающих в регионах, характеризующихся теплым климатом (страны Средиземноморья) (Klee et al., 2007; Chen et al., 2008; Chen, Huang, 2010; Yoshiyama, Kimura, 2011; Martínez et al., 2012). Наоборот, микроспоридии *N. apis* чаще встречается в регионах с более холодными климатическими условиями, например, в Германии и Великобритании (Budge et al., 2010; Gisder et al., 2010, 2017), то есть наблюдается влияние климатических факторов (прежде всего температуры) на распространение видов *Nosema*.

На территории США также показано широкое распространение микроспоридии *N. ceranae* в пчелиных семьях, в основном, в «чистом» виде, тогда как *N. apis* регистрировалась преимущественно в форме ко-инвазии (Runckel et al., 2011; Mulholland et al., 2012). При изучении путей проникновения микроспоридии *N. ceranae* в Америку, во-первых, возбудитель был обнаружен в импортируемом китайском маточном молочке, используемом производителями маток (Cox-Foster et al., 2007); во-вторых, генетические особенности изолятов *N. ceranae* указывает на их возможное происхождение из Европы (Williams et al., 2008).

Таким образом, микроспоридии р. *Nosema*, в том числе и более агрессивный возбудитель нозематоза *N. ceranae*, широко распространены во всем мире. Однако данные о влиянии природно-климатических факторов на распространение паразитов – противоречивы. С одной стороны, предполагается, что холодный климат ограничивает распространение возбудителя *N. ceranae* (Gisder et al., 2010; Chen et al., 2012; Forsgren, Fries, 2012), а с другой – исключается влияние природно-климатических факторов на вирулентность двух видов *Nosema* (Dussaubat et al., 2013; Pelin et al., 2015; Natsopoulou et al., 2016).

Зараженность медоносных пчел микроспоридиями р. *Nosema* в России. В России микроспоридии р. *Nosema* также широко распространены в популяциях медоносной пчелы (Краснодарском и Алтайском краях, Оренбургской области, Республиках Удмуртия, Мордовия, Татарстан, Башкортостан, Марий Эл) (Угрюмова и др., 2004; Морева и др., 2008; Домацкая и др., 2010; Макаров, 2010; Непейвода и др., 2012; Ильина, Аладдина, 2014) (таблица 2).

Таблица 2 – Зараженность медоносных пчел микроспоридиями р. *Nosema* на территории некоторых регионов России

Регион проведения исследования	Период исследований	Характеристика зараженности медоносных пчел микроспоридиями р. <i>Nosema</i>	Источник данных
1	2	3	4
Удмуртская Республика	1991–1993, 1995, 2005, 2007–2010	Зараженность пчелиных семей варьировала от 0,6% (1992 г.) до 43,3% (1995 г.), но не ниже 15%, начиная с 1993 года. Диагностика вида <i>Nosema</i> не проводилась.	Непейвода и др., 2012 г.
Республики: Мордовия, Удмуртия, Татарстан, Марий Эл, Башкортостан	1998–2002	Зараженность микроспоридиями пчелиных семей составила 11,6%. Диагностика вида <i>Nosema</i> не проводилась.	Угрюмова и др., 2004 г.
Оренбургская область	2003–2013	С 2006 года отмечается широкое распространение микроспоридии <i>N. apis</i> (заражено 70% проб).	Ильина, Аладдина, 2014 г.
Краснодарский край	2004–2005	Описаны единичные случаи заражения пчелосемей нозематозом, вызываемым видом <i>N. apis</i> .	Морева и др., 2008
Тюменская область	2005–2010	Выявлено более 76% неблагополучных пасек по нозематозу. Причем, на 20% пасек установлена легкая и средняя степень поражения; сильная на 6%. Видовая диагностика не проводилась.	Домацкая и др., 2010 г.
Удмуртская Республика	2007–2014	Доля зараженных семей пчел незначительно превысила 20%. У 28% семей пчел отмечается средняя и сильная степень поражения. В 93,3% случаев выявлена <i>N. apis</i> ; в 3,3% – <i>N. ceranae</i> ; в 3,3% – ко-инвазия.	Колбина и др., 2015 г.
Республика Марий Эл	2008–2009	В 2008 г. споры <i>Nosema</i> выявлены у медоносных пчел на пасеках всех районах. В среднем зараженность пчелосемей составила 9,0%; в отдельных областях достигала 51,2%. В 2009 г. отмечен спад заболеваемости до 5,9%. В двух районах <i>Nosema</i> не выявлена. Видовая диагностика возбудителя <i>Nosema</i> не проводилась.	Макаров, 2010 г.
Московская область	2009–2011	Споры микроспоридий <i>Nosema</i> spp. обнаружены в 59,5% случаев. Отмечено присутствие двух видов возбудителей нозематоза пчел.	Чернышев, 2012

Окончание таблицы 2

1	2	3	4
Тюменская область	2002–2012	Микроспоридии р. <i>Nosema</i> выявлены в 48,3% пчелосемей. Поражение семей пчел в разных районах было неодинаково и варьировало в разные годы от 3,5% до 53,5%.	Пашаян, 2012
Тюменская область	2012	Обнаружено 40,8% неблагополучных пасек в отношении нозематоза, при этом оба вида микроспоридий обнаружены в примерно равном количестве.	Зинатуллина и др., 2012
Республика Татарстан, Алтайский край, Краснодарский край Области: Брянская, Смоленская, Тверская, Липецкая, Псковская, Тамбовская, Новгородская, Ленинградская, Нижегородская	2012	Установлено широкое распространение микроспоридий р. <i>Nosema</i> на пасеках России (49,9%). Микроспоридия <i>N. apis</i> выявлена в 51,6% случаях; <i>N. ceranae</i> в 48,4%.	Зинатуллина и др., 2013
Алтайский край	2013	Изучено более 35 тыс. образцов. Наиболее часто регистрировался нозематоз (1573 случаев в 33 районах). Видовая диагностика паразитов <i>Nosema</i> не проводилась.	http://altvet.org/show_new.php?id_new=903

Новый возбудитель *N. ceranae* обнаружен на европейской территории России и Урале (Нижегородской, Ленинградской, Смоленской, Новгородской, Псковской, Брянской, Тамбовской, Липецкой, Тверской и Московской областях, Удмуртской республике) (Зинатуллина и др., 2012, 2013; Чернышев, 2012; Колбина и др., 2015). На территории Сибири возбудитель *N. ceranae* впервые зарегистрирован в 2009 году в Тюменской области (Зинатуллина и др., 2011).

Как и на территории Европы и США (Klee et al., 2007; Paxton et al., 2007; Chen et al., 2008), на пасеках России установлено ежегодное увеличение количества пчелиных семей, зараженных микроспоридией *N. ceranae*. Некоторыми исследователями распространение микроспоридий *N. ceranae* рассматривается не как региональная, а скорее – проблема мирового масштаба (Higes et al., 2013). Следовательно, необходимо изучение различных аспектов нозематоза типа С, включающих характеристику межвидовых отношений

микроспоридий, оценку влияния различных факторов (окружающая среда, генетические особенности хозяина и паразитов и др.) на распространение микроспоридий. Среди факторов, способствующих распространению нозематоза, отмечается изменение условий окружающей среды, а именно таких факторов, как температура и влажность (Непейвода и др., 2012; Зинатуллина, 2016).

Другой причиной повсеместного распространения инвазии, не менее важной, является торговля пчелами. Она ведется очень активно, при этом не все сделки официально зарегистрированы и не все продаваемые медоносные пчелы и их продукты (в том числе матки и сперма) прошли проверку на наличие особо опасных заболеваний (Mutinelli, 2011; Traver, Fell, 2011). Кроме того, воздействие на пчел самых разнообразных стрессов, таких как недостаток питания, болезни, паразиты, вредные химические вещества (vanEngelsdorp et. al., 2010; Cornman et. al., 2012; Zhu et. al., 2014), также приводит к снижению резистентности организма пчел. Факторами, представляющими опасность для пчел, способных увеличить тяжесть инвазии *N. ceranae* в полевых условиях, являются сублетальные дозы инсектицидов (Wu et al., 2012), фунгицидов и пестицидов (Vidau et al., 2011), применяемые для обработки сельскохозяйственных культур. При сборе пыльцы с растений на участках, обработанных химикатами, пчелы подвергаются негативному воздействию препаратов. Это ведет к увеличению вероятности поражения пчел нозематозом, способствуя повышению количества спор в кишечнике (Pettis et al., 2013), а, следовательно, негативному воздействию вирусов (Bacandritsos et al., 2010), что, в итоге, приводит к повышению смертности в пчелиных семьях (Vidau et al., 2011; Aufauvre et al., 2012). Интересен тот факт, что хроническое воздействие сублетальных доз пестицидов на личинок в дальнейшем способствует увеличению производства спор *Nosema* spp. у взрослых пчел и, как следствие, увеличение смертности особей в пчелиной семье (Vidau et al., 2011).

Взаимодействие микроспоридий р. *Nosema* с другими паразитами и патогенами *A. mellifera*. Эпизоотологические исследования заболеваемости медоносных пчел на территории России немногочисленны и, главным образом, проведены на пасеках европейской части России и Урала (таблица 3).

Таблица 3 –Распространение паразитов и патогенов у медоносных пчел на пасеках некоторых регионов России

Регион проведения исследования	Период исследования	Характеристика распространения возбудителей основных болезней	Источник данных
1	2	3	4
Республики: Мордовия, Удмуртия, Татарстан, Марий Эл, Башкортостан	1998–2002	Широко распространенными являются варроатоз (36,9%), и аскосфероз (10,9%). Зараженность медоносных пчел патогенами на пасеках различных республик отличается. Варроатоз выявлен в Мордовии – 100% случаев; в Удмуртии – 40,2%; в Татарстане – 33,9% пасек. Процент заражения аскосферозом в Удмуртии достигал 40%; в Татарстане – 13,4%; в Мордовии, Башкортостане, Марий Эл выявлено менее 13%.	Угрюмова и др., 2004 г.
Республика Татарстан	1998–2004	Отмечается расширение ареала распространения микозов. Грибки обнаружены в 20% пчелосемей. Преобладает аскосфероз (64%) и аспергиллез (32%), в небольшом количестве (4%) выявлены меланоз, кандидомикоз и мукормикоза.	Попов и др., 2005
Тюменская область	2002–2012	Выявлена неблагополучная эпизоотологическая ситуация по варроатозу (96,3%) и аскосферозу (15,9%). Зараженность варроатозом варьировала в разных районах от 13,5% до 58,3%. Отмечено присутствие возбудителей гнильцовых заболеваний и колибактериоза. Чаще встречалась смешанная инфекция (нозематоз, аскосфероз, варроатоз).	Пашаян, 2012
Оренбургская область	2003–2013	Наиболее часто выявляемые болезни на пасеках: варроатоз (100%), сальмонеллез (60%).	Ильина, Аладдина, 2014 г.
Удмуртская Республика	2007–2014	Отмечено неблагополучное состояние пасек по ряду заболеваний: варроатоз (47%), аскосфероз (78%), европейский гнилец (20%). Установлена различная степень заражения пчелосемей в трех зонах Республики.	Колбина и др., 2015 г.
Республика Марий Эл	2008–2009	В 2008 г. варроатоз в среднем выявлялся в 15,6% пчелосемей. В 2009 году клещ выявлен в 8,3% семей. Зараженность в различных районах составила от 1,7% до 64,1%.	Макаров, 2010 г.
Алтайский край	2013	Исследованно более 35 тыс. проб. Среди исследованных образцов часто выявлялся варроатоз (950 случаев в 45 районах), аскосфероз (39 случаев в 13 районах) и европейский гнилец (23 случая в 13 районах).	http://altvet.org/show_new.php?id_new=903

Окончание таблицы 3

1	2	3	4
Республика Татарстан	2011	Выявлена низкая степень пораженности пчелосемей варроатозом: от 1,01% до 4,51%. Отмечено более высокое поражение расплода (от 3,5% до 9,78%) по сравнению с заклещеванностью пчел. Большую опасность вызвало выявление нескольких заболеваний в одной пчелосемье. В большинстве случаев совместно с варроатозом диагностировался нозематоз.	Сафиуллин, Набиуллин, 2011

В России исследования зараженности медоносных пчел проводятся сотрудниками лаборатории болезней пчел ВНИИ ветеринарной энтомологии и арахнологии (г. Тюмень), в областных и региональных ветеринарных лабораториях и центрах по пчеловодству.

В результате проведенных исследований выявлена высокая регистрация нозематоза в пчелиных семьях, зараженных клещом *Varroa* (коэффициент корреляции составил 0,95) (Непейвода и др., 2012). Так смешанная инвазия выявлена в 65% исследованных образцов (Микитюк, 1990), при этом течение нозематоза осложняется и влечет за собой гибель семей. При этом у погибших пчел в кишечнике обнаруживается гораздо меньшее количество спор микроспоридий, чем у пчел без клеща (Гробов и др., 2008).

При смешанной инвазии пчелосемьи плохо развиваются, наблюдается значительное снижение количества расплода (до 44%) и продуктивность семьи (до 15%) по сравнению с семьями, зараженными только варроатозом (Марков, 1986). У пчел, пораженных клещом *Varroa*, из-за дефицита белка наблюдается снижение образования слоев перитрофической мембраны средней кишки. Вероятно, это объясняет частое поражение нозематозом пчел, зараженных клещом *Varroa* (Гробов и др., 2008). Наряду с этим, у больных варроатозом пчел отмечается более раннее проявление микроспориоза.

С другой стороны, высокий уровень зараженности пчел клещом *V. destructor* является фактором, способствующим развитию вирусных инфекций (Калашникова, Удина, 2012). Инвазия пчел клещом *V. destructor* привела к гибели диких пчелиных семей во многих областях России и является основной

проблемой при содержании пчел на пасеках. Инвазия клеща ослабляет иммунитет пчел и способствует развитию вирусной инфекции. Во время инвазии клеща снижается уровень экспрессии генов, вырабатывающих основные антибактериальные и противовирусные белки, что обуславливает развитие заболеваний, в том числе вирусного происхождения.

Тяжесть течения некоторых вирусных болезней четко связана со степенью поражения семьи пчел клещами варроа (острый паралич, болезнь деформации крыла, медленный паралич и Кашмир-вирус). Появление клеща варроа внесло существенные изменения в спектр болезней медоносных пчел. Клещ не только ослабляет организм пчелы, разрушая его естественные защитные механизмы, но и, перемещаясь от одной особи к другой, накапливает, сохраняет и передает им ряд возбудителей инфекционной природы. Болезни быстро распространяются внутри семьи, а также между семьями соседних пасек.

При попадании в организм многих патогенов, вирусы, находящиеся в неактивном состоянии, могут активироваться (Yang, Cox-Foster, 2005). Однако исследования показали отрицательную корреляцию межвидовых взаимодействий – вируса деформации крыла и *N. ceranae* (Costa et al., 2011), которые могут возникнуть в результате борьбы за клетки хозяина: *N. ceranae* вызывает поражение и дистрофию эпителиальных клеток кишечника (Higes et al., 2007), в то же время желудочно-кишечный тракт пчелы имеет решающее значение для патогенеза вируса деформации крыла (Boncristiani et al., 2009).

Таким образом, эпизоотологические исследования основных болезней медоносной пчелы в России показали широкое распространение заболеваний пчел и высокую степень поражения пчелосемей в ряде регионов. Кроме нозематоза и варроатоза особую тревогу вызывает аскосфероз, аспергиллез, американский и европейский гнильцы. Вместе с тем, согласно данным Департамента ветеринарии обстановка в России по заразным болезням пчел характеризуется как стабильная. Несмотря на широкое распространение варроатоза и нозематоза, некоторыми исследователями отмечается некоторое относительное улучшение в последние годы ситуации по этим заболеваниям (Мачнев, Яременко, 2000).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Регион исследования

Томская область располагается в географическом центре Сибири, в юго-восточной части Западно-Сибирской равнины. Практически вся территория области находится в пределах таежной зоны. Томская область характеризуется суровыми природно-климатическими условиями. Климат – умеренно континентальный, особенностью которого являются резкие контрасты температур воздуха в теплое и холодное время года, быстрые переходы с лета на зиму и с зимы на лето, а также продолжительность межсезонья (весна и осень), которое в некоторых районах не превышает 1–2 месяца. В переходные периоды (весна и осень) происходят резкие колебания температуры (в течение дня амплитуда температур в некоторых местах может достигать 25–30°C). Зимний период – продолжительный (5–6 месяцев). Снежный покров в северных районах держится 183–201 день, на юге области – 178–180 дней. Средняя годовая температура во всех районах области отрицательная и составляет от минус 0,6°C в южных районах области до минус 3,5°C в северных районах. Средняя температура в июле составляет +18,1°C, а в январе – минус 19,2°C. Безморозный период длится 100–120 дней. Количество осадков – 435 мм (Евсеева, 2001).

Медоносная пчела была завезена на территорию Сибири, в том числе в Томскую губернию, 230 лет назад, хорошо адаптировалась к местным природно-климатическим условиям и растительным сообществам. В связи с тем, что, с одной стороны, медоносная пчела в Томской области представляет собой искусственные популяции, зимовку которых контролирует человек, а с другой стороны, регистрация и учет пчелиных семей проводится органами государственной власти, в настоящем исследовании использовался подход, основанный на административно-территориальном делении Томской области.

Территория Томской области разделена на 16 административных районов (рисунок 6). По природно-климатическим показателям (с учетом средних годовых

температур, заболоченности, продолжительности зимнего периода и т. д.) 10 районов области приравнены к местностям Крайнего Севера. В двух самых северных районах области (Александровском и Каргасокском), согласно данным Управления ветеринарии за 2017 год, пасек не зарегистрировано. Наиболее удаленным северным районом, где зарегистрировано всего 5 пасек, является Верхнекетский район.



Рисунок 6 – Административно-территориальное деление Томской области на районы:
 1 – Александровский; 2 – Каргасокский; 3 – Парабельский; 4 – Колпашевский; 5 – Чаинский;
 6 – Бакчарский; 7 – Верхнекетский; 8 – Молчановский; 9 – Кривошеинский; 10 – Шегарский;
 11 – Кожевниковский; 12 – Томский; 13 – Асиновский; 14 – Первомайский;
 15 – Тегульдетский; 16 – Зырянский. Примечание. Линией отмечена граница между южными районами (10–14, 16) и районами, приравненными к местностям Крайнего Севера (1–9, 15).

Южные районы характеризуются хорошо развитым пчеловодством; на их территории располагается около 60% пасек и 66% пчелиных семей от общего числа пасек и семей, зарегистрированных в Томской области. Кроме того, большинство пасек, на которых содержится от 40 пчелиных семей и более, сосредоточены в южных районах области; пчеловоды северных районов содержат пасеки небольшого (до 10 семей) и среднего (10–20 семей) размера.

В связи с отсутствием или труднодоступностью пасек в ряде северных районов (и некоторых южных), откуда отбор и доставка проб медоносных пчел для анализа не представлялись возможными, всего было исследовано 13 районов Томской области, включающих 7 северных и 6 южных (в некоторых районах изучены пчелы с 1–2 пасек).

2.2. Алгоритм исследования

Исследование зараженности микроспоридиями р. *Nosema* пчелиных семей и пасек на территории Томской области проводилось в нескольких направлениях (рисунок 7) и включало:

- 1) характеристику распространенности микроспоридий р. *Nosema* на пасеках области с учетом многолетней динамики и природно-климатических условий обитания пчел (северные и южные районы);
- 2) выявление видового состава микроспоридий р. *Nosema* у медоносных пчел на пасеках;
- 3) изучение многолетней и сезонной динамики зараженности микроспоридиями р. *Nosema* медоносных пчел на уровне отдельных особей, пчелиной семьи и пасек;
- 4) оценку информативности методов, применяемых для диагностики микроспоридий р. *Nosema* на уровне пчелосемей и отдельных особей;
- 5) анализ взаимоотношений «микроспоридии р. *Nosema* – паразиты/патогены» на примере изучения встречаемости нозематоза с другими заболеваниями пчел.

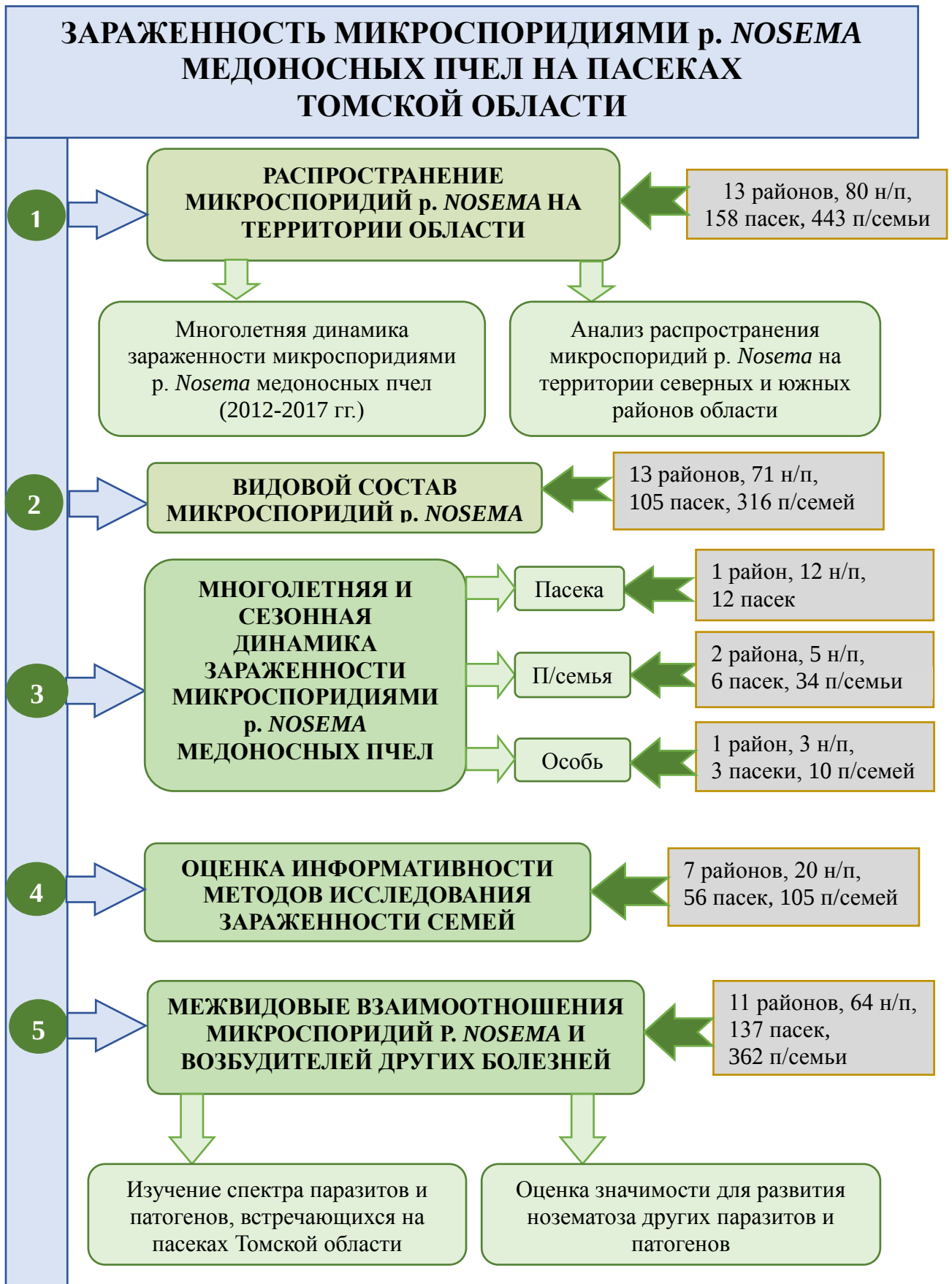


Рисунок 7 – Алгоритм исследования зараженности микроспоридиями р. *Nosema* медоносных пчел на пасеках Томской области.

2.3. Материал исследования

Материалом для исследования послужили медоносные пчелы, полученные с 158 пасек 80 населенных пунктов 13 районов Томской области (Асиновского, Бакчарского, Зырянского, Кожевниковского, Колпашевского, Кривошеинского, Молчановского, Парабельского, Первомайского, Тегульдетского, Томского, Чаинского и Шегарского) в период 2012–2017 гг. (рисунок 8).

Отбор материала проводился двумя способами в зависимости от времени года: весной от семей отбирался подмор, в летне-осенний период – живые пчелы. Пробы отбирались минимум от 50% пчелиных семей пасеки, формируя, таким образом, среднюю пробу пасеки. С каждой пасеки отбиралось минимум по одной пчелиной семье (в случае наличия только одной семьи на пасеке), от каждой пчелиной семьи анализировалось минимум 50 рабочих особей. Всего исследовано 443 пчелосемьи, 2493 образца пчел/проб (таблица 4; Приложение А, таблица А.1).

На первом этапе исследования было изучено распространение нозематоза на пасеках Томской области за период 2012–2017 гг., включая анализ многолетней динамики, и проведен сравнительный анализ зараженности микроспоридиями р. *Nosema* пчелиных семей и пасек, локализованных в различных географических районах (анализировались северные и южные районы области). Всего исследовано 443 пчелиных семьи, полученных с 158 пасек с использованием микроскопического и молекулярно-генетического методов.

На втором этапе было проведено исследование видового состава возбудителей нозематоза и их распространение на пасеках разных районов области с использованием ПЦР-метода. Всего исследовано 105 пасек, 316 пчелиных семей.

На третьем этапе проведено изучение многолетней (2013–2017 гг.) и сезонной (март–октябрь 2015–2017 гг.) динамики зараженности медоносных пчел разными видами микроспоридий р. *Nosema* на одних и тех же пасеках. Отбор проб проводился от одних и тех же пчелиных семей. Изучена зараженность медоносных пчел разными видами микровпоридий на уровне пасеки, пчелиной семьи и особей.

