

Съдържание на суров протеин в тялото и общ белтък и лизоцим в хемолимфата на пчели работнички (*Apis mellifera L.*) в зависимост от опаразитеността им с *Varroa destructor*

Свилен Лазаров*, Иванка Желязкова

Аграрен факултет, Тракийски университет – Стара Загора

*E-mail: svilendok@abv.bg

Резюме

Установен е процентът на опаразитеност с причинителя на вароатозата (*Varroa destructor*) на 13 пчелни семейства, като са формирани две групи – пчелни семейства с опаразитеност до 5% (слабо опаразитени) и пчелни семейства с опаразитеност между 5–20% (средно опаразитени). Определено е съдържанието на суров протеин в тялото на цели пчели, както и общ белтък и лизоцим в хемолимфата на пчели работнички от семейства с различна степен на опаразитеност. Установени са достоверно ($p \leq 0,01$) по-високи стойности за съдържание на суров протеин в тялото на пчели ($62,04 \pm 1,60\%$) от пчелните семейства със средна степен на опаразитеност (5–20%). При слабо опаразитените семейства (до 5%) нивото на този показател е с по-ниска стойност ($55,26 \pm 1,17\%$). Средните стойности за съдържанието на общ белтък в хемолимфата на пчелите работнички от групата на средно опаразитените пчелни семейства е $17,50 \pm 1,23$ g/l, което е с $2,17$ g/l по-малко от нивото на този показател при слабо опаразитените пчелни семейства ($19,67 \pm 4,59$ g/l). Съдържанието на лизоцим в хемолимфата на пчелите от пчелни семейства със средна степен на опаразитеност е със средна стойност ($16,17 \pm 3,42$ µg/ml), което е с $1,13$ µg/ml по-малко от стойността му при слабо опаразитените пчелни семейства ($17,30 \pm 3,15$ µg/ml). Отчетените разлики за съдържание на общ белтък и лизоцим в хемолимфата на пчели от двете групи са статистически недоказани.

Резултатите от настоящото проучване показват, че нивото на опаразитеност на пчелните семейства с *Varroa destructor* оказва влияние върху съдържанието на суров протеин в тялото на пчелите работнички.

Ключови думи: Медоносна пчела, *Varroa destructor*, хемолимфа, протеини, лизоцим

Content of Crude Protein in the Body and Total Protein and Lysozyme in the Haemolymph of Worker Bees (*Apis mellifera L.*) according to their infestation with *Varroa destructor*

Svilen Lazarov*, Ivanka Zhelyazkova

Faculty of Agriculture, Trakia University – Stara Zagora

*E-mail: svilendok@abv.bg

Citation: Lazarov, S., & Zhelyazkova, I. (2019). Content of Crude Protein in the Body and Total Protein and Lysozyme in the Haemolymph of Worker Bees (*Apis mellifera L.*) according to their infestation with *Varroa destructor*. *Zhivotnovadni Nauki*, 56(2), 9-15 (Bg).

Abstract

The percentage of infectivity with *Varroa destructor* of 13 bee colonies has been identified and two groups have been formed – bee colonies with infestations of up to 5% (low level of infestation) and bee colonies with infestation between 5 and 20% (medium level of infestation). Content of crude protein in the body of whole bees as well as total protein and lysozyme in the haemolymph of worker bees from colonies with different level of infestation has been determined. Higher and statistically reliable values ($p \leq 0.01$) for crude protein content in bee bodies ($62.04 \pm 1.60\%$) in bee colonies with an average degree of infestation (5–20%) have been established. In the low infested colonies (up to 5%) the level of this indicator has lower value ($55.26 \pm 1.17\%$). The mean values for the total protein content in the haemolymph of worker bees in the group of medium infested bee colonies is 17.50 ± 1.23 g/l, which is 2.17 g/l less than the level of this indicator in the low infested bee colonies (19.67 ± 4.59 g/l). The lysozyme content of the haemolymph of bees from bee colonies with medium level of infestation has medium value (16.1 ± 3.42 $\mu\text{g/ml}$), which is 1.13 $\mu\text{g/ml}$ less than its value in the low infested bee colonies (17.30 ± 3.15 $\mu\text{g/ml}$). The reported differences for total protein and lysozyme content in the haemolymph of bees from both groups are statistically unproven.

