

**Latvijas Lauksaimniecības Universitāte  
Veterinārmedicīnas Fakultāte  
Kimrona Veterinārais Institūts, Izraēla**

**Latvia University of Agriculture  
Faculty of Veterinary Medicine  
Kimron Veterinary Institute, Israel**

**Boriss Jākobsons**

## **Bišu kalku Peru bioloģiskā apkarošana**

**Biological treatment of chalkbrood in honey bees**

Promocijas darba  
**KOPSAVILKUMS**  
Dr. med.vet. zinātniskā grāda iegūšanai

**SUMMARY**  
of doctoral thesis  
To obtain scientific degree of Dr. med. vet

**Jelgava, 2005**

**Promocijas darbs veikts Kimronas Veterinārajā Institutā, Izraēla.**

**Promocijas darba aizstāvēšana** notiks LLU Veterinārmedicīnas zinātņu nozares Promocijas padomes atklātā sēdē 2005. gada 19. maijā plkst 14<sup>00</sup>Jelgavā Helmaņa ielā 8, 1.auditorijā.

**Oficiālie recenzenti:**

1. Dr. habil. med. vet. profesors, Valsts Emeritētais zinātnieks **Zigmunds Brūveris**.
2. Dr. med. vet. LLU Veterinārmedicīnas fakultātes asoc. prof. **Roberts Trubka**.
3. Dr. med. vet. LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskā institūta “Sigra” vadošā pētniece **Inese Zītare**.

Ar promocijas darbu var iepazīties LLU Fundamentālajā bibliotēkā Jelgava, Lielā ielā 2.

## Table of Contents

1. Cover page .....	1
2. Table of Contents.....	3
2.1. List of publications .....	4
3. Abstract.....	6
4. Objectives of the research project.....	7
5. Scientific report.....	9
5.1. Introduction.....	9
5.2. Materials and methods .....	13
5.3. Results.....	18
5.3.1. Biological inhibition of <i>A. apis</i> .....	18
5.3.4. Characterization of <i>A. apis</i> isolated in Thailand, Germany and Israel .....	33
5.3.4.1. Enzymatic characteristics .....	33
5.3.4.2. Mating experiments .....	34
5.3.5.1. Virulence tests.....	34
5.4. Discussion.....	35
6. Conclusions.....	38

## Satura rādītājs

1. Titullapa .....	1
2. Satura radītājs .....	3
2.1. Publikāciju saraksts.....	4
3. Kopsavilkums.....	39
4. Pētniecības projekta mērķi.....	40
5. Zinatniskais ziņojums.....	40
5.1. Ievads .....	41
5.2. Materiāli un metodes .....	42
5.3. Pētījumu rezultāti .....	46
5.3.1. <i>A. apis</i> bioloģiskā nomākšana.....	46
5.3.4. Taizemē, Vācijā un Izraēlā izdalīto <i>A. apis</i> raksturojums.....	49
5.3.4.1. Fermentatīvais raksturojums .....	49
5.3.4.2. Pārošanas eksperimenti.....	50
5.3.5.1. Virulences raudze.....	50
5.4. Diskusija.....	50
6. Secināumi.....	53

## 2.1. LIST OF PUBLICATIONS

1. Yakobson B., Rosen S., Hadani A. and SternY. (1986) The occurrence and distribution of Varroasis (*Varroa jacobsoni*) in apiaries in Israel. Am. Bee J., 126(2): 120-121
2. Yakobson B. A. (1986) Varroasis - a new entity in bee diseases in Israel. Proceedings of Symposium of Veterinary Medicine Hebrew University of Jerusalem, Rehovot , 1985 Isr. J. Vet. Med. 42(1): 42
3. Yakobson B. A. and Efrat C. (1986) Current status of bee health in Israel. Proceedings of Apimondia, Symposium of Health Protection of Honey Bees, Zagreb, Yugoslavia, 142-143
4. Efrat C., Yakobson, B. A. (1986) Varroa control in commercial apiaries in Israel. Proceedings of Apimondia, Symposium of Health Protection of Honey Bees, Zagreb, Yugoslavia, 161-163
5. Yakobson B.A, D. Elad D. and Efrat C. (1987) Chalkbrood (ascospaeromycosis) in honey bees. Proceedings of the Eleventh Symposium of Veterinary Medicine, Hebrew University of Jerusalem, Rehovot. Isr. J. Vet. Med. 43(1): 89
6. Yakobson B. A., Elad D., and Efrat H. (1987) Chalkbrood (Ascospaeromycosis) in apiaries in Israel. Isr.J.Vet.Med. 43(1): 28-33
7. Yakobson B .A., Efrat H., Rozental K., Slovecky I. and Kamer, I. (1987) The efficacy of fluvalinate in Apistan strips against Varroa bee mite in honey bees in Israel Yalk. Mich, (in Hebrew), 22: 9-15
8. Yakobson B. A. and Efrat C. (1988) Recent developments in bee disease control in Israel. Proceedings of 4 International Conference on Apiculture in Tropical Climates, Cairo. 383-385
9. Efrat C., Rosental C. and Yakobson B. (1988) Introduction and improvement of bees in Israel. Proceedings of 4 International Conference on Apiculture in Tropical Climates, Cairo. 154-157
10. Yakobson B. A., Efrat, C., Needham G.R., Page R.E.J., Delfinado B.M. and Bowman, C.E. (1988) Influence of *Varroa jacobsoni* on beekeeping in Israel, and future control, Africanized honey bees and bee mites. 425
11. Yakobson B.A. Application of carbon dioxide in portable fumigation chamber to control bee wax moth. (1990) Proceedings of International Symposium on Recent Research on Bee Pathology, Gent, Belgium. 192-193
12. Yakobson B. A., Elad D., Rosental K., Kamer I., Slovecky I. and Efrat C. (1991) A recent chalkbrood outbreak in Israel: attempts at therapeutic intervention, Am. Bee J. 12:786
13. Yakobson B. A. and Rosenthal C. (1991) The status of bee pests in Israel, Proceedings of the International Symposium on Recent Research on Bee Pathology, Ghent, Belgium, 1990. 213-214.
14. Yakobson B. A., Pothichot S., and Wongsiri S. (1992) Possible transfer of *Nosema apis*. from *Apis mellifera* to *Apis cerana*. Proceedings of International Conference on the Asian Honey Bees and Bee Mites, Bangkok, Thailand. 63-64
15. Yakobson B. A., Goldner M., Visbek S. and Slovecky I. (1992) Screening of fluvalinate residues in honey and other hive products. Proceedings of International Conference on the Asian Honey Bees and Bee Mites, Bangkok, Thailand. 31
16. Yakobson B. A., Navaro S., Donahuye J., Azreli A., Slovetcky Y. and Efrat H. (1996) Control of beeswax moths using carbon dioxide in flexible and metal