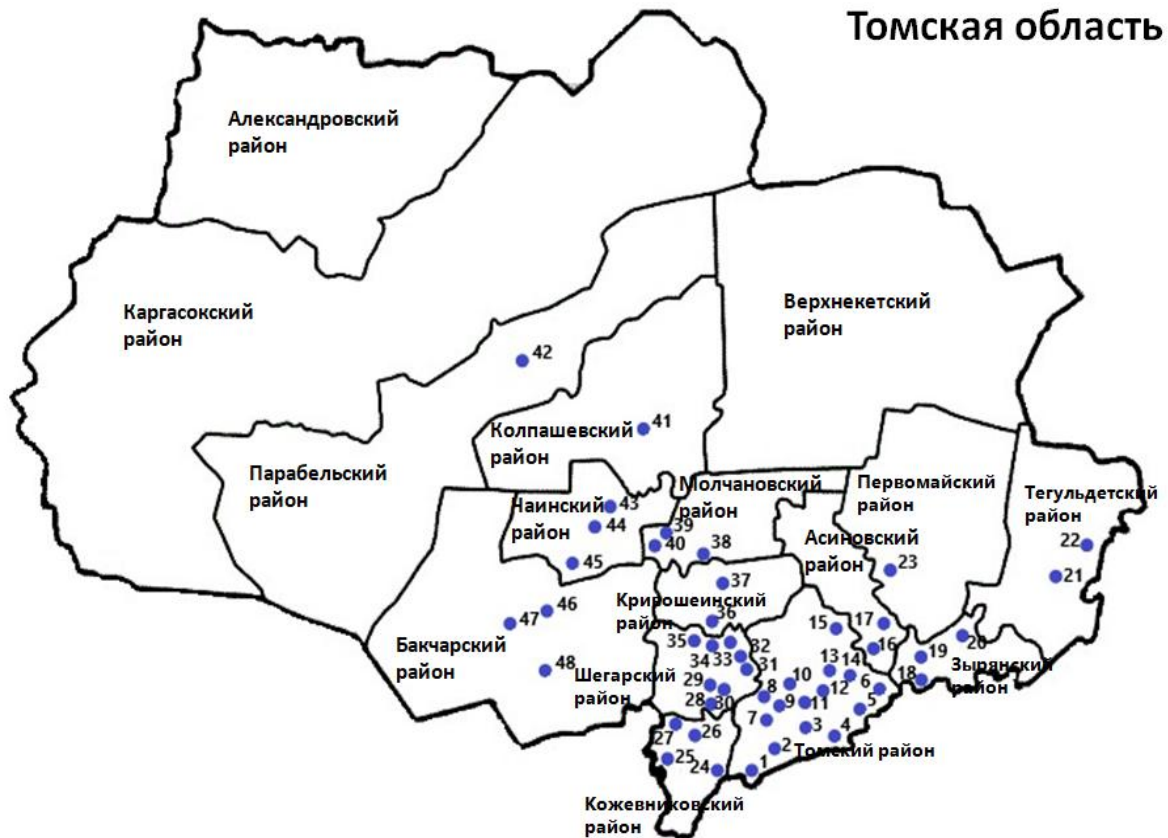


Рисунок 8 – Карта локализации населенных пунктов/пасек, где проведен сбор проб медоносных

пчел для исследования зараженности микроспоридиями р. *Nosema*: 1 – с. Ярское;

- 2 – с. Батурино, с. Вершинино, с. Калтай, с. Курлек; 3 – д. Аникино, д. Большое Протопопово, д. Лоскутово, д. Магадаево, д. Просекино, с. Богашево; 4 – п. Басандайка, п. Заречный (Межениновское сельское поселение), с. Межениновка; 5 – д. Романовка; 6 – д. Мазалово; 7 – д. Кандинка, с. Кафтанчиково, с. Коларово; 8 – д. Березкино, д. Губино, с. Рыбалово; 9 – д. Петрово, д. Поросино; 10 – окр. г. Северска; 11 – п. Степановка, окр. г. Томска, д. Бодажково, п. Заварзино, с. Корнилово; 12 – д. Кусково, п. Молодежный, с. Малиновка, с. Семилужки, п. Заречный (Малиновское сельское поселение); 13 – д. Милоновка, с. Октябрьское; 14 – д. Подломск, д. Халдеево, п. Омутное; 15 – д. Малиновая грива; 16 – с. Цветковка; 17 – г. Асино, д. Тихомировка; 18 – с. Зырянское; 19 – с. Дубровка; 20 – с. Чердаты; 21 – с. Тегульдэт; 22 – с. Новошумилово; 23 – д. Ломовицк; 24 – д. Еловка; 25 – с. Новоивановка; 26 – с. Песочнодубровка; 27 – д. Муллова; 28 – с. Баткат; 29 – с. Каргала; 30 – с. Мельниково; 31 – с. Новониколаевка; 32 – с. Малобагино; 33 – с. Новоильинка; 34 – с. Новотроицкое; 35 – с. Монастырка; 36 – с. Володино; 37 – окр. с. Кривошеино; 38 – с. Соколовка, оз. Юнанга; 39 – с. Могочино; 40 – с. Волок, с. Нарга; 41 – окр. г. Колпашево; 42 – с. Парабель; 43 – с. Подгорное; 44 – д. Григорьевка; 45 – с. Гореловка, с. Стрельниково; 46 – с. Высокий яр; 47 – с. Парбиг; 48 – д. Крыловка.

Примечание. Населенные пункты и пасеки, расположенные на расстоянии менее 20 км друг от друга, обозначены на карте одной точкой.

Таблица 4 – Районы локализации и численность изученных пчелиных семей, проб и пчел с пасек Томской области

Район исследования	Количество исследованного материала, шт.		
	пасека	пчелосемья	проба (подмор / пчелы)
Асиновский	4	18	0/18
Бакчарский	3	11	0/11
Зырянский	4	30	2/18
Кожевниковский	4	13	1/13
Колпашевский	12	13	0/13
Кривошеинский	3	7	4/7
Молчановский	5	8	3/5
Парабельский	2	6	0/6
Первомайский	1	1	0/2
Тегульдетский	3	7	3/4
Томский	99	257	160/2134
Чаинский	6	12	0/12
Шегарский	12	60	56/14
Всего	158	443	226/2267

1) **Анализ на уровне пасек.** Многолетняя динамика зараженности медоносных пчел спорами *Nosema* изучена на 12 пасеках в 12 населенных пунктах Томского района области (таблица 5).

Таблица 5 – Характеристика пасек, использованных для проведения многолетних наблюдений

Населенный пункт	Год сбора материала				
	2013	2014	2015	2016	2017
д. Бодажково					
д. Кандинка					
д. Кусково					
д. Малиновая Грива					
д. Милоновка					
д. Просекино					
п. Басандайка					
п. Молодежный					
п. Заречное (Межениновское сельское поселение)					
с. Малиновка					
с. Рыбалово					
с. Семилужки					
Примечание. Цветом отмечен год, когда был получен материал для анализа.					

2) Анализ на уровне пчелиной семьи (суммарная проба от семьи, пул особей). Изучена сезонная динамика зараженности микроспоридиями р. *Nosema* 20 пчелиных семей, полученных с 3 пасек 3 населенных пунктов двух районов (Томском и Шегарском) Томской области (таблица 6). Отбор пчел проводился от одних и тех же семей в течение одного пчеловодческого сезона в период активного медосбора (с начала июня до конца августа) с интервалом в две недели. Весь полученный с пасек материал сначала анализировался с помощью световой микроскопии, а затем – методом ПЦР (кроме материала с пасеки п. Степановка, который доставлялся непосредственно зафиксированным в этиловом спирте и сразу исследовался методом ПЦР).

Таблица 6 – Населенные пункты и количество пчелиных семей и пчел, использованных для анализа сезонной динамики заражения нозематозом

Район, населенный пункт		Количество материала, шт.		
		семья	метод	
			м/с	ПЦР
Томский	п. Степановка**	10	нет данных	30
	д. Просекино**	7	21	21
Шегарский	с. Ново-троицкое**	3	9	9
Итого		20	30	60
Примечание. * – материал отбирался в период май-октябрь; ** – материал отбирался в период июнь-август; # – указано количество особей, использованных для анализа.				

3) Анализ доли зараженных особей в пчелиной семье. Изучена интенсивность и экстенсивность инвазии микроспоридиями р. *Nosema* медоносных пчел 8 семей с двух пасек Томского района (д. Бодажково, п. Заречный Межениновского сельского поселения) в течение пчеловодческих сезонов 2016–2017 гг. Сбор проб пчел проводили в период май–октябрь с интервалом в две недели. От каждой семьи отбирали минимум 70 особей. Всего исследовано 2800 образцов пчел, из них 1463 методом световой микроскопии, 1337 образцов – методом ПЦР (таблица 7).

На четвертом этапе исследования проведена оценка информативности разных методов исследования нозематоза (микроскопического, молекулярно-генетического). Всего изучено 105 пчелиных семей.

Таблица 7 – Населенные пункты и количество образцов пчел, использованных для анализа сезонной динамики заражения нозематозом

Населенный пункт	Количество, шт.			Метод исследования	
	проб	пчелиных семей	исследований	световая микроскопия	ПЦР-диагностика
п. Заречный	8	5	1462	747	715
п. Степановка	2	2	312	310	2
с. Бодажково	8	3	1338	716	622
ИТОГО	18	10	3112	1773	1339

На последнем этапе исследования проведена оценка зараженности пчелиных семей разными возбудителями болезней, наиболее часто встречающихся на пасеках Томской области, с целью поиска ассоциаций между зараженностью пчел нозематозом и другими заболеваниями. Материалом послужили образцы пчел со 137 пасек 64 населенных пунктов 11 районов Томской области, полученные за период 2012–2017 гг. (таблица 8).

Таблица 8 – Районы локализации и численность пасек и проб, исследованных на зараженность паразитами и патогенами

Район исследования	Количество, шт.			Количество исследований, шт.		
	населенных пунктов	пасек	проб (подмор / пчелы)	варроатоз	бактериозы*	микозы*
Асиновский	2	2	0 / 7	7		
Зырянский	2	2	2 / 13	15	1	4
Кожевниковский	3	3	1 / 3	4	1	2
Колпашевский	1	12	0 / 13	13	11	11
Кривошеинский	2	3	4 / 7	11		2
Парабельский	1	2	0 / 6	6		1
Первомайский	1	1	0 / 2	2		
Тегульдетский	2	3	3 / 4	7		5
Томский	41	95	156 / 133	292	72	165
Чаинский	1	3	0 / 9	9		
Шегарский	8	11	56 / 10	64	15	59
ИТОГО	64	137	222 / 208	430	100	249

Для этого первоначально, кроме нозематоза, изучена зараженность пчелиных семей паразитарными (варроатозом), бактериальными и грибковыми инфекциями. При исследовании пчелиной семьи на зараженность несколькими заболеваниями, отбиралось несколько проб и видов материала (живые пчёлы и

подмор). В некоторых случаях одна проба исследовалась на разные болезни, то есть проводилось несколько исследований. Всего проведено 779 исследований, в том числе 430 проб на варроатоз, 100 – на бактериальные инфекции, 249 – на грибковые инфекции/инвазии. При этом сначала учитывалось общая зараженность проб, затем производилось сравнение сочетания инфекций в двух группах – от пчелиных семей, зараженных и незараженных нозематозом.

2.4. Методы исследования

Исследование зараженности медоносных пчел микроспоридиями р. *Nosema*. Анализ зараженности медоносных пчел спорами *Nosema* проводили с использованием микроскопического и молекулярно-генетического методов. Первоначально образцы исследовались методом световой микроскопии, затем проводился ПЦР-анализ для определения видовой принадлежности возбудителя. Исследовали либо живых особей, которых хранили при минус 20°C, либо погибших пчел (подмор). У замороженных особей извлекали среднюю кишку, часть которой использовали для приготовления препаратов для микроскопии, а другая часть – для выделения ДНК. У погибших пчел использовали брюшки, которые растирали в ступке (готовили пул от семьи).

Микроскопические методы. Использовали методику приготовления препарата спор в воде. Для этого в каплю воды на предметном стекле выделяли из пчелы кишечник со спорами, накрывали покровным стеклом так, чтобы не осталось пузырьков воздуха. Излишки воды удаляли фильтровальной бумагой. Края покровного стекла обводили подогретым раствором глицерин-желатина, чтобы вода не испарилась. В водных препаратах форма и размеры, свойственные живым спорам и спорофорным пузырькам, сохраняются долго (Пушкарь, 1982).

Молекулярно-генетические методы. Для выделения ДНК из средней кишки использовали модифицированный метод экстракции смесью гуанидинизотиоцианат-фенол-хлороформ (Никоноров и др., 1998). Выделенную ДНК анализировали методом мультиплексной ПЦР с применением

видоспецифичных праймеров для генов, кодирующих 16S рДНК *N. apis* (Apis 321-F/R) и *N. ceranae* (Mitoc 218-F/R) (Martín-Hernández et al., 2007; Hamiduzzaman et al., 2010). Использовали следующие последовательности праймеров:

Apis 321–Forward: 5' GGG GGC ATG TCT TTG ACG TAC TAT GTA;

Apis 321–Reverse: 5' GGG GGG CGT TTA AAA TGT GAA ACA ACT ATG;

Mitoc 218–Forward: 5' CGG CGA CGA TGT GAT ATG AAA ATA TTA A;

Mitoc 218– Reverse: 5' CCC GGT CAT TCT CAA ACA AAA AAC CG.

Продукты амплификации фракционировали в 1,0% агарозном геле, окрашивали бромистым этидием, визуализировали в ультрафиолетовом свете и документировали с применением системы гель-документирования Gel-Doc XR+ (Bio-Rad) и специальной программы ImageLab 2.0 для визуализации гель-электрофореза.

Для подтверждения результатов ПЦР-анализа было проведено секвенирование амплифицированных фрагментов на ABI Genetic Analyzer 3730 (Applied Biosystems), выполнение согласно рекомендациям производителя. Секвенирующую ПЦР проводили с прямого или обратного праймеров (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems). Полученные сиквенсы сравнивали с таковыми, депонированными в GenBank (NCBI, NIH) с использованием программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Исследование зараженности медоносных пчел клещом *Varroa*. Исследование отобранных проб на зараженность возбудителем варроатоза проводилось в соответствии с "Методическими указаниями по экспресс-диагностике варроатоза и определению степени поражения пчелиных семей клещами варроа в условиях пасеки" (ГУВ МСХ СССР, 1984).

Для исследования отбирали 100–150 пчел (в основном подмор рабочих пчел). В тарелку или чашку с белым дном наливали 150 см³ горячей (70°C) воды и добавляли в нее 2–3 г стирального порошка любой марки. В полученный раствор высыпали отобранную пробу пчел и помешивали в течение 1–2 мин. Погибших пчел тщательно прополаскивали и извлекали пинцетом из раствора. Отпавшие от пчел клещи оседают на дно емкости и хорошо видны на белом фоне

невооруженным глазом или под лупой малого увеличения.

Клещей *Varroa* дифференцировали от других видов наружных клещей, паразитирующих на пчелах, и от браул.

Исследование зараженности медоносных пчел бактериальными и грибковыми инфекциями. Исследования материала на бактериальные и грибковые инфекции проводили совместно со специалистами ОГБУ «Томская областная ветеринарная лаборатория» согласно методическим рекомендациям, официально утвержденными ГУВ МСХ СССР и РФ:

Парагнилец – «Методические указания по лабораторной диагностике парагнильца пчел» (1986). Положительный бактериологический диагноз ставился при выделении культуры *Bacillus paraalvei*.

Энтеробактериозы – «Методические указания по бактериологической диагностике колибактериоза (эширихиоза) животных» (2000). Положительный диагноз на колибактериоз устанавливали при выделении из гемолимфы пчел культуры *E. coli*. «Методические указания по лабораторной диагностике цитобактериоза пчел» (1994). Диагноз на цитробактероз пчел считали установленным при выделении из патологического материала культур со свойствами, характерными для *Citrobacter* spp.

Аскосфероз – «Методические указания по лабораторной диагностике аскосфероза пчел и выделение возбудителя из пыльцы (перги)» (1986). Для подтверждения результатов микроскопического исследования из патологического материала выделяли чистую культуру гриба *Ascospheara*.

Аспергиллез – «Методические указания по лабораторной диагностике аспергиллеза пчел» (1984). Диагноз на аспергиллез пчел считали установленным при выделении из патологического материала культуру гриба *Aspergillus* spp.

Мукормикоз и пенициллез – для выделения гриба использовали среду Сабуро, содержащую антибиотики. Большинство мукоровых грибов активно спорулируют и быстро растут, часто вырастая до крышки чашки Петри через несколько дней.

Статистическая обработка результатов. Подготовительная обработка данных проводилась в приложении Microsoft Office Excel 2003, статистические расчеты выполнены в приложении StatSoft STATISTICA 8.0 for Windows.

Для расчета статистически значимых отличий между двумя выборками (для сравнения двух долей) был использован Z-критерий (Лакин, 1990).

Для оценки ассоциированности зараженности/незараженности пчел нозематозом с другими болезнями пчел (варроатозом, грибковыми инфекциями) использовали показатель отношение шансов OR (odds ration). Для оценки уровня достигнутой статистической значимости полученных результатов (показатель OR) рассчитывали 95%-ный доверительный интервал (95% CI), значения границ которого позволяют оценить, достигает ли расчетное значение отношения шансов заданного уровня статистической значимости (Morris, Gardner, 1988). Сравнение разных выборок пчел, различающимися по зараженности, проводили с использованием критерия χ^2 или критерия χ^2 с поправкой Йетса (в случае малочисленности одного из классов сравнения).

По величине значения OR при условии достижения различий между сравниваемыми группами уровня статистической значимости ($p < 0,05$) оценивали ассоциированность зараженности пчел микроспоридиями и другими паразитами и патогенами. Если значение $OR > 1$ одно заболевание повышало шанс развития другой болезни; при $OR < 1$, наоборот, шанс развития болезни отсутствовал (Кучер, 2015).

ГЛАВА 3. ЗАРАЖЕННОСТЬ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ МИКРОСПОРИДИЯМИ р. *NOSEMA* НА ПАСЕКАХ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

Исследования зараженности медоносных пчел и пасек на территории Томской области до 2012 года носили единичный характер и проводились только методом световой микроскопии. Споры, обнаруженные при таком исследовании медоносных пчел, диагностировались как *N. apis*. Начиная с 2012 года, проводятся систематические исследования зараженности пчел микроспоридиями р. *Nosema* с использованием как микроскопического, так и молекулярно-генетического методов исследования, что позволило установить их видовую принадлежность.

Первоначально изучена зараженность микроспоридиями р. *Nosema* пчелиных семей и пасек на территории Томской области (оценка эпизоотологической обстановки в области) с использованием метода световой микроскопии (рисунок 9). Затем определен видовой состав микроспоридий, паразитирующих у медоносных пчел, обитающих на пасеках Томской области, с использованием молекулярно-генетического метода. Кроме того, проведен анализ ассоциаций зараженности медоносных пчел нозематозом и некоторыми паразитарными (варроатоз) и инфекционными (микозы) болезнями.

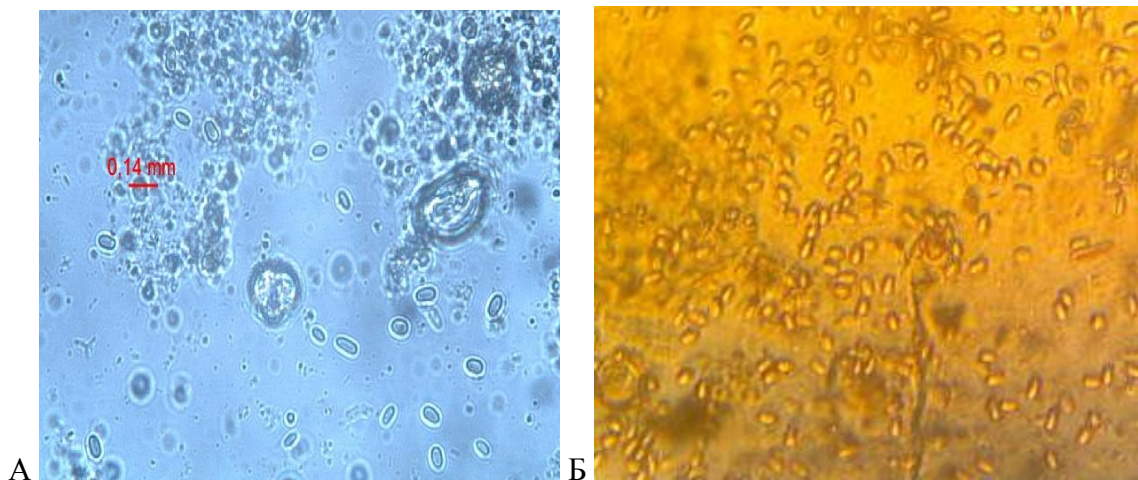


Рисунок 9 – Споры *Nosema*, обнаруженные в средней кишке медоносных пчел при микроскопическом исследовании (увеличение микроскопа $\times 200$).

Показана различная степень зараженности пчел:

А – единичные споры, Б – сильная инвазия (фото автора)

3.1. Характеристика эпизоотологической обстановки на пасеках области

Географическое распределение микроспоридий р. *Nosema* на территории Томской области. Всего в период с 2012 по 2017 из исследованных 443 пчелиных семей, полученных с 158 пасек микроспоридии р. *Nosema* выявлены в 215 семьях (48,5%) и 80 пасеках (50,6%). Микроспоридии р. *Nosema* зарегистрированы в образцах пчел с пасек, расположенных в 12 районах области из 13 исследованных. И лишь в одном (Парабельском) районе на двух исследованных пасеках возбудитель *Nosema* не обнаружен.

Микроспоридии *Nosema* spp. были обнаружены у медоносных пчел, полученных с пасек как южных, так и северных районов области (рисунок 10).

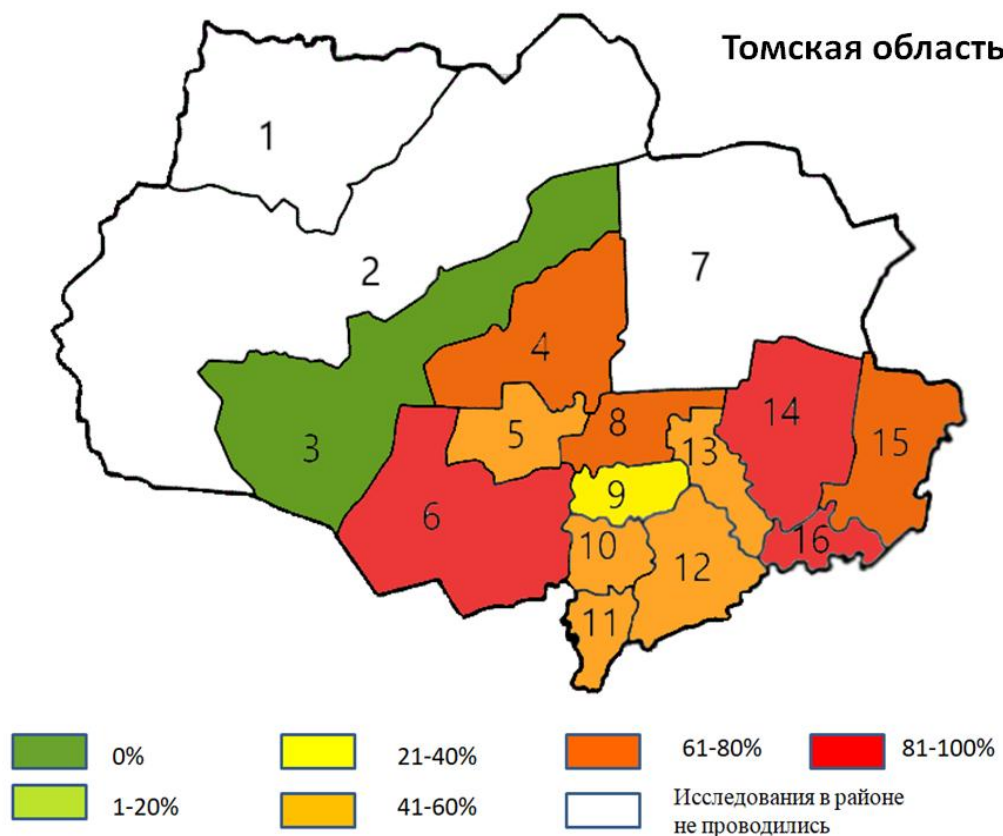


Рисунок 10 – Зараженность микроспоридиями р. *Nosema* различных районов Томской области:

1 – Александровский, 2 – Каргасокский, 3 – Парабельский, 4 – Колпашевский, 5 – Чаинский, 6 – Бакcharский, 7 – Верхнекетский, 8 – Молчановский, 9 – Кривошеинский; 10 – Шегарский, 11 – Кожевниковский, 12 – Томский, 13 – Асиновский, 14 – Первомайский; 15 – Тегульдетский; 16 – Зырянский. Примечание. Указана доля зараженных пасек, %.

Только в одном северном (Парабельском) районе микроспоридии *Nosema* не были зарегистрированы. Для исследования был отбран материал от 6 семей с двух пасек в окрестностях с. Парабель (пробы были отобраны в 2015 и 2016 годах, когда отмечено значительное увеличение количества зараженных семей и пасек на территории Томской области). Уровень зараженности пасек нозематозом от 1 до 20% не выявлен ни в одном районе; в большинстве районов отмечен уровень зараженности от 21 до 100%. Так, из обследованных 13 районов области на территории 10 районов, (76,9% обследованной территории) нозематозом было заражено более 50% пасек от общего числа изученных (таблица 9).

Таблица 9 – Зараженность* микроспоридиями р. *Nosema* пчелиных семей и пасек, расположенных в северных и южных районах Томской области в период 2012–2017 гг.

Администра- тивный район	Количество, шт.		Количество проб/ заражено/ не заражено, шт.	Заражено шт. (%)	
	населенных пунктов	пасек/ семей		пасек	пчелиных семей
Северные районы					
Бакcharский	3	3 / 11	11 / 9 / 2	3 (100,0)	9 (81,8)
Колпашевский	1	12 / 13	13 / 9 / 4	8 (66,7)	9 (69,2)
Кривошеинский	2	3 / 7	11 / 1 / 10	1 (33,3)	1 (14,3)
Молчановский	5	5 / 8	8 / 6 / 2	4 (80,0)	6 (75,0)
Парабельский	1	2 / 6	6 / 0 / 6	0 (0,0)	0 (0,0)
Тегульдетский	2	3 / 7	7 / 6 / 1	2 (66,7)	6 (85,7)
Чаинский	4	6 / 12	12 / 9 / 3	3 (50,0)	9 (75,0)
Итого по северным районам	18	34/64	68/40/28	21 (61,8)	40 (62,5)
Южные районы					
Асиновский	3	4 / 18	18 / 8 / 10	2 (50,0)	8 (44,4)
Зырянский	3	4 / 30	30 / 18 / 12	4 (100,0)	18 (60,0)
Кожевниковский	4	4 / 13	14 / 9 / 5	2 (50,0)	8 (61,5)
Первомайский	1	1 / 1	2 / 2 / 0	1 (100,0)	1 (100,0)
Томский	43	99/257	309 / 155 / 154	44 (44,4)	127 (49,8)
Шегарский	8	12 / 60	68 / 17 / 51	6 (50,0)	13 (21,7)
Итого по южным районам	62	124/379	441/209/232	59 (47,6)	175 (46,2)
ИТОГО по Томской обл.	80	158/443	509/249/260	80 (50,6)	215 (48,5)
Примечание. * – Зараженность пасек и пчелиных семей рассчитывалась отношением числа зараженных к общему числу исследованных пасек и семей.					

Сравнительный анализ зараженности нозематозом пчелиных семей и пасек, расположенных в северных и южных районах области, показал следующие результаты. Доля зараженных семей и пасек северных районов составила 62,5% и 61,8%, соответственно, и была выше, чем в южных районах, на территории которых выявлено 46,2% семей и 47,6% пасек, зараженных *Nosema*, однако статистически значимых отличий между сравниваемыми группами (северные и южные районы) не выявлено ($p > 0,05$). Полученные различные результаты по зараженности пасек северных и южных районов могут быть связаны с меньшим количеством изученных пасек и пчелосемей в северных районах области по сравнению с южными (таблица 9). Наиболее зараженными ($\geq 50\%$ зараженных нозематозом пасек и пчелиных семей) северными районами были Бакчарский, Колпашевский, Молчановский и Тегульдетский; южными – Зырянский, Кожевниковский и Первомайский. Однако следует отметить, что в Первомайском районе исследовано только одна пчелиная семья.

Зараженность микроспоридиями *Nosema* семей и пасек варьировала и в северных, и в южных районах. Так, среди северных районов наименьшая зараженность пчелиных семей и пасек (14,3% и 33,3%, соответственно) зарегистрирована в Кривошеинском районе, наибольшая – в Бакчарском районе (заражено 81,8% пчелиных семей и все исследованные пасеки); исследовано одинаковое количество пасек – по три пасеки в каждом районе. В остальных районах (Колпашевском, Молчановском, Чаинском, Тегульдетском) зарегистрирован уровень заражения пасек от 50% до 80% и пчелиных семей от 69,2% до 85,7% (таблица 9).

Среди южных районов наиболее зараженным нозематозом является Зырянский район, где заражено 60% семей и все исследованные пасеки. Интересно, что Зырянский район является одним из районов Томской области с хорошо развитым пчеловодством, куда активно завозятся пчелиные семьи с других территорий страны (например, Алтая). Вместе с тем, в Томском районе, который также, как и Зырянский, характеризуется высоким уровнем развития пчеловодства, обнаружено наименьшее количество пасек (44,4%), зараженных

паразитом *Nosema*, среди всех южных районов. Наименьшая зараженность пчелиных семей выявлена в Шегарском районе (21,7%). Наиболее высокая зараженность пчелиных семей (61,5%) зарегистрирована в Кожевниковском районе. Что касается Первомайского района (100% заражения пасек и семей), то полученные результаты на основании исследования одной пчелиной семьи, наиболее вероятно не отражают ситуацию на пасеках всего района.

Таким образом, выявлена более высокая степень зараженности возбудителями нозематоза медоносных пчел, обитающих на пасеках северных районов области по сравнению с южными, что согласуется с данными, полученными на территории Республики Удмуртия, где более высокий уровень зараженности медоносных пчел также выявлен в северных районах (28,0% пчелосемей) по сравнению с южной и центральной территорией (17,0% и 18,0%, соответственно) (Колбина и др., 2015). Однако следует отметить, что в отличие от южных районов Томской области, на северных территориях зарегистрировано значительно меньшее количество пчелосемей и пасек, которые расположены на большом расстоянии друг от друга, то есть контакт между пчелиными семьями разных пасек маловероятен (возможность передачи инфекции/инвазии).

