

**BADANIA NAD DOSKONALENIEM METOD ZWALCZANIA
ZGNILCA ZŁOŚLIWEGO U PSZCZOŁ ***

Ryszard Kostecki

Zakład Chorób Owadów Użytkowych I. W.

WSTĘP

Wśród bakteryjnych chorób pszczoły miodnej (*Apis mellifica* L.) najczęstszymi w Polsce są zgnilec złośliwy i łagodny, zwany kiślicą.

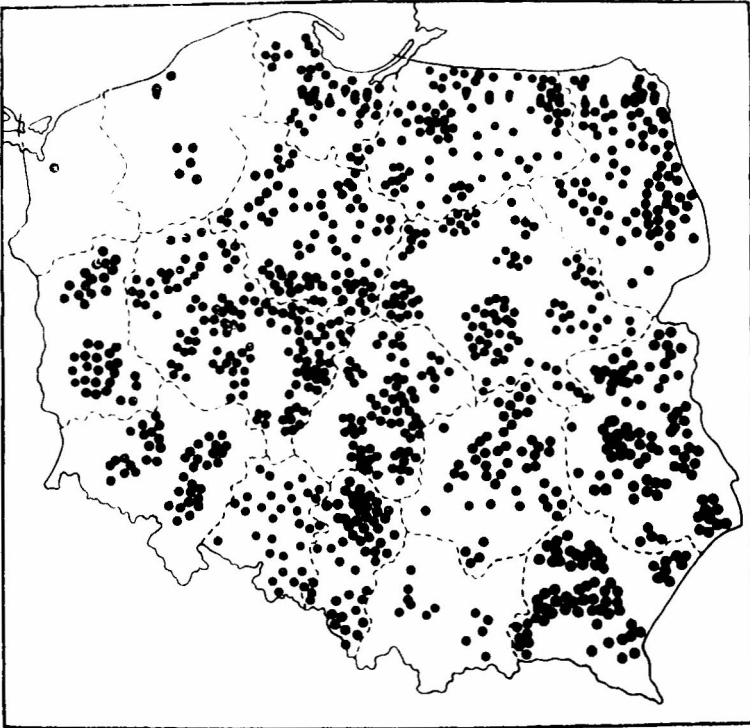
Zgnilec złośliwy (*Histolisis infectiosa pernicioso larvae*) wywoływany przez *Bacillus larvae*, należy do najgroźniejszych chorób zakaźnych i zaraźliwych pszczoł. Nielezione przypadki utrzymują się zwykle przez szereg lat, powodując ubytki pszczoł robotnic i zmniejszenie ilości rodzin w pasiece.

Doniesienia z szeregu krajów wskazują, że w rodzinach opanowanych zgnilcem zbiór miodu zostaje obniżony o 25 do 40%. Również w Polsce obserwujemy podobne straty wywołane przez zgnilec złośliwy i choroba ta stanowi u nas jeden z najpoważniejszych problemów epizootologicznych.

Rozmiar strat wywołanych przez tę chorobę ilustruje wykaz zarejestrowanych przypadków zgnilca złośliwego w okresie pracy badawczo-rozpoznawczej w Zakładzie Badania Chorób Owadów Użytkowych Instytutu Weterynarii w Swarzędzu w latach 1946—1968 (2105 w 1968 r.). W okresie 21 lat obserwuje się stały wzrost liczby stwierdzonych ognisk zgnilca złośliwego (w okresie 1946—48 ok. 20-krotnie, w 1948—58 ok. 2 i 1/2-krotnie i w 1958—68 3 i 1/2-krotnie). Można przypuszczać, że około 5—7% rodzin pszczelich w Polsce jest opanowanych przez zgnilec złośliwy, co stanowi około 85 000 pni. Zwalczanie tej choroby jest więc nieodzowną koniecznością chwili obecnej.

Z uwagi na dużą szkodliwość dla gospodarki pasiecznej zgnilec zwalczany jest z urzędu pod nadzorem służby weterynaryjnej.

* Praca jest rozprawą habilitacyjną Autora, a jej pełny tekst znajduje się w Bibliotece Instytutu Weterynarii w Puławach.



Ryc. 1. Mapa stwierdzonych przypadków zgnilca złośliwego w 1967 r.
 Distribution of American foulbrood cases recorded in Poland in 1967.

Działalność istniejących od 1962 r. Pracowni Chorób Pszczół Zakładów Higieny Weterynaryjnej, których zadaniem jest kierowanie zwalczaniem chorób pszczoł na podległym im terenie, dostarczyła danych o rozprzestrzenianiu zgnilca złośliwego w kraju. Jeżeli chodzi o zwalczanie choroby, służba weterynaryjna napotyka w swej pracy na trudności z powodu skomplikowanych i pracochłonnych metod zwalczania.

Zwiększająca się z roku na rok w Polsce ilość ognisk zgnilca stwarza potrzebę usprawnienia dotychczas stosowanych metod lub opracowania nowych.

Jakkolwiek pewne nadzieje wiąże się z możliwością wyhodowania pszczoł odpornych na zgnilec, to jednak nadal koncentruje się uwagę na zabiegach pszczelarskich i środkach farmakologicznych.

Konieczność zmodyfikowania metod zwalczania zgnilca złośliwego jest uzasadniona również możliwością powstawania szczepów *Bacillus larvae* opornych na stosowany dotychczas importowany sulfatiazol sodowy. Wprowadzenie więc krajowego polisulfamidu oprócz podniesienia skuteczności zabiegów byłoby korzystne ze względów gospodarczych.

Celem niniejszej pracy było udoskonalenie metod zwalczania zgnilca złośliwego przez:

1. Zbadanie przydatności nowych środków farmakologicznych w zwalczaniu zgnilca złośliwego.
2. Zbadanie, w jakim stopniu dorosłe pszczoły przenoszą zarodniki *Bacillus larvae* w czasie przemieszczenia.
3. Określenie czasu przebywania zarodników *Bacillus larvae* w wolu miodowym robotnicy.
4. Przeprowadzenie badań nad wpływem polisulfamidu na *Bacillus larvae* in vivo.
5. Usprawnienie metody oznaczania zarodników *Bacillus larvae* w wosku i węzie.

PRZEGLĄD LITERATURY

Termin zgnilec złośliwy wprowadził do literatury w 1769 r. Schirach, odnosząc go do kompleksu chorób czerwiu. W swych pracach Schirach podał również metodę leczenia i zwalczania chorób pszczół (Kruszka 1933; Kozikowski 1950; Kirkor 1953). O chorobach pszczół typu zgnilca informował również Della Rocca w 1790 roku.

Dzierżon (1882) był pierwszym badaczem, który zwrócił uwagę na występowanie dwóch postaci zgnilca. Naukowe jednak rozróżnienie obu typów chorób przypadło na pierwsze lata obecnego stulecia.

Bakteryjną naturę zgnilca złośliwego wykazał pierwszy White (1904, 1905, 1906, 1920 a, 1920 b), który opisał zarazek i zmiany chorobowe czerwiu przez niego wywołane.

Zarazek zaliczany jest w systematyce bakteryjnej do gromady *Schizomycetes*, rzędu — *Eubacteriales*, rodziny — *Bacillaceae*, rodzaju — *Bacillus*, gatunku — *Bac. larvae* White (Bergey 1957).

Drobnoustrój jest laseczką zarodnikującą o zaokrąglonych końcach, długości 2,5—5,0 μ i szerokości 0,5—0,8 μ , posiada otoczkę oraz rzęski (Borchert 1924; Stilowa 1938; Kirkor 1948; Jałowicyn 1960; Krieg 1961). Na podłożach sztucznych oraz w zamarych larwach zarazek wytwarza endospory kształtu elipsoidalnego, które leżą w komórce centralnie lub subterminalnie.

Hodowla zarazka wymaga specjalnych pożywek. Na podłożach zwykłych wzrost *Bac. larvae* hamowany jest przez obecność peptonu i dlatego do jego hodowli używamy podłoży specjalnych. Obecnie znamy szereg podłoży stosowanych do hodowli *Bac. larvae* — (Lochhead 1942; Katznelson i współaut. 1944; Foster i współaut. 1948 a, b, 1949, 1950; Smith i współaut. 1949; Mylroie i współaut. 1957; Katznelson 1958; Bailey i współaut. 1962).

Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały występowanie różnych szczepów *Bac. larvae*. Różnią się one nie tylko odmienną zdolnością do rozkładania rozmaitych węglowodanów, ale także i stopniem chorobotwórczości dla czerwiu (Zahaczewska i Furowicz 1964). Stwierdzono także odmienną wrażliwość na antybiotyki szczepów wyizolowanych w różnych rejonach geograficznych (Toumanoff i Malmache 1959).

Wniknięcie czynnika wywołującego zgnilec złośliwy następuje zawsze przed zasklepieniem komórki, w okresie karmienia larw przez pszczoły, tj. między trzecim a dziewiątym dniem po złożeniu jaj przez matkę — Kruszką (1933). Ilość zarodników potrzebna do wywołania choroby jest różna. Woodrow ustalił DL_{50} na 35 zarodników przy podaniu doustnym młodej larwie — Krieger (1961). Nie udało się natomiast wywołać zakażenia wegetatywną formą zarazka, podaną nawet w dużych dawkach — Połtiew (1964).

W pierwszym rozwoju larwy stężenie cukru w jelicie dochodzące do 4% nie pozwala na rozwój zarodników i dopiero spadek jego koncentracji poniżej 3% umożliwia ich kiełkowanie — Kirkor (1953), Maurizio (1931). Dzieje się to zwykle po zasklepieniu komórki. Przypadki zamierania niezasklepionego czerwiu stwierdza się częściej przy silnej infekcji oraz niedożywieniu czerwiu — Piskowoj (1963), Schulz-Langner (1960), Borchert (1964). Występująca prawie jednocześnie ze spadkiem zawartości cukru histoliza przewodu pokarmowego zmniejsza odporność larwy oraz przyspiesza wniknięcie bakterii do hemolimfy, powodując śmierć w następstwie posocznicy (Kirkor 1948; Połtiew 1964).

Badania Suttera Rothenbuhlera i Rauna (1968) wykazały, że wzrost larw dwóch genetycznie różnych linii pszczół — odpornej i wrażliwej na zakażenie *Bac. larvae* jest odmienny. W początkowym okresie wzrostu larw linii odpornej waga ich była znacznie wyższa od wagi larw linii wrażliwej. Po pewnym czasie waga larw w obu liniach wyrównywała się. Z danych tych wynika, że szybkie przybieranie na wadze i związane z tym zmiany w fizjologii przewodu pokarmowego decydują o odporności larw pszczelich na zgnilec złośliwy.

Pszczoły wykazują zdolność wczesnego rozpoznawania zakażonego czerwiu, który zostaje zjadany bądź usuwany z ula (Park i współaut. 1937; Rothenbuhler 1956). Gdy niecałkowicie się udaje oczyszczenie plastrów, wówczas zmarłe larwy zmieniają się w charakterystyczną, ciągnącą się masę zgnilcową, która wysychając tworzy strupki silnie przylegające do ścian komórek. Są one również zjadane przez pszczoły i zawierają przeważnie endospory *Bac. larvae*. Jak dowiodły badania Wilsona (1967), zarodniki nie kiełkują w przewodzie pokarmowym dorosłej pszczoły i po opuszczeniu z kałem zachowują dłu-

gotrwałą żywotność. Larwy, którym podano zarodniki otrzymane z jeliczki pszczoł dorosłych, zapadały na zgnilec z typowymi dla tej choroby objawami.

Borchert (1966) zwraca uwagę na istnienie wrodzonej odporności pszczoł, która polega na umiejętności rozpoznawania chorych larw i usuwania ich z gniazd. Jeżeli zdolność ta zostaje osłabiona nie sprzyjającymi warunkami zewnętrznymi lub wewnętrznymi, to istnieje niebezpieczeństwo nawrotu choroby. Niezupełne usuwanie przez pszczoły materiału infekcyjnego prowadzi do nowych zachorowań, a stan ten określa się mianem postaci utajonej. Jest ona na ogół rzadko rozpoznawana przez pszczelarzy i stale grozi niebezpieczeństwem wybuchu ostrej postaci schorzenia.

Trudności w zwalczaniu zgnilca złośliwego są według Meyerhoff i Seifert (1961) wynikiem nieznaności występowania utajonej postaci choroby, co w przeszłości doprowadziło do konieczności stosowania drastycznych i bardzo nieekonomicznych metod.