- structures. International Conference on Controlled Atmospheres and Fumigation in Stored Products, Nicosia, Cyprus. 1996; 169-174
17. Dag A, Yakobson B. and Weiss S. (1996) Fumidil B treatment against nosema disease of the honey bee. Yalkut Hamichveret (in Hebrew) 36: 23-25
  18. Shkap, V., Yakobson, B., Mozes-Koch, R., Galter, F., Pipano, E. and Gerson.U. (1996) Application of a monoclonal antibody based competitive immunoenzyme assay for the detection of *Acarapis woodi* infection in honey bees in Israel. Proceedings of International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Jerusalem, Israel. 51
  19. Yakobson B. A. (1996) The monitoring of possible biological and chemical contaminants in bee products. Proceedings of International Conference on Bee Products: Properties, Application and Apitherapy, Tel-Aviv, Israel. 227- 230
  20. Slabezki Y. and Yakobson B. A. (1996) Honey bee diseases, parasites and predators in apiaries, Israel 1996. Ha-Sadeh (in Hebrew). 10: 56-58
  21. Dag A., Slabezki Y., Efrat H., Kamer Y., Yakobson B.A., Mozes-Koch R. and Gerson U. (1997) Control of honeybee tracheal mite infestations with amitraz fumigation in Israel. American Bee Journal. 137: 599-602
  22. Slabezki Y. and Yakobson B. A.(1998) Diseases, parasites and predators in apiaries in Israel. Yalkut Hamichveret (in Hebrew) 41: 32-42
  23. Yakobson B. A., Elad D., Ritter W., Sheihat N. and Tiewtrakul, S. (1999) Current status of chalkbrood treatment; Achievements in biological control. Proceedings of Apimondia '99, Congress XXXVI of International Federation of Beekeepers' Associations, Vancouver 12-17 Sept., 1999. 144
  24. Yakobson B. A. and Yakobson E. A. (1999) Strategies for chemical control of the *Varroa* mite. Acarology IX, The Ohio Biological , Columbus, Ohio, 1994. (2): 321-323
  25. Slabezki Y., Efrat H., Dag A., KamerY., Yakobson B.A., Mozes-Koch R. and Gerson U. (2000) The effect of honey bee tracheal mite infestation on colony development and honey yield of Buckfast and Italian honey bee strains in Israel. Am. Bee J. 231-234
  26. Mozes-Koch R., Slabezki Y., Efrat H., Kalev H., Yakobson B.A and Dag A. (2000) First detection in Israel of fluvalinate resistance in the varroa mite using bioassay and biochemical methods. Exp. and App. Acarology. 24:35-43
  27. Yakobson B. A., Elad D., Ritter W., Rath W. and Rimeicans J. (2003) Pathological and epidemiological study of chalkbrood disease in Israel, Germany and Thailand. Morphological days in Ceske Budejovica, Proceedings of the International Scientific Conference, Ceske Budejovica, 2003. 21-26
  28. Jakobsons B. (2004) Sēnītes *Ascospaera apis* – kaļķu peru infekcijas bioloģiska ārstēšanas metode, apstrādājot bišu saimes ar *Bacillus* sp. LVU Veterinārmedicīnas fakultāte, Starptautiskā zinātniskā konference Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna. Jelgava, 2004. g. 15. oktobrī.76-81.

### 3. ABSTRACT

*Ascospaera apis* is a fungus which causes a disease known as "chalkbrood" in the honey bee (*Apis mellifera*) larvae. The disease has a widespread incidence in Israel and other countries causing economic damage to the beekeeping industry, so the development of a method for treatment is a matter of highly practical importance. No efficacious chemical treatment for chalkbrood exists in beekeeping practice. Even if such methods were developed, problems with chemical residues in bee products might preclude the use of such substances in the commercial sector. Therefore we focused on developing a practical biological control preparation using *Bacillus* sp., such as are found naturally in beehives.

The "Biological control of chalkbrood in honey bees" scientific project was carried out in Israel, Thailand and Germany. A *Bacillus* sp. was initially isolated in Israel and used for the biological control of chalkbrood. The *in vitro* activity of the *Bacillus* sp. was found to be fungistatic, and this action was found to be related to a diffusible substance. The growth of *A. apis* strains isolated in Israel, Thailand and Germany was inhibited. The efficacy of three biological treatments with the *Bacillus* sp. was proved both in Thailand and Germany, countries widely differing in climatic conditions and beekeeping techniques.