В общем, эпизоотологическая обстановка по заболеваемости медоносных пчел нозематозом на территории Томской области рассматривается как относительно стабильная: в отличие от других территорий как России, так и мира в целом, в Томской области за период исследования 2012–2015 гг. зараженности пасек нозематозом зарегистрированы только единичные случаи осеннего слета пчел и гибели пчелиных семей после зимовки. Так, в некоторых регионах России и многих странах мира, где наблюдается массовая гибель пчелиных семей после зимовки, нозематоз, прежде всего микроспоридии *N. ceranae*, рассматриваются как одна из основных причин коллапса медоносных пчел (Klee et al., 2007; Martin-Hernandes et al., 2007; Chen et al., 2008–2010; Fries, 2010; Higes et al., 2010a; Neumann, Carreck, 2010; Paxton, 2010; Hedtke et al., 2011; Stevanovic et al., 2011; Dainat et al., 2012c; Razmaraii et al., 2013; Natsopoulou et al., 2015, 2016). Например, неблагоприятная эпизоотологическая ситуация по нозематозу выявлена на пасеках

в Тюменской (Пашаян, 2012) и Оренбургской (Ильина, Аладдина, 2014) областях, Краснодарском крае (Морева и др., 2008) и других территориях России, причем в ряде регионов отмечено, также, как и в Томской области (согласно данным настоящего исследования) увеличение зараженности медоносных пчел микроспоридиями. Например, в пчелиных семьях, обитающих на пасеках Оренбургской области массовое распространение возбудителя нозематоза началось с 2006 г. и отмечалось на протяжении всего периода исследования до 2013 г., при этом доля зараженных семей составила 70% (Ильина, Аладдина, 2014). В целом, на территории России количество пчелиных семей, зараженных нозематозом оценивается около 50% (Зинатуллина и др., 2012, 2013).

Многолетняя динамика зараженности пчелиных семей и пасек микроспоридиями р. *Nosema* за период 2012–2017 гг. Исследование многолетней динамики зараженности пчелиных семей и пасек микроспоридиями р. *Nosema* в период с 2012 по 2017 г. с использованием микроскопического метода показало, что зараженность как пчелиных семей, так и пасек микроспоридиями р. *Nosema* изменялась постепенно от 0% в 2012 году до 69,0–75,7% в 2016–2017 гг., когда была выявлена наибольшая степень поражения медоносных пчел (таблица 10). При этом, не отмечено волнообразной динамики, то есть периодов всплесков и спадов зараженности нозематозом медоносных пчел, которая характерна для развития некоторых болезней, например, варроатоза, а наблюдается быстрый неравномерный рост увеличения зараженности немногим более 10% ежегодно за относительно короткий 6-летний период времени количества зараженных спорами *Nosema* пчелиных семей и пасек.

В 2015 году зарегистрировано резкое увеличение (почти в 2 раза) зараженности микроспоридиями р. *Nosema* пчелосемей и пасек. Если в 2014 году возбудители выявлены только на 16,7% пасеках и в 18,5% семей от общего числа проб, то в 2015 году споры *Nosema* обнаружены на 43,7% пасеках и в 35,9% семей. В последующие годы (2016–2017 гг.) отмечен дальнейший рост экстенсивности инвазии медоносных пчел спорами *Nosema* на пасеках Томской области, и количество зараженных семей и пасек составил более 60% (таблица 10).

Таблица 10 – Зараженность микроспоридиями р. *Nosema* пчелиных семей и пасек Томской области за период 2012–2017 гг. по данным микроскопического исследования

Год	Количество исследованных пасек/семей, шт.	Всего проб/заражено/не заражено, шт.	Количество зараженного материала, шт. (%)	
			пасек	пчелосемей
2012	27/37	45/0/45	0/0	0/0
2013	44/81	88/2/86	2 (4,5)	2 (2,5)
2014	23/27	42/12/30	4 (16,7)	5 (18,5)
2015	32/53	58/25/33	13 (43,7)	23 (35,9)
2016	37/104	106/71/35	22 (59,5)	62 (59,6)
2017	35/64	74/43/31	23 (65,7)	39 (60,9)

Причины быстрого увеличения количества зараженных пчелиных семей и пасек в течение 2012–2016 гг., вероятно, были разные: погодные условия разных лет, активный завоз на пасеки пчелиных семей и пчелопакетов, инвазированных спорами *Nosema*, а также отсутствие лечебных и профилактических мероприятий и др. Отсутствие нозематоза на пасеках в первый год наблюдения, вероятно, связано с погодными условиями. Так, 2012 год отличался высокими летними температурами и низкой влагообеспеченностью; за период активной вегетации 2012 года было зарегистрировано 86 случаев превышения абсолютного максимума температуры воздуха для данного дня, большая часть которых пришлась на юг Западной Сибири, где наблюдалась аномально жаркая погода (Барашкова и др., 2013). Такие экстремальные погодные условия, которые резко отличались от таковых за длительный период наблюдения на исследуемой территории, могли повлиять на развитие нозематоза у пчел, и можно было ожидать распространение микроспоридий, прежде всего *N. ceranae*, на пасеках Томской области. Однако в этом году не зарегистрировано ни одного случая зараженности пчелиных семей нозематозом (таблица 10), а пчелы характеризовались высокой летной активностью и медопродуктивностью. Следовательно, высказать какие-либо предположения о влиянии таких климатических факторов, как температура и влажность, на распространение

Nosema на примере 2012 года не представляется возможным, а определяющим фактором, вероятно, является хорошая устойчивость к микроспоридиям обследованных пчел.

Кроме того, в последние годы в Томской области наблюдается активное развитие отрасли пчеловодства, ежегодное увеличение числа пасек и пчелиных семей. По данным Управления ветеринарии количество зарегистрированных пчелиных семей на территории Томской области за 15 лет увеличилось в 2 раза. Пчеловоды более активно закупают пчелопакеты и пчелиные семьи из питомников, пытаясь пополнить число семей и «улучшить» породу на своей пасеке, заказывая материал из разных регионов России и стран ближнего зарубежья, неблагополучных по ряду опасных заболеваний пчел. Согласно исследованию пчелиных семей, завезенных в Томскую область (Островерхова, Голубева и др., 2014), медоносные пчелы являются носителями опасных заболеваний, в том числе и нозематоза типа С.

Таким образом, результаты настоящего многолетнего исследования свидетельствуют о широком распространении возбудителя нозематоза на пасеках Томской области и значительном возрастании количества пчелиных семей и пасек, зараженных микроспоридиозом в последние годы. Полученные данные согласуются с результатами исследований, проведенных в разных регионах России, например, в Оренбургской и Тюменской областях, где нозематозом оказались заражены более чем 70% пчелиных семей и пасек (Домацкая и др., 2010; Ильина, Аладдина, 2014). Вместе с тем, причины распространения нозематоза у медоносных пчел до конца не выяснены. В связи с этим, представляет интерес исследование видового состава возбудителей нозематоза как на пасеках разной географической локализации, так и на территории Томской области в целом.

3.2. Распространение двух видов микроспоридий *N. apis* и *N. ceranae* у медоносных пчел на пасеках Томской области

Видовой состав микроспоридий р. *Nosema*, выявленный у медоносных пчел. На данном этапе настоящего исследования для идентификации разных видов микроспоридий был использован молекулярно-генетический метод, позволяющий дифференцировать виды *Nosema*. На территории Томской области у медоносных пчел зарегистрировано два вида микроспоридий р. *Nosema* – *N. apis* и *N. ceranae* (рисунок 11).

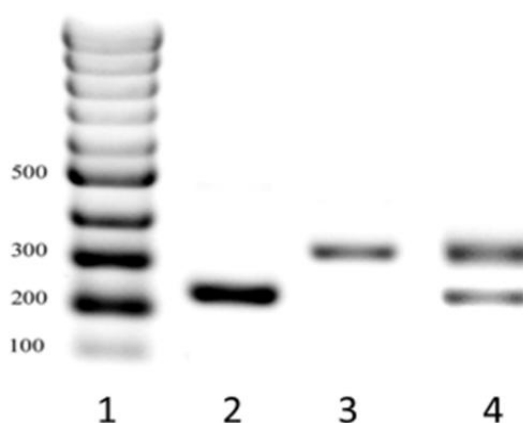


Рисунок 11 – Результаты электрофоретического разделения продуктов мультиплексной ПЦР со специфическими праймерами для 16S рДНК с целью выявления вида *Nosema* (праймеры 218 МТОС специфичны для *N. ceranae*; 321 APIS – для *N. apis*). Дорожки: 1 – маркер длин фрагментов ДНК, леддер 100 пн; 2 – ПЦР-продукт, соответствующий *N. ceranae*; 3 – ПЦР-продукт, соответствующий *N. apis*; 4 – ПЦР-продукт, включающий оба вида *Nosema*

Результаты ПЦР-анализа были подтверждены секвенированием амплифицированных фрагментов. Проведено сравнение последовательностей ПЦР-фрагментов, полученных в настоящем исследовании, с последовательностями 16S рДНК двух видов *Nosema*, представленными в GenBank (NCBI, NIH). Установлена 100% идентичность амплифицированных фрагментов ДНК, определенных нами как *N. apis*, с 16S рДНК *N. apis*, представленной в GenBank (Accession No U97150.1); аналогично, выявлено полное соответствие вида *N. ceranae*, установленного в настоящем исследовании, виду *N. ceranae* (GenBank Accession No DQ486027).

ДНК микроспоридий р. *Nosema* выявлена в пробах пчел с 71 пасеки из 105 исследованных (67,6%). Возбудитель *N. apis* зарегистрирован на 26 пасеках (36,6% от числа зараженных пасек), вид *N. ceranae* – на 12 пасеках (16,9% от числа зараженных). В большинстве случаев (на 33 пасеках) обнаружена вариант заражения «ко-инвазия», что составило 46,5% от числа зараженных пасек (рисунок 12, таблица 11).

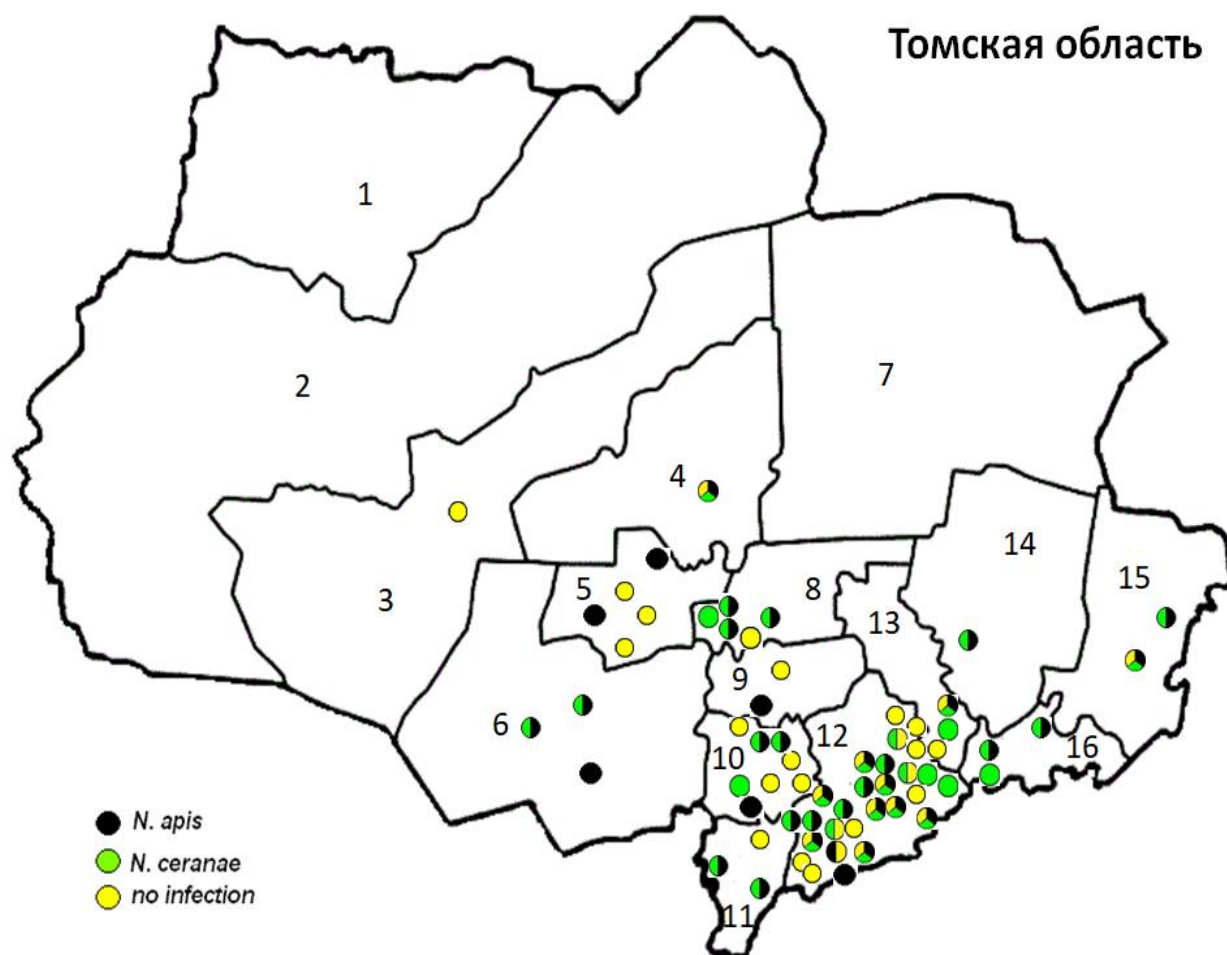


Рисунок 12 – Распространение двух видов микроспоридий р. *Nosema* на пасеках разных районов Томской области: 1 – Александровский; 2 – Кургасокский; 3 – Парабельский; 4 – Колпашевский; 5 – Чаинский; 6 – Бакчарский; 7 – Верхнекетский; 8 – Молчановский; 9 – Кривошеинский; 10 – Шегарский; 11 – Кожевниковский; 12 – Томский; 13 – Асиновский; 14 – Первомайский; 15 – Тегульдетский; 16 – Зырянский.

Примечание. Пасеки, расположенные на расстоянии менее чем 20 км друг от друга, обозначены на карте одной точкой.

Таблица 11 – Распределение двух видов микроспоридий р. *Nosema* в пчелиных семьях и на пасеках Томской области в период 2012–2017 гг.

Единица наблюдения	Количество, шт.	<i>Nosema</i> не обнаружена, %	Выявленный вид микроспоридий, %*		
			<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i>	<i>N. ceranae</i> + <i>N. apis</i>
Пасека	105	32,4	36,6	16,9	46,5
Пчелиная семья	316	38,3	34,9	23,1	42,1
Примечание. * – Зараженность пасек и пчелиных семей разными видами <i>Nosema</i> определялась относительно общего числа зараженных пасек.					

При исследовании 316 пчелиных семей, ДНК микроспоридий р. *Nosema* обнаружена в 195 пробах (61,7%). У медоносных пчел 68 семей (34,9% от числа зараженных) выявлено присутствие только микроспоридии *N. apis*, в 45 пчелиных семьях идентифицирован только возбудитель *N. ceranae* (23,1% от числа зараженных нозематозом). В большинстве случаев выявлены оба возбудителя (82 семьи, 42,1%) (таблица 11). Таким образом, у медоносных пчел, как на уровне семьи, так и на уровне пасеки преобладает вариант заражения «ко-инвазии».

Особенности географического распространения микроспоридий *N. apis* и *N. ceranae* на пасеках Томской области. Распространение двух видов микроспоридий (*N. apis* и *N. ceranae*) в разных районах Томской области отличалось (таблица 12). Так, микроспоридии *N. apis* выявлены в 12 из 13 обследованных районов (92,3%), тогда как *N. ceranae* – в 10 районах (76,9%). На пасеках всех 6 южных и большинства северных районов (4 района из 7) выявлены оба вида микроспоридий. На территории двух северных районов (Кривошеинском и Чаинском) обнаружен только один из двух возбудителей – *N. apis* (28,6% среди северных районов).

Представленность двух видов микроспоридий р. *Nosema* на пасеках разных районов Томской области также отличалась. Так, в одном из наиболее изученных южных районов – Томском (исследовано 33 населенных пункта, 47 пасек и 133 пчелиные семьи), в 6 населенных пунктах на 11 пасеках возбудитель нозематоза не выявлен. Среди 27 населенных пунктов, на пасеках которых зарегистрирован возбудитель нозематоза, в 8 поселениях (29,6% от числа зараженных) обнаружен

паразит *N. apis*, в 3 (11,1%) – *N. ceranae* и в примерно половине населенных пунктов – вариант заражения «ко-инвазия» (Приложение А, таблица А.3). Среди 36 (76,6%) зараженных пасек, только возбудитель *N. apis* был выявлен на 13 пасеках (36,1% от числа зараженных пасек), *N. ceranae* – на 5 пасеках (13,9%), тогда как на большинстве пасек (18 пасек; 50,0%) зарегистрирован вариант заражения «ко-инвазия». Из исследованных 133 семей незараженными нозематозом были 25 семей (18,8%); среди 108 зараженных семей паразит *N. apis* выявлен в 25,9% семей, *N. ceranae* – в 26,9% семей, совместное присутствие двух возбудителей («ко-инвазия») – в 47,2% пчелиных семей (таблица 13, рисунок 12).

Таблица 12 – Распространение двух видов микроспоридий р. *Nosema* на территории разных районов Томской области

Административный район	Вид <i>Nosema</i>
Северные районы	
Бакcharский	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
Колпашевский	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
Кривошеинский	<i>N. apis</i>
Молчановский	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
Парабельский	отр.
Тегульдетский	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
Чаинский	<i>N. apis</i>
Всего 7 северных районов	
Южные районы	
Асиновский	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
Зырянский	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
Кожевниковский	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
Первомайский	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
Томский	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
Шегарский	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
Всего 6 южных районов	

В другом южном районе – Шегарском – нозематоз не зарегистрирован на половине исследованных пасек (изучено 12 пасек в 8 населенных пунктах), что отличает данный район как от других южных, так и северных районов. Например, в с. Монастырка среди 23 исследованных семей с трех пасек не выявлен ни один из возбудителей нозематоза (Приложение А, таблица А.3). На остальных изученных пасеках выявлен либо возбудитель *N. apis* (2 пасеки, 33,3%); либо *N. ceranae* (одна пасека, 16,7%), либо оба возбудителя (3 пасеки,

50% от числа зараженных пасек). Среди исследованных 60 пчелиных семей возбудитель *Nosema* не выявлен в 26 семьях (43,3%); среди 34 зараженных нозематозом семей возбудитель *N. apis* обнаружен в 12 семьях (35,3%), *N. ceranae* – в 1 семьях (2,9%), оба паразита (вариант заражения «ко-инвазия») – в 21 семье (61,8% от числа зараженных семей) (таблица 13, рисунок 12).

Среди северных районов, где были исследованы пасеки в нескольких населенных пунктах, наименее зараженными оказались Чаинский и Кривошеинский районы. Так, в Чаинском районе из исследованных 4 населенных пунктов нозематоз выявлен на пасеках только двух поселений; обнаружено 3 «чистых» пасеки из 6 исследованных. В Кривошеинском районе из 3 исследованных две пасеки, расположенные в с. Кривошеино, оказались незараженными нозематозом. Наиболее неблагополучным из северных районов является Бакcharский (все исследованные пасеки были зараженными, причем на одной пасеке – только возбудитель *N. ceranae*) (Приложение А, таблица А.2).

До недавнего времени распространение возбудителя *N. ceranae* (нозематоз типа С) на пасеках Томской области ограничивалось только двумя южными районами (Томским и Шегарским). Однако весной 2016 года были описаны два новых случая заражения пчелиных семей спорами *N. ceranae* на пасеках двух северных районов области – Молчановского и Тегульдетского, а в 2017 году – на пасеках Бакcharского и Колпашевского районов (рисунок 13; Приложение А, таблица А.2). Следует отметить, что в 2016 году на пасеках Молчановского и Тегульдетского районов зарегистрирована массовая гибель пчелиных семей в конце и после зимовки. Течение заболевания на пасеках, где погибли пчелиные семьи, характеризовалось как типичное для нозематоза типа А (возбудитель *N. apis*), с обострением в конце зимовки и в ранневесенний период: сначала гибель части пчелиных семей наблюдалась в феврале, затем – в течение месяца после первого облета. В пчелиных семьях отмечен основной клинический признак нозематоза типа А – опоношенность пчел (Островерхова, Голубева и др., 2014).

Таблица 13 – Распределение двух видов микроспоридий р. *Nosema* в пчелиных семьях и на пасеках разных районов Томской области в период 2012–2017 гг.

Администра- тивный район	Количество, шт.		<i>Nosema</i> не выявлена, шт. / %		Выявленный вид микроспоридий*, %					
					<i>N. apis</i>		<i>N. ceranae</i>		<i>N. ceranae</i> и <i>N. apis</i>	
	пасека	семья	пасека	семья	пасека	семья	пасека	семья	пасека	семья
Северные районы										
Бакчарский	3	11	0	2/18,2	1/33,3	0	0	3/33,3	2/66,7	6/66,7
Колпашевский	12	13	4/33,3	4/30,8	2/25,0	2/22,2	5/62,5	5/55,6	1/12,5	2/22,2
Кривошеинский	3	7	2/66,7	6/85,7	1/100	1/100	0	0	0	0
Молчановский	5	8	1/20,0	2/25,0	1/25,0	2/33,3	0	0	3/75,0	4/66,7
Парабельский	2	6	2/100	6/100	0	0	0	0	0	0
Тегульдетский	3	7	1/33,3	1/14,3	0	4/66,7	0	0	2/100	2/33,3
Чаинский	6	12	3/50,0	3/25,0	3/100	9/100	0	0	0	0
Итого по северным районам	34	64	13/38,2	24/37,5	8/38,1	18/45,0	5/23,8	8/20,0	8/38,1	14/35,0
Южные районы										
Асиновский	4	18	2/50,0	10/55,6	1/25,0	5/62,5	0	1/12,5	1/25,0	2/25,0
Зырянский	4	28	0	9/32,1	2/50,0	12/63,2	0	0	2/50,0	7/36,8
Кожевниковский	3	12	1/33,3	4/33,3	0	0	0	6/75,0	2/100	2/25,0
Первомайский	1	1	0	0	0	0	0	0	1/100	1/100
Томский	47	133	11/23,0	25/18,8	13/36,1	28/25,9	5/13,9	29/26,9	18/50,0	51/47,2
Шегарский	12	60	6/50,0	26/43,3	2/33,3	12/35,3	1/16,7	1/2,9	3/50,0	21/61,8
Итого по южным районам	71	252	20/28,2	74/29,4	18/35,3	57/32,0	6/11,8	37/20,8	27/52,9	84/47,2
Итого по Томской области	105	316	33/31,4	98/31,0	26/36,1	75/34,4	11/15,3	45/20,6	35/48,6	98/45,0
Примечание. * – Зараженность пасек разными видами <i>Nosema</i> определялась относительно общего числа зараженных пасек.										

При исследовании погибших пчел на нозематоз во всех пробах идентифицированы оба возбудителя – *N. apis* и *N. ceranae* (но паразит *N. apis* преобладал). Наиболее вероятной причиной гибели пчелиных семей на пасеках рассматривается нозематоз в виде «ко-инвазии».

В общем, как на территории южных, так и на территории северных районов Томской области выявлены оба возбудителя нозематоза – *N. apis* и *N. ceranae* (таблица 14). Однако в отличие от южных районов, в некоторых северных районах либо вообще не зарегистрированы возбудители (Парабельский район), либо только один паразит *N. apis* (Кривошеинский и Чаинский районы).

Таблица 14 – Распределение двух видов микроспоридий р. *Nosema* в северных и южных районах Томской области в период 2012–2017 гг.

Районы	Количество исследованных районов	Количество районов, шт. (%)		
		<i>Nosema</i> не обнаружена	вид микроспоридий	
			<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i> и <i>N. apis</i>
южные	6	0	0	6 (100)
северные	7	1 (14,3)	1 (14,3)	5 (71,4)

Вместе с тем, не вызывает сомнений быстрое распространение микроспоридии *N. ceranae* на территории северных районов области, хотя считается, что вид *N. ceranae* менее устойчив к холодным температурам по сравнению с видом *N. apis*. Так, предполагается, что патогенное воздействие микроспоридий на пчелиные семьи отличается в различных климатических условиях (Fries et al., 2010; Gisder et al., 2010; Botías et al., 2012; Forsgren, Fries, 2013; Higes et al., 2013). С одной стороны, чувствительность спор *N. ceranae* к низким температурам не позволяет этому виду конкурировать со спорами *N. apis* в климатических районах, где в зимний период температура опускается ниже минус 20°C, в то время как споры *N. apis* остаются жизнеспособными (Fries et al., 2010; Gisder et al., 2010). С другой стороны, снижение чувствительности спор *N. ceranae* в условиях низких температур компенсируется хорошей устойчивостью к высоким температурам (до 60°C) и

высыханию (Martín-Hernández et al., 2009; Gisder et al., 2010). Наконец, патогенность спор *N. ceranae* может зависеть от комплекса различных факторов, таких как температура, влажность, скорость движения воздуха и т. д. (Игнатьева и др., 2013; Nabian et al., 2011; Chen et al., 2012). Возможно, биологические особенности двух видов микроспоридий р. *Nosema*, прежде всего чувствительность к температуре, а возможно и к другим факторам окружающей среды, могут объяснить более широкую распространенность *N. ceranae* во всем мире и замещение им возбудителя *N. apis* в некоторых странах Европы (Martín-Hernández et al., 2009; Higes et al., 2010b).

Согласно данным настоящего исследования, несмотря на широкое распространение вида *N. ceranae* (преимущественно в форме «ко-инвазии») на территории Томской области, замещения возбудителя *N. apis* паразитом *N. ceranae* не наблюдается.

Таким образом, несмотря на значительное количество исследований в мире, посвященных изучению различных аспектов нозематоза, в настоящее время причины быстрого распространения возбудителя *N. ceranae* в различных природно-климатических регионах остаются до конца невыясненными. Безусловно, одним из основных факторов, способствующим распространению нозематоза, является изменение условий внешней среды – повышение влажности и снижение температуры (Непейвода и др., 2012; Зинатуллина, 2016). Однако пчелы подвергается воздействию самых разнообразных стрессов, таких как недостаток питания, болезни, паразиты, вредные химические вещества (vanEngelsdorp et. al., 2010; Cornman et. al., 2012; Zhu et. al., 2014), что приводит к снижению резистентности организма пчел, в результате чего насекомые более подвержены заражению.

С целью выявления возможного влияния на развитие нозематоза различных болезней, было проведено исследование ассоциаций между микроспоридиями и другими патогенами и паразитами, встречающимися у медоносных пчел на пасеках Томской области.

3.3. Исследование зараженности медоносных пчел паразитами и патогенами и оценка сочетаемости нозематоза с изученными болезнями

Первоначально был изучен спектр паразитов и патогенов, встречающихся на пасеках Томской области (рисунок 13, таблица 15). Затем была проведено изучение зараженности нозематозом в сочетании с другими болезнями с целью оценки значимости для развития микроспоридий р. *Nosema* и других паразитов и патогенов, присутствующих в пчелиных семьях.

Характеристика спектра паразитов и патогенов, встречающихся на пасеках Томской области. В результате исследования 137 пчелиных семей (430 образцов, 779 исследований), полученных с территорий 11 районов Томской области, было установлено, что наиболее распространенными болезнями на пасеках Томской области являются варроатоз, вызываемый клещом *Varroa destructor*, и грибковые инфекции. Так, клещ *Varroa* выявлен в 82% исследованных районов, возбудители бактериальных инфекций – в 60% районов, тогда как возбудители грибковой инфекции – на территории всех изученных районов (Приложение А, таблица А.4, таблица 15, рисунок 13). Наиболее часто на пасеках и в пчелиных семьях встречались возбудители микозов (80,2% и 85,1%, соответственно); несколько реже – возбудитель варроатоза (56,5% и 49,9%) (таблица 15).

Таблица 15 – Зараженность* пчелиных семей и пасек на территории разных районов Томской области паразитами и патогенами

Единица наблюдения	Количество зараженного материала, шт. (%)		
	микозы	бактериозы	варроатоз
Район	8 (100)	3 (60,0)	9 (81,8)
Пасека	69 (80,2)	13 (22,8)	77 (56,5)
Пчелиная семья	177 (85,1)	17 (20,0)	180 (49,9)
Примечание. * – Зараженность районов, пасек и пчелиных семей рассчитывалась отношением числа зараженных к общему числу исследованных районов, пасек и семей.			