The results from this study show that the level of infestation of bee colonies with *Varroa destructor* affects the crude protein content in the body of worker bees.

Key words: Honey bee, *Varroa destructor*, Haemolymph, Proteins, Lysozyme

Въведение

Вароатозата е паразитно заболяване по пчелите, което нанася големи загуби на пчеларството в световен мащаб. Данните от Агростатистика на МЗХ показват, че през 2016 г. в България против вароатоза са третирани 747676 пчелни семейства, което е 99,15% от общия брой семейства, отглеждани в страната (Бюлетин № 322 / февруари 2017 г.).

Вароатозата е заболяване по пилото (работническо, търтеево) и по възрастните пчели (работнички, майка, търтеи). Причинителят е ектопаразит – акарът *Varroa destructor*. Акарът притежава пробивно смучещ устен апарат, с който пробива хитинената мембрана между членчетата на коремчето и през раната смуче хемолимфа от пчелата. По този начин създава входна врата за проникване на микроорганизми (Barr and Shope, 1975). По данни на Senegachnik (1989, cit. by Kantar, 2007) акарът се храни на всеки два часа, при което отнема от своя гостоприемник 1 mg и повече хемолимфа дневно, т.е. приблизително 1% от живата маса на пчелата.

Акарите се размножават в килийките. Женските акари притежават терморепроцесори, с помощта на които се насочват и откриват пчелното пило. Полово зрелият и оплоден женски акар прониква в килийката на пчелата работничка или на търтея един–два дни преди запечатването им – Borhert, 1979; Gurgulova et al., 2000; Kirilov, 2013.

Опаразитените пчелни семейства с *Varroa destructor* са с намалена устойчивост към бактериални и вирусни инфекции. Пчелите са с намалено тегло до 50% и повече, с недоразвити челюстни жлези, с до 20% изчерпано мастно тяло, извършват по-малко на брой полети, с по-малка продължителност на живот (Gurgulova et al., 2000; Kantar, 2007). Инвазираните с *Varroa destructor* пчелни семейства зимуват лошо, бавно се развиват през пролетта, имат ниска медопродуктивност (Kantar, 2007).

Според някои автори причинителят на вароатозата *Varroa destructor* оказва отрицателно влияние върху хуморалния имунитет при пчелите (Gechev, 1995; Gregory et al., 2005 cit. by Ilyasov et al., 2014). Устойчивостта към заболявания при медоносните пчели е в

пряка зависимост както от съдържанието на антимикробни пептиди в хемолимфата, така и от съдържанието на протеини в тялото им.

По данни на Sadov (1979, cit. by Kantar, 2007) в тялото и в хемолимфата на пчели от опаразитени семейства съдържанието на белтъчини е съответно с 20,4% и 40% по-ниско в сравнение със здравите пчели. Имуניתетът на насекомите се проявява чрез секреция на антимикробни пептиди в хемолимфата, фагоцитоза, ензимно разпадане на патогени и др. (Hoffmann, 2003; Hultmark, 2003). Проучванията на Gechev (1995) в нашата страна показват, че лизоцимната активност на хемолимфата намалява при по-висока степен на опаразитяване на пчелните семейства с *Varroa destructor*. Според Gillespie et al. (1997) защитната функция на хемолимфата се изразява в клетъчни и хуморални бариери. Установено е, че съдържанието на лизоцим в хемолимфата на пчелите повишава резистентността им към заболявания и зависи от редица фактори: възраст на пчелите, съдържание на протеини в храната, наличие на болестотворни микроорганизми и паразити в т.ч. *Varroa destructor*, добавяне на стимулиращи продукти при подхранване на пчелните семейства и др. (Zyuman et al., 1987; Nagornaya et al., 1996; Kanchev et al., 1997; Zhelyazkova and Gurgulova, 1997, 2000; Gurgulova et al., 2001; Darkazanli, 2008).

Целта на настоящото проучване е да се определи влиянието на степента на опаразитеност на пчелните семейства с *Varroa destructor* върху съдържанието на суров протеин в тялото и общ белтък и лизоцим в хемолимфата им.