*In vivo*, the *Bacillus* sp. was found to be harmless to the bees while significantly reducing the levels of infestation with the fungus to levels low enough to permit the restoration of the natural host-parasite balance. Positive results were obtained both by applying the *Bacillus* sp. by spray or in the feed (in a 50% sugar solution). The most effective result was obtained by the feeding treatment with *Bacillus* sp. and the results were confirmed in Israel, Thailand and Germany in repeated trials over a three year period.

By comparing the results of the epidemiological surveys in Thailand and Israel and the data obtained in Germany, significant differences in the severity and as well as seasonal variations of chalkbrood were observed. In Israel, chalkbrood was considered by the beekeepers to be the most important brood disease. In Germany levels of chalkbrood infection were generally low (1-15%) probably due to the favourable climatic conditions and nectar availability. In Thailand a high variability in infection rates with *A. apis* in the examined colonies in different seasons was observed, even in small areas ( $30\text{ m}^2$ ). The highest infection rates were observed in the hot and humid months between June and October.

Resistance to most bee diseases in Israel (with the exception of chalkbrood and *Acarapis woodi* infestation) was found to increase in F1 generations resulting from queens imported to Israel from Australia and New Zealand.

The comparison between *A. apis* strains isolated from Israel, Thailand and Germany indicated that, although several differences exist in their enzymatic activity and growth rate, sexual stages were produced by suitable mating types of all strains. Zymograms showed a variability between strains. The variability was, however, more pronounced between strains originating in different countries than the one observed between strains from the same region.

Virulence tests on *A. apis* indicated the Thai strain to be significantly more virulent than the South German strains but it differed less when compared to the virulence of the Israeli and North German strains. Marked differences were observed between North and South German strains.

Nosematosis protozoa disease in *Apis mellifera* and *Apis cerana* bees in Thailand was diagnosed within this project. Our survey indicates the possibility of a correlation

between chalkbrood and nosematosis, whereby colonies affected by nosematosis might become more susceptible to chalkbrood. Our observations indicated that certain chemotherapeutic drugs also increase bee susceptibility towards chalkbrood. Treatment of larvae of *Apis mellifera* with oxytetracycline *in vitro* enhanced their susceptibility to an experimental infection with *A. apis*. Virological examinations showed the existence of a correlation between viral bee diseases and chalkbrood. This correlation was proved for Acute Paralysis Virus and Sacbrood Virus. A phenomenon of natural resistance of *A. mellifera* towards chalkbrood was observed by cross infection of bee colonies with different genotypes.

It was shown that actively growing *A. apis* hyphae are able to invade larvae percutaneously. When nurse bees were fed on chalkbrood mummies, this material appeared to be more infective than the *A. apis* spores cultivated in laboratory.

#### **4. OBJECTIVES OF THE RESEARCH PROJECT**

1. To develop a biological control preparation for the treatment of chalkbrood.
2. To isolate bacteria from bee larvae, that have inhibitory activity on *A. apis* and to identify isolates with the most potent activity.
3. To control *A. apis* by treating hives with the above-mentioned bacteria.
4. To study any interaction between *A. apis* and other bee pathogens (viruses and protozoa).
5. To compare the virulence to bees and susceptibility to the bacteria of *A. apis* strains isolated in Israel, Germany and Thailand.

##### **4.1. Evaluation of research achievements**

The principal objective of the research work was to attempt the biological control of chalkbrood. Additional objectives were the study of the epidemiology of bee diseases in the 3 countries involved and to examine various aspects of the host-parasite interaction between *A. apis* and the honey bee.

All these objectives were achieved during the research period. Our success in limiting *A. apis* infestation in hives by means of biological control with a *Bacillus* sp. is likely to provide a practical method to control the disease. The use of this microorganism is likely to be particularly suitable for use in Third World countries with limited cooling facilities, due to its ability to form spores. In addition, the cultivation of the *Bacillus* sp. is straightforward and requires neither sophisticated equipment nor highly trained personnel. Preparation and transport of the microorganism should pose no problems. The biological control of chalkbrood found in this work bodes well for its use in the development of organic farming.

The epidemiological information gathered in the 3 countries as well as the information regarding the host-parasite relation between the bees and *A. apis* is likely to contribute to the development of appropriate and rational treatment protocols, minimizing expenses and maximizing results. This is especially important considering the seasonal variations and the importance of environmental factors found in this study to predispose bees to chalkbrood.

The evidence here found of natural genetic resistance of bees to chalkbrood indicates that selection of suitable material may limit the spread and the economical damage caused by chalkbrood.

The biological control preparation containing the *Bacillus* sp. is now at the stage of development for large-scale manufacturing protocol.

#### **4.2. Evaluation of results**

Differences between treated and untreated hives were statistically analyzed by the chi<sup>2</sup> test.

#### **4.3. Practical importance of the research**

The problem of *A. apis* infestation in honeybee colonies is of the utmost practical and economic importance in many countries. The work showed that:

1. High percentages of beehive mortality have been observed due to chalkbrood infection.
2. Excessive treatment with antibiotics increases susceptibility of bee larvae to *A. apis* and therefore must be reduced.
3. Attempts of chemical control did not give the expected results.
4. The risks of drug residues in honey, wax and other honeybee products make the research involving possibilities of biological control important and realistic.
5. There is a potential for selection of honeybees to be more tolerant to chalkbrood.

#### **4.4. Approbation of the research results**

The research has been conducted in the Pathology Department of Kimron Veterinary Institute, Israel in the framework of a scientific project supported by a German-Israel Agricultural Research Agreement for the Benefit of Developing Countries (GIARA, Project No.: 93-4) during the years 1993-1997.

The progress of the work and the results has been presented on a regular basis in the scientific conferences of the Koret School of Veterinary Medicine, Hebrew University of Jerusalem.