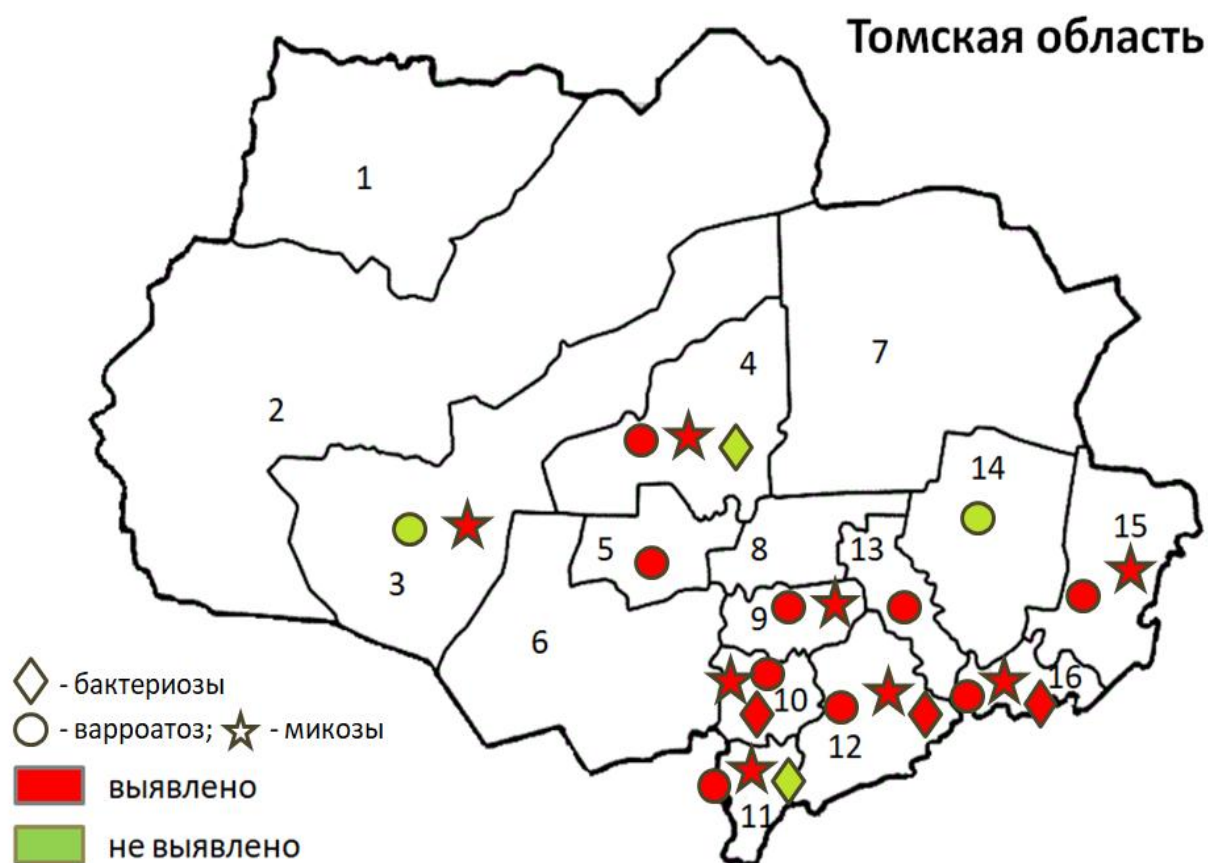


Рисунок 13 – Распространение возбудителей болезней пчел в районах Томской области:
 1 – Александровский; 2 – Каргасокский; 3 – Парабельский; 4 – Колпашевский; 5 – Чаинский;
 6 – Бакcharский; 7 – Верхнекетский; 8 – Молчановский; 9 – Кривошеинский; 10 – Шегарский;
 11 – Кожевниковский; 12 – Томский; 13 – Асиновский; 14 – Первомайский;
 15 – Тегульдетский; 16 – Зырянский.

Достаточно часто в пчелиных семьях регистрировалось одновременно несколько заболеваний, например, варроатоз с грибковой или бактериальной инфекцией, или грибковая и бактериальная инфекции. Среди возбудителей микозов в исследованных пробах пчелиных семей наиболее часто встречались условно патогенные грибы родов *Mucor* spp. и *Penicillium* spp. (таблица 16). Наряду с этим на пасеках зарегистрированы возбудители таких опасных грибковых инфекций, как аскофероз и аспергиллёз. Доля заражения пасек и пчелиных семей аскоферозом составила 23,2% и 17,0% соответственно, от общего числа грибковых инфекций.

Таблица 16 – Распространенность грибковых инфекций у медоносных пчел на территории Томской области

Единица наблюдения	Количество зараженного материала, шт. (%)			
	условно патогенные возбудители	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Asc. apis</i>	два и более возбудителя
Район	1 (12,5)	5 (62,5)	5 (62,5)	3 (37,5)
Пасека	28 (40,6)	29 (42,0)	16 (23,2)	20 (29,0)
Пчелиная семья	98 (55,4)	59 (33,3)	30 (17,0)	59 (33,3)
Примечание. * – Зараженность районов, пасек и пчелосемей разными видами возбудителей микозов определялась относительно общего числа зараженных районов, пасек и пчелосемей.				

Среди грибов рода *Aspergillus* патогенными для пчёл являются три вида – *A. flavus*, *A. niger* и *A. fumigatus*. Наиболее опасным для пчёл и расплода является гриб *A. flavus* (Гробов и др., 1987). На территории двух районов области из 8 исследованных идентифицированы все три вида возбудителя. В исследованных пчелиных семьях так же выявлены все виды особо опасных возбудителей микозов (таблица 16). Примерно в трети случаев отмечено одновременное заражение пчелиных семей двумя и более возбудителями микозов.

Наиболее благополучная эпизоотологическая ситуация в районах и на пасеках области наблюдается по бактериальным заболеваниям. В двух районах из 5 исследованных возбудители бактериозов не обнаружены (рисунок 13). Общая зараженность пасек и пчелиных семей возбудителями бактериальных инфекций составила около 20,0%. За период исследований не выявлено ни одного случая заражения пчёл американским и европейским гнильцом. В 2013 году описан единственный случай присутствия на пасеке п. Аникино Томского района особо опасного возбудителя парагнильца *Bacillus paraalvei*. Основными обнаруженными возбудителями бактериальных инфекций в исследованных районах являются представители четырех родов *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia* и *Proteus* (сем. *Enterobacteriaceae*), рассматриваемые как условно патогенные.

Таким образом, среди наиболее распространенных заболеваний медоносных пчел на территории Томской области наиболее опасными являются нозематоз типа С, вызываемый *N. ceranae*, и варроатоз, возбудителем которого является клещ *V. destructor* – переносчик некоторых возбудителей болезней, прежде всего, вирусных инфекций. Предполагается, что варроатоз способствует распространению грибковых заболеваний, которые проявляются гораздо чаще при варроатозе, и их течение характеризуется, как более тяжелое (Воронков, 2010). Однако более 50% выявленных возбудителей микозов относятся к условно патогенным грибам и при условии высокого иммунитета пчелиной семьи и проведении эффективных лечебных мероприятий могут не оказывать негативного воздействия. Наконец, согласно проведенному анкетированию большинство пчеловодов не рассматривают грибковые и бактериальные инфекции как опасные болезни, не проводят диагностику и своевременные профилактические и лечебные мероприятия (Попова, Голубева, 2013).

Полученные результаты по зараженности пчелиных семей и пасек Томской области паразитами и патогенами частично согласуются с данными, полученными для других регионов страны. Так, эпизоотологическая обстановка по варроатозу оценивается как неблагоприятная на пасеках Мордовии, Татарстана и Удмуртии, на территории Сибири – на пасеках Тюменской области (Угрюмова и др., 2004; Пашаян, 2012); по аскосферозу – в Удмуртии и некоторых других областях (Колбина и др., 2015).

Слудет отметить, что зараженность медоносных пчел различными заболеваниями на разных территориях отличалась. Например, в Республике Мордовия варроатозом были заражены все исследованные пасеки, в Удмуртской Республике – 40,2% пасек, тогда как в Республике Татарстан – не более 33,9% пасек. Аналогичная ситуация наблюдалась и по другим заболеваниям – различная степень зараженности исследованных территорий возбудителями. Так, аскосфероз и аспергиллез широко распространены на пасеках России, но уровень заражения пасек отличался в разных регионах: в Удмуртии процент заражения медоносных пчел аскосферозом достигал 40%, в Татарстане – только

13,4%, а в Мордовии, Башкортостане, Марий Эл выявлено менее 13% случаев (Угрюмова и др., 2004; Колбина и др., 2015). На большинстве исследованных территорий зарегистрировано около 50% пасек, зараженных аспергиллезом, тогда как в республике Марий Эл – не более чем 1% пасек, а в Мордовии болезнь вообще не обнаружена. Данные по зараженности пчелиных семей на пасеках Томской области аскосферозом (17,0%) согласуются с результатами, полученными на территории Татарстана, где зафиксировано 13,4% заражённых семей аскосферозом, но отличаются от данных по зараженности пчелосемей аскосферозом (40,0% семей) на пасеках в Республике Удмуртии.

Вместе с тем, в Томской области, а также и в других регионах (например, Татарстан, Краснодарский край) отмечается расширение ареала распространения микозов за последние несколько лет, что связано, вероятно, с нарушением равновесия нормальной микрофлоры в пчелиной семье, вызванной бесконтрольным применением антибиотиков и других химических препаратов (Попов и др., 2005; Морева, 2008).

Таким образом, в Томской области, как и в некоторых других регионах России, отмечается высокий уровень заражения пчелиных семей и пасек варроатозом, нозематозом и микозами, хотя уровень зараженности болезнями отличается. В отличие от других территорий России в Томской области случаи массовой гибели медоносных пчел носят единичный характер, опасные бактериальные инфекции, такие как европейский и американский гнильцы не зарегистрированы (за исключением одного случая в 2013 г.).

Анализ встречаемости микроспоридий р. *Nosema* с другими паразитами и патогенами у медоносных пчел. Для оценки встречаемости микроспоридий одновременно с одним или несколькими возбудителями болезней, такими как варроатоз, микозы, бактериозы проанализированы пробы от 362 пчелиных семей со 137 пасек из 64 населенных пунктов, расположенных в 11 районах области. Были сформированы две выборки пчелиных семей, зараженных и незараженных микроспоридиями р. *Nosema*.

Наиболее часто в обеих изучаемых группах, выявлялись возбудители

микозов, доля зараженных пчелиных семей при этом была идентичной и составила более 85% (таблица 17). Возбудители бактериальных инфекций и клещ *Varroa* выявлялись чаще в *Nosema*-отрицательной группе – заражение было выше на 14,7% и на 9,8%, соответственно, в сравнении с *Nosema*-положительной группой.

Таблица 17 – Зараженность пчелиных семей возбудителями болезней различной этиологии

Характеристика пчелиных семей	Количество зараженных пчелиных семей, шт. (%)		
	микозы	бактериозы	варроатоз
<i>Nosema</i> -положительные	74 (85,1)	3 (10,3)	74 (44,6)
<i>Nosema</i> -отрицательные	103 (85,1)	14 (25,0)	106 (54,4)
Итого	177 (85,1)	17 (20,0)	180 (49,9)
Примечание. * – Зараженность пчелиных семей рассчитывалась отношением числа зараженных к общему числу исследованных пчелосемей.			

Видовой состав идентифицированных возбудителей грибковых инфекций не отличался в двух анализируемых выборках (таблица 18). Наиболее часто регистрировались условно патогенные грибы из родов *Mucor* и *Penicillium*, значительно реже пчелосемьи были заражены особо опасными грибами *Asc. apis* и *Aspergillus* spp.

В семьях, зараженных *Nosema*, чаще диагностировались условно патогенные грибы (таблица 18), при этом заражение составило около двух третей нозема-положительной группы, в отличие от второй группы, где этот показатель составил чуть менее половины. Напротив, более патогенные возбудители микозов в пробах, незараженных нозематозом, встречались более чем в половине случаев, что на 12 % выше аналогичной зараженности свободных от ноземы пчелиных семей (таблица 18). Кроме того, в незараженных нозематозом пчелиных семьях пчел также часто выявлялись и особо опасные возбудители микозов (*Aspergillus* spp. и *Asc. apis*). Так, возбудитель аскосфероза пчел выявлялся на 3,6 % реже в зараженных нозематозом семьях.

Таблица 18 – Зараженность грибковыми инфекциями пчелиных семей разной степени экстенсивности инвазии микроспоридиями *Nosema*

Характеристика пчелиных семей	Количество исследованных семей	Выявленные возбудители микозов*, шт. (%)			
		условно патогенные	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Ascosphaera apis</i>	два и более возбудителя
<i>Nosema</i> –положительные	87	47 (63,5)	21 (28,4)	11 (14,9)	18 (24,3)
<i>Nosema</i> –отрицательные	121	51 (49,5)	38 (36,9)	19 (18,5)	41 (39,8)
Итого	208	98 (55,4)	59 (33,3)	30 (17,0)	59 (33,3)
Примечание. * – Зараженность пчелосемей разными видами возбудителей микозов определялась относительно общего числа зараженных пчелосемей.					

Нередко в одном исследуемом образце обнаруживались два и более возбудителя микоза, причем такая ситуация более характерна для выборки пчел, незараженных нозематозом (таблица 18). Кроме того, в незараженных нозематозом пчелиных семьях пчел также часто выявлялись и особо опасные возбудители микозов (*Aspergillus* spp. и *Ascosphaera apis*). В зараженных *Nosema* семьях, наоборот, чаще диагностировались условно патогенные грибы.

Вторым по частоте выявляемости в пчелиных семьях возбудителем является клещ *Varroa* (возбудитель варроатоза). Паразита *Varroa* выявлен в 44,6% семей, зараженных нозематозом, и в 54,4% семей, свободных от микроспоридий (таблица 17).

При исследовании бактериальной инфекции в образцах наиболее часто встречаемыми возбудителями бактериозов пчёл являлись представители семейства *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*. У нозема-положительной группы они выявлялись в 100 % случаев, у незараженных микроспоридиями пчелосемей – 92,9 %, соответственно (таблица 19). Однако, в нозема-отрицательных пробах кроме представителей родов *Escherichia* и *Citobacter*, в 28,6 % случаев обнаружен представитель рода *Proteus*. Кроме того, возбудителя парагнильца пчел *Bacillus paraalvei* так же был выявлен на пасеке п. Аникино Томского района в пчелосемье благополучной по нозематозу.

Таблица 19 – Зараженность грибковыми инфекциями пчелиных семей разной степени экстенсивности инвазии микроспоридиями *Nosema*

Выявленные возбудители бактериозов	Количество зараженных пчелиных семей*, %	
	нозема-положительные	нозема-отрицательные
<i>Escherichia coli</i>	33,3	50,0
<i>Citobacter diversus</i>	66,7	14,3
<i>Proteus vulgaris</i>	0	28,6
<i>Bacillus paraalvei</i>	0	7,1
ИТОГО	100	100
Примечание. * – Зараженность пчелосемей разными видами возбудителей микозов определялась относительно общего числа зараженных пчелосемей.		

Таким образом, для выборки пчелиных семей, зараженных нозематозом, отмечен меньший уровень зараженности другими паразитами и патогенами (варроатозом, аскосферозом и аспергиллезом) по сравнению с выборкой пчелосемей, незараженной микроспоридиями *Nosema*. Только условно патогенные грибы преобладали в группе семей, зараженных *Nosema*. Вместе с тем, статистически значимых различий между исследованными выборками пчел не выявлено (таблица 20).

На основании анализа отношения шансов (OR) установлено, что каждая из рассмотренных болезней (варроатоз и грибковые инфекции) не определяет риск (шанс) развития другой инфекции/инвазии (нозематоза) (таблица 20). Результаты, полученные в настоящем исследовании, не согласуются с данными, согласно которым существует тесная связь заболеваемости пчел нозематозом с заболеваемостью варроатозом (коэффициент корреляции равен 0,950) (Непейвода и др., 2012). С другой стороны, отмечается частое развитие нозематоза в пчелиных семьях, зараженных клещом *Varroa*, смешанная инфекция фиксируется до 65% случаев (Микитюк, 1990), а течение нозематоза в этом случае осложняется и влечет за собой гибель семей. При этом у погибших пчел в кишечнике обнаруживается гораздо меньшее количество спор микроспоридий, чем у пчел без клеща (Гробов и др., 2008). У пчел, пораженных

клещом *Varroa*, из-за дефицита белка наблюдается снижение образования слоев перитрофической мембраны средней кишки. Вероятно, это объясняет частое поражение нозематозом пчел, зараженных клещом *Varroa* (Гробов и др., 2008). Наряду с этим у больных варроатозом пчел отмечается более раннее проявление микроспориоза.

Таблица 20 – Сравнительный анализ выборок пчел разной степени зараженности нозематозом для определения развития других заболеваний

Сравниваемые группы	OR	95% CI	χ^2/p	χ^2 -Йейтса /p
Нозематоз – варроатоз	0,68	0,44–1,06	3,21/0,07	
<i>N. apis</i> – варроатоз	1,33	0,46–3,90	0,34/0,56	
<i>N. ceranae</i> – варроатоз	0,37	0,12–1,18		2,20/0,14
Ко-инвазия – варроатоз	1,15	0,40–3,32	0,08/0,78	
Нозематоз–микозы	0,99	0,43–2,31	0,00/0,99	
Нозематоз – <i>Ascosphaera apis</i>	2,75	0,84–9,13	3,60/0,06	2,64/0,10
Нозематоз – <i>Aspergilla</i> spp.	0,90	0,29–2,84	0,04/0,84	0,00/0,95
Нозематоз – условно патогенные	1,50	0,52–4,38	0,68/0,41	
<i>N. apis</i> – микозы	1,17	0,30–4,53		0,00/0,98
<i>N. ceranae</i> – микозы	1,04	0,30–3,64		0,04/0,85
Ко-инвазия–микозы	0,97	0,32–2,97		0,07/0,79

Вместе с тем, данные настоящего исследования, а именно меньший уровень зараженности другими паразитами и патогенами выборки пчелиных семей, зараженных нозематозом, по сравнению с выборкой «*Nosema*–отрицательных» пчел, согласуются с данными В. И. Маркова (1986) о том, что при смешанной инвазии пчелиные семьи плохо развиваются, наблюдается значительное снижение количества расплода (до 44 %) и продуктивности семьи (до 15%) по сравнению с семьями, зараженными только варроатозом.

ГЛАВА 4. МНОГОЛЕТНЯЯ И СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ЗАРАЖЕННОСТИ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ МИКРОСПОРИДИЯМИ р. *NOSEMA* НА ПАСЕКАХ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

4.1. Многолетняя динамика зараженности пасек микроспоридиями *N. apis* и *N. ceranae* за период 2012–2017 гг.

В результате многолетних исследований (2012–2017 гг.) зараженности медоносных пчел микроспоридиями р. *Nosema* выявлена волнообразная динамика зараженности пасек Томской области разными видами возбудителей (рисунок 14; Приложение А, таблица А.3):

2012 г. – микроспоридии р. *Nosema* не зарегистрированы ни на одной исследованной пасеке.

2013 г. – из 40 изученных пасек только две пасеки были заражены спорами *Nosema*. На одной пасеке выявлен возбудитель *N. apis*, на другой – вид *N. ceranae*. В 2013 году с использованием метода ПЦР описан первый случай заражения медоносных пчел более агрессивным возбудителем *N. ceranae* на пасеке с. Курлек Томского района (Островерхова, Голубева и др., 2014).

2014 г. – выявлено 8 зараженных пасек, причем паразит *N. apis* – на 5 пасеках, *N. ceranae* – на 1 пасеке, ко-инвазия – на 2 пасеках (62,5%, 12,5% и 25,0%, соответственно, от числа зараженных пасек); всего изучено 44 пасеки. Второй случай заражения медоносных пчел возбудителем *N. ceranae* зарегистрирован на пасеке с. Баткат Шегарского района.

2015 г. – из 14 зараженных пасек (всего исследовано 32 пасеки) возбудитель *N. apis* выявлен на 4 пасеках, *N. ceranae* – также на 4 пасеках и ко-инвазия – на 6 пасеках (28,6%, 28,6% и 42,8 %, соответственно, от числа зараженных пасек). Увеличилось количество пасек, медоносные пчелы на которых заражены возбудителем *N. ceranae*: два новых случая заражения выявлено в начале пчеловодческого сезона на пасеках в окр. г. Томска и в п. Заречный (Межениновское сельское поселение).

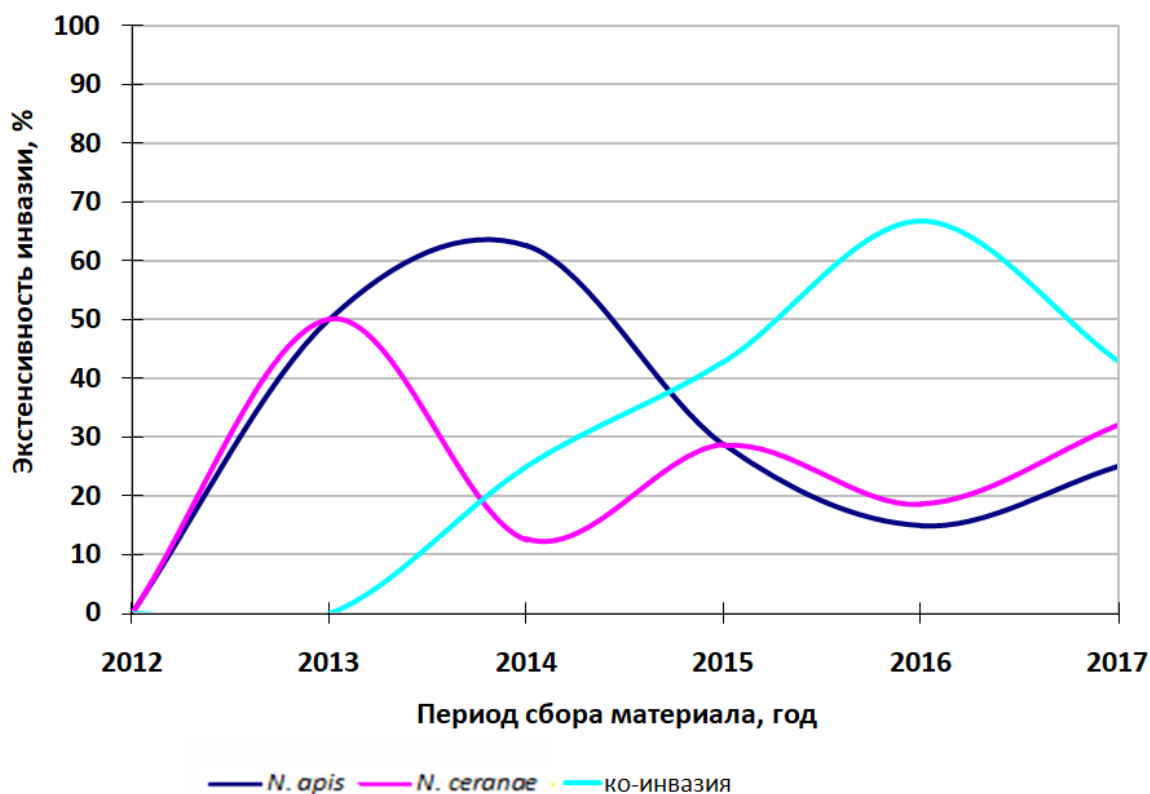


Рисунок 14 – Многолетняя динамика зараженности пасек разными видами *Nosema* в период 2012–2017 гг.

2016 г. – зараженными оказались 27 пасек из 39 исследованных; *N. apis* выявлен на 4 пасаках (14,8%), *N. ceranae* – на 5 пасаках (18,5%) и ко-инвазия – на 18 пасаках (66,7% от числа зараженных пасек).

2017 г. – из 37 исследованных пасек возбудители нозематоза выявлены на 28 пасаках: *N. apis* – на 7 пасаках (25,0%), *N. ceranae* – на 9 пасаках (32,1%) и ко-инвазия – на 12 пасаках (42,9% от числа зараженных пасек) (рисунок 13).

В 2016–2017 гг. количество пасек, на которых обнаружен возбудитель *N. ceranae*, значительно увеличилось и составило 59,0% и 56,8% в 2016 и 2017 гг., соответственно, от общего числа исследованных пасек (Приложение А, таблица А.3).

Таким образом, зараженность медоносных пчел на пасеках Томской области паразитами р. *Nosema* возросла за изученный период (2012–2017 гг.) преимущественно за счет варианта заражения «ко-инвазия». Замещения традиционного паразита *N. apis* более агрессивным *N. ceranae* не наблюдается.

**Данные многолетних наблюдений по зараженности
микроспоридиями р. *Nosema* пчелиных семей на пасеках Томского района.**

Исследование динамики зараженности медоносных пчел возбудителями нозематоза (*N. ceranae* и *N. apis*) проведено на 12 пасеках 12 населенных пунктов как минимум 3 раза в период 2013–2017 гг. (таблица 21).

Таблица 21 – Данные многолетних наблюдений по зараженности микроспоридиями р. *Nosema* медоносных пчел на пасеках Томского района

Наименование населенного пункта	Период наблюдений, год				
	2013	2014	2015	2016	2017
д. Бодажково	отр. **	отр. **	NA	NA + NC	NA + NC
д. Кандинка	нет данных	отр. **	нет данных	отр.*	отр.*
д. Кусково	нет данных		NA	NA	NA
д. Малиновая Грива	отр. **	отр. **	отр. **	NC	NC
д. Милоновка	отр. **	NA	NA + NC	NA + NC	NA + NC
д. Просекино	отр. **	отр. **	NA + NC	NA + NC	NA + NC
п. Басандайка	отр. **	отр. **	NC	NC	NC
п. Молодежный	нет данных	отр. **	NA	NA	нет данных
п. Заречный (Межениновское сельское поселение)	отр. **	NA + NC	NA + NC	NA + NC	NA + NC
с. Малиновка	NA	NA + NC	NA + NC	NA + NC	NA + NC
с. Рыбалово	отр. **	отр. **	отр. **	нет данных	NA + NC
с. Семилужки	нет данных	отр. **	отр. **	NA	нет данных
ИТОГО:	8	11	11	11	10
Примечание. Исследование проводилось: * – методом ПЦР, ** – методом световой микроскопии; отр. – <i>Nosema</i> не выявлена (отрицательный результат). NA – <i>N. apis</i> ; NC – <i>N. ceranae</i> .					

Только на одной пасеке в д. Кандинка (8,3% от числа обследованных пасек), за все время исследований не выявлено пчел, зараженных спорами *Nosema*. На всех остальных пасеках (11 пасек, 91,7% от общего количества исследованных пасек) хотя бы один раз зарегистрировано наличие спор *Nosema* в пчелиных семьях.

На двух пасеках (с. Малиновка, д. Кусково) в течение всего периода наблюдений регистрировались возбудители нозематоза. Так, на пасеке с. Малиновка первоначально обнаружен только вид *N. apis* (2013 г.), затем оба вида возбудителя (2014–2017 гг.). На пасеке в д. Кусково выявлен только возбудитель *N. apis* (2015–2017 гг.).

На всех остальных пасеках отмечено ухудшение ситуации: на изначально незараженных пасеках впоследствии выявлены споры *Nosema*. На пасеках п. Молодежном и с. Семилужки зарегистрирован только возбудитель *N. apis*, тогда как на остальных пасеках – *N. ceranae* либо в «чистом» виде (д. Малиновая грива), либо в форме заражения «ко-инвазия» (д. Бодажково, д. Милоновка, д. Просекино, п. Заречный и с. Рыбалово).