Материал и методи

Проучването е проведено през периода август–октомври 2017 г. при подготовката на пчелните семейства за зимуване.

1. Материали

В проучването са използвани пчелни семейства с пчели от местното отродие на *Apis mellifera L.*

Извършено е тестване за степен на опаразитеност с *Varroa destructor* на 13 пчелни семейства, заселени в 10 рамкови Дадан-Блатови кошери от Учебния пчелин на Аграрен факултет при Тракийски университет, Стара Загора.

2. Методи

2.1. Определяне силата на пчелните семейства и количеството на запечатаното пило.

Силата (количеството пчели в пчелното гнездо) е определена, като са изброени всички междурамия, плътно заети с пчели, и е представена в kg, при разчет 0,250 kg пчели в едно междурамие на Дадан-Блатов кошер. Количеството на запечатаното работническо пило е измерено с помощта на мерителна рамка с големина на квадратите 5x5 cm и е изчислено в брой килийки (в 1 cm² от питата има 4 работнически килийки).

2.2. Определяне степента на опаразитеност на пчели и пило.

Използвани са методи за определяне степента на опаразитеност с *Varroa destructor* в пчели и пило, съгласно Office International Epizootic (OIE) Terrestrial Manual, 2008, раздел 2.2.7. От произволно избрана пита се смятат около 200–250 пчели в полиетиленов плик и се заливат със спирт. Изброяват се пчелите и падналите акари, а опаразитеността се представя в проценти (%).

Степента на опаразитеност на пилото се определя на базата на 100 ларви и какавиди, извадени от пита с пило. Изброяват се намиращите се по тях акари. Изчислява се в проценти.

Опаразитеността на пчелите и пилото е определена двукратно.

Въз основа на степента на опаразитеност с *Varroa destructor* може да се формират три групи пчелни семейства: с ниска степен на опаразитеност – до 5%; със средна степен на опаразитеност – от 5 до 20% и с висока степен на опаразитеност – над 20%.

2.3. Получаване на хемолимфа и определяне съдържанието на лизоцим и общ белтък в нея.

От тестваните за степен на опаразитеност с *Varroa destructor* пчелни семейства са взе-

ти проби от пчели работнички, от които са формирани сборни проби хемолимфа. Хемолимфата е получена чрез изсмукване с пастърова пипета на границата между II и III коремен тергит.

Количеството на лизоцим в хемолимфата е определено по метода на Motavkina et al. (1979), модифициран от Kostov and Bonovska (1983). Използва се жива култура от *Micrococcus lisodeicticus*, който се лизира специфично от лизоцима. Съдържанието на общ белтък в хемолимфата е определено по метода на Биорет (Stambolova et al., 1978). Химичните анализи са извършени в Националната референтна лаборатория „Здраве на пчелите” при НДНИВМИ – гр. София.

2.4. Определяне на съдържанието на суров протеин (в % от сухото вещество) в тялото на пчели работнички.

Анализът на химичния състав на тялото на пробите пчели е извършен в Научно-изследователската лаборатория към Аграрния факултет на Тракийски университет, Стара Загора. Съдържанието на влага в тялото на цели пчели и суров протеин (в проценти спрямо сухото вещество) е определено, като са използвани следните методи:

Влага (%) – тегловен анализ (гравиметрия) по БДС – SR ISO 5984;

Протеин (%) – по Kjeldahl, БДС – SR ISO 5983.

Данните от проучването са обработени вариационно-статистически на компютър – програма Statistika.

Резултати и обсъждане

Резултатите от настоящото проучване показват, че от включените в изследването пчелни семейства няма такива с висока степен на опаразитеност с *Varroa destructor* (над 20%), което е показател за добър контрол на вароатозата в учебната база по пчеларство на Аграрния факултет при Тракийския университет в Стара Загора. Установени са 4 пчелни семейства със средна степен на опаразитеност (5–20%) и 9 слабо опаразитени семейства (ниска степен – до 5%).