During the research period several project-exclusive symposia were conducted in Israel and international workshops were organized in Thailand, Germany to present and discuss the results (Workshop on Bee Diseases and Research Progress of GIARA Project, 1995; Annual Beekeeping Symposium on Chalkbrood, Bet Dagan, 1997; Annual Beekeeping Symposium on Chalkbrood conrol, Rupin, 1999). The results were published in an article in the Israeli Journal of Veterinary Medicine, American Bee Journal 1991, 1997, 2000; Eksperimental And Applyied Acarology 2000 and presented at international conferences in Belgium, Canada, Cyprus, Chech Republic, Egypt, USA, Thailand, Yugoslavia, and Latvia with publication in the proceedings.

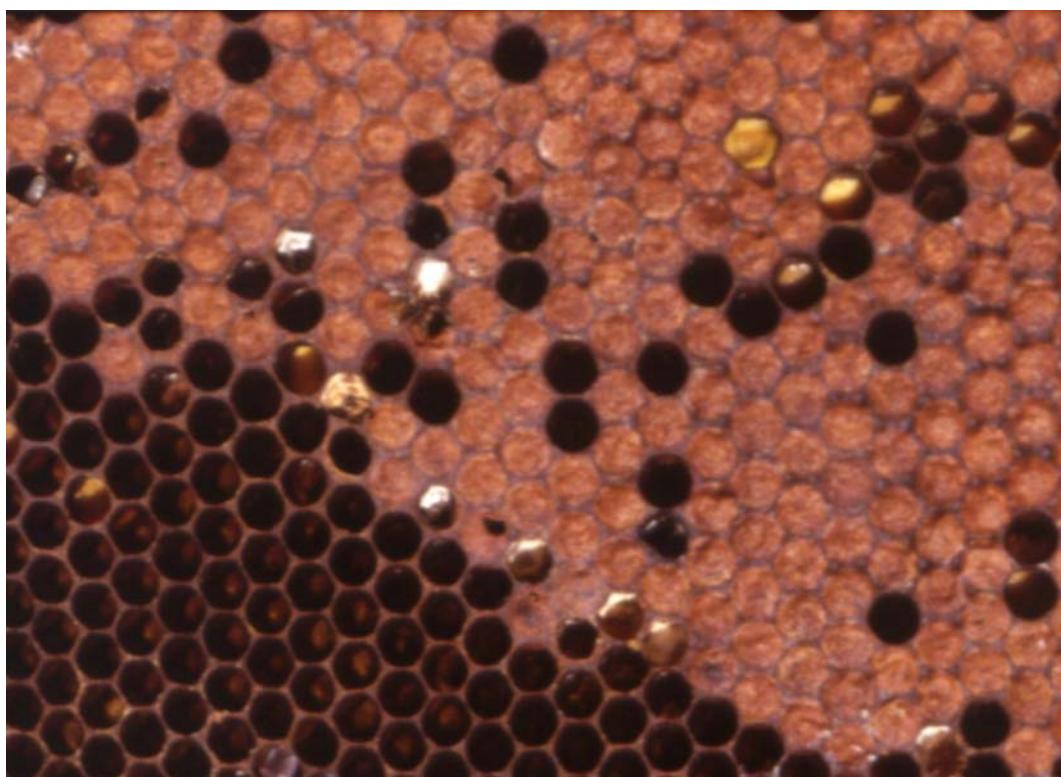
From 1988 –2000 the author taught the honeybee pathology course in the Koret School of Veterinary Medicine of the Hebrew University of Jerusalem and he was a scientific adviser of an MSc student. In addition the results were presented during three International Courses on Beekeeping and Honeybee Pathology in Latvia, Vietnam and the Kyrgyz Republic.

This activity in honeybee pathology resulted in 28 journal publications and presentations published in the proceedings.