Таким образом, на пяти пасеках (45,5% от числа зараженных) обнаружен только один вид микроспоридий (либо *N. apis* – 3 пасеки, 27,3%; либо *N. ceranae* – 2 пасеки, 18,2%); на 6 пасеках зарегистрирован вариант заражения «ко-инвазия» (54,5%). На трех пасеках (д. Бодажково, д. Милоновка и с. Малиновка), первоначально незараженных нозематозом, в течение одного пчеловодческого сезона был выявлен возбудитель *N. apis*, затем – оба вида возбудителей («ко-инвазия»). На трех других пасеках (д. Просекино, п. Заречный, с. Рыбалово) диагностировался только вариант заражения «ко-инвазия». Если в 2013 году из 8 исследованных пасек только на одной в с. Малиновке выявлен паразит *N. apis*, то в 2017 году из 10 исследованных пасек только одна пасека в д. Кандинка была незараженной. Из зараженных нозематозом 9 пасек только на одной пасеке выявлен вид *N. apis*, на остальных – присутствовал вид *N. ceranae* либо в «чистой» форме, либо в форме «ко-инвазии», что свидетельствует о быстром распространении возбудителя *N. ceranae* на ранее благополучных территориях.

Для выяснения причин заболеваемости пчел на данных пасеках (в частности, пути проникновения паразита *N. ceranae* на пасеки, в том числе ранее незараженные) получена информация от пчеловодов по истории пасеки и происхождении пчелиных семей, разводимых в пчеловодческом хозяйстве. Так,

согласно данным пчеловодов пасек в д. Бодажково, д. Просекино и с. Рыбалово микроспоридии *N. ceranae* были выявлены у медоносных пчел вскоре после завоза новых семей из южных регионов России. Следовательно, одной из причин широкого распространения возбудителя *N. ceranae* является завоз уже зараженных нозематозом семей.

Второй причиной быстрого распространения возбудителей *Nosema* может рассматриваться контактная передача паразитов между пчелами отдельных пасек, так как большая часть исследованных пасек расположена в непосредственной близости от других пасек. Вместе с тем, пасека в д. Кандинка также близко соседствует с другими пасеками, но является благополучной в отношении нозематоза, по крайней мере, в течение исследованного периода. Стабильная эпизоотологическая ситуация на пасеке может определяться успешными профилактическими и лечебными мероприятиями, проводимыми на пасеке, а также другими причинами (например, породой пчел, разводимых на пасеке и устойчивой к нозематозу).

Наконец, пчеловоды практикуют вывоз ульев за пределы территории пасеки на время основного медосбора, что также может быть причиной заражения нозематозом. Согласно данным ряда публикаций микроспоридии р. *Nosema* обнаружены у некоторых видов ос и шмелей (Plischuk et al., 2009; Graystock et al., 2013; Plischuk, Lange, 2016; Arbulo et al., 2015; Porrini et al., 2017), то есть широко распространены в природе. Можно предположить такой способ передачи, как через контакт с окружающей средой и для медоносных пчел, обитающих на изолированных пасеках, например, в п. Заречный, где были выявлены оба возбудителя нозематоза, однако новых пчелиных семей на пасеку не завозилось в течение последних 5 лет.

Наибольшее количество зараженных пасек выявлено в 2016 году (90,9%), наименьшее – в 2013 году (12,5%), при этом стоит отметить, что, начиная с 2015 года, количество зараженных пасек было высоким и составляло более 70% (таблица 21).

Оценка видового состава микроспоридий показала постепенное изменение представленности видов паразитов на пасеках в течение изученного периода. Так, в 2013 году на пасеках выявлен только возбудитель *N. apis*. Начиная с 2014 года, на пасеках (2 пасеки) регистрируется вид *N. ceranae*, сначала в форме заражения «ко-инвазия», а затем и в «чистом» виде (с 2015 года). В 2016–2017 гг. количество зараженных семей возбудителем *N. ceranae* возрастает до 70% и 88,9%, соответственно, с преобладанием варианта заражения «ко-инвазия» (таблица 22).

Таблица 22 – Динамика зараженности пчелиных семей разными видами *Nosema* на пасеках за период 2013–2017 гг.

Год исследования	Количество изученных пасек	Пасеки (%)			
		<i>Nosema</i> не обнаружена	<i>Nosema</i> выявлена*		
			<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i>	<i>N.apis</i> + <i>N.ceranae</i>
2013	8	87,5	100	0	0
2014	11	72,7	33,3	0	66,7
2015	11	27,3	37,5	12,5	50,0
2016	11	9,1	30,0	20,0	50,0
2017	10	10	11,1	22,2	66,7
Примечание. * – Зараженность пасек разными видами <i>Nosema</i> определялась относительно общего числа зараженных пасек.					

Таким образом, данные многолетних наблюдений по зараженности пчелиных семей спорами *Nosema* на пасеках Томского района согласуются с представленными выше результатами по зараженности нозематозом пчелиных семей и пасек Томской области, в целом, и указывают на увеличение числа зараженных пчелиных семей и пасек микроспоридиями р. *Nosema* с преобладанием варианта заражения «ко-инвазия».

Кроме того, полученные данные в настоящем исследовании частично согласуются с данными, полученными при изучении зараженности медоносных пчел на пасеках Удмуртской Республики (Колбина и др., 2015) и Оренбургской области (Ильина, Аладдина, 2014). Так, на этих территориях на пасеках преобладал возбудитель *N. apis*, по крайней мере, до 2014 года: доля

зараженных семей на территории Удмуртской Республики составила 93,3%; на территории Оренбургской области – заражено 70% исследованных проб. К сожалению, данные по более позднему периоду, оказались недоступными.

4.2. Сезонная динамика зараженности пчелиных семей разными видами *Nosema*

Сезонная динамика зараженности медоносных пчел микроспоридиями р. *Nosema* изучалась на 5 пасеках двух районов (Томского и Шегарского) Томской области с использованием как микроскопического, так и молекулярно-генетического методов:

1) на трех пасеках в с. Новотроицкое (Шегарский район), д. Просекино и п. Степановка (Томский район) исследовано 20 пчелиных семей в течение одного пчеловодческого сезона (июнь–август 2016 г.);

2) на двух пасеках в п. Заречный и д. Бодажково (Томский район) проанализировано 5 пчелиных семей в течение двух пчеловодческих сезонов 2016 и 2017 гг. (сбор проб осуществлялся с мая по октябрь с интервалом в 2 недели). На данных пасеках проводились плановые профилактические обработки пчелиных семей от нозематоза после зимовки (конец апреля), поэтому пробы пчел отбирались в конце мая, чтобы исключить возможное влияние химического препарата. Кроме того, в качестве группы сравнения были использованы зараженные нозематозом семьи с пасеки в окр. г. Томска, где лечение пчел вообще не проводилось. Сбор проб проводился также, как и для опытной группы (с мая по октябрь с интервалом в 2 недели).

Анализ пчелиных семей. При исследовании сезонной динамики зараженности разными видами *Nosema* 20 пчелиных семей с трех пасек (7 семей – д. Просекино, 3 семьи – с. Новотроицкое, 10 семей – п. Степановка) получены следующие результаты (таблица 23):

1) Большинство изученных семей были заражены паразитами р. *Nosema* в течение всего изученного периода; незараженные нозематозом разные семьи

выявлены в п. Степановка (5 семей в июне и августе, 4 семьи – в июле) и одна и та же семья в д. Просекино в течение всего сезона. Преобладал возбудитель *N. ceranae* либо в «чистом» виде, либо в форме «ко-инвазия». Только в июле на пасеке п. Степановка выявлены семьи, зараженные одним паразитом *N. apis*.

Таблица 23 – Динамика зараженности пчелиных семей на трех пасеках в период июнь–август 2016 года

Период сбора материала	Метод исследования					
	Микроскопия	ПЦР				
		Споры не обнаружены, %	Nosema не обнаружена, %	Выявленный вид микроспоридий*, %		
				N. apis	N. ceranae	N. ceranae и N. apis
п. Степановка						
июнь	Нет данных	50,0	0	100	0	
июль		40,0	33,3	50,0	16,7	
август		50,0	0	100	0	
д. Просекино						
июнь	14,3	14,3	0	50,0	50,0	
июль	14,3	14,3	0	83,3	16,7	
август	57,1	14,3	0	50,0	50,0	
д. Новотроицкое						
июнь	100	0	0	0	100	
июль	100	0	0	33,3	66,7	
август	100	0	0	66,7	33,3	
Примечание. * – Зараженность пascек разными видами Nosema определялась относительно общего числа зараженных пascек.						

2) Динамика зараженности семей возбудителем *N. ceranae* различалась на изученных пасеках. Так, если на пасеке д. Новотроицкое в период июнь–август наблюдалось постепенное увеличение количества семей, зараженных *N. ceranae* (0%–33,3%–66,7%), и, соответственно, уменьшение числа семей, зараженных обоими возбудителями, то на пасеках д. Просекино и п. Степановка выявлена разнонаправленная динамика зараженности семей возбудителем *N. ceranae* (д. Просекино – 50,0%–83,3%–50,0%; п. Степановка – 100%–50,0%–100%).

На пасеке п. Степановка в начале сезона (июнь) в пчелиных семьях выявлялся один вид микроспоридий – *N. ceranae*; в июле – обнаружен вид ноземы – *N. apis*, однако в августе на пасеке снова присутствует только возбудитель нозематоза типа С – *N. ceranae*. На пасеке в д. Просекино в отборах проб в июне и августе установлен одинаковый процент зараженности пчелосемей *N. ceranae* и «ко-инвазией», тогда как в июле отмечено увеличение доли семей, зараженных только *N. ceranae*, до 83,3%. Интересно, что в июне во всех пчелиных семьях, полученных с пасеки в д. Новотроицкое, зарегистрирован вариант заражения «ко-инвазия»; с июля по август доля семей, зараженных обоими видами микроспоридий, снизилась до 33,3% (таблица 23).

3) В большинстве случаев (кроме семей с пасеки д. Просекино, изученных в июне–июле) результаты анализа, проведенного микроскопическим и молекулярно-генетическими методами, отличались. Микроскопический анализ медоносных пчел, полученных с пасеки в п. Степановка, не проводился.

Анализ доли зараженных особей в пчелиной семье. Изучена динамика интенсивности инвазии (исследование методом микроскопии) и экстенсивности инвазии (исследование методом ПЦР) 5 пчелиных семей, отобранных с двух пасек п. Заречный (3 семьи) и д. Бодажково (2 семьи) в течение пчеловодческих сезонов 2016–2017 гг., в период май–сентябрь (рисунок 15).

Выявлена сходная картина развития заболеваемости во всех исследованных семьях на двух изученных пасеках. В начале каждого сезона (май 2016–2017 гг.) в большинстве пчелиных семей возбудитель не выявлен (возбудители *Nosema* зарегистрированы только в трех семьях в мае 2017 года). В июне наблюдалось как увеличение количества зараженных особей (хотя уровень экстенсивности инвазии не превышал 30%), так и количества спор *Nosema* в особях (максимальная интенсивность инвазии составила 300 спор в поле зрения микроскопа, увеличение $\times 200$). В июле–августе согласно данным молекулярно-генетического исследования большинство особей исследованных семей были заражены обоими видами *Nosema* («ко-инвазия»). В конце пчеловодческого сезона (сентябрь) в большинстве исследованных семей

нозематоз не обнаружен. Только в одной семье (№ 2) на протяжении двух сезонов отмечен рост числа зараженных особей в сентябре (рисунок 15).

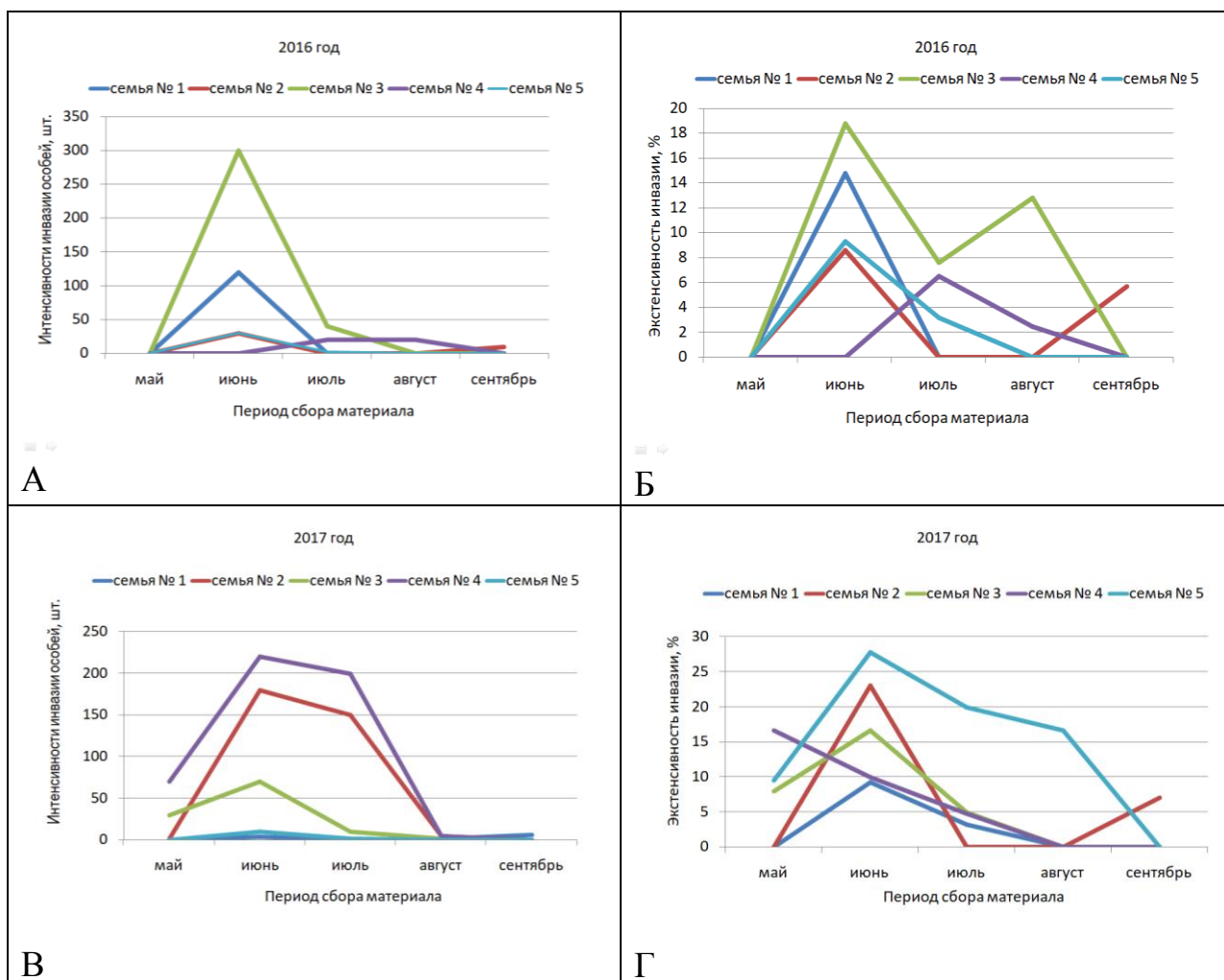


Рисунок 15 – Интенсивность инвазии (А, В) и экстенсивность инвазии (Б, Г) 5 пчелиных семей за период 2016–2017 гг.

Исследование двух пчелиных семей, включенных в группу сравнения (пасека в окр. г. Томска), показало следующие результаты. При обследовании первой семьи в начале пчеловодческого сезона 2016 г. методом световой микроскопии было обнаружено большое количество спор микроспоридий (более 350 в поле зрения микроскопа, увеличение $\times 200$). Методом ПЦР возбудитель нозематоза был идентифицирован как *N. ceranae*. Однако, начиная с августа, в пчелиной семье были обнаружены оба возбудителя нозематоза – *N. apis* и *N. ceranae*, при этом количество выявляемых при микроскопии спор постепенно снижалось, что наблюдалось и в опытной группе. При изучении

материала, отобранного в сентябре–октябре, методом микроскопии, споры ноземы не были обнаружены, но возбудитель был выявлен методом ПЦР.

В конце лета от изучаемой пчелиной семьи пчеловодом был сформирован отводок. В результате исследования образцов пчел семьи-отводка методом микроскопии было установлено наличие спор микроспоридий (около 60 в поле зрения), которые были диагностированы как вид *N. ceranae*.

В период зимовки 2016–2017 гг. на пасеке обнаружена гибель первой пчелиной семьи. Анализ подмора от погибшей семьи методом световой микроскопии показал высокую зараженность пчел нозематозом (в поле зрения микроскопа при увеличении $\times 200$ определялось более 300 спор). Молекулярно-генетическое исследование показало наличие в семье двух видов возбудителей.

Вторая семья (отводок) на пасеке перезимовала благополучно, при этом в пробах, отобранных в конце апреля, в поле зрения выявлялось более 60 спор ($\times 200$); методом ПЦР выявлено присутствие одного вида микроспоридий – *N. ceranae*. Однако в начале мая, после выставления улья из зимовника и весеннего облета, по словам пчеловода в пчелиной семье стали наблюдаться признаки гибели матки. Большинство особей в пробе пчел, отобранной в конце мая, оказалось трутнями, а проба, отобранная в июне, состояла только из одних из трутней. В начале июля пчелиная семья погибла.

Таким образом, исследование сезонной динамики зараженности медоносных пчел разными видами микроспоридий показало сходную картину в двух сравниваемых группах (опытная группы и группа сравнения): для пчелиных семей обеих групп было характерно наличие пика летом, а затем постепенный спад зараженности особей нозематозом к осени. Однако, если для пчелиных семей, обработанных лечебными препаратами, пик инвазии наблюдался в июне, то для пчелиных семей, для которых не проведены лечебные мероприятия, максимальный уровень заражения сохранялся в течение более длительного времени (май–июль). Очевидно, что лечебно-профилактические мероприятия эффективны. Тогда как «больные» семьи с трудом противодействуют заболеванию, им требуется больше времени для

выработки иммунного ответа. Такая «борьба» приводит к ослаблению семьи (в настоящем исследовании обе семьи погибли).

К сожалению, исследования, в которых изучалась сезонная динамика зараженности микроспоридиями *Nosema* spp. пчелиных семей, немногочисленны, поэтому сравнительный анализ результатов, полученных в разных географических (природно-климатических) регионах, практически невозможен. Одним из таких исследований, представляющих значительный интерес, является анализ сезонной динамики зараженности медоносных пчел, обитающих пасеках США (штат Калифорния) и Германии. Так, на территории США выявлена следующая сезонная динамика зараженности нозематозом пчелиных семей: около 50% семей заражено в апреле–мае и почти все исследованные семьи – в августе–сентябре (Runckel et al., 2011), что не согласуется с данными настоящего исследования. Вместе с тем, выявлено некоторое сходство особенностей сезонной динамики зараженности пчелиных семей на территории Томской области и Германии. Так, наибольший процент зараженных нозематозом пчел на пасеках Германии отмечен в июне, затем наблюдалось постепенное снижение зараженных особей к сентябрю, что согласуется с данными по зараженности пчелосемей в Томской области (Gisder et al., 2010; Mulholland et al., 2012). Однако у медоносных пчел с пасек Германии на протяжении всего сезона наблюдалось преобладание возбудителя *N. ceranae*, а вид *N. apis* встречался преимущественно в форме «ко-инвазии» (Runckel et al., 2011), тогда как у медоносных пчел с пасек Томской области в течение всего периода исследований преобладал вариант заражения «ко-инвазия».

Таким образом, немногочисленные данные, полученные в разных популяциях медоносной пчелы, противоречивы и не дают целостного представления о сезонной динамике зараженности пчелиных семей разными видами *Nosema*. Тем не менее, очевидно, что существуют некоторые особенности сезонной динамики зараженности медоносных пчел нозематозом, на которую могут влиять различные факторы (например, абиотические, такие как температура, влажность), а также лечение пчелиных семей.

4.3. Оценка информативности микроскопического и молекулярно-генетического методов для анализа зараженности медоносных пчел микроспоридиями р. *Nosema*

При исследовании многолетней и сезонной динамики зараженности пчелиных семей и пасек микроспоридиями р. *Nosema* были использованы, как микроскопический, так и молекулярно-генетический методы.

С целью оценки информативности микроскопического и молекулярно-генетического методов в диагностике нозематоза первоначально проведен сравнительный анализ зараженности пчелиных семей и пасек микроспоридиями р. *Nosema* за период 2012–2017 гг. (рисунок 16). Анализ экстенсивности инвазии медоносных пчел микроспоридиями, проведенный с использованием разных методов (микроскопического и молекулярно-генетического), показал одинаковую картину: наблюдается увеличение зараженности пчелиных семей и пасек за исследованный период.

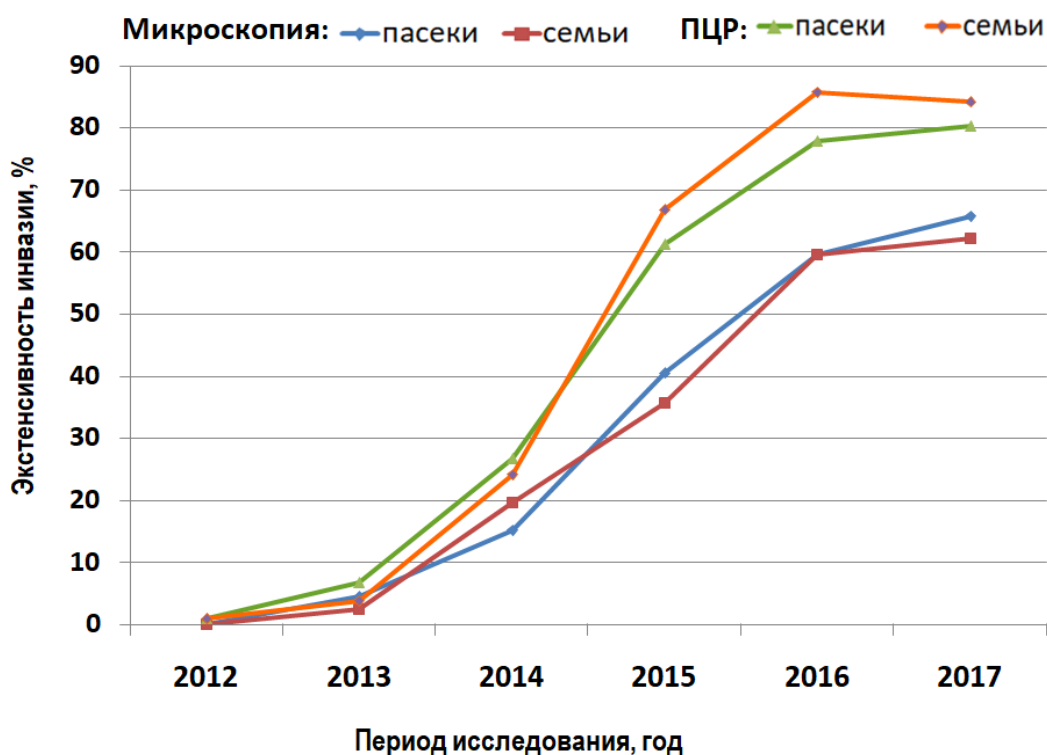


Рисунок 16 – Многолетняя динамика зараженности пчелиных семей и пасек микроспоридиями р. *Nosema* на территории Томской области за период 2012–2017 гг., исследованная микроскопическим и молекулярно-генетическим методами

Вместе с тем, если в случае низкой степени зараженности медоносных пчел, наблюдаемой в период 2012–2014 гг., результаты микроскопического и молекулярно-генетического анализа были сходными, то при увеличении степени инвазии медоносных пчел нозематозом, выявленной в период 2015–2017 гг., показаны значительные различия в данных, полученных разными методами. Например, в 2013 году зараженность пчелиных семей и пасек составила 2,5% и 4,5%, соответственно, согласно данным микроскопического метода, и 2,8% и 5,0%, соответственно, согласно данным метода ПЦР. Тогда как в 2016 году значения экстенсивности инвазии пчелиных семей и пасек, полученные разными методами, отличались и составили около 60,0% (анализ методом микроскопии) и около 80% (анализ методом ПЦР).

Кроме того, на протяжении всего периода исследований более близкими были значения экстенсивности инвазии пасек, но не пчелиных семей (рисунок 16). Так, при анализе зараженности нозематозом пасек готовится суммарная проба с пасеки и вероятность выявления спор *Nosema* микроскопическим методом возрастает, тогда как при исследовании пчелиной семьи (при анализе небольшого количества особей в пуле) споры возбудителя могут быть не обнаружены методом световой микроскопии. Следовательно, для диагностики методом микроскопического анализа одним из основных требований является количество анализируемых особей пчел.

С целью определения оптимального размера выборки материала, прежде всего при проведении микроскопического исследования, был проведен сравнительный анализ зараженности пчелиных семей микроспоридиями р. *Nosema* с использованием метода микроскопии и молекулярно-генетического анализа. Первоначально проведено исследование 105 пчелиных семей, полученных с 56 пасек, с использованием разных методов (анализировалась суммарная проба от пчелиной семьи, пул особей пчел). Затем оценена информативность разных методов в диагностике нозематоза пчелиных семей при анализе зараженности микроспоридиями отдельных особей (анализировалась доля зараженных особей в семье; исследовано 3 пчелиные семьи с пасеки п. Заречный).

Так, при исследовании 105 пчелиных семей согласно данным микроскопического исследования микроспоридии *Nosema* spp. выявлены в 60 пчелиных семьях (57,1% от числа изученных семей), тогда как методом ПЦР ДНК возбудителей нозематоза обнаружена в 85 семьях (81,0% от общего числа пчелиных семей). Применение молекулярно-генетического метода обеспечило более точную диагностику заболевания (выявляемость микроспоридий была в 1,4 раза выше при использовании метода ПЦР по сравнению с микроскопическим методом). Вместе с тем, следует отметить высокую идентичность результатов (66,7% случаев) двух методов исследования. Так, в 52,4% исследованных семей зарегистрированы возбудители с использованием как микроскопического, так и молекулярно-генетического методов; отрицательные результаты (не выявлены микроспоридии р. *Nosema*) получены разными методами для 14,3% пчелиных семей (таблица 24).

Таблица 24 – Результаты сравнительного исследования зараженности микроспоридиями пчелиных семей разными методами

Количество исследованных пчелиных семей	Количество пчелиных семей, шт. (%) по данным исследования зараженности микроспоридиями разными методами			
	микроскопия (+)		микроскопия (–)	
	ПЦР (+)	ПЦР (–)	ПЦР (+)	ПЦР (–)
105	55 (52,4)	5 (4,8)	30 (28,6)	15 (14,3)
Примечание. Микроспоридии р. <i>Nosema</i> : «+» – зарегистрированы; «–» – не зарегистрированы.				

Эти данные согласуются с описанными выше результатами (см. раздел 4.2, стр. 88) по исследованию зараженности микроспоридиями пчелиных семей на двух пасеках (д. Просекино, д. Новотроицкое) с использованием как микроскопического, так и молекулярно-генетического анализа (таблица 23). Так, в образцах пчел с пасеки д. Новотроицкое споры *Nosema* не были выявлены методом световой микроскопии, тогда как в образцах пчел с пасеки д. Просекино споры были обнаружены, причем результаты микроскопического и ПЦР-анализа идентичны для проб, отобранных в июне–

июле (возбудители выявлены в 85,7% изученных семей). Однако в августе споры *Nosema* были обнаружены только в 3 семьях (42,9%) методом микроскопии, но в 6 семьях (85,7%) методом ПЦР.

Однако несмотря на то, что метод ПЦР является более информативным в диагностике нозематоза по сравнению с методом микроскопического анализа, выявлены необычные случаи, которые представляют особый интерес. Так, при исследовании 5 пчелиных семей, полученных с 5 пасек двух районов Томской области, у медоносных пчел были идентифицированы споры *Nosema* (до 300 спор в поле зрения микроскопа, увеличение $\times 200$) методом световой микроскопии, тогда как методом ПЦР результаты микроскопического анализа не подтвердились. Аналогичная ситуация описана при исследовании африканизированных пчел, детальный анализ зараженности которых позволил идентифицировать новый вид микроспоридий – *Nosema neumannii* (Chemurot et al., 2017).

При исследовании зараженности микроспоридиями медоносных пчел от 3 пчелиных семей (использован подход – анализ доли зараженных особей в семье; исследовано 322 особи), выявлены значительные различия в результатах, полученных разными методами (микроскопическим и молекулярно-генетическим) (таблица 25). Так, методом микроскопии споры *Nosema* обнаружены только в 19 образцах (5,9%), тогда как методом ПЦР ДНК микроспоридий выявлена в 161 особи (50,0%). Доля зараженных особей, идентифицированных методом микроскопии, в разных семьях варьировала от 3,3% до 9,2%; доля зараженных особей, идентифицированных методом ПЦР, в разных семьях варьировала от 44,2% до 60,7%. В среднем количество положительных проб, выявленных методом ПЦР, оказалось более чем в 8 раз выше количества проб, выявленных микроскопическим методом. Для семьи №3 количество зараженных особей, выявленных методом ПЦР, было в 18,5 раз выше количества зараженных особей, в которых обнаружены споры возбудителя методом световой микроскопии.