Szczegółowy opis tej jednostki chorobowej podał Steinhaus (1949, 1952).

Połtiew (1950) podkreśla, że przeciętna wydajności w produkcji miodu chorej rodziny w ZSRR zostaje zmniejszona czterokrotnie, wosku prawie dwukrotnie. Również rozmnażanie się pszczoł (roje, odkłady) jest o 3,7 razy mniejsze w porównaniu ze zdrowymi rodzinami.

W okresie wiosenno-letnim rozwoju rodziny, które uległy zakażeniu zgnilcem jesienią, wychowały w ciągu 55 dni o 34—45% mniej czerwiu aniżeli zdrowe w tych samych warunkach klimatycznych i bytowych (Smirnowa 1968).

Zarówno zwalczanie jak i zapobieganie zgnilcowi złośliwemu jest trudne przede wszystkim ze względu na znaczną odporność zarodników *Bac. larvae* na działanie czynników środowiska zewnętrznego. Pociągnęło to za sobą konieczność opracowania specjalnych metod zwalczania (Kirkor 1953).

Wprowadzenie sulfonamidów do terapii schorzeń ludzi i zwierząt zapoczątkowało badania nad skutecznością tych preparatów w chorobach pszczoł. Hassemann (1946) stosował z powodzeniem w zwalczaniu zgnilca sulfadiazynę, sulfaguanydynę i sulfatiazol podając je pszczołom w syropie. Latham (1947) leczył zakażone roje alkoholowym roztworem sulfamidów. Należy przy tym podkreślić, że sulfamidy nie tylko zapobiegały rozwojowi choroby, ale powodowały również wzmocnienie roju do tego stopnia, że następowało całkowite ozdrowienie pnia. Jednakże przerwanie leczenia powodowało częste nawroty choroby (Reinhardt 1947; Połtiew 1967).

W dobie antybiotyków podjęto szereg badań nad ich wykorzystaniem w zwalczaniu i zapobieganiu chorobom pszczoł (Niemczuk

1962). Katznelson (1949, 1950, 1952) zbadał działanie 13 antybiotyków i 3 sulfonamidów na *Bac. larvae*, *Bac. alvei* i *Bac. paraalvei* i wykazał, że na *Bac. larvae* najsilniej działa aureomycyna. Autor ten również stwierdził istnienie dużych różnic rodzajowych, a nawet szczepowych we wrażliwości drobnoustrojów w stosunku do dozowanych preparatów.

Brizard, Delmaré i Albisetti (1964) w rojach zakażonych zgnilcem złośliwym stosowali leczniczo tetracyklinę i sulfatiazol. Pszczoły dobrze znosiły tetracyklinę, której efektywność przewyższała w pierwszym okresie działanie sulfatiazolu.

W zwalczaniu zgnilca złośliwego należy uwzględniać nie tylko leczenie chorych larw, lecz także uzdrawianie całej rodziny pszczelej (Kirkor 1953). Najbardziej skuteczną w działaniu, chociaż zbyt skomplikowaną i pracochłonną, okazała się metoda podwójnego przesiedlenia. Polega ona na przesiedleniu pszczół do rojnicy i głodzeniu ich w ciemnym i chłodnym pomieszczeniu przez 48 godzin. Głodzenie pszczół ma na celu opróżnienie wola miodowego z pokarmu zawierającego zarodniki *Bac. larvae*. Następnie rój przesiedla się do nowego lub odkażonego ula, na paski lub całe arkusze węzy. Rój taki intensywnie się podkarmia sropem cukrowym z dodatkiem leku (Kirkor 1953; KostECKI 1962; Piskowoj 1963; Połtiew 1964).

Szereg autorów zwraca uwagę na możliwość zakażenia rojów przez węzę zawierającą zarodniki *Bac. larvae*. Jeśli bowiem do produkcji węzy użyjemy wosku z pni opanowanych zgnilcem, następuje zakażenie nowych pni, którym ją podajemy. Z tego względu wosk przeznaczony do produkcji węzy musi być wolny od zarodników *Bac. larvae*.

Możliwości przeniesienia się choroby przez odwiedzanie tych samych pastwisk przez pszczoły pochodzące z rodzin zakażonych i zdrowych zaprzecza wielu autorów, natomiast co do przenoszenia zarazy poprzez zakażone wodopoje zdania są podzielone (Kirkor 1953; Połtiew 1964).

Kontynuowane w Zakładzie Badania Chorób Owadów Użytkowych Instytutu Weterynarii w Swarzędzu prace — zostały ujęte w kilku publikacjach poświęconych chemoterapeutykom w leczeniu zgnilca (KostECKI 1962, 1966; WawrzkieWicz, Gliński, KostECKI 1966; KostECKI, WawrzkieWicz, Gliński 1965), przesiedleniu (KostECKI 1965) i zagadnieniom organizacyjno-prawnym (KostECKI 1965, 1966, 1967).

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

SKUTECZNOŚĆ IN VITRO W STOSUNKU DO *BACILLUS LARVAE* NOWYCH ŚRODKÓW FARMAKOLOGICZNYCH

MATERIAŁ I METODA

Badania przeprowadzono w oparciu o izolowane w latach 1966—1967 szczepy *Bac. larvae* z plastrów dotkniętych zgnilcem złośliwym, pochodzącym z siedmiu województw.

W ciągu badań wyosobniono 23 szczepy bakteryjne (tab. 1). Wyodrębniono je z materiału pochodzącego z zamarych larw pszczelich wykazujących makroskopowe zmiany charakterystyczne dla zgnilca złośliwego. Z zamarego czerwiu przeznaczonego do posiewów bakteriologicznych sporządzono uprzednio rozmazy barwione fuksyną dla stwierdzenia obecności zarodników.

Tabela 1

Liczba stwierdzonych przypadków zgnilca złośliwego i numery wyosobnionych
szczepów *Bacillus larvae* na terenie kilku województw

Number of American foulbrood and N° *Bacillus larvae* strains isolated

Województwo Voivodeship	1966 r.		1967 r.	
	Liczba przypadków zgnilca Number of cases	Numery wyosobn. szczepów N° of strains	Liczba przypadków zgnilca Number of cases	Numery wyosobn. szczepów N° of strains
Białostockie	182	17, 28	284	2, 16
Bydgoskie	244	4, 8	279	—
Łódzkie	151	11, 14, 20	203	—
Olsztyńskie	119	7	215	32
Poznańskie	387	6, 10, 19, 22	265	18, 21, 29
Rzeszowskie	50	23, 31	160	24, 35
Warszawskie	125	13	241	—

Badane szczepy przechowywano na podłożu stałym Bailey'a (1) o składzie: ekstrakt drożdżowy 1 g, skrobia rozpuszczalna 1 g, woda destylowana do 100 ml, KH_2PO_4 0,1 g, agar 2 g, pH podłoża ustalono na 6,6. Po wyjałowieniu podłoża w autoklawie w 116° przez 20 minut dodawano glukozy 1 g.

Do namnażania szczepów stosowano podłoża płynne (Myroie i współaut. 1957) o składzie: glukoza 1 g, K_2HPO_4 0,05 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, FeSO_4 0,0001 g, MnSO_4 0,0001 g, woda destylowana ad 100 ml, pH podłoża ustalono na 7,0. Do badań używano 72-godzinne hodowle

drobnoustrojów zawierające zarówno formy wegetatywne laseczek jak i przetrwalnikowe.

Oznaczenie wrażliwości badanych szczepów *Bac. larvae* na sulfatiazol, polisulfamid, bioval i madroxin wykonano metodą krążkową. Na jałowe krążki przygotowane z bibuły Whatman 1 nakraplano po 0,2 ml odpowiedniego rozcieńczenia sulfatiazolu sodu lub innych preparatów. Preparaty te rozcieńczano płynem fizjologicznym ustalając następujące końcowe pH: dla sulfatiazolu, polisulfamidu i biovalu 7,0, a dla madroxinu 7,6.

Na stałą pożywkę posiewano 0,1 ml 72-godzinną hodowlę odpowiedniego szczepu *Bac. larvae*. Po 10 minutach od posiewu nakładano na powierzchnię pożywki krążki bibuły zwilżone preparatami i inkubowano płytki w 37°C. Wyniki odczytywano w milimetrach mierząc po 24 i 48 godzinach przy pomocy cyrkla średnicę stref zahamowania wzrostu *Bac. larvae*.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W województwach: białostockim, bydgoskim, łódzkim, olsztyńskim, poznańskim, rzeszowskim, warszawskim stwierdzono największą ilość ognisk chorobowych. Odpowiednio też zużycie sulfatiazolu sodowego w tych województwach było wielokrotnie większe aniżeli w pozostałych. Zanotowano jednakże nawroty choroby w następnym roku po zabiegach leczniczych. Najprawdopodobniej nawroty choroby były wynikiem stosowania sulfatiazolu tylko w pniach chorych lub były następstwem istnienia w pasiekach utajonej postaci zgnilca, a także stosowania preparatu bez kontroli w pasiekach sąsiadujących z ogniskiem zakażenia. Można przypuszczać, że w ten sposób stworzono warunki powstawania szczepów *Bac. larvae* opornych na działanie sulfatiazolu. Jak wynika z badań, szczepy nr: 6, 10, 21, 22 cechuje wyższa wrażliwość od pozostałych. Doniesienia z innych krajów potwierdzają nasze obserwacje, wskazując również na oporność *Bac. larvae* w stosunku do niektórych antybiotyków i sulfatiazolu (Hasseman 1953; Frisch 1957; Eckert 1960; Połtiew 1967; Smirnowa 1968).

Sulfatiazol hamował wzrost większości badanych szczepów w rozcieńczeniu 1 : 8, dając szeroką strefę zahamowania wzrostu, średnica 20—33 mm (tabela 2). W rozcieńczeniu 1 : 16 hamował on tylko nieznacznie wzrost czterech badanych szczepów (nr nr 6, 10, 21, 22); słabsze działanie hamujące sulfatiazol wywierał na szczepy nr nr 4, 7, 14, 24 w rozcieńczeniu 1 : 4. W rozcieńczeniach wyższych (1 : 32) preparat nie działał na szczepy w ogóle.

Szczepy *Bac. larvae* charakteryzowały się stosunkowo wyrównaną

Tabela 2

Wrażliwość na sulfatiazol i polisulfamid wyizolowanych szczepów *Bacillus larvae*
 Susceptibility of isolated strains of *Bacillus larvae* to Sulfathiazole and Polisulfamid

Rozcieńczenie Dilution	Sulfatiazol		Polisulfamid	
	Strefy zahamowania w mm Area of inhibited growth in mm	Liczba szczepów wrażliwych Number of strains susceptibility	Strefy zahamowania w mm Area of inhibited growth in mm	Liczba szczepów wrażliwych Number of strains susceptibility
0	34 ± 8	23	34 ± 6	23
1:2	30 ± 8	23	31 ± 7	23
1:4	28 ± 10	23	30 ± 6	23
1:8	24 ± 6	19	26 ± 6	23
1:16	18 ± 1	4	22 ± 3	23
1:32	—	0	19 ± 2	7
1:64	—	0	—	0

wrażliwością na sulfatiazol z wyjątkiem nr nr 4, 7, 14 i 24 wykazujących zmniejszoną wrażliwość.

Być może, fakt ten wskazuje na powstawanie oporności w stosunku do tego preparatu.

Wyniki badań nad działaniem polisulfamidu, a następnie biovalu, polisulfamidu i madroksinu na *Bac. larvae* oraz wrażliwość szczepów na te preparaty, ich miana bakteriobójcze i toksyczne, a także ocena aktywności były już uprzednio publikowane — Kostecki (1966), Wawrzekiewicz, Gliński, Kostecki (1966) (tab. 3, 4, 5, 6, 8).

Badania przeprowadzono w oparciu o szczepy krajowe i zagraniczne, posługując się metodą ich izolacji i podłożami opisanymi przy sulfatiazolu.

W podobny sposób oznaczono wrażliwość badanych szczepów *Bac. larvae* na działanie polisulfamidu i sulfatiazolu.