## 5. SCIENTIFIC REPORT

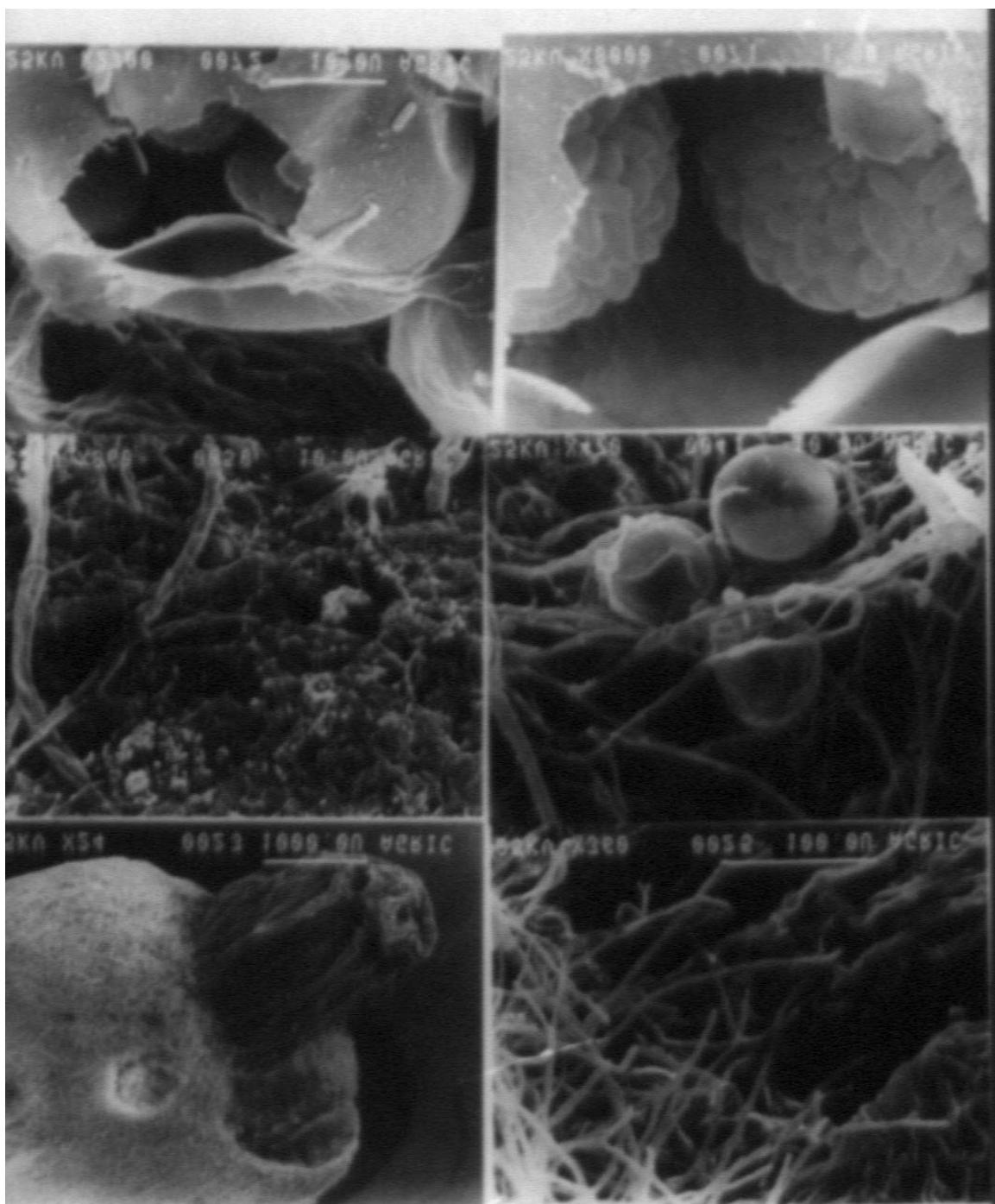
### 5.1. Introduction

*A. apis* is a fungus which causes a disease known as "chalkbrood" in the honey bee (*Apis mellifera*). The spores of the fungus are the infectious stage of the microorganism. Infection of the larva results mainly by ingestion of spores but can also occur by the growth of the fungus through the cuticle. The larvae are most susceptible to infection by the fungus when they are 3 to 4 days old (Illustration 1).



Ill. 1. Chalkbrood infested mummies in comb  
1 att. Ar kaļķu periem inficēts rāmītis

The spores usually germinate in the hind gut. After the cells are capped, mycelia from the spores develop in the hind gut of the larva or prepupae and eventually engulf the whole bee (Illustration 2).



III. 2. Electron-microscopy of an *A. apis* infected larva (bottom left), the fungus' hyphae (bottom right) and fruiting bodies

2. att. Ar *A. apis* inficēta pera elektronogrammas fotografāfija (pa kreisi apakšā sēnīšu micēlijs; pa labi augšā sporu lodītes (auglķermeņi)

The dead bee first becomes covered with a fluffy white growth of mycelium. Later the mummified larva dries, becomes hard, shrunken and chalklike (Illustration 3).



Ill. 3. Drone and worker brood larvae infected by *A. apis*: sexual (black) and asexual stages (white)

3. att. Ar *A. apis* inficēti tranu un darba bišu peri (melna – sporu dzimumvairošanās stadija, balta – micēlija bezdzimumvairošanās stadija)

These mummies remain white or turn grey to black in color. The whitish mummies indicate that the larva have been infected by only one sexual type of the fungus, whereas the colored mummies indicate invasion by both sexual types. The dark color is caused by the spore producing (fruiting) bodies that result from the two mating types (Illustration 4).



Ill. 4. Mating of *A. apis*: Sexual fruiting bodies (black areas) formed between different but not between equal mating types

4. att. *A. apis* dzimumvairošanās stadija: sporu lodītes veidošanās (melnā zona)

Bees detect the dead larvae under the cupping and chew small pink holes in it. These holes are commonly the first clinical sign of infection with *A. apis*. Later bees remove the cuppings and the dead larvae from the cells. The mummies are usually removed from the cells in less than ten days (Illustration 5), although the colonies seem to vary in their ability to detect and remove mummies. A genetic factor which influences the hygienic behaviour of bees has been suggested.



III. 5. Chalkbrood infested mummies, removed by bees, at the entrance to the colony  
5. att. Ar kaļķu periem inficētā stropa skrejā izmestās mūmijas

Studies indicate that many factors are involved in the infection, maintenance and spread of the chalkbrood disease. These factors include spore contaminated pollen, genetic patrimony of the queens, cool and moist environment, drifting of bees from infected colonies, spore levels in combs of previously infected colonies and a spore contaminated food source such as water, nectar and honey. An upset microbial equilibrium, cause by extensive use of antibacterials has been suspected to be a predisposing factor as well.

Chalkbrood appears to be a stress-related disease as infections have been noted when one or more of following conditions exist: excessive hive moisture, cool and wet weather, poor foraging conditions, weak colonies, poor management or as a condition secondary to other bee diseases such as sacbrood and nosema.

Spores of *A. apis* are resistant to environmental conditions and endure in the infected hives for as long as 15 years.

The economic impact of chalkbrood to the beekeeping industry in the world has been increasing in recent years. Nevertheless, although well investigated, there is still, to the best of our knowledge, no efficient agent for the control of *A. apis*. The only means of control today is an improvement of management, including destruction of combs containing a large number of mummies, strengthening of badly-diseased colonies by adding bees and brood, and requeening by stock that is less susceptible and has better cleaning behavior for removing diseased brood. Furthermore, transfer of combs from infected to uninfected colonies should be avoided as should be the use of contaminated pollen.