Таблица 25 – Результаты сравнительного исследования зараженности микроспоридиями отдельных особей 3 пчелиных семей разными методами

Номер пчелиной семьи	Количество образцов пчел	Количество особей, шт. (%), у которых выявлены микроспоридии р. <i>Nosema</i>	
		микроскопия	ПЦР
1	141	13 (9,2)	71 (50,4)
2	120	4 (3,3)	53 (44,2)
3	61	2 (3,3)	37 (60,7)
Итого:	322	19 (5,9)	161 (50,0)

Таким образом, согласно полученным данным метод ПЦР является высоко информативным и имеет значительные преимущества по сравнению с классическим методом световой микроскопии, что согласуется с результатами ряда российских и зарубежных исследователей (Токарев и др., 2010; Зинатуллина и др., 2011; Hamiduzzaman et al., 2010; Traver, Fell, 2011; Martin-Hernandez et al., 2012; Mulholland et al., 2012; Teixeira et al., 2013). Вместе с тем, следует отметить, что анализ зараженности медоносных пчел микроспоридиями р. *Nosema* с помощью микроскопического метода является достаточно информативным при диагностике нозематоза на уровне пчелиной семьи (идентичность результатов, полученных разными методами составляет 66,7%), но не при анализе отдельных особей пчелиной семьи (идентичность положительных результатов составила только 5,9%). Кроме того, молекулярно-генетический метод позволяет дифференцировать виды микроспоридий р. *Nosema*.

Несмотря на использование молекулярно-генетических методов при исследовании микроспоридий р. *Nosema* и постановке диагноза, в любом случае необходимо соблюдать следующие условия и требования:

1) при постановке диагноза необходимо учитывать симптомы болезни и дифференцировать нозематоз от бактериальной кишечной инфекции, недоброкачественного или токсичного корма у пчел во время зимовки;

2) требования к размеру выборки материала. В связи с тем, что подсчет спор производится в пчелах случайной выборки, её размер должен

обеспечивать достоверные результаты. Однако в различных методических рекомендациях необходимый размер выборки пчел для постановки диагноза на нозематоз варьирует от 10–25 особей пчел до нескольких сотен (Зинатуллина, 2016; Сохликов и др., 2017; Gisder et al., 2010; Mulholland et al., 2012). Согласно данным настоящего исследования метод микроскопии на уровне отдельных особей оказался малоинформативным, но на уровне пчелиной семьи (при исследовании пула, включающего минимум 70 особей) был достаточно информативным.

3) характер материала (возраст пчел). Для более точной постановки диагноза рекомендовано в качестве надежного измерения уровней инфекции в пчелиной семье осуществлять подсчет спор в образцах пчел более старших возрастов (фуражиров). Показано, что средний уровень инфекции пчел-фуражиров всегда значительно выше, чем у молодых особей пчел и пчел улья (Meana et al., 2010; Smart, Sheppard, 2012). Вместе с тем, в другом исследовании не выявлено существенного отличия в инфекции между пчелами, отобранными с летка, и пчелами внутри улья (Traver et al., 2012).

4) время взятия пробы на нозематоз (месяц и день) имеет большое значение при постановке диагноза (Botías et al., 2012), что обусловлено особенностями жизненного цикла и сезонной динамики микроспоридий. В данном исследовании наиболее высокий уровень экстенсивности заражения пчелиных семей выявлен в июне (на примере 2016–2017 гг.), что позволит скорректировать время сбора проб на пасеках Томской области.

5) метод исследования. Метод световой микроскопии – самый простой и быстрый способ обнаружения спор микроспоридий (Williams et al., 2008). Так, препараты, окрашенные специальными красителями, позволяют обнаружить в ткани кишечника как споры *N. apis*, так и *N. ceranae* (Gisder et al., 2010). Применение метода микроскопии целиком оправдывает себя при экспресс-диагностике зараженности пчелиных семей нозематозом на пасеках и исследовании средней пробы (пула) от каждой семьи. Однако при отборе проб следует учитывать тот факт, что метод микроскопии не всегда позволяет

выявить споровую форму *Nosema* на начальном этапе развития болезни (Mulholland et al., 2012), а также при исследовании пчел после проведенных лечебных и профилактических мероприятий. Кроме того, метод световой микроскопии не позволяет идентифицировать вид возбудителя: крупные споры *N. ceranae* имеют размеры, близкие к спорам *N. apis* наименьшего размера (Higes et al., 2007). Так, в образцах африканизированных трутней, собранных в 1979 году, методом световой микроскопии были обнаружены споры паразита, диагностированные как *N. apis*. Спустя 35 лет эти же образцы пчел были исследованы методом ПЦР: выявлены споры обоих возбудителей нозематоза, как *N. apis*, так и *N. ceranae* (Teixeira et al., 2013). Польские исследователи при микроскопии материала от 15 погибших пчелосемей выявили наличие спор *Nosema* spp. в 10 образцах. Анализ морфологических данных показал присутствие одного вида спор – *N. ceranae* в двух пробах, восемь образцов содержали одновременно споры *N. apis* и *N. ceranae*. Исследование того же материала методом ПЦР, выявило присутствие возбудителя нозематоза во всех образцах, при этом споры *N. apis* выявлены дополнительно в трех образцах (Topolska, Kasprzak, 2007).

Таким образом, несмотря на высокое разрешение метода ПЦР при диагностике нозематоза, особенно видовой принадлежности возбудителя, микроскопический метод необходим при первичном анализе пчелиных семей на пасеках. Использование различных методов при первичном (микроскопический метод) и детальном исследованиях (метод ПЦР) обеспечивает эффективную диагностику нозематоза. В связи с вышеизложенным, в диссертационной работе использовались оба подхода для изучения зараженности медоносных пчел микроспоридиями р. *Nosema* на пасеках Томской области. Это позволило оценить эпизоотологическую обстановку по нозематозу в Томской области, изучить многолетнюю и сезонную динамику зараженности медоносных пчел микроспоридиями р. *Nosema* на пасеках и охарактеризовать парзито-хозяйинные и межвидовые отношения микроспоридий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате настоящего исследования изучена зараженность микроспоридиями р. *Nosema* медоносных пчел на пасеках Томской области и показано широкое распространение нозематоза на территории области. Так, микроспоридии р. *Nosema* выявлены в образцах пчел с пасек 12 районов области из 13 исследованных (кроме Парабельского района). Вместе с тем, в Томской области выявлены территории и пасеки (в 9 районах области), благополучные в отношении нозематоза. В общем, эпизоотологическая обстановка по заболеваемости медоносных пчел нозематозом оценивается как относительно стабильная, так как на территории Томской области отмечены только единичные случаи массовой гибели пчелиных семей во время и после зимовки (в 2016 году в двух северных районах области – Молчановском и Тегульдетском).

Зараженность пчелиных семей и пасек увеличилась за период 2012–2017 гг. с 0% в 2012 году до 69,0% и 75,5%, соответственно, 2017 году. Причем на территории северных районов области отмечено более широкое распространение микроспоридий р. *Nosema* в пчелиных семьях и на пасеках (62,5% и 61,8%, соответственно) по сравнению с южными районами (зараженными возбудителями нозематоза оказались 46,2% пчелиных семей и 47,6% пасек).

Для оценки влияния на риск развития нозематоза других заболеваний медоносной пчелы был проведен анализ встречаемости в пчелиных семьях различных возбудителей. Для этого первоначально был выявлен спектр паразитов и патогенов у медоносной пчелы на пасеках Томской области и проведена оценка их влияния на развитие нозематоза других паразитов и патогенов, присутствующих в пчелиных семьях. Было установлено, что наиболее распространенными болезнями на пасеках Томской области являются варроатоз (возбудитель *Varroa destructor*) (Попова и др., 2014), и грибковые инфекции, среди которых наиболее опасные для пчел – аскосфероз (возбудитель

Ascosphaera apis) и аспергиллез (возбудители *Aspergillus* spp).

Сравнительный анализ зараженности паразитами и патогенами двух выборок пчелиных семей, характеризующихся различной степенью инвазии микроспоридиями *Nosema* (*Nosema*-положительные и *Nosema*-отрицательные), выявил некоторые различия в представленности возбудителей. Так, для *Nosema*-положительной выборки пчелиных семей, зарегистрирован более низкий уровень зараженности варроатозом, аскосферозом и аспергиллезом по сравнению с *Nosema*-отрицательной выборкой семей. Однако статистически значимых различий между исследованными выборками пчелиных семей не выявлено.

С целью изучения особенностей распространения возбудителей нозематоза на территории области с учетом природно-климатических факторов и уровня развития пчеловодства (северные и южные районы), был проведен анализ видового состава микроспоридий р. *Nosema* у медоносных пчел в Томской области.

У медоносных пчел на пасеках Томской области выявлено два вида микроспоридий – *N. apis* и *N. ceranae*. Показано постепенное увеличение количества образцов пчел, зараженных паразитом *N. ceranae* в последние годы либо в «чистом» виде, либо в форме «ко-инвазии» – от 37,5% в 2014 году до 85,2% в 2016 году. Несмотря на значительное снижение в течение изученного периода (2013–2017 гг.) количества пчелиных семей и пасек, зараженных только возбудителем *N. apis* (60% пасек в 2014 году и только 15% пасек в 2016 году), замещения вида *N. apis* более агрессивным паразитом *N. ceranae* на территории Томской области не наблюдается (вид *N. apis* присутствует у медоносных пчел совместно с *N. ceranae* в форме «ко-инвазии»).

Оба возбудителя нозематоза зарегистрированы в большинстве исследованных районов области (11 районов из 12, где выявлены микроспоридии р. *Nosema*), что составило 91,7%. Однако распределение двух видов микроспоридий на территории северных и южных районов было различным. Так, во всех южных районах выявлены оба возбудителя нозематоза

– *N. apis* и *N. ceranae*. Среди северных районов – в двух районах (Чаинском и Кривошеинском) зарегистрирован только вид *N. apis* (14,3% от общего числа северных районов), в остальных (71,4%) – оба вида микроспоридий. Таким образом, наблюдается постепенное распространение *N. ceranae* на северные территории области. Если первоначально, вид *N. ceranae* регистрировался только в южных районах области, то с 2016 года возбудитель выявляется и в северных районах (сначала в Молчановском и Тегульдетском, на трех пасеках которых отмечена массовая гибель пчелиных семей после зимовки 2016 года; затем в 2017 году – в Бакчарском и Колпашевский районах).

Одной из основных причин широкого распространения болезней, в том числе нозематоза типа С, у медоносных пчел во всем мире рассматривается бесконтрольный завоз зараженных пчелопакетов и пчелиных семей на незараженные территории (Mutinelli et al., 2011). Томская область не является исключением: на пасеки области активно завозятся пчелиные семьи южного происхождения (преимущественно карпатской породы и карники), а чаще гибриды неизвестного происхождения с других территорий России и стран ближнего зарубежья, в первую очередь Украины, Узбекистана и других территорий, неблагополучных по нозематозу. Так, обнаруженные в южных районах области (Томском и Шегарском) пчелиные семьи, зараженные возбудителем *N. ceranae*, являются или завезенными с территорий, неблагополучных по эпизоотологической ситуации, или потомками этих зараженных семей.

В отличие от южных районов области, где распространение нозематоза, вероятно, связано с активным завозом зараженных пчелосемей с других территорий и более развитым пчеловодством (высока вероятность контактной передачи инфекции между пчелами отдельных пасек), для северных районов вопрос распространения *N. ceranae* остается открытым (северные районы характеризуются менее развитым пчеловодством; согласно информации пчеловодов на пасеки Молчановского и Тегульдетского районов новые пчелиные семьи в последние годы не завозились). Кроме того, предполагается,

что заболеваемости более подвержены гибридные семьи и семьи южного происхождения как менее адаптированные к условиям Сибири (Островерхова и др., 2015, 2016), однако на пасеках Молчановского и Тегульдетского районов, на которых обнаружена *N. ceranae*, культивируется среднерусская порода. Также распространению инвазии способствует недостаточное проведение (или отсутствие) карантинных мероприятий. Так, пчеловодами отмечается слабая работа по внедрению профилактических и лечебных мероприятий на пасеках, и нежелание пчеловодов использовать новые средства лечения и профилактики болезней пчел.

Наконец, нельзя исключать вариант естественного распространения возбудителей нозематоза, включая *N. ceranae*, в природе. Так, микроспоридия *N. ceranae* была обнаружена у некоторых видов перепончатокрылых, например, одиночных ос и шмелей (Plischuk et al., 2009; Graystock et al., 2013; Plischuk, Lange, 2016; Porrini et al., 2017). Кроме того, возбудитель *N. ceranae* зарегистрирован в пчелиных семьях на длительно изолированных пасеках в Красноярском крае (Островерхова и др., 2018). Возможно, микроспоридии *N. ceranae* начали паразитировать в медоносных пчелах намного раньше, чем описано в литературе (впервые вид *N. ceranae* был выявлен у медоносной пчелы в 1996 году) (Fries et al., 1996).

Согласно данным многолетней динамики (2012–2017 гг.) зараженности медоносных пчел на пасеках Томской области двумя видами микроспоридий выявлено значительное количество пасек, где преобладал вариант заражения медоносных пчел «ко-инвазия» (доля пасек варьировала от 25% в 2014 году до 66,7% в 2017 году). Количество пчелиных семей, зараженных одновременно двумя видами микроспоридий, также было высоким (45% семей от числа исследованных было заражено обоими видами возбудителей). Однако если в южных районах преобладали семьи, зараженные двумя видами микроспоридий («ко-инвазия» выявлена в 47,2% семей от числа исследованных), то в северных районах – большинство исследованных семей было заражено только возбудителем *N. apis* (45,0% семей).

Таким образом, оба вида микроспоридий (*N. apis*, *N. ceranae*) были выявлены в пчелосемьях на пасеках как южных, так и северных районов Томской области, то есть возбудитель *N. ceranae*, как и *N. apis*, широко распространен на территориях с суровыми природно-климатическими условиями, прежде всего характеризующихся продолжительной холодной зимой. Возможно, что процессы изменения климата в дальнейшем будут оказывать влияние на распространение в северных регионах микроспоридии *N. ceranae*, споры которой менее устойчивы к низким температурам по сравнению со спорами *N. apis*. Так, по результатам анализа температурного режима Сибири выявлены районы, где скорость потепления превышает 0,5°C/10 лет, что на порядок больше, чем для Северного полушария Земли в целом (Горбатенко и др., 2011).

Очевидно, что необходимы дальнейшие исследования зараженности микроспоридиями р. *Nosema*, в том числе *N. ceranae*, медоносных пчел на пасеках разных географических районов и в различных природо-климатических регионах с учетом динамических наблюдений для лучшего понимания как паразито-хозяйинных отношений «микроспоридии – медоносная пчела», так и межвидовых взаимоотношений микроспоридий.

Для этого была изучена многолетняя и сезонная динамика зараженности медоносных пчел микроспоридий р. *Nosema* (анализ проводился на уровне пасек, пчелиных семей и отдельных особей).

Многолетние наблюдения показали увеличение числа пасек и пчелиных семей, зараженных обоими видами микроспоридий, причем для большинства исследованных пасек выявлена отрицательная динамика зараженности нозематозом (паразиты выявлены на ранее незараженных пасеках). Наибольшее количество зараженных нозематозом пасек выявлено в 2016 году и составило 90,9% от числа исследованных. Если в 2013 году на пасеках регистрировался только возбудитель *N. apis*, то, начиная с 2014 года, на пасеках впервые выявлен вид *N. ceranae*, сначала в форме ко-инвазии, а с 2015 года и в «чистом» виде. В 2016 и 2017 гг. количество зараженных семей видом *N. ceranae*

(преимущественно в форме «ко-инвазии») достигло 70% и 88,9%, соответственно.

Изучение сезонной динамики зараженности медоносных пчел в период 2016–2017 гг., описывается следующим образом: низкая зараженность микроспоридиями медоносных пчел отмечается в начале сезона; пик развития нозематозного процесса – в июне, когда выявляется наибольший уровень экстенсивности и интенсивности инвазии; в то время как в конце пчеловодческого сезона (сентябрь) вновь отмечен низкий уровень экстенсивности инвазии. Показано сходство выявленной сезонной динамики с таковой, описанной для медоносных пчел, обитающих на пасеках Германии, но это не относится к видовому составу паразитов (на пасеке Томской области преобладает вариант заражения «ко-инвазия», на пасеках Германии – возбудитель *N. ceranae*) (Gisder et al., 2010).

На заключительном этапе исследования с целью оценки информативности разных методов в диагностики нозематоза проведен сравнительный анализ информативности микроскопического и молекулярно-генетического методов, используемых для диагностики нозематоза. Количество положительных проб, выявленных методом ПЦР, значительно превышало число проб, выявленных методом световой микроскопии, особенно при анализе на уровне отдельных особей. Показано, что метод молекулярно-генетической диагностики чувствительнее в сравнении с микроскопическим методом, а значит, является более высоко информативным для дифференциации разных видов микроспоридий.

По результатам исследования зараженности микроспоридиями р. *Nosema* медоносных пчел на пасеках Томской области можно сделать следующие **выводы:**

1) Зараженность медоносных пчел в Томской области микроспоридиями р. *Nosema* возросла с 0% в 2012 г. до 70% в 2017 г.; резкое увеличение зараженности пчел зарегистрировано в 2015 году (53,3% семей и 43,7% пасек).

2) Более 50% пчелиных семей и пасек Томской области заражены

нозематозом. В северных районах области за исключением Парабельского района, где микроспоридии *Nosema* не обнаружены, экстенсивность инвазии пчелиных семей и пасек (62,5% и 61,8%, соответственно) была выше, чем в южных районах (46,2% семей и 47,6% пасек).

3) Два вида микроспоридий (*N. apis* и *N. ceranae*) выявлены на пасеках всех изученных южных и большинства северных районов за исключением Кривошеинского и Чаинского районов, где зарегистрирован только возбудитель *N. apis*. В большинстве зараженных нозематозом пчелиных семей (42,0%) присутствовало оба возбудителя, в 34,9% семей – возбудитель *N. apis* и в 23,1% семей – *N. ceranae*.

4) Динамика экстенсивности инвазии пчелиных семей и пасек возбудителями нозематоза изменялась в течение 2013–2017 гг.: заражено 80,0% пасек возбудителем *N. apis* в период 2013–2015 гг.; с 2016 г. преобладает возбудитель *N. ceranae* в «чистом» виде (заражено 20% пасек в 2016 г. и 36% пасек в 2017 г.) или в форме «ко-инвазии» (заражено 73% пасек в 2016 г. и 33% пасек в 2017 г.). Пик инвазии зарегистрирован в июне.

5) Микроскопический метод является достаточно информативным при диагностике нозематоза на уровне пчелиной семьи (идентичность результатов, полученных разными методами, составляет 66,7%), но не при анализе отдельных особей пчелиной семьи (идентичность положительных результатов, полученных разными методами, составляет 5,9%).

6) Зараженность нозематозом не повышает вероятность развития таких болезней как варроатоз, аскосфероз и аспергиллез, которые наиболее распространены на пасеках Томской области.

Таким образом, в настоящей работе впервые проведено исследование зараженности медоносных пчел микроспоридиями р. *Nosema* на пасеках Томской области с учетом видового состава паразитов с использованием как классического микроскопического метода, так и молекулярно-генетических методов. Полученные данные представляют, как научный, так и практический интерес. Так перспективными направлениями являются следующие: изучение

распространения микроспоридий на территории наиболее северных районов Томской области с учетом межвидовых отношений микроспоридий и других паразитов и патогенов для оценки роли природно-климатических факторов в распространении *N. ceranae*; идентификация возбудителя, выявленного только методом микроскопии, но не методом ПЦР; оценка эффективности лечебных препаратов, наиболее часто применяемых при лечении нозематоза, на жизнеспособность и выживаемость микроспоридий *Nosema* spp.

Полученные результаты по изучению зараженности медоносных пчел на пасеках Томской области представляют собой научную основу для проведения мониторинговых исследований пчелиных семей и пасек (изучение многолетней и сезонной динамики) для оценки эпизоотологической ситуации в Томской области, выявления очагов распространения болезни с целью предупреждения массовой гибели пчелосемей.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

д. – деревня

н/п – населенный пункт

окр. – окрестность

п. – поселок

пн – пара нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция, PCR

с. – село

A. m. mellifera – среднерусская порода (*Apis mellifera mellifera* L.)

Asc. apis – *Ascosphaera apis* возбудитель аскосфероза пчел

Asp. flavus – *Aspergillus flavus*, возбудителей аспергиллеза пчел

Asp. fumigatus – *Aspergillus fumigatus*, возбудителей аспергиллеза пчел

Asp. niger – *Aspergillus niger*, возбудителей аспергиллеза пчел

B. paraalvei – *Bacillus paraalvei*, возбудитель парагнильца пчел

C. diversus – *Citrobacter diversus*, возбудитель цитробактериоза пчел

CI – доверительный интервал

E. coli – *Escherichia coli* (кишечная палочка), возбудитель колибактериоза пчел

N. apis – *Nosema apis*, возбудитель нозематоза типа А

N. ceranae – *Nosema ceranae*, возбудитель нозематоза типа С

OR – отношение шансов (Odds Ratio)

P. vulgaris – *Proteus vulgaris*, возбудитель протериоза пчел

V. destructor – эктопаразитический клещ *Varroa destructor* Anderson et Trueman

СПИСОК ТЕРМИНОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЙ

Аскосфероз – заболевание медоносных пчел, вызываемое грибом *Ascosphaera apis*.

Аспергиллез – заболевание медоносных пчел, вызываемое грибами рода *Aspergillus* (*Asp. niger*, *Asp. flavus*, *Asp. fumigatus* и др.).

Варроатоз – заболевание медоносных пчел, вызываемое эктопаразитическим клещом *Varroa destructor*.

Коллапс пчелиных семей – массовая гибель пчелиных семей в период зимовки и после зимовки, а также внезапное исчезновение пчелиных семей без видимых на то причин (слет пчел, синдром разрушения пчелиных семей).

Нозематоз – инвазионная болезнь рабочих пчел, маток и трутней, вызываемая микроспоридиями рода *Nosema* и характеризующаяся разрушением тканей средней кишки.

Порода – многочисленная, целостная группа животных одного вида, созданная творческим трудом человека, имеющая общую историю развития, характеризующаяся специфическими морфологическими и хозяйственно-полезными свойствами и типом телосложения, которые передаются по наследству, и имеющую в своей структуре необходимое количество линий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алпатов В. В. Породы медоносной пчелы и их использование в сельском хозяйстве / В. В. Алпатов. – М.: Московское общество испытателей природы. – 1948. – 183 с.
2. Барашкова Н. К. Экстремальный режим погоды летом 2012 г. на территории Томской области как отражение современных глобальных климатических тенденций / Н. К. Барашкова, Н. В. Кужевская, Д. В. Поляков // Вестник Томского государственного университета. – 2013. – № 372. – С. 173–179.
3. Воронков И. М. Варроатоз / И. М. Воронков // Пчеловодство. – 2010. – № 4. – С. 48–51.
4. Горбатенко В. П. Роль циркуляционных факторов в потеплении климата Сибири / В. П. Горбатенко [и др.] // Вестник Томского государственного университета. – 2011. – № 346. – С. 174–180.
5. Гробов О. Ф. Болезни и вредители пчёл. Справочник / О. Ф. Гробов, А. М. Смирнов, Е. Т. Попов // М.: Агропромиздат, 1987. – 335 с.
6. Гробов О. Ф. Взаимоотношения *Varroa destructor* с различными организмами / О. Ф. Гробов, А. Н. Сотников, Д. А. Штондина // Ветеринарная патология. – 2008. – № 3. – С.5.
7. Гробов О. Ф. Болезни и вредители пчёл / О. Ф. Гробов, А. К. Лихотин // М.: Агропромиздат, 1989. – 239 с.
8. Домацкая Т. Ф. Основные болезни медоносных пчел на пасеках Тюменской области (эпизоотология, диагностика, профилактика, меры борьбы) / Т. Ф. Домацкая [и др.]. – Тюмень: ООО «Делс», 2010. – С. 31.
9. Евсеева Н. С. География Томской области (Природные условия и ресурсы) / Н. С. Евсеева – Томск: Изд-во Томского ун-та, 2001. – 223 с.
10. Еськов Е. К. Экология медоносной пчелы / Е. К. Еськов. – М.: Россельхозиздат, 1990. – 221 с.

11. Зинатуллина З. Я. Влияние условий зимовки на чистоту пчелиного гнезда и зараженность пчелиных семей возбудителем *Nosema ceranae* / З. Я. Зинатуллина // Биомика. – 2016. – Т. 8, № 4. – С. 93–96.
12. Зинатуллина З. Я. Нозематоз медоносных пчел на пасеках России / З. Я. Зинатуллина, О. Н. Жигилева, А. Н. Игнатьева, Ю. С. Токарев // Материалы III форума пчеловодов «Медовый мир». – Ярославль. – 2012. – С. 72–75.
13. Зинатуллина З. Я. «Азиатский» нозематоз в России / З. Я. Зинатуллина, А. Н. Игнатьева, О. Н. Жигилева, Ю. С. Токарев // Пчеловодство. – 2011. – № 10. – С. 24–26.
14. Зинатуллина З. Я. Дифференциальная диагностика возбудителей нозематоза пчел / З. Я. Зинатуллина, О. Н. Жигилева, А. Н. Игнатьева, Ю. С. Токарев // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013 – Т. 2014. – С. 190–194.
15. Зинатуллина З. Я. Способы зимовки пчелиных семей на пасеке, неблагополучной по *Nosema ceranae* / З. Я. Зинатуллина // Вестник КрасГАУ. – 2017. – № 1. – С. 40–44.
16. Игнатьева А. Н. Влияние температурных режимов на инфекционность спор *Nosema ceranae* и *Nosema apis* – возбудителей нозематоза медоносных пчел / А. Н. Игнатьева, Ю. С. Токарев, З. Я. Зинатуллина // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. – 2013. – № 31. – С. 82–85.
17. Ильина Е. К. Эпизоотология заболеваний пчелы медоносной на территории Оренбургской области / Е. К. Ильина, О. Н. Аладдина // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2014. – № 4. – С. 183–185.
18. Ильясов Р. А. Биология, распространение и профилактика микроспоридий рода *Nosema*, паразитирующих на медоносной пчеле / Р. А. Ильясов, Л. Р. Гайфуллина, Е. С. Салтыкова, А. Г. Николенко // Биомика. – 2014. – Т. 6. – № 3. – С. 145–154.

19. Исси И. В. Микроспоридии как тип паразитических простейших / И. В. Исси // В кн.: Микроспоридии. Сер. «Протозоология», Ленинград: Наука, 1986. – С. 6–135.
20. Исси И. В. Тип Microsporidia – Микроспоридии // Протисты = Protista: руководство по зоологии / И. В. Исси, В. Н. Воронин – СПб: Рос. акад. наук, Зоол. ин-т. 2007. – Т. 2. – С. 994–1045.
21. Исси, И. В. Влияние микроспоридий на гормональный баланс насекомых / И. В. Исси, Ю. С. Токарев // Паразитология. – 2002. – Т. 36. – С. 405-421.
22. Калашникова А. Е, Удина И. Г. Распространение РНК-содержащих вирусов у медоносной пчелы *Apis mellifera* L. на территории России [Электронный ресурс]. – <http://www.apeworld.ru> (дата обращения: 09.04.2017).
23. Колбина Л. М. Эпизоотическое обследование пасек в Удмуртии / Л. М. Колбина [и др.] // Пчеловодство. – 2012. – № 7. – С. 24–25.
24. Конусова О. Л. Пчеловодство Томской области / О. Л. Конусова, Н. В. Островерхова, Ю. Л. Погорелов, Е. С. Попова, Т. Н. Киреева // Пчеловодство. – 2012. – № 9. – С. 8–9.
25. Кривцов Н. И. Среднерусские пчелы и их селекция / Н. И. Кривцов, Н. Н. Гранкин. – Рыбное, 2004. – 120 с.
26. Кучер А. Н. Планирование исследований по генетике многофакторных заболеваний и сложнопотомственных состояний / А. Н. Кучер // Серия «Наследственность и здоровье». Вып. 13, под ред. В. П. Пузырева. – Новосибирск: Академиздат, 2015. – 88 с.
27. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 350 с.
28. Макаров С. Г. Поражённость пчёл варроатозом и нозематозом в Республике Марий Эл / С. Г. Макаров // Пчеловодство. – 2010. – № 8. – С. 21–24.
29. Марков В. И. Нозематоз при варроатозной инвазии / В. И. Марков // Пчеловодство. – 1986. – № 9. – С. 11–12.