Uzyskane wyniki wykazują bardzo wyraźne różnice w aktywności badanych preparatów. Stwierdzono, że polisulfamid odznacza się większym działaniem na badane szczepy *Bac. larvae* niż inne preparaty, w tym także i stosowany w praktyce sulfatiazol (tab. 4). Pozytywne wyniki w naszych badaniach dał również preparat weterynaryjny bioval. Wykazał on wysokie miano bakteriobójcze zarówno w stosunku do form wegetatywnych jak i zarodnikowych *Bac. larvae*. Preparat ten cechował się stosunkowo niskim mianem toksycznym 10^{-2} w związku z czym jego indeks toksyczności wynosił zaledwie 0,3 do 0,5. Wydaje się więc, że bioval mógłby znaleźć zastosowanie jako środek do odkażania uli oraz sprzętu pasiecznego w przypadku infekcji zgnilcem złośliwym. Również należałoby go zalecać do odkażania rąk, co w pewnym stopniu uniemożliwiłoby mechaniczne przenoszenie drobnoustrojów chorobotwórczych w pasiece w czasie pracy.

Tabela 3

Wrażliwość 4 szczepów *Bacillus larvae* na polisulfamid, bioval i madroxin
 Susceptibility of 4 *Bacillus larvae* strains to Polisulfamid, Bioval and Madroxin

Szczepy <i>Bacillus larvae</i> strains	Strefy zahamowania wzrostu w mm Area of inhibited growth in mm																	
	Polisulfamid w rozc. Dilution of Polisulfamid							Bioval w rozc. Dilution of Bioval							Madroxin w rozc. Dilution of Madroxin			
	nie- rozc.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	nie- rozc.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	nie- rozc.	1:2	1:4	1:8
A	31	29	26	24	22	—	—	34	24	24	21	—	—	—	—	—	—	—
G. B.	37	35	34	35	32	24	—	40	34	35	25	20	—	—	20	—	—	—
B	32	31	27	24	22	—	—	34	29	25	—	—	—	—	—	—	—	—
C	40	36	37	29	27	17	—	26	23	22	18	—	—	—	19	—	—	—

Oznaczenia: liczby oznaczają strefy zahamowania wzrostu łącznie z krążkiem (średnica krążka 12 mm); — brak działania preparatu

Miano bakteriobójcze polisulfamidu, biovalu i madroxinu w stosunku do 2 szczepów *Bacillus larvae*
 Bacteriostatic titer of Polisulfamid, Bioval and Madroxin against two strains of *Bacillus larvae*

Szczepy <i>Bacillus larvae</i> strains	Czas działania preparatu w minutach Time of exposure to chemicals in minutes	Polisulfamid w rozcieńczeniu Dilution of Polisulfamid							Bioval w rozcieńczeniu Dilution of Bioval								Madroxin w rozcieńczeniu Dilution of Madroxin						Kontrola — Check	
		nie-rozc. undiluted	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:10	nie-rozc. undiluted	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7	1:8	1:10	nie-rozc. undiluted	1:2	1:3	1:4	1:5		1:6
G. B.	5	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C	5	—	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	—	—	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Oznaczenia: + wzrost drobnoustrojów; — brak wzrostu drobnoustrojów

Tabela 5

Miana toksyczne polisulfamidu, biovalu i madroxinu w stosunku do hodowli komórek zarodka kurzego

Toxic titers of Polisulfamid, Bioval and Madroxin to chicken embryo

Preparat Preparation	Czas odczytu Time of checking	Stopień zniszczenia tkanki przy stężeniu preparatu Degree of damage of tissue at concentrations					
		nierozc. undiluted	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Kontrola Check
Polisulfamid	24 h	2	1	—	—	—	—
	48 h	2	1	—	—	—	—
Bioval	24 h	3	2	2	—	—	—
	48 h	3	2	2	—	—	—
Madroxin	24 h	2	1	—	—	—	—
	48 h	3	1	—	—	—	—

Oznaczenia: — brak zmian na tkance; 1 zmiany zwyrodniające, bardzo słabo zaznaczone; 2 wyraźne zmiany zwyrodniające; 3 kompletne zniszczenie tkanki

Tabela 6

Ocena aktywności polisulfamidu, biovalu i madroxinu

Total evaluation of activity of Polisulfamid, Bioval and Madroxin

Szczepy <i>Bacillus larvae</i> — strains	Polisulfamid	Bioval	Madroxin
G. B.	Miano bakteriostatyczne Bacteriostatic titer		
	1:5	1:450	nie działa
	C	1:3	1:300
G. B.	Miano bakteriobójcze Titer of mortality of bacteria		
	1:3	1:300	nie działa
	C	1:2	1:200
	Miano toksyczne Titer of toxicity		
	10 ⁰ (1)	10 ⁻² ($\frac{1}{100}$)	10 ⁰ (1)
G. B.	Indeks toksyczności Index of toxicity		
	0,33	0,33	—
	C	0,50	0,50

Polisulfamid hamował wzrost wszystkich badanych szczepów nawet w rozcieńczeniu 1 : 16, dając dość szeroką strefę zahamowania wzrostu bakterii. W rozcieńczeniu 1 : 32 hamował on jeszcze wzrost niektórych szczepów, pozostałe zaś okazały się niewrażliwe. Preparat ten działał bakteriobójczo i bakteriostatycznie zarówno na formy wegetatywne i przetrwalnikowe. Skuteczne działanie tego preparatu na *Bac. larvae* uzyskiwano w stężeniach wahających się w granicach od 1 : 3 do 1 : 5, a działanie bakteriobójcze przy stężeniach 1 : 2 do 1 : 3. Z uwagi na to, że preparat ten, łatwo rozpuszczalny w wodzie i syropie cukrowym, jest tani oraz odznacza się skutecznym działaniem zarówno na formy wegetatywne jak i przetrwalnikowe *Bac. larvae*, powinien on stać się głównym preparatem stosowanym w zapobieganiu i leczeniu zgnilca złośliwego.

Dla całkowitej oceny tego preparatu autor podjął badania terenowe w pasiekach zaatakowanych zgnilcem złośliwym. Wyniki tych badań ujęte są w punkcie 4 części doświadczalnej.

PRZENOSZENIE PRZEZ PSZCZOŁY DOROSŁE ZARODNIKÓW *BACILLUS LARVAE* PRZY ZABIEGU PRZESIEDLANIA

Pszczoły dorosłe to zasadniczy element roju. Ich liczebność, zróżnicowanie pod względem wieku i aktywność decydują o wielkości gniazda, ilości i jakości czerwiu oraz o zbiorze miodu i zapyłaniu roślin. W okresie zimowym rodzina składa się tylko z pszczoł dorosłych. Podczas lata robotnice mogą przynosić do ula pokarm zawierający czynniki chorobotwórcze, w tym także zarodniki *Bac. larvae*. Stąd też rola pszczoł dorosłych w epizootii zgnilca ma zasadnicze znaczenie.

Celem tej części pracy było przebadanie możliwości przenoszenia przez pszczoły dorosłe zarodników *Bac. larvae* przy bezpośrednim przesiedleniu pszczoł z zakażonego gniazda na odbudowane plastry i węzę, z pominięciem głodówki.

MATERIAŁ I METODA

1. Typy uli

Badania wykonano w trzech seriach różnych typów uli. Pierwszą serią stanowiły cztery małe ule obserwacyjne typu „Liebefeld”, które obsadzono pszczołami po około 150 sztuk w każdym. Drugą serią — cztery ule weselne typu „Zandera” zawierające pszczoły ok. 500 sztuk wraz z zapłodnioną matką. Trzecią serią stanowiły — ule wielkopolskie w pasiece, w której trzy pnie były silnie opanowane przez chorobę, po ok. 10 000 sztuk.

2. Pozyskiwanie zarodników *Bac. larvae*

Materiał zakaźny pobierano z komórek z czerwiem wykazującym makroskopowe zmiany typowe dla zgnilca.

Z martwych larw sporządzono rozmazy barwione 1% roztworem fuksyny zasadowej.

3. Sposób przygotowania zakażonego pokarmu

Do przygotowania zakażonego pokarmu dla pszczół używano jedynie ciała larw, w których stwierdzono zarodniki *Bac. larvae*. Trzy martwe larwy wkładano do moździerzka, dodawano 1,5 ml wody destylowanej i rozcierano. Do uzyskanej masy dodawano 10 ml syropu miodowego, uzyskanego przez zmieszanie równych części miodu i wody. Tak przygotowany pokarm używano do podkarmiania pszczół.

4. Zakażenie pszczół w ulach typu „Liebefeld”

Ule tego typu mają oszklone dwie boczne ściany ułatwiające obserwacje rodziny. Pszczoły bez matki, przeznaczone do doświadczenia, pobierano z podstawowej rodziny bez użycia dymu, w ilości około 150 sztuk na każdy ul, do którego wstawiano plaster z pustymi komórkami. Nie stosowano dymu, aby zapobiec pobraniu przez pszczoły pokarmu do wola miodowego. Pszczoły głodzono przez dwie godziny przetrzymując je w osiatkowanych słojach w temperaturze pokojowej. Po tym czasie przez otwór w siatce wypuszczano po jednej pszczole do małej rurki szklanej o średnicy 0,7 cm i długości około 7 cm. Oba końce rurki szklanej zatykano watą (Ryc. 2). Syropem miodowym, zawierającym zarodniki *Bac. larvae*, karmiono pszczoły za pomocą pipetki.

Do dalszych obserwacji przeznaczano tylko te pszczoły, które przyjęły podany pokarm.

Pszczołom kontrolnym podano syrop miodowy bez zarodników. Podkarmione pszczoły wpuszczano przez otworek wlotowy do uli zawierających puste plastry. Po czterech godzinach od wypuszczenia pszczół do ula wypłukiwano płynem fizjologicznym 10 komórek plastra zawierających złożony przez pszczoły pokarm i sporządzano z niego preparaty barwione 1% fuksyną.

Część komórek, do których pszczoły złożyły pokarm, pozostawiono, aby więzione w ulu pszczoły mogły się nim odżywiać w dalszych dniach doświadczenia. Po opróżnieniu komórek z pokarmu przez pszczoły sprawdzano obecność zarodników na ich ściankach.



Ryc. 2. Sposób karmienia pszczół syropem zawierającym zarodniki *Bacillus larvae*
Feeding of a bee with a syrup containing spores of *Bacillus larvae*

5. Zakażenie pszczół w ulach typu „Zandera”

Do doświadczeń użyto rodziny liczące 300 do 500 pszczół. Nie wykazywały one objawów zgnilca złośliwego i miały czerw w różnych stadiach rozwoju. Aby je zakażyć, wstawiono do uli plastry zawierające chory czerw i skażony pokarm.

Czwartego dnia pszczoły poddymiano i przesiedlano do takiego samego typu uli, zawierających ramki z plastrami o pustych komórkach. Dym pobudza pszczoły do pobrania dużych ilości pokarmu. Gdy pszczoły złożyły pokarm do komórek, wymywano go płynem fizjologicznym i sporządzano barwione preparaty, podobnie jak w doświadczeniu w ulach typu „Liebefeld”.

6. Przesiedlenie pszczół w pasiece zapowietrzonej

Po silnym odymieniu pszczół zakażone pnie o sile ok. 10 000 pszczół odstawiano na bok i na ich miejsce stawiano ule z pustymi plastrami wziętymi ze zdrowych pni. Pszczoły z zakażonego ula przesiedlano na puste plastry w nowym ulu.

Ule po przesiedleniu zakryto daszkami pozostawiając otwarte wylotki. Po trzech godzinach dokonano przeglądu gniazd przesiedlonych rodzin w celu pobrania pokarmu z komórek do badania na obecność zarodników *Bac. larvae*.

Pobranie pszczół z podstawowej rodziny i przetrzymanie w ciągu dwóch godzin w osiatkowanych słojach bez podkarmiania miało na celu stworzenie warunków zapewniających przyjęcie zakażonego pokarmu, podanego im pipetą. W okresie głodzenia następowało bowiem opróżnienie wola miodowego, dzięki czemu pszczoły chętnie pobierały podawany pokarm. Po umieszczeniu pszczół w ulach „Liebefeld” już w pierwszej godzinie przeważająca część pszczół złożyła pokarm do pustych komórek rozmieszczonych w różnych częściach plastra, wypełniając je do około jednej trzeciej ich objętości. W następnych trzech godzinach już tylko nieznaczna liczba pszczół (25—30 sztuk) nappełniła nowe komórki. Po czterech godzinach pszczoły złożyły pokarm do 24 komórek po obu stronach plastra. Z 10 komórek wypłukano pokarm i sporządzono barwione preparaty, a pozostałe zostawiono do dalszych obserwacji.

W następnym dniu liczba komórek z pokarmem zmniejszyła się we wszystkich ulach o 30%, a więc pszczoły pobrały pokarm z plastra na potrzeby własne. W ciągu trzech dni pozostałe komórki zostały opróżnione z pokarmu. W okresie doświadczenia pszczoły nie wylatywały z uli.