An increase in the incidence of chalkbrood has been reported from Canada and the USA. In Thailand the steep increase in the incidence of chalkbrood, noted in recent years affects mainly the production of royal jelly. In Israel the first case of chalkbrood was reported in 1984. While no significant change in the low incidence of chalkbrood was noted until 1989, today practically every apiary is affected to some level by *A. apis*, some with 50% of the hives showing clinical signs of the disease. The decline of honey production in 1991 was estimated to be about 10% - 15%. In Germany chalkbrood is becoming more and more a problem. Although losses of colonies are quite low at the present time, the nature of the disease process shows an increasing virulence.

In spite of having a large distribution around the world, differences and similarities between *A. apis* isolated in various countries have only rarely been studied.

Strains from Thailand, Israel and Germany have not been, to the best of our knowledge, compared as to their interfertility, morphology and biochemical characteristics.

Microorganisms, including bacteria and fungi, having an *in vitro* inhibitory activity on *A. apis* have been investigated. *In vivo* experimentation with fungal antagonist is presently being conducted in France (Gilliam, M. 1990). Similar experiments with bacteria or their metabolites have not been made so far. We have isolated a *Bacillus* sp. which was able to inhibit *A. apis* growth *in vitro*, but lost this capacity after several passages. This change in the characteristics of the isolate might be due to the fact that the inhibitory factor(s) are plasmid dependent. The isolation of this *Bacillus* sp. as well as results obtained by other researchers with similar bacteria and moulds., makes investigation of the possibility of biological control of chalkbrood promising. If successful, this research could lead to the isolation of a microorganism and/or its metabolite which could be spread in the hive or be incorporated into the bees' food and lead to the reduction of infection by *A. apis*.

Several factors, such as (temperature changes, elevated moisture) seem to be predisposing to chalkbrood. The importance of other bee pathogens such as *Nosema apis* and viruses is however not clear. Hence there is great importance in investigating the connection between these microorganisms and *A. apis*.

## 5.2. MATERIALS AND METHODS

### 5.2.1. Biological inhibition of *A. apis*

#### 5.2.1.1. *In vitro*

##### 5.2.1.1.1. Screening of apiaries for bacteria with inhibitory activity on *A. apis*

Twenty apiaries located in different parts of Israel were inspected to identify infected beehives to be included in the research. Hives with various levels of infection were chosen. Seven apiaries were chosen because clinically infected and uninfected hives were found in them. Healthy L3 to L5 instar larvae, from 5 clinically uninfected and 5 infected hives, were sampled from each apiary. Twenty larvae from each hive were submitted for laboratory examination. A total of 1400 larvae representing 35 uninfected and 35 infected hives were examined. *A. apis* infection was ascertained by mycological methods.

Larvae with no clinical signs of *A. apis* infection were examined bacteriologically to isolate bacteria to be evaluated as inhibitors of the fungus' growth. The larvae were immersed in 70% alcohol for 1 minute and air-dried. Each larva was crushed and inoculated onto nutrient agar, blood agar, McConkey agar and Sabouraud dextrose agar (SDA). The agar plates (except for the SDA plate) were then incubated at 37°C for 48 hours. The SDA plate was incubated for 7 days at 28°C. All the cultures were examined daily. Bacteria isolated from the larvae were cultured on nutrient agar and kept for further examinations at 4°C.

##### 5.2.1.1.2. Inhibitory activity

The activity of the bacterium was assessed on six Israeli, 1 Thai and 3 German strains of *A. apis* isolated from various honey bee (*Apis mellifera*) apiaries and 1 strain isolated in Israel from a bumble bee (*Bombus terrestris*). Asexual and sexual (sporulating) stages of the fungi were examined.

To assess the strains' mode of action, whether by direct contact with the fungus or by diffusion of metabolites, the two isolates were evenly distributed with a sterile cotton swab on SDA. The plates were then incubated at 28°C for 7 days following which the

agar was inverted into another sterile Petri dish, exposing the uninoculated surface. This surface was sterilized by UV irradiation in a Biohazard Laminar Flow Unit for 20 minutes. Subsequently, a square measuring 0.5x0.5 cm. of a culture of *A. apis* was deposited onto the exposed surface. Similarly treated SDA plates, not inoculated with the bacteria served as controls.

To examine whether the bacterial isolates' action upon *A. apis* was mycostatic or mycocidal, the fungus was exposed to the bacteria as described in paragraph 6.2.1.1.1. for 3, 5 or 7 days. Subsequently the *A. apis* isolates were transferred to SDA plates, incubated at 28°C and examined daily for fungal growth.

In addition to the experiments described above, the direct activity of the bacterium upon the fungus in the presence of the larva (possible inactivation of the inhibitory activity by the decomposing larva) was assessed. Larvae sampled in 6 Israeli apiaries, infected with the sexual stage (black) or asexual stage (white) of the fungus were divided in two parts. One part was deposited on the inverted SDA plates, prepared as described above, whereas the other part was deposited on a normal SDA plate.

Two bacterial isolates showing the strongest antimycotic activity were chosen for further investigation. To avoid eventual changes in the original antimycotic activity of the isolates (such as plasmid loss) the strains were lyophilized.

Fourteen *Bacillus* sp. strains isolated in Thailand showed anti-*A. apis* activity. The strain most active in his inhibitory activity on *A. apis* was chosen for further investigations. The *in vitro* inhibitory activity of this strain and the Israeli isolate against 4 Israeli and 4 Thai isolates of *A. apis* was assessed.