30. Мачнев А. Н., Эпизоотическая обстановка на пасеках России на рубеже тысячелетий / А. Н. Мачнев, Н. А. Яременко // Пчеловодство. – 2000. – № 1. – С. 5–6.

31. Методические указания по бактериологической диагностике колибактериоза (эширихиоза) животных. – М. – 2000. – 17 с.

32. Методические указания по лабораторной диагностике аскосфероза пчёл и выделение возбудителя из пыльцы (перги). – М. – 1986. – 2 с.

33. Методические указания по лабораторной диагностике аспергиллёза пчёл. – М. – 1984. – 2 с.

34. Методические указания по лабораторной диагностике парагнильца пчёл. – М. – 1986. – 3 с.

35. Методические указания по лабораторной диагностике цитробактериоза пчел. – М. – 1994. – 5 с.

36. Методические указания по лабораторным исследованиям на нозематоз медоносных пчёл. – М. – 1985. – 3 с.

37. Методические указания по экспресс-диагностике варроатоза и определению степени поражения пчелиных семей клещами варроа в условиях пасеки. – М. – 1984. – 1 с.

38. Методические указания: Эпизоотология нозематоза медоносных пчёл на пасеках Сибири, диагностика и система мер борьбы с его возбудителем. Тюменская государственная сельскохозяйственная академия. – 2004. – 44 с.

39. Морева Л. Я. Болезни медоносных пчел на пасеках Краснодарского края / Л. Я. Морева, М. С. Цуркан, А. В. Абрамчук // Ветеринария Кубани. – 2008. – № 4. – С. 28–30.

40. Непейвода С. Н. Некоторые факторы, влияющие на заболеваемость пчелиных семей нозематозом в удмуртской республике / С. Н. Непейвода, Л. М. Колбина, З. Я. Зинатуллина. // Материалы III форума пчеловодов «Медовый мир». – Ярославль. – 2012. – С. 53–56.

41. Никоноров Ю. М. Использование метода ПЦР для контроля чистопородности пчелосемей *Apis mellifera mellifera* L. в условиях южного

Урала / Ю. М. Никоноров [и др.] // Генетика. – 1998. – Т. 34, № 11. – С. 1574–1577.

42. Островерхова Н. В. Нозематоз типа С в Томской области / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова, А. Н. Кучер, Е. П. Голубева, Т. Н. Киреева // Пчеловодство. – 2016. – № 8. – С. 30–32.

43. Островерхова Н. В. Первый случай диагностики *Nosema ceranae* на пасеке Томской области / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова, Ю. Л. Погорелов, Т. Н. Киреева, М. Ю. Салик, Е. П. Голубева // Пчеловодство. – 2014. – № 9. – С. 28–30.

44. Островерхова Н. В. Морфометрическая и молекулярно-генетическая характеристика пчелосемей Томской области, зараженных нозематозом / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова, Ю. Л. Погорелов // Современное состояние и перспективы развития пчеловодства в Сибири: материалы регион. научно-практ. конф. Красноярск, 25 марта 2015 г. – Красноярск, 2015. – С. 36–42.

45. Островерхова Н. В. Нозематоз типа С в Сибири: ретроспективный анализ / Н. В. Островерхова, Е. П. Голубева, Е. А. Бадмажапова, А. Н. Кучер, О. Л. Конусова, Ю. Л. Погорелов // Пчеловодство. – 2018. – № 1. – С. 32–34.

46. Пашаян С. А. Эколого-биологические основы, определяющие резистентность пчёл к заболеваниям: автореф. дис. доктора биол. наук. – Екатеринбург, 2012. – 40 с.

47. Попов А. А., Мукминов М. Н., Курбанов И. В., Салимов Т. М. Проблемы экологии и патологии медоносных пчёл в республике Татарстан / А. А. Попов, М. Н. Мукминов, И. В. Курбанов, Т. М. Салимов // Вестник ТГГПУ (Вестник Татарского государственного гуманитарно-педагогического университета). – 2005. – № 4. – С. 182–187.

48. Попова Е. С. К изучению распространения клеща *Varroa destructor* Anderson et Trueman на пасеках Томской области / Е. С. Попова, О. Л. Конусова, Н. В. Островерхова, Е. П. Голубева // Современные проблемы зоологии и паразитологии: материалы VI Международной научной

конференции «Чтения памяти проф. И. И. Барабаш-Никифорова». – Воронеж: Изд. дом ВГУ. – 2014. – С. 137–140.

49. Пушкарь Е. Н. Влияние микроспоридий на линьку и обменные процессы у личинок мошек / Е. Н. Пушкарь // В кн.: Современные проблемы протозоологии. Мат-лы III съезда ВОПР. – Вильнюс, 1982. – 298 с.

50. Сафиуллин Р. Р., Набиуллин Р. Г. Состояние пасек в регионах Татарстана / Р. Р. Сафиуллин, Р. Г. Набиуллин // Пчеловодство. – 2011. – № 4. – С. 28–29.

51. Симакова А. В. Выявление микроспоридий *Amblyospora rugosa* и *Trichoctosporea pygopellita* (Microsporidia: Amblyosporidae) — паразитов кровососущих комаров у *Acanthocyclops venustus* и *Acanthocyclops reductus* (Copepoda: Cyclopidae) на основе анализа малой субъединицы рибосомальной ДНК / А. В. Симакова, В. В. Лукьянцев, С. Р. Воссбринк, Т. Г. Андреатис // Паразитология. – 2011. – Т. 45, № 2. – С. 140–146.

52. Симакова А. В. Экология и эпизоотология микроспоридий малярийных комаров (*Diptera culicidae*) юга Западной Сибири / А. В. Симакова, Т. Ф. Панкова // Паразитология. – 2008. – Т. 42, № 2. – С. 139–150.

53. Смирнов А. М. Лечение нозематоза / А. М. Смирнов, А. Б. Сохликов // Пчеловодство. – 2002. – № 4. – С. 28–29.

54. Соколова Ю. Я. Энтомопатогенные простейшие и особенности патогенеза протозойных заболеваний насекомых / Ю. Я. Соколова, И. В. Исси // В сборнике: Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. Москва, 2001. – С. 76–188.

55. Сохликов А. Б. Внимание! Нозематоз / А. Б. Сохликов, А. С. Ульянич, Е. Т. Попов // Пчеловодство. – 2005. – № 3. – С. 48–49.

56. Сохликов А. Б. Идентификация возбудителей нозематоза пчел / А. Б. Сохликов, Г. И. Игнатьева, А. А. Чернышев // Российский журнал Проблема ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2017. – № 2 (22). – С. 72–75

57. Сохликов А. Б. Метод ПЦР-рв для идентификации возбудителей нозематоза / А. Б. Сохликов, Г. И. Игнатьева, А. А. Чернышев // Пчеловодство. – 2012. – № 1 (22). – С. 24–25
58. Сохликов А. Б. Научное обоснование и разработка комплекса ветеринарно-санитарных и лечебных мероприятий при нозематозе пчёл: дис. кандидата. биол. наук. Москва, 1994. – 123 с.
59. Тимофеев, С. А. Взаимоотношения микроспоридий с зараженной клеткой хозяина / С. А. Тимофеев [и др.] // Interactions of microsporidia with infected host cell. Source. Цитология. – 2016. – Vol. 58, is. 8. – P. 594–601
60. Токарев Ю. С. Молекулярная диагностика нозематоза / Ю. С. Токарев, А. Н. Игнатьева, З. Я. Зинатуллина // Пчеловодство. – 2010. – № 5. – С. 18–19.
61. Угрюмова В. С. Эпизоотический мониторинг болезней пчел / В. С. Угрюмова [и др.] // Пчеловодство. – 2004. – № 3. – С. 26–27.
62. Управление ветеринарии Алтайского края. Пришло время исследовать пчел [Электронный ресурс]. 2014. http://altvet.org/show_new.php?id_new=903. (дата обращения: 09.09.2017).
63. Ханбекова Е. М. Поражение медоносной пчелы *Apis mellifera caucasica* Gorb. вирусами и паразитами и состояние пчелиных семей в разных эколого-географических условиях Большого Кавказа / Е. М. Ханбекова [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2013. – № 6. – С. 43–54.
64. Харитонов Н. Н. Влияние различных факторов на устойчивость пчел к заболеваниям / Н. Н. Харитонов // Пчеловодство. – 2012. – № 4. – С. 24–27.
65. Харитонов Н. Н. Селекция устойчивых к заболеваниям пчел / Н. Н. Харитонов // Пчеловодство. – 2006. – № 7. – С. 14–16.
66. Чернышев А. А. Усовершенствование метода диагностики нозематоза медоносных пчёл / А. А. Чернышев // Автореф. дисс...канд. биол. наук. – Москва, 2012. – 21 с.
67. Amdam G. V. The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis / G. V. Amdam, W. Omholt // J. Theor. Biol. – 2003. – Vol. 223. – P. 451–464.

68. Andreadis T. G. Ultrastructural characterization and comparative phylogenetic analysis of new microsporidia from Siberian mosquitoes: evidence for coevolution and host switching / T. G. Andreadis [et al.] // J. Invertebr. Pathol. – 2012. – Vol. 109, is.1. – P. 59–75.

69. Antúñez K. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia) / K. Antúñez [et al.] // Environmental Microbiology. – 2009. – Vol. 11, is. 9. – P. 2284–2290.

70. Aufauvre J. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee / J. Aufauvre [et al.] // Sci. Rep. – 2012. – Vol. 2. – P. 326.

71. Bacandritsos N. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies / N. Bacandritsos [et al.] // Journal of Invertebrate Pathology. – 2010. – Vol. 105, is. 3. – P. 335–340.

72. Baer B. The seminal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera* / B. Baer [et al.] // Proteomics. – 2009. – Vol. 9, is. 8. – P. 2085–2097.

73. Bailey L. The epidemiology and control of *Nosema* disease of the honeybee / L. Bailey // Annals of Applied Biology. – 1955. – Vol. 43, is. 3. – P. 379–389.

74. Bollan K. A. The microsporidian parasites *Nosema ceranae* and *Nosema apis* are widespread in honeybee (*Apis mellifera*) colonies across Scotland / K. A. Bollan [et al.] // Parasitology Research. – 2013. – Vol. 112. – P. 751–759.

75. Boncristiani H. F Molecular approaches to the analysis of deformed wing virus replication and pathogenesis in the honey bee *Apis mellifera* / H. F. Boncristiani [et al.] // Virol. J. – 2009. – Vol. 11, is. 6. – P. 221.

76. Borneck R. Honey bee colony losses in the Jura Region, France and related pathogens / R. Borneck, A. Viry, R. Martin-Hernandez, M. Higes // J. Apic. Res. – 2010. – Vol. 49. – P. 334–336.

77. Botías C. Critical aspects of the *Nosema* spp. diagnostic sampling in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. / C. Botías, R. Martín-Hernández, A. Meana, M. Higes // Parasitol. Res. – 2012a. – Vol. 110, is. 6. – P. 2557–2561.

78. Botías C. Further evidence of an oriental origin for *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) / C. Botías [et al.] // J. Invertebr. Pathol. – 2012c. – Vol. 110, is. 1. – P. 108–113.

79. Botías C. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level / C. Botías [et al.] // Veterinary Research. – 2013. – Vol. 44, is. 25. – P. 1–14.

80. Botías C. The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade / C. Botías [et al.] // Res. Vet. Sci. – 2012b. – Vol. 93, is. 1 – P. 150–155.

81. Bourgeois A. L. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee / A. L. Bourgeois, T. E. Rinderer, L. D. Beaman, R. G. Danka // J. Invertebr. Pathol. – 2010. – Vol. 103. – P. 53–58.

82. Bourgeois A. L. Patterns of *Apis mellifera* infestation by *Nosema ceranae* support the parasite hypothesis for the evolution of extreme polyandry in eusocial insects / A. L. Bourgeois [et al.] // Apidologie. – 2012. – Vol. 43. – P. 539–548.

83. Branchiccela B. Characterization of *Nosema ceranae* genetic variants from different geographic origin / B. Branchiccela [et al.] // Microbial. Ecology. – 2017. – Vol. 73, is. 4. – P. 978–987.

84. Budge G. E. Pathogens as predictors of honey bee colony strength in England and Wales / G. E. Budge [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, is. 7. – e0133228. – 10 p.

85. Budge G. What has *Nosema* got to do with losses? Monitoring both *Nosema* species in the UK / G. Budge [et al.] // Proceedings of the 4th European conference of apidology. – 2010. – P. 48.

86. Burges H. D. Ultrastructure of *Nosema oryzaephili* and the taxonomic value of the polar filament / H. D. Burges, E. U. Canning, I. K. Hulls // J. Invertebr. Pathol. – 1974. – Vol. 23, is. 2. P. 135–139.

87. Burgher-MacLellan K L. Optimization of duplex real-time PCR with melting-curve analysis for detecting the microsporidian parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* / K. L. Burgher-maclellan; G. R. Williams;

D. Shutler; K. C. Mackenzie; R. E. L. Rogers // Canadian Entomologist. – 2010. – Vol. 142. – P. 271–283.

88. Bush A. O. Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites / A. O. Bush, J. C. Fernandez, G. W. Esch, J. R. Seed // Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. – 2001. – P. 566.

89. Cepero A. Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study / A. Cepero [et al.] // BMC Research Notes. – 2014. – Vol. 7. – P. 649.

90. Chaïmanee V. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae* / V. Chaïmanee [et al.] // Journal of Insect Physiology. – 2012. – Vol. 58. – P. 1090–1095.

91. Chaïmanee V. Effects of host age on susceptibility to infection and immune gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) inoculated with *Nosema ceranae* / V. Chaïmanee [et al.] // Apidologie. – 2014. – Vol. 45, is. 4. – P. 451–463.

92. Chauzat M. P. A case control study and a survey on mortalities of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in France during the winter of 2005-6 / M. P. Chauzat [et al.] // Journal of Apicultural Research. – 2010. – Vol. 49. – P. 40–51.

93. Chauzat M. Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies / M. Chauzat [et al.] // Journal of Apicultural Research. – 2007. – Vol. 46, is. 2. – P. 127–128.

94. Chemurot M. *Nosema neumanni* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda / M. Chemurot [et al.] // European Journal of Protistology. – 2017. – Vol. 61. – Part A. – P. 13–19.

95. Chen Y. P. Genome sequencing and comparative genomics of honey bee microsporidia, *Nosema apis* reveal novel insights into host-parasite interactions / Y. P. Chen [et al.] // BMC Genomics. – 2013. – Vol. 14. – P. 451–467.

96. Chen Y. P. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera* / Y. P. Chen [et al.] // Journal of Eukaryotic Microbiology. – 2009. – Vol. 56. – P. 142–147.

97. Chen Y. P. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States / Y. P. Chen, J. D. Evans, I. B. Smith, J. S. Pettis // Journal of Invertebrate Pathology. – 2008. – Vol. 97, is. 2. – P. 186–188.

98. Chen Y. P. *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia / Y. P. Chen, Z. Y. Huang // Apidologie. – 2010. – Vol. 41. – P. 364–374.

99. Chen Y. W. *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperature / Y. W. Chen [et al.] // J. Invertebr Pathol. – 2012 – Vol. 111, is. 3. – P. 264–267.

100. Copley T. R. Detection of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybee bottom scraps and frass in naturally infected hives / T. R. Copley, P. Giovenazzo, S. H. Jabaji // Apidologie. – 2012. – Vol. 43. – P. 753–760.

101. Cornman R. S. / Pathogen webs in collapsing honey bee colonies // R. S. Cornman [et al.] // PLoS One. – 2012 – Vol. 7, is. 8 – e43562. – 15 p.

102. Cornman R. S. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees / R. S. Cornman [et al.] // PLoS Pathog. – 2009. – Vol. 5, is. 6 – e1000466. – 14 p.

103. Costa C. Negative correlation between *Nosema ceranae* spore loads and deformed wing virus infection levels in adult honey bee workers / C. Costa [et al.] // J. Invertebr. Pathol. – 2011. – Vol. 108, is. 3. – P. 224–225.

104. Cox-Foster D. L. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder / D. L. Cox-Foster [et al.] // Science – 2007. – Vol. 318, is. 5848. – P. 283–287.

105. Dainat B. Colony collapse disorder in Europe / B. Dainat, D. vanEngelsdorp, P. Neumann // Environmental Microbiology Reports. – 2012a. – Vol. 4. – P. 123–125.

106. Dainat B. Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees / B. Dainat [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2012c. – Vol. 78. – P. 981–987.

107. Dainat B. Predictive markers of honey bee colony collapse / B. Dainat [et al.] // PLoS One. – 2012b. – Vol. 7. – e32151. – 9 p.
108. de Graaf D. Tissue specificity of *Nosema apis* / D. de Graaf, F. J. Jacobs // J. Invertebr. Pathol. – 1991. – Vol. 58. – P. 277–278.
109. Dietemann V. *Varroa destructor*: Research avenues towards sustainable control / V. Dietemann [et al.] // Journal of Apicultural Research. – 2012. – Vol. 51, is. 1. – P. 125–132.
110. Dussaubat C. Gut pathology and responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera* / C. Dussaubat [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, is. 5. – e37017. – 11 p.
111. Dussaubat C. *Nosema* spp. Infection alters pheromone production in honey bee (*Apis mellifera*). / C. Dussaubat [et al.] // J Chem Ecol. – 2010. – Vol. 36. – P. 522–525.
112. Eiri D.M. *Nosema ceranae* can infect honey bee larvae and reduces subsequent adult longevity / D.M. Eiri, G. Suwannapong, M. Endler, J.C. Nieh // PLoS One. – 2015. – Vol. 27 – P. 10, is. 5. – e0126330. – 17 p.
113. Emsen B. Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honey bee colonies / B. Emsen [et al.] // Parasitol. Res. – 2016. – Vol. 115, is. 1. – P. 175–81.
114. Fenoy S. High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation / S. Fenoy [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2009. – Vol. 75, is. 21. – P. 6886–6889.
115. Fernández J. M. Asymptomatic presence of *Nosema* spp. in Spanish commercial apiaries / J. M. Fernández [et al.] // Journal of Invertebrate Pathology. – 2012. – Vol. 111, is. 2. – P. 106–110.
116. Forsgren E. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees / E. Forsgren, I. Fries // Veterinary Parasitology. – 2010. – Vol. 170, is. 3–4. – P. 212–217.
117. Forsgren E. Molecular diagnosis and characterization of honey bee pathogens / E. Forsgren // Acta Universitatis agriculturae Sueciae. – 2009. – P. 59.

118. Forsgren E. Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate / E. Forsgren, I. Fries // Environmental Microbiology Reports. – 2013. – Vol. 5, is. 1. – P. 78–82.
119. Fries I. Crossinfectivity of *Nosema apis* in *Apis mellifera* and *Apis Cerana* / I. Fries, F. Feng // Proceedings of the Apimondia 34th International Apicultural Congress. Bucharest, Romania. – 1995. – P. 151–155.
120. Fries I. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology / I. Fries, S. Camazine // Apidologie. – 2001. – Vol. 32. – P. 199–214
121. Fries I. Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z in the ventriculus of the honey bee (*Apis mellifera* L) / I. Fries // Apidologie. – 1988. – Vol. 19. – P. 319–328.
122. Fries I. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees / I. Fries, R. Martin, A. Meana, P. Garcia-Palencia, M. Higes // J. Apicult. Res. – 2006. – Vol. 45. – P. 230–233.
123. Fries I. *Nosema apis*, a parasite in the honeybee colony / I. Fries // Bee World. – 1993. – Vol. 74, is. 1. – P. 5–19.
117. Fries I. *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield / I. Fries, G. Ekbohm, E. Villumstad // J. Apic. Res. – 1984. – Vol. 23. – P. 102–105.
124. Fries I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*) / I. Fries // Journal of Invertebrate Pathology. – 2010. – Vol. 103 (Suppl.). – P. S73–S79.
125. Fries I. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae) / I. Fries [et al.] // European Journal of Protistology. – 1996. – Vol. 32, is. 3. – P. 356–365.
126. Fries I. Protozoa // Honey Bee Pests, Predators and Diseases, third ed. A. I. Root Company, Medina, Ohio, USA. – 1997. – P. 59–76.
127. García-Palencia P. Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-workers honey bees (*Apis mellifera*) / P. García-Palencia [et al.] // J. Apic. Res. – 2010. – Vol. 49. – P. 278–283.

128. Genersch E. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies / E. Genersch [et al.] // *Apidologie*. – 2010. – Vol. 41. – P. 332–352.

129. Giersch T. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia / T. Giersch, T. Berg, F. Galea, M. Hornitzky // *Apidologie*. – 2009. – Vol. 40. – P. 117–123.

130. Gisder S. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? / S. Gisder [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2010. – Vol. 76, is. 9. – P. 3032–3038.

131. Gisder S. Long-term temporal trends of *Nosema* spp. infection prevalence in northeast Germany: continuous spread of *Nosema ceranae*, an emerging pathogen of honey bees (*Apis mellifera*), but no general replacement of *Nosema apis* / S. Gisder [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2017. – Vol. 7. – P. 301.

132. Goblirsch M. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection / M. Goblirsch, Z. Y. Huang, M. Spivak // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, is. 3. – e58165. 8 p.

133. Gómez-Moracho T. Recent worldwide expansion of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in *Apis mellifera* populations inferred from multilocus patterns of genetic variation / T. Gómez-Moracho [et al.] // *Infect. Genet. Evol.* – 2015. – Vol. 31. – P. 87–94.

134. Graystock P. Emerging dangers: deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host / P. Graystock [et al.] // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2013. – Vol. 114. – P. 114–119.

135. Guerrero-Molina C. *Nosema ceranae* is an old resident of honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Mexico, causing infection levels of one million spores per bee or higher during summer and fall / C. Guerrero-Molina, A. Correa-Benítez, M. M. Hamiduzzaman, E. Guzman-Novoa // *J. Invertebr. Pathol.* – 2016. – Vol. 141. P. 38–40.

136. Guzmán-Novoa E. *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada / E. Guzmán-Novoa [et al.] // *Apidologie*. – 2010. – Vol. 41. – P. 443–450.

137. Hamiduzzaman M. Md. A multiplex PCR assay to diagnose and quantify *Nosema* infections in honey bees (*Apis mellifera*) / M. Md. Hamiduzzaman, E. Guzman-Novoa, P. H. Goodwin // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2010. – Vol. 105, is. 2. – P. 151–155.

138. Hatjina F. Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study / F. Hatjina [et al.] // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2011. – Vol. 108, is. 2. – P. 131–134.

139. Hedtke K. Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood / K. Hedtke, P. M. Jensen, A. B. Jensen, E. Genersch // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2011. – Vol. 108, is. 3. – P. 167–173.

140. Higes M. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain / M. Higes [et al.] // *Environmental Microbiology Reports*. – 2010a. – Vol. 2, is. 2. – P. 243–250.

141. Higes M. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*) / M. Higes [et al.] // *Environmental Microbiology Reports*. – 2013. – Vol. 5. – P. 530–536.

142. Higes M. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia) / M. Higes, P. García-Palencia, R. Martín-Hernández, A. Meana // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2007. – Vol. 94, is. 3. – P. 211–217.

143. Higes M. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse / M. Higes [et al.] // *Environmental Microbiology*. – 2008. – Vol. 10. – P. 2659–2669.

144. Higes M. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bees in Europe / M. Higes, R. Martín-Hernández, A. Meana // *J. invertebr. Pathol.* – 2006. – Vol. 92. – P. 93–95.

145. Higes M. The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature / M. Higes [et al.] // Environmental Microbiology Reports. – 2010b. – Vol. 2, is. 6. – P. 745–748.
146. Higes M. The presence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in North African honey bees (*Apis mellifera intermissa*) / M. Higes [et al.] // Journal of Apicultural Research. – 2009. – Vol. 48. – P. 217–219.
147. Holt H. L. Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*) / H. L. Holt, K. A. Aronstein, C. Grozinger // BMC Genomics. – 2013. – Vol. 14, is. 1. – 799.
148. Huang W. F. Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* / W. F. Huang, L. F. Solter // Journal of Invertebrate Pathology. – 2013. – Vol. 113, is. 1. – P. 35–41.
149. Huang Z. Y. Inspection and feeding of larvae by worker honey bees (Hymenoptera: Apidae): Effect of starvation and food quantity. / Z. Y. Huang, G. W. Otis // J. Insect. Behav. – 1991. – Vol. 4, is. 3. – 305–317.
150. Invernizzi C. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay / C. Invernizzi [et al.] // Journal of Invertebrate Pathology. – 2009. – Vol. 101, is. 2. – P. 150–153.
151. Invernizzi C. Sanitary and nutritional characterization of honeybee colonies in Eucalyptus grandis plantations / C. Invernizzi [et al.] // Arch. Zootec. – 2011. – Vol. 60. – P. 1303–1314.
152. Kasprzak S. *Nosema ceranae* (Eukaryota: Fungi: Microsporea) - a new parasite of western honey bee *Apis mellifera* L. / S. Kasprzak, G. Topolska // Wiad. Parazytol. – 2007. – Vol. 53, is. 4 – P. 281–284.
153. Khoury D. S. A quantitative model of honey bee colony population dynamics / D. S. Khoury, M. R. Myerscough, A. B. Barron // PLoS One. – 2011. – Vol. 18, is. 4. – e18491. – 6 p.

154. Kirk, P. M. Dictionary of the Fungi. 10th Edition / P. M. Kirk, P. F. Cannon, D. W. Minter, J. A. Stalpers // CABI Publishing. Wallingford, UK. – 2008. – 782 p.
155. Klee J. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera* / J. Klee [et al.] // Journal of Invertebrate Pathology. – 2007. – Vol. 96. – P. 1–10.
156. Kralj J. *Nosema* sp. influences flight behaviour of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers / J. Kralj, S. Fuchs // Apidologie. – 2010. – Vol. 41. – P. 21–28.
157. Lin H., Sullivan J., Huang Z.Y. (2009) Mechanisms through which *Nosema apis* affects onset of foraging in worker honeybees (*Apis mellifera* L.). In: Proceedings Workshop Nosema disease: lack of knowledge and work standardization (COST Action FA0803) Guadalajara, 19–22 October 2000 [WWW document]. URL <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (дата обращения 25.08.2017 г.).
158. Losey J. E. The economic value of ecological services provided by insects / J. E. Losey, M. Vaughan // BioScience. – 2006. – Vol. 56. – P. 311–323.
159. Malone L. A. Effects of time, temperature, and honey on *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae), a parasite of the honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) / L. A. Malone, H. S. Gatehouse, E. L. Tregidga // J. Invertebr. Pathol. – 2001. – Vol. 77. – P. 258–268.
160. Martínez J. *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile / J. Martínez, G. Leal, P. Conget // Parasitology Research. – 2012. – Vol. 111, is. 2. – P. 601–607.
161. Martín-Hernández R. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*) / R. Martín-Hernández [et al.] // Parasitology Research. – 2011. – Vol. 109. – P. 605–612.