W pokarmie wypłukanym z komórek stwierdzono obecność zarodników *Bac. larvae*.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W polu widzenia w mikroskopie na barwionym fuksyną preparacie stwierdzono od 40 do 65 zarodników. Ilość ta odpowiadała ilości zarodników w preparatach sporządzonych w identyczny sposób z pokarmu użytego do zakażenia pszczoł. A więc ilość zarodników w pokarmie nie uległa zmianie po przejściu przez wole miodowe pszczoł. Ponieważ są one bardzo drobne, nie wychwytuje ich wentyl wola miodowego pszczoł. Dlatego też zarodniki *Bac. larvae* prawie w nie zmienionym stężeniu znalazły się ponownie w komórkach plastrów napełnionych przez pszczoły. Demianowiczowa (1967) w podobny sposób tłumaczy niewychwytywanie drobnitkich ziaren pyłku niezapominajki o wymiarach 6μ na $2,6 \mu$, chociaż są one znacznie większe od zarodników *Bac. larvae*.

Opróżnione przez pszczoły z pokarmu komórki wypłukiwano 0,5 ml płynem fizjologicznym przez jedną godzinę, po czym pobierano esą płyn i sporządzano barwione preparaty.

W polu widzenia mikroskopu stwierdzono od 15 do 35 zarodników. Preparaty sporządzone z płynu, którym wypłukiwano sąsiednie puste komórki (nie napełnione przez pszczoły pokarmem), wykazywały niekiedy od 2 do 10 zarodników. Natomiast w ulach kontrolnych nie stwierdzono obecności zarodników *Bac. larvae*.

Uzyskane wyniki wskazują na to, że pszczoły dorosłe, jakkolwiek nie są wrażliwe na zakażenie, mogą być roznośicielami zarodników *Bac. larvae*. A więc przesiedlanie pszczoł na plastry może być przyczyną ponownego zakażenia pnia.

Część zarodników po spożyciu pokarmu pozostaje na ściankach opróżnionych komórek. Jeżeli pszczoły użyją tych komórek do gromadzenia świeżego pokarmu, zarodniki zakażą go.

Obecność zarodników w pustych komórkach nie wykorzystanych przez pszczoły uprzednio do gromadzenia pokarmu, wskazuje na to, że są one przenoszone mechanicznie na odnóżach i narządach gębowych po całym plastrze. Okoliczności tej sprzyja fakt, że młode pszczoły, które czyszczą komórki z zamarym czerwem, spełniają następnie funkcje karmicielek czerwiu.

Doświadczenia przeprowadzone w ulach „Zandera” potwierdziły, że miód w zakażonych plastrach zawiera zarodniki *Bac. larvae*. W odróżnieniu od doświadczeń w ulach „Liebefeld”, w których pszczoły sztucznie zakażano, w tym doświadczeniu pszczołom podawano zakażony pokarm z plastrów. Wylotki uli Zandera nie były zamknięte i pszczoły mogły swobodnie wylatywać. Jednakże obserwacje wykazały, że w czasie od 15 do 24 godzin po przesiedleniu pszczoły nie wykazują skłonności do wylatywania.

Badania mikroskopowe wykazały większą o 70% koncentrację zarodników w komórkach położonych bliżej czerwiu. Komórki brzeżne zawierały od 0 do 18 zarodników w polu widzenia.

Pozostawienie otwartych wylotków pozwoliło stwierdzić, że pszczoły po przesiedleniu prawie nie wylatywały z uli, z wyjątkiem pojedynczych przypadków. Powracające pszczoły nie przynosiły do ula nektaru ani pyłku. Normalne ich loty nastąpiły drugiego dnia, to jest po 15 do 24 godzinach. Z uwagi na istniejący pożytek pozostawiono rodziny bez podkarmiania i następnie obserwowano. W dwa tygodnie po przesiedleniu zauważono pierwsze objawy śmierci larwy w otwartej niezasklepionej komórce w ulu nr 2, a w trzy dni później w ulu nr 3.

W ulu nr 2 na 275 komórek czerwiu 4 wykazały objawy choroby. W ulu nr 3 dziewięć na 310. Pozostałe 3 pnie, w tym jeden kontrolny, nie wykazywały widocznych klinicznych objawów choroby.

Badania nad przesiedlaniem pszczół w pasiece zapowietrzanej miały potwierdzić wyniki doświadczeń laboratoryjnych. Obserwacje potwierdziły możliwość przeprowadzania głodówki pszczół przy otwartych wylotach uli. Przez 15 do 24 godzin po przesiedleniu pszczoły nie wylatywały bowiem z uli, z wyjątkiem sporadycznego wynoszenia trupów czy też okruszków plastrów. Podobnie jak w poprzednich doświadczeniach przesiedlone pszczoły złożyły pokarm do pustych komórek plastrów. Preparaty sporządzone z tego pokarmu wykazały obecność 30 do 60 przetrwalników *Bac. larvae* w polu widzenia mikroskopu.

Normalne loty pszczół w pole stwierdzono po 15 do 24 godzinach od przesiedlenia, natomiast matki rozpoczęły czerwienie na trzeci dzień. Podkarmiania nie przeprowadzono, gdyż w sąsiedztwie pasieki nektarowały lipy drobnolistne.

Po 18 dniach w jednej rodzinie stwierdzono nawrót zgnilca złośliwego (kilka zakażonych komórek), natomiast w pozostałych ulach choroby nie stwierdzono.

Okresowe zawieszenie lotów po przesiedleniu jest przypuszczalnie spowodowane zaburzeniami, jakie powoduje ten zabieg i przystosowaniem się do nowego gniazda oraz koniecznością oczyszczenia plastrów. Zmusza to pszczoły do spożycia pobranego wcześniej pokarmu i do czasowej głodówki.

Doświadczenie to wykazało również, że bezpośrednie przesiedlenie pszczół z zakażonego ula na puste plastry stwarza jednak niebezpieczeństwo nawrotu choroby. Pszczoły pobierają bowiem przed przesiedleniem znacznie więcej zapasów, aniżeli jest to im potrzebne do jednorazowego spożycia. Wskutek tego zakażony pokarm nie zostaje zużyty, lecz składany do komórek pustych plastrów nowego ula.

CZAS PRZEBYWANIA ZARODNIKÓW *BACILLUS LARVAE* W WOLU MIODOWYM PSZCZOŁY ROBOTNICZY

Przetrwalniki *Bac. larvae* zachowują w miodzie wyjątkowo długą żywotność i są trudne do zabicia (Połtiew 1948, 1950). Ma to istotne znaczenie dla epizootii zgnilca, gdyż pszczoły przy odymianiu przed przesiedleniem wypełniają swe wole zapasem zakażonego miodu. Nadmiar tego pokarmu jest następnie składany do komórek plastrów w nowym ulu, co prowadzi do nawrotu choroby. Aby temu zapobiec, należy stworzyć warunki, w których owady spożyją całą zawartość wola. Można to osiągnąć przez odpowiednio długie głodzenie pszczół i podanie potem plastrów węzy, których odbudowanie wymaga pewnego czasu.

Czas głodzenia według różnych autorów powinien wynosić 4 do 5 dni (Kirkor 1948; Morgenthaler 1948; Bouchardeau 1950). Zbyt długie głodzenie osłabia jednak rój, z drugiej zaś strony zbyt krótkie głodzenie może spowodować niecałkowite opróżnienie wola i tym samym nieoczyszczenie się z zarodników. Stąd też uznaliśmy za konieczne podjęcie badań nad ustaleniem czasu, w którym zarodniki *Bac. larvae* są całkowicie usuwane z wola do jelita środkowego. Jest to równoznaczne z ustaleniem okresu niezbędnej głodówki.

Wole stanowi rozszerzoną tylną część przelyku tworząc pęcherzykowaty cienkościenny worek. Może ono służyć jako zbiornik do przenoszenia wody lub zebranego z kwiatów nektaru. Wole łączy się z przedżołądkiem, którego przednia część ma kształt główki złożonej z 4 trójkątnych klap. Jest to tzw. wentyl, przez który pokarm przenika z wola do jelita środkowego.

MATERIAŁ I METODA

Do doświadczenia użyto dwie grupy pszczół po 150 sztuk każda. Pierwszą grupę stanowiły pszczoły zdrowe, karmione indywidualnie pokarmem według metody opisanej wcześniej.

Drugą grupę pszczół uzyskano z pnia silnie opanowanego zgnilcem złośliwym przez odymianie i strząśnięcie ich do pustego ulika typu „Liebefeld”.

Badane owady umieszczono w termostacie, utrzymując temperaturę 37°C.

W odstępach 5, 10, 20, 40, 60 minut, a później co godzinę pobierano po 10 pszczół i usypiano je.

Przewód pokarmowy z tych pszczół uzyskiwano po uprzedniej dekapitacji przez pociąganie pincetą za ostatni segment odwłoka i dzielono na szkiełku podstawowym na dwie części.

Pierwszą stanowiło wole i przedżołądek. Z niej sporządzano rozmazy,

a następnie barwiono 1% alkoholo-wodnym roztworem fuksyny zasadowej.

Zarodniki liczono w pięciu kolejnych polach widzenia mikroskopu. Podczas doświadczenia pszczoły nie otrzymywały żadnego pokarmu. Grupę kontrolną stanowiły pszczoły karmione samym miodem.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Jaki widać z tabeli 7, pokarm w wolu u obu grup pszczół głodzonych zalegał przez 5 do 6 godzin.

Ilość zarodników zmniejszała się w wolu dość szybko w miarę przechodzenia treści pokarmowej do jelita środkowego. Po pierwszej godzinie było już trzy razy mniej zarodników w porównaniu do ilości stwierdzonej po 5 minutach. Czas przebywania zarodników i pokarmu w wolu

Tabela 7

Liczba zarodników *Bacillus larvae* w wolu pszczół głodzonych przez różny czas

Decrease in number of *Bacillus larvae* spores in honey sac of starved bees (mean from three countings)

Czas pobrania Sampling after	Grupy pszczół — Groups of bees		
	I	II	III kontrolna check
Przeciętna liczba zarodników w polu widzenia Average number of spores in the microscopes-field			
po 5 min.	35	27	—
after 10 min.	31	21	—
„ 20 min.	27	17	—
„ 40 min.	17	15	—
„ 60 min.	12	9	—
„ 2 godz.	7	3	—
„ 3 h.	3	2	—
„ 4 h.	2	1	—
„ 5 h.	2	—	—
„ 6 h.	1	—	—
„ 7 h.	—	—	—

pszczół grupy drugiej był zdecydowanie krótszy, co można tłumaczyć mniejszą koncentracją zarodników w pokarmie pobranym z zakażonych plastrów.

Maksymalny czas przebywania pokarmu i zarodników w wolu wynosił przy sztucznym zakażeniu 6 godzin, a przy naturalnym 4 godziny.

Uzyskane wyniki wskazują na istnienie realnej możliwości znacznego

skrócenia i uproszczenia metody przesiedlania pszczół. Zabieg ten może być przeprowadzany w godzinach popołudniowych do pustego ula bez plastrów, aby pszczoły nie złożyły tam zakażonego pokarmu. Okres nocy prawie dwukrotnie przewyższa czas przebywania pokarmu w wolu miodowym. Plastry węzy należy więc podawać pszczołom dopiero następnego dnia i podkarmiać je syropem z dodatkiem polisulfamidu, co uzupełnia leczenie chorych rodzin.

WPLYW POLISULFAMIDU NA *BACILLUS LARVAE* IN VIVO

Poprzednio wykazano w warunkach *in vitro*, że polisulfamid działał najsilniej na *Bac. larvae*. Dla pełnej oceny tego preparatu konieczne jednak było przeprowadzenie badań terenowych, w pasiekach zaatakowanych przez zgnilec złośliwy. Warto podkreślić również, że w przypadku leczenia zakażeń wywołanych przez bakterie, które są bardziej odporne na poszczególne sulfonamidy, mieszanka sulfonamidowa zapewnia lepsze oddziaływanie na te drobnoustroje oraz pozwala bez zbytniego ryzyka znacznie zwiększyć dawkę preparatu — Helander (1954).

Polisulfamid produkcji Puławskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego jest mieszaniną soli sodowych 2-p-aminobenzenosulfonamidu, 4,6-dwumetylopirymidyny, 2-p-aminobenzenosulfonamido-tiazolu i p-aminobenzenoacetylosulfonamidu w $\frac{1}{6}$ molarnym roztworze mleczanu sodowego, zabarwioną na kolor czerwony. Polisulfamid zawiera 12% czynnego składnika (związków sulfamidowych). Można go stosować w odpowiednio dobranych dawkach łącznie z innymi chemoterapeutykami-antybiotykami i preparatami nitrofuranowymi itd. — Juszkiewicz (1959).