На табл. 1 са представени резултатите от съдържанието на лизоцим в хемолимфата на пчели работнички от семейства с ниска и средна степен на опаразитеност с *V. destructor*. Данните за съдържание на лизоцим в хемолимфата на пчели работнички от двете групи пчелни семейства са с близки и недостоверни средни стойности. Разликата на измерените стойности в минимално-максимални граници е по-голяма при слабо опаразитените пчелни семейства – 13,00 µg/ml (от 12,00 µg/ml до 25,00 µg/ml) в сравнение с групата на средно опаразитените – 10,5 µg/ml (12,500 µg/ml–23,00 µg/ml). Вероятна причина за установената по-ниска стойност за съдържание на лизоцим в хемолимфата на пчели от семейства със средна степен на опаразитеност е негативното въздействие на *Varroa destructor* върху хуморалния имунитет на пчелите (Gechev, 1995; Gregory et al., 2005, cit. by Ilyasov et al., 2014). По данни на

Таблица 1. Съдържание на лизоцим в хемолимфата на пчели работнички от пчелни семейства с различна степен на опаразитеност с *Varroa destructor*

Table 1. Lysozyme content in the haemolymph of worker bees from bee colonies with different level of infestation with *Varroa destructor*

Степен на опаразитеност на пчелните семейства Level of infestation of bee colonies	Съдържание на лизоцим в хемолимфата на пчели работнички (µg/ml) Lysozyme content in the haemolymph of worker bees (µg/ml)				
	mean	SE	SD	min	max
Слабо опаразитени (до 5%) – n = 9 Low infested (up to 5%) – n = 9	17,30	3,145	7,032	12,00	25,00
Средно опаразитени (5–20%) – n = 4 Medium infested (5–20%) – n = 4	16,17	3,420	5,923	12,50	23,00

Gechev (1995) и Kanchev et al. (1997) нивото на лизоцим в хемолимфата намалява при висока степен на опаразитяване на пчелните семейства с *V. destructor*.

Подобно на съдържанието на лизоцим в хемолимфата и количеството на общ белтък в пчелната кръв е с 11,03% (2,17 g/l) по-високо, но с недостоверна средна стойност при пчелите от семействата с ниска степен на опаразитеност ($19,67 \pm 4,591$ g/l) в сравнение с тези със средна степен на опаразитеност ($17,50 \pm 1,591$ g/l) – табл. 2.

Данните от табл. 2 показват голяма разлика (13,2 g/l) в отчетените максимални стойности по отношение съдържанието на общ белтък в хемолимфата на пчелите от двете групи семейства. Установената по-ниска максимална стойност (19,56 g/l) и по-ниска средна стойност ($17,50 \pm 1,591$ g/l) на проучвания признак при пчелите от средно опаразитените семейства може да се обясни с факта, че причинителят на вароатозата *Varroa destructor* се храни с хемолимфа (Senegachnik, 1989, cit. by Kantar, 2007) и отнема от пчелата 1 mg и повече хемолимфа дневно.

Резултатите от настоящото проучване показват, че при изследваните пчелни семейства с по-висока степен на опаразитеност с *Varroa destructor* (5–20%) съдържанието на лизоцим и общ белтък в хемолимфата на пчелите работнички е с по-ниски, но недостоверни, средни стойности. Независимо, че отчетените разлики са статистически недоказани, вземайки под внимание факта, че за-

щитната функция на хемолимфата се изразява в клетъчни и хуморални бариери (Gillespie et al., 1997), може да се коментира, че установените по-ниски стойности за количество на лизоцим и общ белтък в хемолимфата са предпоставка за понижаване устойчивостта на пчелите към заболявания.

Резултатите за съдържание на суров протеин в тялото на пчели работнички от слабо и средно опаразитените с *Varroa destructor* пчелни семейства са представени на табл. 3. При групата пчелни семейства с ниска степен на опаразитеност се установява с 10,93% по-ниска средна стойност за съдържание на суров протеин ($55,26 \pm 1,174\%$) в сравнение със средната стойност на признака при пчелите от средно опаразитените семейства ($62,04 \pm 1,595\%$). Получените разлики в средните стойности на този показател са статистически достоверни ($P \leq 0,01$) (табл.3). Получените в настоящото проучване данни по разглеждания показател не съвпадат с резултатите на Sadov (1979, cit. by Kantar, 2007), според които в тялото и в хемолимфата на пчели от опаразитени семейства съдържанието на белтъчини е с 20% до 40% по-ниско в сравнение със здравите пчели.