### **5.2.1.1.3. Characterization of the bacterium**

One Israeli *Bacillus* sp. and one Thai isolate were analyzed by gas chromatography on a MIDI System at the Plant Protection Division of the Ministry of Agriculture. Only the Israeli isolate could be identified (at an intermediate level of probability – see results) and consequently, further identification was attempted only for this isolate. Further attempts to identify the species of the isolate were made by the API (bioMerieux, France) 50 CHB<sup>77</sup> system and the Biolog (Biolog, Inc. Hayward, CA, USA)<sup>23</sup>.

Due to the possibility that the bacteriocins produced by the *Bacillus* sp. isolate are plasmid determined, the Israeli strain was examined for the presence of extrachromosomal genetic material by the method described by Birnboim & Doly<sup>20</sup>. The susceptibility of the *Bacillus* sp. isolate was assessed by a standard method (NCCLS).

### **5.2.1.2. In-vivo. Assessment of the anti-*A. apis* activity of the Israeli isolate of *Bacillus* sp. in honey bee colonies**

#### **5.2.1.2.1. Healthy bee larvae**

In the first experiment, serial dilutions of bacteria ranging up to 10<sup>5</sup>CFU suspended in 20µl distilled water (5\*10<sup>6</sup>CFU/ml) were applied by micropipetor to 150 cells of 3-4 days old living larvae. Untreated cells and cells to which distilled water was applied were used as negative controls. The cells were mapped on celluloid foils and the larvae were examined once every two days.

#### **5.2.1.2.1.2. Spray treatment of *A. apis* infected hives**

Nine hives, naturally infected with *A. apis*, located in the Kimron Veterinary Institute (KVI) were divided in 2 groups: 5 hives were treated and 4 hives served as controls. Lyophilized *Bacillus* sp. where rehydrated and their vitality assessed by colony counts. Consequently, the bacteria were suspended in 50 ml. water to a final dilution of

$4 \times 10^4$  colony forming units (CFU)/ml. This suspension was sprayed on the combs with brood and bees of each hive. Control hives were sprayed with an equal amount of water. Colonies were sprayed on days 1, 7, 14 and 21 of the experiment.

#### 5.2.1.2.1.3. Oral treatment of *A. apis* infected hives

This experiment was conducted between May and June 1996 (Series 1). Fourteen hives, naturally infected with *A. apis*, located in the Kimron Veterinary Institute (KVI) were divided in 2 groups: 7 hives were treated and 7 hives served as controls. Lyophilized *Bacillus* sp. were rehydrated and suspended in 1000 ml. of a 60% commercial sugar solution, to a final dilution of  $4 \times 10^4$  CFU/ml. In addition to the vitality counts described in the previous paragraph, colony counts in the 60% sugar solution were performed to assess the capability of the *Bacillus* sp. to survive in the suspension. The suspension was contained in sealed plastic bags, with 25 perforations made with an 18-gauge syringe needle. The plastic bags were placed on the top of the combs, under the roof. Colonies were fed with these solutions on days 1, 7, 14 and 21 of the experiment. Control hives were given an equal amount of the sugar solution alone.

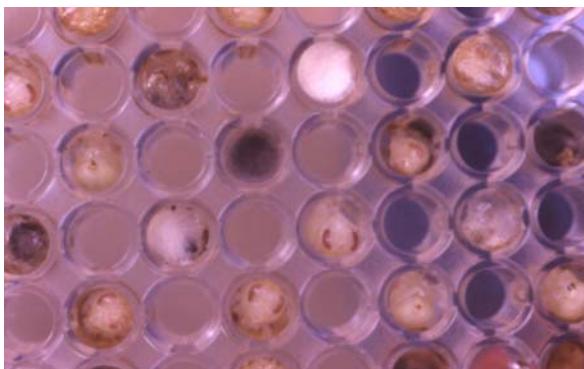
This experiment was repeated in 1997 (Series 2). Hives were treated 4 times with an interval of 10 days between treatments. The hives were examined at time 0 and 3, 6 and 7 weeks after the first treatment. In addition to the parameters assessed in Series 1, we examined the population of the colonies by counting populated combs, and the number of infected frames.

#### 5.2.1.2.1.4. Evaluation of results

The colonies were examined clinically and the total number of mummies per hive was counted before the first treatment, on day 21, 42 and 63. In addition to the clinical examination, 50 larvae chosen randomly were transferred to ELISA plates (Illustration 6), incubated at 35°C until pupation. Brood that developed to the pupal stages was considered healthy, whereas *A. apis* infection was recognized by the appearance of mycelia on the prepupal body (Illustration 7). Differences between treated and untreated hives were statistically analyzed by the chi<sup>2</sup> test.



Ill. 6. ELISA plates with healthy larvae  
6. att. ELISA plates ar veseliem periem



Ill. 7. ELISA plates with chalkbrood infested larvae (white wells)

7. att. ELISA plates ar kaļķu Peru inficētiem periem (baltās bedrītes)

#### 5.2.4. Characterization of *A. apis* isolated in Thailand, Germany and Israel

##### 5.2.4.1. Enzymatic characterization

The rate of growth and the behavior of growing of *A. apis* stains from the different countries (2 strains from Germany and 1 strain each from Israel and Thailand) were examined.