W badaniach postanowiono zastosować modyfikacje kompleksowego leczenia zgnilca złośliwego, oparte

- 1) na opisanych w poprzednich rozdziałach wynikach,
- 2) na stopniu zagrożenia pasieką oraz
- 3) na czasie stwierdzenia choroby.

Badania przeprowadzono w pasiekach na terenie województwa poznańskiego, przy współpracy zespołów rzeczoznawców chorób pszczół powiatów: poznańskiego, średzkiego, gnieźnieńskiego i kaliskiego. Przeprowadzona analiza liczby stwierdzonych przypadków zgnilca złośliwego wykazuje, że najwięcej przypadków wykryto w miesiącach sierpniu i wrześniu (139), znacznie mniej w maju, czerwcu i lipcu (57) (tab. 8).

W związku z tym w naszych badaniach zwróciliśmy uwagę przede wszystkim na opracowanie metody zwalczania zgnilca złośliwego w okresie jesiennym, a następnie w letnim.

Tabela 8

Liczba przypadków zgnilca złośliwego stwierdzona w 1968 r. w woj. poznańskim
Number of American foulbrood cases in Poznań voivodeship

Miesiąc Month	Liczba przypadków Number of cases	%
styczeń	—	—
luty	—	—
marzec	3	1,38
kwiecień	18	8,28
maj	16	7,3
czerwiec	15	6,9
lipiec	26	11,5
sierpień	58	26,7
wrzesień	60	27,6
październik	21	9,5
listopad	—	—
grudzień	—	—
Razem Together	217	100,0

MATERIAŁ I METODA

1. Zabiegi w okresie jesiennym

Badania przeprowadzono na przestrzeni lat trzech 1965—1968.

Pierwszą grupę stanowiło 8 pasiek z powiatu Środa Wlkp. o łącznej liczbie 134 pni, z których 27 rodzin było silnie opanowanych przez chorobę, a 4 w początkowym okresie jej rozwoju. Po dokonaniu przeglądu 12 sierpnia 1965 zdecydowano zlikwidować 7 pni najbardziej osłabionych chorobą.

Pozostałym rojom podano po 5 l syropu cukrowego z dodatkiem polisulfamidu w ilości 0,5 g na 1 litr, po pół litra dziennie. W pniach zakażonych pozostawiono plastry z chorym czerwiem.

Druga grupa obejmowała 4 pasieki w pow. poznańskim, liczące 69 pni, z których 18 wykazywało 28 sierpnia 1965 r. objawy zgnilca. Cztery najsłabsze rodziny, które nie rokowały przeżycia, zniszczono siarką. Leczeniu polisulfamidem poddano natomiast 10 września tylko pnie chore, nie usuwając z nich zakażonych plastrów. Kontrolę wyników leczenia, zarówno w pierwszej jak i drugiej grupie, przeprowadzono wiosną 25 kwietnia 1966 r.

Trzecia grupa obejmowała 17 pasiek powiatu gnieźnieńskiego w ulach wielkopolskich, w których na 149 pni w 79 stwierdzono zgnilca złośliwego 10 września 1966 roku.

W tej grupie zastosowano w zakażonych pniach 18 września 1966 r. przemieszczenie plastrów z czerwiem do kondygnacji nadstawkowej,

oddzielonej od gniazda kratą odgradową. Manipulacja ta miała na celu uratowanie zdrowego czerwiu i usunięcie z ula zakażonych plastrów. W miejsce plastrów gniazdowych wstawiono inne plastry nie wykazujące makroskopowych objawów zgnilca złośliwego. Równocześnie wszystkim rojom w pasiekach zapowietrzonych podano syrop z dodatkiem polisulfamidu.

Właścicielom pasiek polecono przeprowadzenie dezynfekcji pasiek, sprzętu i narzędzi pszczelarskich. W kwietniu 1967 r. wszystkie pnie w pasiekach tej grupy podkarmiono syropem z dodatkiem polisulfamidu jak w grupie pierwszej.

Czwarta grupa obejmowała 6 pasiek, w tym jedną złożoną z 32 pni, z których 11 rodzin uległo silnemu zakażeniu. W wywiadzie ustalono, że 4 pnie z tej pasieki pochodzą z miejscowości oddalanej o 4 km.

W związku z tym przeprowadzono 20 sierpnia 1967 r. przy pomocy rzeczoznawców chorób pszczół lustrację wszystkich pasiek w promieniu 5—7 km w 32 gromadach w ciągu jednego dnia.

Wszystkie roje pasiek zapowietrzonych podkarmiono na zimę syropem z polisulfamidem przeprowadzając uprzednio w pniach zakażonych wychów czerwiu w nastawkach. Kontrolę pasiek tej grupy przeprowadzono wiosną 1968 roku (od 25 kwietnia do 2 maja).

2. Zabiegi w okresie wiosenno-letnim

Doświadczenia w okresie letnim przeprowadzono na terenie innych pasiek, które podzielono na 3 grupy.

Grupę pierwszą stanowiły trzy pasieki na terenie powiatu kaliskiego liczące 68 pni, w których 11 rodzin było silnie zakażonych. Wszystkie rodziny w pasiekach zapowietrzonych podkarmiono 10 czerwca 1966 r. polisulfamidem w dawce 0,5 g na 1 litr syropu przez 5 dni po 1 litrze. Kontrolę pasiek przeprowadzono 15 lipca tego roku.

Badania w drugiej grupie polegały na przesiedleniu chorych rojów do pustych uli po uprzednim mechanicznym ich oczyszczeniu (oskrobaniu). Przesiedlenie przeprowadzono w godzinach popołudniowych, tj. między godziną 15 a 19 25 czerwca 1966 r. Ogółem zabiegami objęto 12 pasiek w powiatach średzkim, poznańskim i gnieźnieńskim, z których na 164 pni 39 było opanowanych chorobą. Następnego dnia przesiedlonym rojom podano średnio po 5 do 7 plastrów węzy i podkarmiono w godzinach wieczornych syropem cukrowym z dodatkiem polisulfamidu. Jesienią tegoż roku przy podkarmianiu na zimę wszystkie roje tej grupy pasiek otrzymały w trzeciej dekadzie sierpnia syrop leczniczy. Podobne podkarmianie zastosowano na następną wiosnę. Kontrolę pasiek przeprowadzono dwukrotnie, w październiku 1966 roku i w kwietniu 1967 roku.

Grupę trzecią stanowiło 7 pasiek liczących 121 pni, w tym 17 pni chorych, w których w początkach sierpnia 1967 r. przeprowadzono wy-

chów czerwiu w plastrach zakażonych w gnieździe przy jednoczesnej izolacji matki w klateczce na okres 10 dni.

Po tym czasie rodziny przesiedlono do pustych uli, postępując nadal podobnie jak w grupie drugiej. Kontrolę przeprowadzono w październiku tego roku oraz 25 kwietnia 1968 roku.

WYNIKI I OMÓWIENIE

1. Leczenie jesienne

We wszystkich pasiekach stwierdzono zgnilca złośliwego klinicznie i laboratoryjnie. Podkarmianie wszystkich pni w pasiekach grupy pierwszej miało na celu zahamowanie dalszego rozwoju choroby w pasiekach zapowietrzonych.

W naszym doświadczeniu trzy najsłabsze zakażone rodziny uległy w ciągu zimy 1965/66 osypaniu. Następnego 1966 roku w początkach maja w dwóch rodzinach zakażonych stwierdzono nawrót choroby oraz strupki zmarłych larw w 17 komórkach, których pszczoły nie zdążyły dotychczas usunąć. Obserwacje te wskazują, że pozostawienie na zimę w gnieździe plastrów silnie zakażonych stwarza mimo leczenia jesienią możliwość nawrotów choroby wiosną następnego roku.

Podkarmianie syropem leczniczym tylko zakażonych pni w drugiej grupie pasiek miało na celu stwierdzenie jego wpływu na stan zdrowotny pozostałych pozornie zdrowych rodzin w pasiece. Wyniki kontroli ujawniły chorobę w 4 innych pniach oraz jej nawrót w 6 poprzednio zakażonych rodzinach.

Samo podkarmianie zakażonych pni syropem cukrowym z dodatkiem leku nie jest więc wystarczająco skuteczne, bowiem stwarza możliwość nawrotu choroby zarówno w pniach zakażonych jak i poszerzenia jej na te, które ubiegłego roku nie wykazywały klinicznych objawów zgnilca. Dlatego w pniach zakażonych zastosowano ponadto wymianę plastrów i podkarmianie polisulfamidem całej pasieki jeszcze przed pożytkiem rzepakowym. Dzięki temu zarówno w roku 1967 jak i 1968 choroba w pasiece nie wystąpiła.

Doświadczenie z trzecią grupą pasiek w powiecie gnieźnieńskim pozwoliło stwierdzić, że przemieszczenie plastrów z chorym czerwiem do nadstawki jest zabiegiem pozwalającym na usunięcie z gniazd źródeł zakażenia i jednocześnie wzbogaca rodzinę w młode pszczoły, które stanowią ważny element w składzie rodziny zimującej. Podkarmianie stymuluje matkę do intensywnego składania jaj w komórki pustych plastrów i w ten sposób rodzina wyrównuje straty wywołane chorobą.

Przegląd pasieki przeprowadzony 25 października 1966 r. nie wykazał makroskopowych zmian czerwiu w ulach. Wiosną 1967 roku zakażone roje niczym się nie różniły od zdrowych.

W wiosennym podkarmianiu 25.IV.1967 r. w całej pasiece podano ponownie polisulfamid w ilości 0,5 g na 1 litr syropu, 5 razy po pół litra. Przez dwa kolejne lata (1967, 1968) nie stwierdzono nawrotu choroby w tej pasiece.

Jesienne zwalczanie zgnilca złośliwego w czwartej grupie pasiek potwierdziło raz jeszcze skuteczność zabiegów leczniczych przeprowadzonych w pasiekach grupy trzeciej.

Na uwagę zasługują wyniki jesiennego przeglądu pasiek w tej części powiatu, w której podejrzewało się istnienie utajonych ognisk zgnilca. Wykrycie w 1968 r. w czasie tego przeglądu 19 pasiek zakażonych potwierdza konieczność przeprowadzania tego rodzaju akcji z urzędu.



Ryc. 3. Mapa stwierdzonych przypadków zgnilca złośliwego na terenie pow. Gniezno w roku 1968 (po kompleksowym badaniu pasiek).

Cases of American foulbrood recorded in Gniezno county in 1968.

■ Część powiatu objęta przeglądem

O ich wynikach najdobitniej świadczy mapa powiatu gnieźnieńskiego, przedstawiająca sytuację epizootyczną zgnilca złośliwego w 1968 r. po przeprowadzonej lustracji na określonym obszarze powiatu.

2. Leczenie w okresie wiosenno-letnim

Doświadczenie przeprowadzone z pierwszą grupą pasiek wykazało, iż leczenie w okresie wiosenno-letnim, polegające tylko na podkarmianiu środkami leczniczymi, nie daje zadowalających efektów.

W miesiącu maju kwitną rzepaki, które dostarczają pszczołom dużych ilości nektaru. W tym czasie pszczoły niechętnie przyjmują pokarm podawany im w podkarmiaczkach. W naszym doświadczeniu w maju pokarm przyjęło tylko 40% leczonych rodzin.

Poza tym podkarmianie pszczoł w okresie wziętku naturalnego stwarza możliwości złożenia podanego syropu z polisulfamidem razem z nektarem do plastrów nadstawkowych. Stwarza to więc niebezpieczeństwo obecności w miodzie konsumpcyjnym środków stosowanych w leczeniu pszczoł.

O małym stopniu skuteczności tej metody świadczy nawrót choroby w 7 pniach, obserwowany 26 lipca.

W drugiej grupie pasiek, leczonych pod koniec maja i w czerwcu, zastosowano przesiedlenie pszczół do pustych uli bez ich zamykania. Przesiedlenie pszczół w godzinach popołudniowych zmusiło je do spożycia pokarmu pobranego do wola miodowego. Podanie następnego dnia węży uniemożliwiło ewentualne złożenie pokarmu, gdyż pszczoły musiały najpierw zbudować plastry.