162. Martín-Hernández R. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia / R. Martín-Hernández [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2009. – Vol. 75. – P. 2554–2557.
163. Martín-Hernández R. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? / R. Martín-Hernández [et al.] // Environmental Microbiology. – 2012. – Vol. 14, is. 8. – P. 2127–2138.
164. Martín-Hernández R. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae* / R. Martín-Hernández [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73, is. 20. – P. 6331–6338.
165. Mayack C. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection / C. Mayack. D. Naug // Journal of Invertebrate Pathology. – 2009. – Vol. 100, is. 3. – P. 185–188.
166. Mayack C. Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers / C. Mayack. D. Naug // J. Insect. Physiol. – 2010. – Vol. 56, is. 11. – P. 1572–1575.
167. Meana A. M. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees / A. M. Meana, R. Martin-Hernandez, M. Higes // J. Apic. Res. – 2010. – Vol. 49. – P. 212–214.
168. Medici S. K. Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina / S. K. Medici [et al.] // Parasitology Research. – 2012. – Vol. 110, is. 2. – P. 859–864.
169. Mehlhorn H. (ed) Encyclopedic reference of parasitology: Biology, Structure, Function / Diseases, Treatment, Therapy, 2nd ed. – CD-ROM version. – Springer Verlag, Berlin, 2001. – 1353 p.
170. Milbrath M. O. Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) / M. O. Milbrath [et al.] // Journal of Invertebrate Pathology. – 2015. – Vol. 125. – P. 9–15.
171. Mulholland G. E. Individual variability of *Nosema ceranae* infections in *Apis mellifera* colonies / G. E. Mulholland, B. E. Traver, N. G. Johnson, R. D. Fell // Insects. – 2012. – Vol. 3, is. 4. – P. 1143–1155.

172. Mutinelli F. The spread of pathogens through trade in honey bees and their products (including queen bees and semen): overview and recent developments / F. Mutinelli // *Revue Scientifique et Technique*. – 2011. – Vol. 30, is. 1. – P. 257–271.

173. Nabian C. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian protozoa of European honeybees (*Apis mellifera*) in Iran / C. Nabian, K. Ahmadi, M. H. N. Shirazi, A. G. Sadeghian // *Iranian Journal of Parasitology*. – 2011. – Vol. 6, is. 3. – P. 89–95.

174. Natsopoulou M. E. European isolates of the Microsporidia *Nosema apis* and *Nosema ceranae* have similar virulence in laboratory tests on European worker honey bees / E. Natsopoulou, V. Doublet, R. J. Paxton // *Apidologie*. – 2016. – Vol. 47, is. 1. – P. 57–65.

175. Natsopoulou M. E. Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease / M. E. Natsopoulou [et al.] // *Proceedings of the Royal Society of London B*. – 2015. – Vol. 282. – e20141896. 3 p.

176. Neumann P. Honey bee colony losses / P. Neumann, N. L. Carreck // *Journal of Apicultural Research*. – 2010. – Vol. 49, is. 1. – P. 1–6.

177. Pajuelo A. G. Colony losses: a double blind trial on the influence of supplementary protein nutrition and preventative treatment with fumagillin against *Nosema ceranae* / A. G. Pajuelo, C. Torre, F.J.O Bermejo // *J. Apicult. Res.* – 2008. – Vol. 47. – P. 84–86.

178. Paxton R. J. Does infection by *Nosema ceranae* cause "Colony Collapse Disorder" in honey bees (*Apis mellifera*)? / R. J. Paxton // *Journal of Apicultural Research*. – 2010. – Vol. 49. – P. 80–84.

179. Paxton R. J. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis* / R. J. Paxton, J. Klee, S. Korpela, I. Fries // *Apidologie*. – 2007. – Vol. 38, is. 6. – P. 558–565.

180. Pelin A. Genome analyses suggests the presence of polyploidy and recent human-driven expansions in eight global populations of the honeybee pathogen

Nosema ceranae / A. Pelin [et al.] // Environmental Microbiology. – 2015. – Vol. 17, is. 11. – P. 4443–4458.

181. Peng Y. Consequences of *Nosema apis* infection for male honey bees and their fertility. / Y. Peng, B. Baer-Imhoof, A. H. Millar, B. Baer // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 30, is. 5. – P. 10565.

182. Peng Y. Seminal fluid of honeybees contains multiple mechanisms to combat infections of the sexually transmitted pathogen *Nosema apis* / Y. Peng, J. Grassl, A. H. Millar, B. Baer // Proc. Biol. Sci. – 2016. – Vol. 27. – P. 283 (1823).

183. Pettis J. S. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae* / J. S. Pettis, [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, is. 7. – e70182. 9 p.

184. Plischuk S. *Bombus brasiliensis* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) infected with *Nosema ceranae* (Microsporidia) / S. Plischuka, C. E. Lange // Revista Brasileira de Entomologia. – 2016. – Vol. 60. – P. 347–351.

185. Plischuk S. South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*) / S. Plischuk [et al.] // Environmental Microbiology Reports. – 2009. – Vol. 1, is. 2. – P. 131–135.

186. Porrini M. P. *Nosema ceranae* in South American native stingless bees and social wasp / M. P. Porrini [et al.] // Microbial. Ecology. – 2017. – Vol. 74 is. 4. – P. 761–764.

187. Ptaszyńska A. Differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* spores under Scanning Electron Microscopy (SEM) / A. Ptaszyńska, G. Borsuk, W. Mułenko, J. Demetraki-Paleolog // J. Apicult. Res. – 2014. – Vol. 53. – P. 537–544.

188. Ptaszynska A. Location of *Nosema* spp. spores within the body of the honey bee. / A. Ptaszyńska, G. Borsuk, M. Anusiewicz, W. Mulenko // Med. Weter. – 2012. – Vol. 68, is. 10 – P. 618–621.

189. Razmaraii N. Molecular identification of *Nosema* species in East Azerbaijan province / N. Razmaraii [et al.] // Iran Archives of Razi Institute journal. – 2013. – Vol. 68, is. 1. – P. 23–27.
190. Retschnig G. Cold ambient temperature promotes *Nosema* spp. / G. Retschnig, G. R. Williams, A. Schneeberger, P. Neumann // Intensity in Honey Bees (*Apis mellifera*). Insects. – 2017. – Vol. 8. – P. 20.
191. Roberts K. E. The cost of promiscuity: sexual transmission of *Nosema* microsporidian parasites in polyandrous honey bees / K. E. Roberts, S. E. Evison, B. Baer, W. O. Hughes // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 30, is. 5. – P. 10982.
192. Runckel C. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and Crithidia / C. Runckel [et al.] // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, is. 6. – e20656. – 18 p.
193. Santrac V. Detection of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* from Bosnia and Herzegovina / V. Santrac, A. Granato, F. Mutinelli // Journal of Apicultural Research. – 2010. – Vol. 49. – P. 100–101.
194. Smart M. *Nosema ceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*) / M. Smart, W. S. Sheppard // J. Invertebr. Pathol. – 2012 – Vol. 109, is. 1. – P. 148–151.
195. Smith M. L. The honey bee parasite *Nosema ceranae*: transmissible via food exchange? / M. L. Smith // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – e43319. – 6 p.
196. Snow J. W. A fluorescent method for visualization of *Nosema* infection in whole-mount honey bee tissues / J. W. Snow // J. Invertebr. Pathol. – 2016. – Vol. 16. – P. 3007–3006.
197. Sokolov J. Y. About genus (microsporidia): in the connection with new data on the life cycle of microsporidian *Nosema mesnili* paillot (1933) (Microsporidia. Nosematida) / J. Y. Sokolov, I. V. Issi // Паразитология. – 1997. – Vol. 31. – P. 307.
198. Soroker V. Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests / V. Soroker [et al.] // Apidologie. – 2011. – Vol. 42. – P. 192–199.

199. Stevanovic J. Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies / J. Stevanovic [et al.] // *Apidologie*. – 2013. – Vol. 44. – P. 522–536.
200. Stevanovic J. Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder / J. Stevanovic [et al.] // *Apidologie*. – 2011. – Vol. 42. – P. 49–58.
201. Suwannapong G., Maksong S., Seanbualuang P., Benbow M. E. Experimental infection of red dwarf honeybee, *Apis florea*, with *Nosema ceranae* / G. Suwannapong, S. Maksong, P. Seanbualuang, M. E. Benbow // *J. Asia Pac. Entomol.* – 2010. – Vol. 13. – P. 361–364.
202. Tapaszti Z. First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies / Z. Tapaszti [et al.] // *Acta Vet Hung.* – 2009. – Vol. 57, is. 3. – P. 383–388.
203. Teixeira E. W. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees / E. W. Teixeira [et al.] // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2013. – Vol. 114. – P. 250–254.
204. Toplak I. Chronic Bee Paralysis Virus and *Nosema ceranae* Experimental Co-Infection of Winter Honey Bee Workers (*Apis mellifera* L.) / I. Toplak, U. J. Ciglenecki, K. Aronstein, A. Gregorc // *Viruses-Basel*. – 2013. – Vol. 5. – P. 2282–2297.
205. Traver B. E. Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia / B. E. Traver, R. D. Fell // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2011. – Vol. 107. – P. 43–49.
206. Traver B. E. Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens / B. E. Traver, R. D. Fell // *Journal of Invertebrate Pathology* – 2012. – Vol. 110. – P. 408–410.
207. Van der Zee R. Results of international standardised beekeeper surveys of colony losses for winter 2012–2013: analysis of winter loss rates and mixed effects modelling of risk factors for winter loss / R. Van der Zee [et al.] // *Journal of Apicultural Research*. – 2014. – Vol. 53, is. 1. – P. 19–34.

208. vanEngelsdorp D. A national survey of managed honey bee 2010–11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership / D. vanEngelsdorp [et al.] // Journal of Apicultural Research. – 2012. – Vol. 51. – P. 115–124.

203. VanEngelsdorp D. Weighing risk factors associated with bee colony collapse disorder by classification and regression tree analysis / D. VanEngelsdorp [et al.] // J. Econ. Entomol. – 2010. – Vol. 103, is. 5. – P. 1517–1523.

204. Vidau C. Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions / C. Vidau [et al.] // Journal of Invertebrate Pathology. – 2014. – Vol. 121. – P. 89–96.

205. Vidau C. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae* / C. Vidau, [et al.] // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, is. 6. – P. 21550.

206. Whitaker J. Molecular detection of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* from Turkish honey bees / J. Whitaker, A. L. Szalanski, M. Kence // Apidologie. – 2011. – Vol. 42. – P. 174–180.

207. Williams G. R. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA / G. R. Williams [et al.] // Journal of Invertebrate Pathology. – 2008. – Vol. 97, is. 2. – P. 189–192.

208. Williams G. R. Intrapopulation and -community dynamics of the parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and consequences for honey bee (*Apis mellifera*) hosts / G. R. Williams, D. Shutler, K. L. Burgher-MacLellan, R. E. L. Rogers // PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – P. 5–10.

209. Wolf S. So near and yet so far: harmonic radar reveals reduced homing ability of *Nosema* infected honeybees / S. Wolf [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, is. 8. – e103989.

210. Wu Y. J. Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema*

(Microsporidia) infection / Y. J. Wu, M. D. Smart, C. M. Anelli, W. S. Sheppard // J. Invertebr. Pathol. – 2012. – Vol. 109. – P. 326–329.

211. Yang X. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification / X. Yang, D. L. Cox-Foster // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102. – P. 7470–7475.

212. Yoshiyama M. Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan / M. Yoshiyama, K. Kimura // J. Invertebr. Pathol. – 2011. – Vol. 106, is. 2. – P. 263–267.

213. Zhu W. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae / W. Zhu, D. R. Schmehl, C.A. Mullin, J.L. Frazier // PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – e77547. 11 p.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1 – Районы локализации и количество изученных пчелиных семей, проб и пчел с пасек Томской области на зараженность паразитами и патогенами

Административный район	Наименование населенного пункта	количество пасек	количество семей	количество проб (подмор / пчелы)	Исследования				
					варроатоз	нозематоз м/с	нозематоз ПЩР	бактериозы**	микозы**
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Асиновский	г. Асино	1	2	0 / 2			2		
	г. Асино	1	9	0 / 9			9		
	д. Тихомировка	1	5	0 / 5	5	5	5		
	с. Цветковка	1	2	0 / 2	2	2	2		
Бакcharский	д. Крыловка	1	1	0 / 1			1		
	с. Высокий яр	1	6	0 / 6			6		
	с. Парбиг	1	4	0 / 4			4		
Зырянский	с. Дубровка	1	15	0 / 15			15		
	с. Зырянское	2	12	2 / 10	12	12	10	1	1
	с. Чердаты	1	3	0 / 3	3	3	3		3
Кожевниковский	д. Еловка	1	10	0 / 10			10		
	д. Муллова	1	1	0 / 1	1	1		1	1
	с. Новоивановка	1	1	0 / 2	2	2	1		
	с. Песочнодубровка	1	1	1 / 0	1	1	1		1
Колпашевский	г. Колпашево	12	13	0 / 13	13	13	13	11	11
Кривошеинский	с. Володино	1	2	0 / 2	2	2	2		2
	с. Кривошеино	2	5	4 / 5	9	9	9		

Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Молчановский	оз. Юнанга	1	2	0 / 2			2		
	с. Могочино	1	2	0 / 2		2	2		
	с. Волог	1	2	2 / 0		2	2		
	с. Нарга	1	1	1 / 0		1	1		
	с. Соколовка	1	1	0 / 1		1	1		
Парабельский	с. Парабель	2	6	0 / 6	6	6			1
Первомайский	д. Ломовицк	1	1	0 / 2	2	2	2		
Тегульдетский	с. Тегульдет	2	3	3 / 0	3	3	3		1
	с. Новошумилово	1	4	0 / 4	4	4	4		4
Томский	д. Аркашево	1	1	0 / 1		1	1		
	д. Аникино	1	1	1 / 0	1	1		1	1
	д. Березкино	1	2	2 / 1	3	3	1		
	д. Бодажково	1	16	5 / 799*	16	804*	709*	2	4
	д. Б-Протопопово	2	2	2 / 2	1	3	1		
	д. Губино	3	6	5 / 4	9	9		2	4
	д. Кандинка	2	7	7 / 1	8	8	8		8
	д. Кусково	1	3	3 / 3	6	6	3		4
	д. Лаврово	1	4	4 / 0	4	4		3	2
	д. Лоскутово	1	1	0 / 1	1	1			1
	д. Магадаево	1	1	0 / 1	1	1	1		
	д. Мазалово	1	1	0 / 1		1	1		
	д. Малиновая Грива	2	8	7 / 4	11	11	1	2	3
	д. Милоновка	1	7	7 / 2	9	9	4	1	6
	д. Петрово	1	1	1 / 0	1	1	1		
	д. Подломск	2	3	3 / 0	3	3			
	д. Поросино	3	3	3 / 2	5	5	1	1	1
	д. Просекино	1	19	13 / 27	19	38*	38*	2	14
	д. Романовка	2	5	5 / 3	7	7	2		4
	д. Халдеево	1	3	2 / 1	3	3	2	2	2

Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	окр. г. Северска	2	3	2 / 1	3	3	1	2	1
	окр. г. Томск	30	42	34 / 14	48	48	17	21	34
	п. Басандайка	1	5	4 / 4	8	8	5	2	7
	п. Заварзино	1	8	0 / 8	8	8	8		8
	п. Заречный (Малиновское пос.)	4	7	2 / 5	7	7	2		1
	п. Заречный (Межениновское пос.)	1	10	1 / 837*	21	837*	801*	11	21
	п. Молодежный	2	3	2 / 2	4	4	1	2	
	п. Омутное	1	3	3 / 2	5	5		4	4
	п. Степановка	4	17	2 / 365*	8	365*	42*		5
	с. Батурино	1	1	0 / 1	1	1	1	1	1
	с. Богашево	2	3	2 / 3	5	5	3		
	с. Вершинино	1	2	2 / 0	2	2			
	с. Калтай	2	3	2 / 1	3	3		1	3
	с. Кафтанчиково	2	5	5 / 1	6	6	2		
	с. Коларово	1	4	3 / 1	4	4	3	3	3
	с. Корнилово	3	3	0 / 3	3	3	1	2	2
	с. Курлек	1	7	0 / 7	7	7	7		
	с. Малиновка	4	12	12 / 10	17	17	3	4	4
	с. Межениновка	2	4	1 / 3	1	1	3		
	с. Октябрьское	1	1	1 / 1	2	2		2	2
	с. Рыбалово	2	7	5 / 2	7	7	1		4
	с. Семилужки	1	12	2 / 10	12	12	10	1	11
	с. Ярское	1	1	2 / 0	2	2			
Чаинский	д. Григорьевка	1	1	0 / 1		1	1		
	с. Гореловка	1	1	0 / 1			1		
	с. Подгорное	3	9	0 / 9	9	9	9		

Окончание таблицы А.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	с. Стрельниково	1	1	0 / 1			1		
Шегарский	с. Баткат	1	1	1 / 1	2	2	1	2	2
	с. Каргала	2	12	12 / 3	13	13	1	2	12
	с. Малобрагино	1	1	1 / 1	2	2		2	2
	с. Мельниково	1	1	1 / 1	2	2		2	2
	с. Монастырка	3	23	23 / 1	24	24		3	24
	с. Новоильинка	2	5	1 / 5	2	2	5	2	2
	с. Новониколаевка	1	1	1 / 1	2	2		2	2
	с. Новотроицкое	2	16	16 / 1	17	17	13		13
ИТОГО	Населенных пунктов – 80	158	443	226 / 2267	430	2421	1827	100	249
Примечание. * – указано количество материала, использованного для динамических наблюдений; ** – материал исследован на базе ОГБУ «ТОВЛ».									

Таблица А.2 – Распространение двух видов микроспоридий р. *Nosema* на пасеках разных районов Томской области

Администра тивный район	Наименование населенного пункта	Количество, шт.		вид <i>Nosema</i>
		пасек	семей	
1	2	3	4	5
Южные районы				
Асиновский	г. Асино	2	11	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	д. Тихомировка	1	5	<i>N.apis</i>
	с. Цветковка	1	2	отр.
Зырянский	с. Дубровка	1	15	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	с. Зырянское	2	10	<i>N.apis</i>
	с. Чердаты	1	3	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
Кожевниковский	д. Еловка	1	10	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	с. Новоивановка	1	1	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	с. Песочнодубровка	1	1	отр.
Первомайский	д. Ломовицк	1	1	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
Томский	д. Аркашево	1	1	отр.
	д. Березкино	1	1	отр.
	д. Бодажково	1	10	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	д. Б-Протопопово	1	1	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	д. Кандинка	2	6	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	д. Кусково	1	3	<i>N. apis</i>
	д. Магадаево	1	1	отр.
	д. Мазалово	1	1	<i>N.apis</i>
	д. Малиновая Грива	1	1	<i>N. ceranae</i>
	д. Милоновка	1	4	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	д. Петрово	1	1	<i>N.apis</i>
	д. Порозино	1	1	<i>N.apis</i>
	д. Просекино	1	14	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	д. Романовка	1	1	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	д. Халдеево	1	2	<i>N. apis</i>
	окр. г. Северска	1	1	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	окр. г. Томск	11	14	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	п. Басандайка	1	3	<i>N. ceranae</i>
	п. Заварзино	1	8	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	п. Заречный (Малиновское сельское поселение)	1	2	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	п. Заречный (Межениновское сельское поселение)	1	6	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	п. Молодежный	1	1	отр.
	п. Степановка	3	16	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	с. Батурино	1	1	отр.
	с. Богашево	2	2	<i>N.apis</i>
	с. Кафтанчиково	1	1	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
	с. Коларово	1	4	<i>N.apis</i>
	с. Корнилово	1	1	отр.

Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5
	с. Курлек	1	7	<i>N. ceranae</i>
	с. Малиновка	1	4	<i>N. apis+N. ceranae</i>
	с. Межениновка	1	3	<i>N. apis+N. ceranae</i>
	с. Рыбалово	1	1	<i>N. apis+N. ceranae</i>
	с. Семилужки	1	10	<i>N. apis</i>
Шегарский	с. Баткат	1	1	<i>N. ceranae</i>
	с. Каргала	2	12	<i>N. apis</i>
	с. Малобрагино	1	1	отр.
	с. Мельниково	1	1	отр.
	с. Монастырка	3	23	отр.
	с. Новониколаевка	1	1	отр.
	с. Новоильинка	2	5	<i>N. apis+N. ceranae</i>
	с. Новотроицкое	1	16	<i>N. apis+N. ceranae</i>
Северные районы				
Бакчарский	д. Крыловка	1	1	<i>N. ceranae</i>
	с. Высокий яр	1	6	<i>N. apis+N. ceranae</i>
	с. Парбиг	1	4	<i>N. apis+N. ceranae</i>
Колпашевский	г. Колпашево	12	13	<i>N. apis+N. ceranae</i>
Кривошеинский	с. Володино	1	2	<i>N. apis</i>
	с. Кривошеино	2	5	отр.
Молчановский	оз. Юнанга	1	2	отр.
	с. Могочино	1	2	<i>N. apis+N. ceranae</i>
	с. Волог	1	2	<i>N. apis+N. ceranae</i>
	с. Нарга	1	1	<i>N. apis</i>
	с. Соколовка	1	1	<i>N. apis+N. ceranae</i>
Парабельский	с. Парабель	2	6	отр.
Тегульдетский	с. Тегульдет	2	3	<i>N. apis+N. ceranae</i>
	с. Новошумилово	1	4	<i>N. apis</i>
Чаинский	д. Григорьевка	1	1	отр.
	с. Гореловка	1	1	<i>N. apis</i>
	с. Подгорное	3	9	<i>N. apis</i>
	с. Стрельниково	1	1	отр.
ИТОГО	Населенных пунктов – 71	105	336	

Таблица А.3 – Распределение двух видов микроспоридий р. *Nosema* на пасеках Томской области в период 2012–2017 гг.

Год	Количество исследованных пасек, шт.	Пасеки, %			
		<i>Nosema</i> не обнаружена	<i>Nosema</i> выявлена*		
			<i>N.apis</i>	<i>N.ceranae</i>	<i>N.apis</i> + <i>N.ceranae</i>
2012	15	100	0	0	0
2013	40	95,0	50,0	50,0	0
2014	44	81,8	62,5	12,5	25,0
2015	32	56,3	28,6	28,6	42,9
2016	39	30,8	14,8	18,5	66,7
2017	37	24,3	25,0	32,1	42,9
Итого	207	61,8	26,6	25,3	48,1
Примечание. * – Зараженность пасек разными видами <i>Nosema</i> определялась относительно общего числа зараженных пасек.					

Таблица А.4 – Распространение паразитов и патогенов, выявленных на пасеках разных районов Томской области

Администра- тивный район	Наименование населенного пункта	Количество пасек	Количество семей	Выявленные возбудители болезней		
				варроатоз	бактериозы	микозы
1	2	3	4	5	6	7
Асиновский	д. Тихомировка	1	5	варроатоз	-	-
	с. Цветковка	1	2	варроатоз	-	-
Зырянский	с. Зырянское	2	12	варроатоз.	<i>E. coli</i>	отр.
	с. Чердаты	1	3	отр.	-	-
Кожевниковский	д. Муллова	1	1	варроатоз	отр.	отр.
	с. Новоивановское	1	1	варроатоз	-	-
	с. Песочнодубровка	1	1	варроатоз	-	<i>Asc. apis</i>
Колпашевский	г. Колпашево	12	13	варроатоз	отр.	<i>Asp. flavus</i>
Кривошеинский	с. Володино	1	1	варроатоз	-	<i>Asp. flavus</i>
	с. Кривошеино	2	5	варроатоз	-	-
Парабельский	с. Парабель	1	1	отр.	-	<i>Asc. apis</i>
Первомайский	д. Ломовицк	1	1	отр.	-	-
Тегульдетский	с. Тегульдет	2	3	варроатоз	-	<i>Asc. apis, Asp. flavus, Penicillium spp.</i>
	с. Новошумилово	1	4	варроатоз	-	<i>Asc. apis, Asp. flavus, Mucor spp., Penicillium spp.</i>
Томский	д. Аникино	1	1	отр.	<i>B. para alvei</i>	<i>Mucor spp., Penicillium spp.</i>
	д. Берёзкино	1	2	варроатоз	-	-
	д. Бодажково	1	16	варроатоз	-	<i>Mucor spp.</i>
	д. Б-Протопопово	1	1	варроатоз	-	-
	д. Губино	3	6	варроатоз.	<i>C. diversus</i>	<i>Mucor spp.</i>
	д. Кандинка	2	7	варроатоз	-	<i>Mucor spp.</i>
	д. Кусково	1	3	варроатоз	-	<i>Asp. flavus, Mucor spp., Asp. fumigates,</i>
	д. Лаврово	1	4	варроатоз	-	<i>Mucor spp.</i>

Продолжение таблицы А.4

1	2	3	4	5	6	7
	д. Лоскутово	1	1	отр.	-	отр.
	д. Магадаево	1	1	варроатоз	-	-
	д. Малиновая Грива	2	8	варроатоз	-	<i>Asp. flavus, Mucor spp.</i>
	д. Милоновка	1	7	варроатоз	-	<i>Asp. flavus, Mucor spp.</i>
	д. Петрово	1	1	варроатоз	-	-
	д. Подломск	2	3	варроатоз	-	-
	д. Порозино	3	3	варроатоз	<i>E. coli</i>	отр.
	д. Просекино	1	19	варроатоз	-	<i>Asp. niger, Mucor spp., Penicillium spp.</i>
	д. Романовка	2	5	варроатоз	-	<i>Mucor, Penicillium spp.</i>
	д. Халдеево	1	3	варроатоз	<i>C. diversus</i>	<i>Asp. flavus</i>
	окр. г. Северска	2	3	варроатоз	<i>P. vulgaris</i>	<i>Asp. fumigatus</i>
	окр. г. Томск	31	39	варроатоз	<i>P. vulgaris, E. coli</i>	<i>Asc. apis, Asp. flavus, Penicillium spp., Mucor spp.</i>
	п. Басандайка	1	5	отр.	-	<i>Asc. apis, Mucor spp.</i>
	п. Заварзино	1	8	варроатоз	-	<i>Asc. apis, Asp. flavus, Mucor spp., Penicillium spp.</i>
	п. Заречный (Малиновское пос.)	4	7	варроатоз.	-	<i>Asp. niger, Penicillium spp.</i>
	п. Заречный (Межениновское пос.)	1	10	отр.	<i>E. coli</i>	<i>Asc. apis, Asp. flavus, Mucor spp., Penicillium spp.,</i>
	п. Молодёжный	2	3	отр.	отр.	-
	п. Омутное	1	3	варроатоз	-	<i>Asc. apis, Asp. niger, Penicillium spp.</i>
	п. Степановка	4	6	варроатоз отр.	-	<i>Asc. apis, Asp. flavus, Mucor spp., Penicillium spp.</i>
	с. Батурино	1	1	-	отр.	<i>Asc. apis, Mucor spp.</i>
	с. Богашёво	2	3	варроатоз	-	-
	с. Вершинино	1	2	варроатоз	-	-

Окончание таблицы А.4

1	2	3	4	5	6	7
	с. Калтай	2	3	отр.	<i>E. coli</i>	<i>Asp. flavus, Asp. niger, Mucor spp., Penicillium spp.</i>
	с. Кафтанчиково	1	1	варроатоз	-	-
	с. Коларово	1	4	отр.	отр.	<i>Penicillium spp.</i>
	с. Корнилово	3	3	отр.	-отр.	<i>Mucor spp.</i>
	с. Курлек	1	7	отр.	-	-
	с. Малиновка	4	12	варроатоз	отр.	<i>Mucor spp., Asp. niger</i>
	с. Межениновка	1	1	отр.	-	-
	с. Октябрьское	1	1	отр.	отр.	отр.
	с. Рыбалово	2	7	варроатоз	-	<i>Mucor spp., Penicillium spp.</i>
	с. Семилужки	1	12	варроатоз	отр.	<i>Asp. niger, Mucor spp., Penicillium spp.</i>
	с. Ярское	1	1	варроатоз	-	-
Чаинский	с. Подгорное	3	9	варроатоз	-	-
Шегарский	с. Баткат	1	1	варроатоз	отр.	<i>Penicillium spp.</i>
	с. Каргала	2	12	варроатоз	отр.	<i>Asp. niger, Asp. flavus, Mucor spp., Penicillium spp.</i>
	с. Малобрагино	1	1	варроатоз	отр.	отр.
	с. Мельниково	1	1	отр.	отр.	отр.
	с. Монастырка	3	23	варроатоз	<i>C. diversus</i>	<i>Asc. apis, Asp. fumigatus, Asp. flavus, Asp. niger, Mucor spp., Penicillium spp.</i>
	с. Новоильинка	1	1	варроатоз	отр.	<i>Mucor spp., Penicillium spp.</i>
	с. Новониколаевка	1	1	отр.	отр.	<i>Asc. apis</i>
	с. Новотроицкое	1	16	варроатоз	-	<i>Asc. apis, Asp. flavus, Asp. fumigates, Mucor spp., Penicillium spp.</i>
ИТОГО	Населенных пунктов – 64	137	351			