Данните за отчетените минимални и максимални стойности по отношение съдържанието на суров протеин в тялото на пчелите показват вариране в по-тесни граници (7,37%) за средно опаразитените пчелни семейства в сравнение с групата на слабо опаразитените (11,45%), табл. 3. Завишените стойности на

Таблица 2. Съдържание на общ белтък в хемолимфата на пчели работнички от пчелни семейства с различна степен на опаразитеност с *Varroa destructor*

Table 2. Total protein content in the haemolymph of worker bees from bee colonies with different level of infestation with *Varroa destructor*

Степен на опаразитеност на пчелните семейства Level of infestation of bee colonies	Съдържание на общ белтък в хемолимфата на пчели работнички (g/l) Total protein content in the haemolymph of worker bees (g/l)				
	mean	SE	SD	min	max
Слабо опаразитени (до 5%) – n = 9 Poorly infested (up to 5%) – n = 9	19,67	4,591	9,181	11,76	32,76
Средно опаразитени (5–20%) – n=4 Medium infested (5–20%) – n = 4	17,50	1,591	2,133	15,30	19,56

Таблица 3. Съдържание на суров протеин в тялото на пчели работнички от пчелни семейства с различна степен на опаразитеност с *Varroa destructor*

Table 3. Crude protein content in the body worker bees from bee colonies with different level of infestation with *Varroa destructor*

Степен на опаразитеност на пчелните семейства Level of infestation of bee colonies	Съдържание на суров протеин в тялото на пчели работнички (% от сухо вещество) Crude protein content in the body of worker bees (% of dry matter)				
	mean	SE	SD	min	max
Слабо опаразитени (до 5%) – n = 9 Low infested (up to 5%) – n = 9	55,26	1,174	3,523	50,24	61,69
Средно опаразитени (5-20%) – n = 4 Medium infested (5-20%) – n = 4	62,04	1,595	3,190	57,59	64,96
P	0,007 **				

** $P \leq 0.01$

суровия протеин в тялото на пчелите от семейства със средна степен на опаразитеност (в сравнение с тези с ниска опаразитеност) вероятно се дължи на засилена консумация на цветен прашец и последващо натрупване на повече белтъчни запаси в тялото, като компенсаторен механизъм на по-ниското ниво на протеините в хемолимфата на пчелите от тази група.

Получените резултати от настоящото проучване с пчелни семейства от учебно-експерименталния пчелин на Аграрния факултет при Тракийския университет в Стара Загора от една страна имат потвърдителен характер, а от друга допълват установеното от други автори, че съдържанието на лизоцим и общ белтък в хемолимфата на пчелите зависи от редица фактори: възраст на пчелите, съдържание на протеини в храната, наличие на болестотворни микроорганизми и паразити в т.ч. *Varroa destructor*, добавяне на стимулиращи продукти при подхранване на пчелните семейства и др. (Zyuman et al., 1987; Nagornaya et al., 1996; Gechev, 1995; Kanchev et al., 1997; Zhelyazkova and Gurgulova, 1997, 2000; Gurgulova et al., 2001; Darkazanli, 2008; Shumkova, 2016).

Изводи

При настоящото проучване е установено, че:

Количествата на лизоцим и общ белтък в хемолимфата на пчелите работнички от семействата с ниска степен на опаразитеност с *Varroa destructor* (до 5%) са с по-високи, но недостоверни средни стойности в сравнение с хемолимфата на пчелите от семействата със средна степен на опаразитеност (5–20%).

Съдържанието на суров протеин (в % от сухо вещество) в тялото на цели пчели е с по-висока стойност при пчелните семейства със средна степен на опаразитеност ($62,04 \pm 1,595\%$) в сравнение със стойността на този признак при слабо опаразитените семейства ($55,26 \pm 1,174\%$). Получените разлики в стойностите на проучвания признак при двете групи пчелни семейства са статистически достоверни при $P \leq 0,01$.

Степента на опаразитеност на пчелните семейства с *Varroa destructor* оказва влияние върху съдържанието на суров протеин в тялото на пчелите работнички.