Podkarmianie pszczół po prawie dwudziestoczterogodzinnej naturalnej głodówce spowodowało, że pszczoły z pustymi wolami przystąpiły do odbudowy gniazda z podobną energią, jaką obserwuje się po normalnym wyrojeniu się pszczół. Rodziny przesiedlone podkarmiono polisulfamidem w opisany już sposób. Przeprowadzone kontrole potwierdziły skuteczność tego rodzaju zabiegów.

Na uwagę zasługuje również wynik pewnej obserwacji. Przyjmuje się bowiem, że ule po zakażonych rodzinach powinny być odkażone przez mechaniczne oczyszczenie, a następnie wypalanie lampą benzynową. W naszych warunkach nie mogliśmy wykonać tego zabiegu i dlatego 15 rodzin przesiedlono do tych samych uli, ograniczając się jedynie do ich częściowego odkażenia przez oskrobanie. Zarówno w 12 ulach wypalanych, jak też w 15 nie wypalanych nie stwierdzono nawrotów choroby, co naszym zdaniem można tłumaczyć małą ilością zarodników pozostających na ścianach ula po oskrobaniu. Na podobne zjawisko zwraca uwagę Meyerhof i Seifert (1956).

Celem sprawdzenia możliwości występowania zarodników *Bac. larvae* na ścianach ula, w grupie uli, które poddano tylko mechanicznemu oczyszczeniu, badano zawartość zeszkrobów w następujący sposób:

część zeszkrobów (2 g) rozpuszczono w odpowiedniej ilości chloroformu (20 ml), a następnie odwirowano z szybkością 3—4 tys. obrotów na minutę w ciągu 10 minut.

Preparaty barwione 1%-wym roztworem fuksyny wykonywano zarówno z osadu jak i z płynu nad osadem. Na piętnaście przeprowadzonych obserwacji w dwóch przypadkach stwierdzono w polu widzenia mikroskopu 4—7 zarodników *Bac. larvae*. Jak z powyższego wynika, obecność zarodników na ścianach ula zakażonego pnia nie odgrywa w zasadzie roli w rozprzestrzenianiu choroby.

W trzech przypadkach na 24 roje przesiedlone do pustych odkażonych przez wypalanie uli, zanotowano ucieczkę roju następnego dnia. Ucieczki rojów można unikać przez izolację matki w klateczce na okres 2—3 dni po przesiedleniu. Nie zanotowano natomiast ucieczki rojów w grupie uli oczyszczonych mechanicznie. Przypuszczalnie powodem był zapach wypalonego ula. Kontrola przeprowadzona w październiku w 1967 r., a także w maju 1968 r., nie wykazała nawrotu choroby.

Leczenie pni tym sposobem w miesiącu sierpniu stwarza możliwość zwiększenia liczby osobników wchodzących w skład pszczół zimujących. 60% leczonych pni przewyższało liczbą pszczół pozostałe pnie w pasiece.

Reasumując trzeba podkreślić, że leczeniem należy objąć jedynie te roje, które nie poniosły większych szkód wywołanych przez *Bac. larvae*. Natomiast pnie silnie osłabione chorobą należy zlikwidować przez wy-siarkowanie, a plastry przeznaczyć do przetopienia na wosk.

Leczenie (z przesiedleniem) daje podobne efekty jak naturalne rojenie się pszczół w szczytowym okresie rozwoju rodziny. Podany wraz ze środkiem leczniczym pokarm wpływa pobudzająco na szybkość odbudowy plastrów w nowym ulu i na zdolność oczyszczania gniazda ze znamion choroby.

W każdym przypadku wystąpienia zgnilca złośliwego w okresie jesiennym należy usunąć plastry z zakażonym czerwiem po uprzednim wygryzieniu się z nich pszczół. Gniazda takie powinny być uzupełniane pustymi plastrami z pni nie wykazujących klinicznych objawów choroby. Przesiedlenie rodzin w tym czasie na plastry z węzą jest dla pszczół szkodliwe.

Jak podaje Taranow (1961), rozwój gruczołów woskowych u pszczół w okresie jesieni przebiega kosztem zmniejszania się ciała tłuszczowego. Gruczoły woskowe pszczół jesiennych nie osiągają nigdy takiego stopnia rozwoju jak u pszczół letnich. Autor ten zwraca uwagę na złą zimowlę rodzin, u których w okresie jesiennym obserwowano wydzielanie wosku.

Podkarmianie syropem z dodatkiem polisulfamidu trzeba przeprowadzić w całej pasiece zarówno w okresie jesiennym (przy zimowym podkarmianiu) jak też wczesną wiosną.

Leczenie profilaktyczne powinno się stosować jedynie wówczas, gdy istnieje niebezpieczeństwo zakażenia z sąsiednich pasiek lub infekcji utajonej.

Można również zalecić profilaktyczne stosowanie w pasiekach polisulfamidu w rejonach stałej infekcji do czasu przeprowadzenia kompleksowego badania rojów w całych powiatach lub w ich częściach.

W celach profilaktycznych można obniżyć ilość podawanego polisulfamidu do 0,3 g na 1 litr, natomiast leczniczo stosować 0,5 g na 1 litr.

Dawki polisulfamidu ustalono na podstawie własnych obserwacji nad wpływem preparatu na *Bac. larvae* in vitro oraz na podstawie badań przeprowadzonych przez Popę (1960) w odniesieniu do sulfatiazolu. Jak podaje Juszkiewicz (1959), polisulfamid utrzymuje się we krwi zwierząt domowych w stężeniach trzy- do pięciokrotnie wyższych niż podane w taki sam sposób równorzędne dawki sulfatiazolu. Podobne zjawisko według naszych obserwacji występuje w odniesieniu do wpływu stężenia polisulfamidu w syropie cukrowym na *Bac. larvae* in vivo.

Ze względu na większą częstotliwość występowania zgnilca złośliwego w okresie jesiennym zachodzi potrzeba zwrócenia baczniejszej uwagi na zwalczanie choroby w tym okresie. Dlatego wydaje się koniecznym zróżnicowanie zabiegów leczniczych w zależności od czasu stwierdzenia choroby.

METODA BADANIA WOSKU I WĘZY NA ZAWARTOŚĆ ZARODNIKÓW *BACILLUS LARVAE*

Jedną z dróg rozprzestrzeniania się zgnilca złośliwego jest przeniesienie zarodników *Bac. larvae* za pośrednictwem węzy. Zarodniki mogą być wtopione w węzę przy jej produkcji z wosku, który pochodził z plasterów rodzin zakażonych. Węza może też ulec zakażeniu w czasie składowania lub sprzedaży w wyniku stykania się z materiałem zakażonym.

W pierwszym oczywiście przypadku zarodniki będą wtopione w węzę, w drugim znajdować się będą tylko na jej powierzchni. Doniesienie Szkućnika (1955) o nieudanym zakażeniu rodziny pszczelej przez wstawienie do jej gniazda arkusza węzy, uzyskanego z wosku, zakażonego zgnilcem złośliwym, dotyczy próby tylko z jednym plastrem i jest sprzeczne z wynikami innych autorów. Liczne bowiem badania, między innymi Toszkowa (1938), Kamburowa (1962), Smirnowa (1968) udowodniły, że przenoszenie zgnilca przez węzę jest możliwe.

Gochnauer i współaut. (1967) oraz Smirnow (1968) niezależnie od siebie opracowali metody sterylizacji węzy przez jej napromieniowanie przy pomocy Co^{60} , mając właśnie na uwadze zapobieganie przenoszeniu choroby tą drogą.

Doświadczalne dane potwierdzają zatem spostrzeżenia pszczelarzy i terenowej służby weterynaryjnej, sygnalizujące wybuchy nowych ognisk chorobowych zgnilca, których jedynym wytłumaczalnym źródłem mogła być tylko zakażona węza.

Obserwacje te pochodziły głównie z okręgów zagrożonych zgnilcem, w których istnieją prywatne wytwórnie węzy. Wytwórnie te nie odpowiadają podstawowym wymogom sanitarnym oraz nie posiadają sprzętu zapewniającego właściwą sterylizację wosku, ani także aparatury dla wyprodukowania wysoko jakościowej węzy. Wskutek tego produkowana tam węza zawiera zarodniki *Bac. larvae*.

Temperatura produkcji węzy w wytwórniach Okręgowych Spółdzielni Pszczelarskich wynosi około $110^{\circ}C$. ale zarodniki bakterii są chronione warstwą wosku, a więc warunki dla całkowitej sterylizacji nie są zapewnione. Dlatego też badania wosku przeznaczonego do produkcji węzy oraz samej węzy mają podstawowe znaczenie w zapobieganiu rozprzestrzeniania choroby tą drogą.

Metoda wykrywania przetrwalników na powierzchni wosku lub węzy

jest bardzo prosta i nie przedstawia żadnych trudności. Natomiast metoda wykrywania zarodników zatopionych w wosku lub węzie przedstawia poważne kłopoty z uwagi na specyficzne właściwości chemiczne wosku. Jest on, jak wiadomo, bardzo odporny na barwienie.

Metoda opisana przez Kirkora (1953), polegająca na rozpuszczaniu wosku w gorącej terpentynie i następnie wirowaniu przy 5000 obr/min pozwala oddzielić zarodniki *Bac. larvae* od wosku. Metoda ta była jednak kłopotliwa i żmudna, zwłaszcza przy masowych badaniach. Wymagała ona także dużej ostrożności w czasie bezpośredniego podgrzewania próbek z woskiem i terpentyną nad płomieniem palnika gazowego.

Powstała zatem konieczność opracowania takiej metody badania węzy, aby była ona niezawodna i nadawała się do seryjnego i wygodnego stosowania.

MATERIAŁ I METODA

W pracy wypróbowano następujące rozpuszczalniki wosku: aceton, alkohol amyłowy, benzen, benzyna, chloroform, czterochlorek węgla, eter, olejek anyżowy, olejek eukaliptusowy, olejek koprowy, terpentyna, trójchloroetylen („Tri”). Próbowano rozpuszczać wosk z wymienionymi rozpuszczalnikami, a także w ich mieszaninach w równych częściach: eter + terpentyna, eter + alkohol, eter + trójchloroetylen, eter + benzyna itd. Zwracano przy tym uwagę nie tylko na szybkość rozpuszczania się 2 g próbek wosku, lecz także na ilość rozpuszczalnika potrzebną do pełnego rozpuszczenia próbki, na stopień klarowności i gęstość uzyskiwanej mieszaniny.

Ubocznie należałoby wyjaśnić jaki jest wpływ rozpuszczalników wosku na wygląd zarodników. Istniała bowiem obawa, że przy dłuższym ich działaniu mogą one zmieniać budowę zarodników *Bac. larvae* lub je niszczyć. W obu wypadkach utrudniałoby to lub uniemożliwiłoby wykrycie zarodników przy badaniach mikroskopowych. Dla sprawdzenia użyto zawiesiny przetrwalników z ciał larw zmarłych na zgnilec złośliwy, uzyskanej przez roztarcie jednej larwy w 2 ml roztworu fizjologicznego.

Do 1 ml takiej zawiesiny dodawano 2 ml każdego rozpuszczalnika i wykonywano z niej kolejne rozmazy po $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4, 5 i 6 godzinach.

Wosk i węzę bez zarodników *Bac. larvae* posiadaliśmy z uprzednio przebadanych próbek, jakie nadchodziły do naszego Zakładu. Wosk zakażony otrzymano przez przetopienie będących w posiadaniu Zakładu próbek plastrów, w których stwierdzono klinicznie i laboratoryjnie zgnilec złośliwy.

Odrębną próbkę wosku otrzymano metodą ekstrakcji z suszu zakażonego zgnilcem złośliwym. Została ona przygotowana w laboratorium Okręgowej Spółdzielni Pszczelarskiej w Poznaniu według metody stosowanej w warunkach przemysłowych. W badaniach użyto również wosk i węzę z wtopionymi zarodnikami oraz węzę zakażoną powierzchnie przez posmarowanie roztworem zarodników.

Do dużej próbówki bakteriologicznej odważono 2 g wosku, który zalewano 20 ml rozpuszczalnika. Po rozpuszczeniu się wosku lub węży zawartość rozlewano do dwóch mniejszych próbek po 10 ml i dodawano do każdej 0,5 ml wody destylowanej w celu wytworzenia warstwy wodnej ponad „kaszą” woskową po odwirowaniu. Zawartość próbek, przed umieszczeniem w wirówce, wstrząsano celem dokładnego wymieszania wody z rozpuszczonym woskiem. Wykonano po 3 serie prób z woskiem i węzą (tabela 9).

Roztwory wirowano przez 10 minut przy 3—4 tys. obr./min. Następnie opaloną węzą wykonano 2 do 4 preparatów z każdej próbówki.

Materiał do sporządzania preparatów mikroskopowych pobierano z warstwy granicznej „kożucha” i wody, gdyż tu zbierały się części stałe i ewentualnie obecne zarodniki *Bac. larvae*. Sporządzone rozmazy barwiono 1% fuksyną karbolową.

W obrazach mikroskopowych badanych próbek można było łatwo odnaleźć zarodniki. Ilość ich była różna w zależności od rodzaju badanego wosku i węży i wynosiła od 0 do 54.

Zarodniki *Bac. larvae* liczone w 3 polach widzenia mikroskopu, a wyniki dla 2 rozpuszczalników zestawiono w tabeli 10. Dla każdego rodzaju wosku i węży wykonywano 3 serie badań, sporządzając po 3 preparaty barwione. Liczbę zarodników w obrazie mikroskopowym podano w wielkościach minimalnych i maksymalnych stwierdzonych w jednym preparacie.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Z przeprowadzonych badań wynika, że najlepszym rozpuszczalnikiem jest chloroform. Całkowite rozpuszczenie wosku w temperaturze pokojowej (około 18°C) trwało od 10 do 15 minut, przy czym stosowano parokrotne wstrząsanie zawartością próbówki. Po rozpuszczeniu się 2 g wosku lub kawałka węży o wymiarach 6×6 cm w 20 ml chloroformu powstawała klarowna mieszanina słomkowożółtej barwy. Osad nie tworzył się, gdyż wszystkie zanieczyszczenia, jako lżejsze od chloroformu, zbierały się w górnej warstwie płynu.

Po odwirowaniu następuje rozwarstwienie mieszaniny, na dole jest słomkowożółty roztwór wosku w chloroformie, a nad nim jest warstwa

Tabela 9

Rozpuszczalność wosku w rozpuszczalnikach i wyniki mikroskopowych badań wosków i węży na zawartość *Bacillus larvae*

Solubility of wax in two solvents and results of microscopic examination of wax and comb foundation on contents of *Bacillus larvae*

Sposób przygotowania wosku lub węży do badań Preparation of material to study	Rozpuszczalność wosku Solubility of wax in solvents		Ilość preparatów oglądanych pod mikroskopem Number of examined microscopic slides		Liczba stwierdzonych zarodników (średnia z trzech preparatów) Number of observed spores	
	chloroform	„Tri”	wosk wax	węza comb	wosk wax	węza comb
przetopienie zakażonych plastrów By melting of infected comb	++	+	9	9	25—30	16—23
wtopienie zarodników Embedding of spores to wax	++	+	9	9	45—54	31—42
ekstrakcja zakażonego suszu Extraction of infected combs	++	+	9	9	—	—
zakażenie węży powierzchniowe Surface infection of comb foundation	++	+	—	9	—	28—47
wosk i węza ze skupu Wax and comb foundation from market	++	+	18	—	0—26	0—17
przetopienie plastrów wolnych od zarodników By melting uninfected comb	++	+	9	9	—	—

Objaśnienie: ++ = bardzo dobra rozpuszczalność wosku
+ = dobra rozpuszczalność wosku

zagęszczonego wosku grubości 1 cm. Górną warstwę tworzy woda pokryta cieniutkim krążkiem wosku, który usuwamy eżą.

Gorszym rozpuszczalnikiem okazał się trójchloroetylen „Tri”. Po rozpuszczeniu w nim wosku wytworzona mieszanina jest bardziej gęsta

Tabela 10

Porównanie postępowania i leczenia zgnilca złośliwego w programie tradycyjnym i nowo opracowanym
Comparing of procedures and treatment against American foulbrood in traditional and integrated control of the disease

Zabiegi Treatments	Program tradycyjny Traditional control	Program integrowany Integrated control	Uwagi Comments
1	2	3	4
LECZENIE LETNIE 1. Likwidacja rojów	Stosowano tylko w pasiekach o małej ilości pni, gdy w okręgu zagrożonym nie stwierdzono nowych ognisk	Stosuje się przy rojach silnie osłabionych	
2. Przesiedlanie pszczół	Podwójne przesiedlanie pszczół do rojnicy, a następnie do odkażonego ula	Przesiedla się bezpośrednio do odkażonego ula z pominięciem rojnicy	
3. Izolacja pni przez osiatkowanie	Osiatkowanie pozostałych pni w pasiece na czas zabiegów	Nie stosuje się	Wylotki ula pozostają otwarte
4. Głodówka	Wymuszona 48-godzinna głodówka w rojnicach w piwnicy	Nie stosuje się	Stwierdzono samodzielną głodówkę po przesiedleniu pszczół do ula
5. Podawanie węzy	Podawanie paszków węzy, a następnie całych plastrów węzy	Podawanie plastrów węzy	
6. Odkażanie uli	Odkażanie obejmowało: 1) oczyszczenie mechaniczne 2) odkażenie 2%-wym roztworem NaOH 3) opalenie lampą benzynową wnętrza ula do zwęglania drewna	Oczyszczenie mechaniczne ula i ewentualne lekkie opalenie ścian lub odkażenie 2%-wym roztworem NaOH	

Tabela 10 c. d.

1	2	3	4
7. Podkarmianie syropem z dodatkiem leku	Podkarmianie pni zakażonych syropem cukrowym z dodatkiem sulfatiazolu w dawce 0,2—0,3 g na litr	Podkarmianie wszystkich pni pasieki zapowietrzonej syropem z dodatkiem polisulfamidu w dawce 0,5 g/litr oraz profilaktycznie w okresie jesiennym i wiosennym	
LECZENIE JESIENNE 1. Przesiedlanie	Stosowano	Nie stosuje się	W okresie jesiennym zabiegi obejmowały zwykle podkarmianie syropem leczniczym po uprzednim przesiedleniu Stosowanie jesiennego przesiedlania rojów w programie tradycyjnym uznano za szkodliwe dla rodziny i w nowym programie nie jest zalecane
2. Likwidacja rojów	Łączenie słabych rojów	Likwidacja naj-słabszych, nie rokujących przezi-mowania	Z uwagi na małą ilość młodych pszczoł łączenie słabych rojów, zwłaszcza w okresie jesiennym, nie jest wskazane
3. Wychów czerwiiu	Nie stosowano	Stosuje się przemieszczenie plastrów z czerwem lub ograniczoną izolację matki	Przy wykryciu choroby w mies. lipcu i sierpniu — izolacja matki, przy wykryciu choroby we wrześniu i październiku — tylko przemieszczenie plastrów

1	2	3	4
4. Leczenie profilaktyczne	Nie stosowano	W okręgu zagrożonym podawanie wszystkim pniom polisulfamidu w dawkach zmniejszonych (0,3 g/l syropu) w okresie jesiennym i wiosennym	
KOMPLEKSOWE BADANIE PASIEK	Nie stosowano	Stosuje się	Patrz przepisy ogólne instrukcji nr 2 z dn. 15. IX. 1966 r. (Nr WET zp-656/zł—1/66)

niż w przypadku chloroformu, mniej klarowna, a warstwa wosku ponad płynem po odwirowaniu jest grubsza (10 do 15 mm).

Pozostałe rozpuszczalniki i ich mieszaniny, wymienione w metodyce, okazały się mniej przydatne od obu wyżej wymienionych. Ilość zużywanych rozpuszczalników przekraczała 20 ml płynu, a uzyskiwane mieszaniny były zbyt gęste i zawierały wosk częściowo nierozpuszczony. Dlatego też w dalszych badaniach stosowano tylko chloroform i trójchloroetylen.

Uzyskane wyniki wskazują, że nawet po 6 godzinach działania rozpuszczalników kształt i wielkość zarodników nie uległy zmianie. Były one dobrze widoczne, z charakterystycznym dla *Bac. larvae* palisadowatym ułożeniem.

Brak przetrwalników w węzie z wosku ekstrahowanego trójchloroetylenem był niewątpliwie spowodowany jego przefiltrowaniem przez cienkie płótno oraz oczyszczeniem przy pomocy węgla aktywowanego. Jest to metoda stosowana przez Okręgową Spółdzielnię Pszczelarską w Poznaniu, więc można sądzić, że metoda ekstrakcji wosku przy użyciu trójchloroetyleny usuwa zarodniki zgnilca z zakażonych plastrów.

Opisana metoda może być zatem przydatna w powszechnym badaniu wosku przeznaczonego do produkcji węzy i jej kontroli na obecność zarodników *Bac. larvae*.

STRESZCZENIE I WNIOSKI

1. Badania nad wpływem środków farmakologicznych na *Bacillus larvae* in vitro wykazały, że polisulfamid okazał się najbardziej skutecznym preparatem.

Pozostałe preparaty, jak sulfatiazol, bioval i madroxin były mniej skuteczne. A więc polisulfamid powinien być stosowany w leczeniu zgnilca w miejsce mniej skutecznego sulfatiazolu sodowego.

2. Na terenie Polski występują szczepy *Bacillus larvae* odporne na sulfatiazol, które jednak okazały się w pełni wrażliwe na polisulfamid.

3. W badaniach *in vivo* potwierdziła się wyższa skuteczność polisulfamidu w leczeniu zgnilca w porównaniu z sulfatiazolem.

4. Przesiedlenie pszczół na puste plastry nie jest zabiegiem skutecznym w zwalczaniu zgnilca. W wolu miodowym przesiedlonych pszczół znajdują się zarodniki, które są z pokarmem składane przez pszczoły do pustych komórek. Stanowią one źródło infekcji w ulu.

5. W szerokich badaniach terenowych stwierdzono, że przesiedlanie należy przeprowadzać do pustych uli w godzinach popołudniowych. Samoistna głódówka (pszczoły nie opuszczają ula mimo otwartych wylotów) powoduje zużycie pokarmu znajdującego się w polu i zawierającego zarodniki. Podanie więc następnego dnia arkuszy węzy zmusza pszczoły do budowy komórek. W rezultacie do pustych komórek składany jest już tylko podany syrop leczniczy lub świeżo przyniesiony nektar. Tak przeprowadzony zabieg przesiedlania w pełni eliminuje ważną drogę rozprzestrzeniania się choroby.

6. W badaniach eksperymentalnych stwierdzono, że pokarm znajdujący się w wolu robotnicy jest zużywany w ciągu 4—6 godzin. W tym czasie wszystkie zarodniki *Bacillus larvae* przechodzą z wola do dalszych odcinków przewodu pokarmowego pszczoły.

Okres samoistnej głódówki przesiedlonych pszczół w godzinach popołudniowych (godziny nocne oraz szok po przesiedleniu) trwa 15—24 godzin i wielokrotnie przewyższa czas, w którym zarodniki są usuwane z wola.

7. W miesiącach sierpniu, wrześniu i październiku wykrywa się przeszło 65% wszystkich ognisk chorobowych pszczół każdego roku. W tym czasie stosowanie zabiegu tradycyjnego leczenia, który polegał głównie na przesiedlaniu pszczół, zostało uznane za bardzo szkodliwe dla rodziny. Rozwój gruczołów woskowych u pszczół w okresie jesieni przebiega kosztem zmniejszania się ciała tłuszczowego. W związku z tym konieczne jest podzielenie zabiegu na odrębne leczenie jesienne i letnie.

Leczenie letnie obejmuje przesiedlenie, podanie plastrów węzy oraz syropu leczniczego.

W leczeniu jesiennym nie stosuje się przesiedlenia, lecz wychów czerwii (przez izolację matki lub przemieszczenie plastrów) i podawanie syropu leczniczego we wszystkich pniach pasieki leczniczo i profilaktycznie.

8. Ponieważ zgnilec złośliwy może szerzyć się poprzez zarodniki, znajdujące się w wosku, konieczna jest analiza kontrolna wosku przeznaczanego do produkcji węzy.

Opracowano metodę wypłukiwania zarodników w wosku chloroformem i stwierdzono, że może ona znaleźć zastosowanie w szerokiej praktyce.

Stwierdzono również, że badany wosk ekstrahowany nie zawiera zarodników *Bacillus larvae*, gdyż giną one w czasie produkcji.

Uwzględniając wyniki przedstawionych tu badań autor zaproponował niektóre zmiany w metodach zwalczania zgnilca złośliwego, zmierzające do usprawnienia zabiegów i zapewnienia większej skuteczności ich działania.