Литература

- Barr, A. R., & Shope, R. E. (1975). The invertebrate gut as a barrier to invading parasites. *Invertebrate immunity*, 113-114.
- Borhert, A. (1979). *Diseases in bees*. Zemizdat, (Bg)
- Darkazanli, S. (2008). *Study of hygiene behavior in honey bee and its relation to some factor deficiencies*, Doctoral dissertation, Sofia (Bg)

- Gechev, I.** (1995). *On some morphological, physiological and biochemical changes in bees infested with Varroa jacobsoni*. PhD Thesis – Abstract (Bg)
- Gillespie and, J. P., Kanost, M. R., & Trenczek, T.** (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annual review of entomology*, 42(1), 611-643.
- Gurgulova, K., Pavlich, T., Radoslavovich, I. M.** (2000). Beekeeping – diseases, pests, *Образование и наука* (Bg)
- Gurgulova K., Valchovski, R., Zhelyazkova, I., Nenechev, P.** (2001). Effect of some stimulating substances on the natural immunity of the honey bee *Apis mellifera L.*, *Zhivotnovadni nauki*, XXXVII, (2), 113 – 115 (Bg)
- Hoffmann, J. A.** (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature*. 426:33–38.
- Hultmark, D.** (2003). *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Current opinion in immunology*, 15(1), 12-19.
- Ilyasov, R. A., Gayfullina, L. R., Saltaykova, E. S., Poskryakov, A. V., Nikolenko, A. G.** (2014). The role of the antimicrobial defensin peptide in the immunity of the bee colony. *Institute of biochemistry and genetics, Pchelovodstvo, 1*, <http://o-paceke.ru/rol-antimikrobnogo-peptida-defensisa-v-immunitete-pchelinoy-semi/> (Ru)
- Kanchev, K., Gechev, I., Parvanov, P., Bonovska, M.** (1997). Amount of total protein, protein fractions and lysozyme concentration in the haemolymph of newly hatched worker bees (*Apis mellifera*) infested with *Varroa jacobsoni*, *Veterinarnomeditsinski nauki(r)*, XXIX, 12 (Bg)
- Kantar, Y.** (2007). Healthy bees in XXI century, IK “*Videlina*” Sofia (Bg)
- Kirilov, N.** (2013). *Varroa destructor* in bees – prevention and control measures, IK „*Enyovche*“ Sofia (Bg)
- Kostov, G., Bonovska, M.** (1983). Methods for determining lysozyme activity of the sera from farm animals and poultry, *Veterinarna sbirka*, (11), 30-32 (Bg)
- Motavkina, N. S., Kovalev, B. M., Sharonov, A. S.** (1979). Micromethod for quantitative determination of lysozyme, *Laboratornoe delo*, №(12). c.722-723. 18 (Ru)
- Nagornaya, I. M., Bondarchuk, L. I., Levchenko, I. A.** (1996). Lysozyme in the bee salivary gland secretions, *Pchelovodstvo*, (3) 19-21 (Ru)
- Shumkova, R.** (2016). Comparative study on the effect of stimulating products on the biological development of bee colonies, *PhD Thesis*, Kostinbrod (Bg)
- Stambolova, M. A., Chomoneva, T., Argirova, T.** (1978). Handbook for practical classes in biochemistry (Bg)
- Zhelyazkova, I., Gurgulova, K.** (1997). Study on the lysozyme level in the haemolymph of worker bees (*Apis mellifera L.*) under different conditions of rearing and feeding, *Zhivotnovadni nauki, Prilozhenie*, 278 – 280 (Bg)
- Zhelyazkova, I., Gurgulova, K.** (2000). Effect of supplemental feeding with pollen substitute on the amount of total protein and the lysozyme level in the haemolymph of worker bees (*Apis mellifera L.*) Natsionalna konferentsiya s mezhdunarodno uchastie “Postizheniya v oblastta na agrarnite i obshtenite nauki”, 1–2.VI. 2000, SUB – Stara Zagora, *Sbornik*, p. I, *Agrarni nauki*, 39 – 44 (Bg)
- Zyuman, B. V., Sharikov, A. P., & Lobachenko, N. I.** (1987). Resistance of bees to diseases, *Pchelovodstvo*, (5), 12 (Ru)