Tabela 10 przedstawia porównanie postępowania i leczenia zgnilca złośliwego w programie tradycyjnym i nowo opracowanym.

LITERATURA

- Bailey L. Lee D. C. 1962 *Bacillus larvae*, its cultivation in vitro and growth in vivo. *J. Gen. Microbiol.* 29, s. 711
- Bouchardeau C. 1950 Efficacite d'une methode de traitement contre la loque Americaine. *La Rev. Franc. d'Apic.* nr 54 s. 356
- Brizard A., Deimare G., Albisetti J. 1964 Etude comparative des traitements de la loque americaine par la tetracycline et la sulfathiazole. *Ann. Abeille*, 7 s. 13
- Demianowicz Z. 1960 Ocena miódów na podstawie analizy pyłkowej. Materiały Sesji Naukowo-Technicznej 22.X.1966 Warszawa
- Frisch W. 1957 Untersuchungen an 56 Stämmen des *Bac. Larvae White*. *Arch. Bienenk.* 1, s. 22—32
- Hasseman L. 1946 Sulfa drugs to control foulbrood. *J. Econ. Entomol.* 39, s. 5
- Hasseman L. 1953 The sulfathiazole control for American foulbrood. *Amer. Bee J.* 10, s. 402
- Hasseman L. 1961 How long can live the spores of american foulbrood. *Amer. Bee J.* 8, s. 298—299
- Juszkiewicz T. 1959 Polisulfamid — mieszanka sulfonamidowa. Biul. Przem. Biow. Warszawa
- Katznelson H. 1950 The influence of antibiotics and sulfa drugs on *Bacillus larvae* casue of American foulbrood of the honeybee in vitro and in vivo. *J. Bacteriol.* 59, s. 471
- Katznelson H., Gooderham C. B. 1949 Sulfathiazole in relation to American foulbrood. *Sci. Agr.* 29, s. 340
- Kirkor S. 1948 Stan epizootyczny pszczelnictwa w roku 1947, *Med. Wet.*, 3, s. 203—205
- Kostecki R. 1965 Zgnilec złośliwy pszczół. *Biul. Inf. IWet* nr 5, ss. 1—29
- Kostecki R. 1965 Organisation der Bekämpfung von Bienenkrankheiten in Polen. Der 20. Internationale Jubiläumskongress der Bienenzüchter. Bukarest, s. 1—5
- Kostecki R. 1966 Intensyfikacja produkcji pszczelarskiej. Materiały Sesji Naukowo-Technicznej 22.X.1966, Warszawa, ss. 41—49

- Kostecki R., Wawrzekiewicz K., Gliński Z., 1965 Anwendung von Polysulfamid zur Heilung der Bösartigen Faulbrut in vivo. Die Arbeiten des XX Internationalen Kongresses der Bienenzüchter. Bukarest 26—31 August. ss. 1—9
- Kostecki R. 1966 Instrukcja w sprawie zwalczania zgnilca złośliwego (amerykańskiego) i kiślicy (zgnilca europejskiego) oraz choroby roztoczej (Nr WET zp-656/zł-1/66)
- Latham P. 1947 Direct treatment of American foulbrood. *Amer. Bee J.* 87, s. 118
- Lochhead A. G. 1942 Growth factor requirements of *Bacillus larvae* White. *J. of Bact.* 44, s. 185—189
- Meyerhoff H., Seifert L. 1961 Über die Heilung der an Bösartiger Faulbrut erkrankter Bienenvölker mit Sulfathiasol. Fachrichtung Imker-Berlin
- Morgenthaler O. 1948 Die Bekämpfung der Faulbrut mit Sulfanilamid Präparaten. *Schw. Bienen Zeit.* nr 6, s. 254
- Niemczuk R. 1962 Wpływ sulfonamidów i antybiotyków na *Bacillus larvae* White in vitro i in vivo. *Zeszyty Naukowe WSR Wrocław, Weterynaria XII*, 43, 97—116
- Park F. O. W., Pellet C., Paddock E. B. 1937 Disease Resistance and American Foulbrood. *Amer. Bee J.* vol. 77, nr 1, s. 17—21
- Popa Al. 1960 Cercetari asupra sensibilitatii de sulfatiasol a 27 tulpine de *Bacillus larvae* diu diferite regiuni ale tarii — *Lucrari științifice* vol. II s. 241—247 Bucuresti
- Reinhardt J. F. 1947 The sulfathiasole cure of American foulbrood: an explanatory theory. *J. Econ. Entomol.* 40, s. 45
- Rothenbuhler W. C., Thompson V. C. 1956 Resistance of American Foulbrood in Honey Bees. I. Differential Survival of Larvae of Different Genetic Lines. *J. of Econ. Ent.* vol. 46, nr 4
- Smirnow A. M. 1968 Sposób sterylizacji woszczyny w towarowej upakowkie. *Pczelowodstwo* 2.
- Stoilowa E. R. 1938 Vergleichende bakteriologische Untersuchungen an einigen deutschen Stämmen des Bac. larvae des Erregers der bösartigen Faulbrut der Honigbiene. *Zentralbl. für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektion skrankheiten.* s. 124—133, Jena
- Sutter G. R., Rothenbuhler W. C., Rann E. S. 1968 Resistance to american foulbrood in honey bees VII. Growth of resistant and susceptible larvae, *J. Invertebr. Path.* vol. 12 nr 1 s. 25—28
- Szkutnik Z. 1955 Przyczynek do możliwości przenoszenia zgnilca złośliwego za pośrednictwem węzy. *Medycyna Weterynaryjna* 9, s. 536—538
- Toumanoff C., Malmache L. 1959 L'action des antibiotiques sur des souches de *Bacillus larvae* White d'origine géographique différente. *Ann. Inst. Past.* 2, s. 140—143
- Wawrzekiewicz K., Gliński Z., Kostecki R. 1966 Effect du Bioval, du Polysulfamide et de la Madroxine sur le *Bacillus larvae* in vitro. *Bulletin Apicole* — IX — nr 2, s. 141—154
- William T., Wilson 1967 *Bacillus larvae* in the intestinal tract and in the cavity of honey bees — *Apis mellifica*. Ohio St. Univ. Columbia. Papers of the XXI Intenat. Congr. „Apsimondia” Maryland s. 11—17, VIII. USA
- Zahaczewska M. 1965 Choroby pszczoł w województwie katowickim. *Pszczelarstwo* 11, s. 8—9.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ МЕТОДА БОРЬБЫ С АМЕРИКАНСКИМ ГНИЛЬЦОМ У ПЧЁЛ

Ришард Костецки

Выводы

На основании полученных результатов сделаны следующие выводы:

1. Исследования над влиянием фармакологических средств на *Bacillus larvae* in vitro показали, что полисульфамид является наиболее эффективным средством. Прочие препараты, такие как сульфатиазол, биовал и мадроксин оказались менее эффективны. Поэтому полисульфамид следует применять в лечении гнильца, взамен менее эффективного сульфатиазола натрия.

2. На территории Польши распространены штаммы *Bacillus larvae* с разной устойчивостью к сульфатиазолу (5 на 21 исследованных), которые однако оказались чувствительны к полисульфамиду.

3. В исследованиях in vitro также показана высокая эффективность полисульфамида в лечении гнильца по сравнению с сульфатиазолом.

4. Перегон пчёл на пустые соты не является эффективным средством в борьбе с гнильцом. В медовой зобике перегнанных пчёл находятся споры, которые с пищей откладываются пчёлами в пустые ячейки, являющиеся источником инфекции в улье.

5. В ряде исследований проведенных на пасеке обнаружено, что перегон лучше всего производить в пустые улья во второй половине дня. Самопроизвольная голодовка (пчёлы не покидают улья, помимо открытых летков) способствует расходованию пищи содержащей споры. Подача им на следующий день искусственной вошины принуждает пчёлы к постройке новых ячеек. В итоге в пустые ячейки откладывается лишь лекарственный сироп или свежесобраный нектар.

Таким образом проведенное мероприятие перегона полностью ликвидирует основной источник болезни.

6. В экспериментальных условиях обнаружено, что пища находящаяся в медовой зобике пчёл потребляется ими в течении 4—6 часов. В это время все споры *Bacillus larvae* переходят из зобика в дальнейшие отделы кишечного канала. Период самопроизвольной голодовки (ночные часы и шок после перегона) прододжается 15—24 часа и многократно превышает время в течении которого споры удаляются из зобика.

7. В течении августа, сентября и октября обнаруживается более 65% всех очагов инфекции ежегодно. В это время применение традиционного лечения, основанного главным образом на перегоне пчёл следует считать очень вредным для целой семьи. Развитие восковых желёз у пчёл в течении осени происходит за счет уменьшения количества жирового тела. В связи с этим необходимо мероприятия по борьбе разделить на лечение осенние и летнее.

8. Летнее лечение это главным образом перегона, снабжение искусственной вошиной и лекарственным сиропом.

В осеннем лечении не применяется перегона, но воспитание расплода (благодаря изоляции матки) или перемещение сотов, подкормка лекарственным сиропом всех улей в пасеке в лекарственных и профилактических целях.

9. Так как американский гнилец распространяется спорами, необходимо производить контрольные анализы воска предназначенного для производства искусственной вошины. Разработан метод „смывания” спор из воска хлороформом и доказано, что этот метод может найти широкое применение в практике. Обнаружено также, что экстрагированный воск не содержит спор, так как споры погибают во время продукции.

Принимая во внимание результаты проведенных исследований автор предлагает внести некоторые изменения в методах борьбы с американским гнильцом для усовершенствования лечения и его большей эффективности.

В таблице II представлено лечения американского гнильца традиционным и усовершенствованным методом.

STUDIES ON IMPROVMENT OF CONTROL OF AMERICAN FOULBROOD OF HONEY BEE

Ryszard Kostecki

Summary

Results of broad studies carried out by the author in order to improve the control of American foulbrood of honey bee (*Apis mellifera* L.) caused by *Bacillus larvae* can be summarized as follow.

1. Studies on the effect of pharmaceuticals on *Bacillus larvae* in vitro showed that Polisulfamid was the most active. Other preparations like Sulfathiazole, Bioval and Madroxin were less effective. Accordingly, Polisulfamid was recommended to replace Sulfathiazole in controlling American foulbrood.

2. Five out of 21 strains of *Bacillus larvae* isolated in Poland showed resistance of various degree against Sulfathiazole but they were susceptible to Polisulfamid.

3. In vivo tests confirmed the high efficiency of Polisulfamid in treatments against *B. larvae*.

4. Transfer of bees on empty combs immediately from diseased hives is ineffective in control of American foulbrood as in the honey stomach of the bees are spores of *B. larvae* which are placed to empty cells with surplus food. These spores are a source of infection in a new hive.

5. During broad studies it was found that transfer of bees to empty hives should be made in the afternoon. Due to independent starvation (bees do not leave hives although they are not closed) the food in the honey sac becomes ingested and therefore the spores pass to further regions of the alimentary tract of bees and do not play any role in epizootic of the foulbrood. When comb foundations are given on the following day bees build complete combs and place only freshly collected nectar or given curing syrup. The transferring of bees in this manner fully eliminate the important way of transmission of the disease.

6. During experimental studies it was found that food stored in the honey sac is utilized during 4 to 6 hours. During that time all spores of *B. larvae* pass from honey sac to further regions of the alimentary tract. Period of independent starvation of bees that are transferred during the afternoon lasts 15—24 hours (night time and shock after transfer) that is much longer than time in which spores of *B. larvae* disappear from the honey sac of bees.

7. The majority of American foulbrood cases (about 65%) is recorded in August, September and October. Application of a traditional procedure to control American foulbrood, that is mainly transfer of bees, is very harmful to bee colonies at that time. Therefore, it is necessary to recognize two separate treatments in controlling of American foulbrood: summer and autumn.

8. Summer treatments include: transfer, giving of comb foundations, and curing syrup. During autumn treatments instead of transferring of colonies, only brood rearing of (by isolation of a queen or transfer of combs) and feeding with curing syrup of all colonies therapeutically and prophylactically.

9. As spores of *B. larvae* can be transmitted in wax it is, therefore, necessary to examine the wax before it is used to produce comb foundation. Special method of extraction of spores from wax was developed using chloroform as a solvent: this method may be practically applied in production of comb foundation. No *B. larvae* spores were observed in extracted wax.

10. On the ground of the studies presented in this paper the author proposed important modifications in the procedure of controlling American foulbrood that improved treatments and made them more effective. In Table 12 there are compared procedures and treatments against American foulbrood applied in a traditional and a newly developed integrated control.