Male and female myceliae of the different *A. apis* strains were separately grown and bred. The biochemical characteristics of the isolated was assessed by examining the presence and titer of the following 18 different enzymes with the API ZYM (Bio Merieux, France) alkaline phosphatase kit:

- |                          |                                       |
|--------------------------|---------------------------------------|
| 1. esterase (C 4)        | 10. naphthol-AS-BI-phosphohydrolase   |
| 2. esterase lipase (C 8) | 11. galactosidase                     |
| 3. lipase (C 14)         | 12. $\beta$ galactosidase             |
| 4. leucine arylamidase   | 13. $\beta$ glucuronidase             |
| 5. valine arylamidase    | 14. $\alpha$ glucosidase              |
| 6. cystine arylamidase   | 15. $\beta$ glucosidase               |
| 7. trypsin               | 16. N-acetyl- $\beta$ -lucosaminidase |
| 8. chymotrypsin          | 17. $\alpha$ mannosidase              |
| 9. acid phosphatase      | 18. $\alpha$ fucosidase               |

The examination was performed on individual sexes as well as mated mycelium.

Three isoenzymes were examined: esterase, leucine arylamidase and alkaline phosphatase. This was done by separating the proteins in 10% native acryl- amid-gel and staining them afterwards. However, only a few protein bands could be made visible. Thus, for a better separation of the proteins, isoelectric-focussing was applied.

The results of the APIZYM enzyme test showed that the APIZYM method is suitable to screen test materials regarding different enzymes. The different *A. apis* strains were also characterized by means of zymogrammes received by isoelectric focusing.

The isoenzyme characteristics of *A. apis* strains were specified by means of zymograms obtained by isoelectric focusing (IEF). Mycelia and spores of all fungus strains were harvested and homogenized. Solid particles were eliminated from the homogenate by cooled centrifugation of 10000g. After determining the protein concentration, protein solutions from different isolates were put on ampholine focusing gels with a focusing range of pH 4.0 to 6.5. Focusing lasted three hours and than individual enzymes were indentified from specific color reactions. Preliminary tests

showed that only the examination of the esterases was suitable to differentiate between starins by producing different band patterns.

#### **5.2.4.2. Mating experiments**

*A. apis* is a fungus which has a sexual stage. Therefore, hybridization capacity can be tested in order to verify if the *A. apis* strains from different origins are sexually compatible.

The unmated mycelia of 12 originally different strains were separately cultured and identified by means of an unmated minus test strain. The mycelia of different sexes were classified as mating type + and mating type -. The mating capacity was tested in Petri dishes. The mating type was determined on the basis of development of ascocarps.

#### **5.2.4.3. Virulence tests**

Bee larvae were infected with the various fungal strains. The larvae were cultivated in an incubator according to the method of Rembold (Rembold et. al. J.Insect. Physiol. 20:307-314). The larvae were transferred from the combs to the artificial cells at the L2 instar to L3 instar stage. The larvae were fed and their growth was controlled in regular intervals. At the L3 instar to L4 instar stage the larvae were fed with a diet contaminated with a defined amount of *A. apis* spores. Five concentrations of spores, from 10 to  $10^5$  per ml feeding solution were administered. After pupation, the brood was controlled periodically to assess whether it developed normally or was mummified. From these observations the lethal dose ( $LD_{50}$ ) was calculated.

#### **5.2.4.4. Population dynamics**

Thirty chalkbrood-infected colonies, located in 3 beeyards were included in the survey. For this purpose the estimation method developed at Liebefeld (Switzerland) was applied. This method, which is based on calculating the number of bees on each single comb and the measurement of sealed and unsealed brood areas, is rather complex but yields the most accurate values. The estimation is done 4 times a year.

### **5.2.5. Host-parasite relations between *Apis mellifera* and *A. apis***

#### **5.2.5.1. Effect of tetracycline treatment on the susceptibility of *Apis mellifera* to infection by *A. apis***

Four groups of L4 instar larvae were treated as follows:

- a)  $5 \times 10^5$  spores of *A. apis* suspended in a solution of 1% glucose and 1% yeast extract in distilled water.
- b) 0.005% oxytetracycline (OT) was added to the diet described for group a).
- c) Solution of 1% glucose and 1% yeast extract in distilled water.
- d) Solution of 1% glucose and 1% yeast extract in distilled water with 0.005% OT.

A fifth group served as untreated control and was fed normally with no additives.

Each larva was fed with 10 $\mu$ l suspension. Before and after the feeding, the larvae were kept at 33°C in 80% relative humidity (RH) to ensure that they cleared the food previously present in their cell and would ingest a major amount of the food administered before being returned to the center of the nursing colony. Consequently the cells were observed for 3 days after waxcapping. At the development stage of white eyed pupae the brood was considered as not affected by chalkbrood. Four successive repetitions of the experiment were performed.

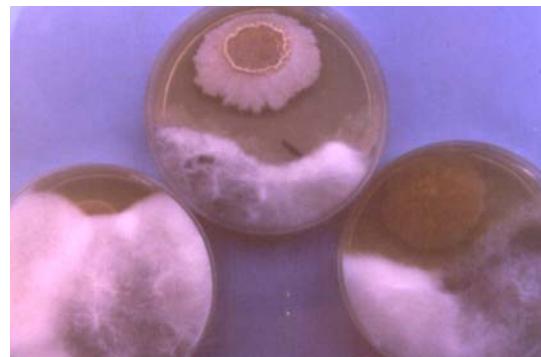
## 5.3. RESULTS

### 5.3.1. Biological inhibition of *A. apis*

#### 5.3.1.1. *In vitro*

##### 5.3.1.1.1. Screening of apiaries for bacteria with inhibitory activity on *A. apis*

Several bacterial strains isolated from healthy bee larvae in Israel and Thailand showed inhibitory activity *in vitro* on the growth of *A. apis*. The most active strains were chosen for the *in vivo* experiments (Illustration 8).



Ill. 8. Various inhibitory activity levels of different *Bacillus* sp. isolates. The topmost strain was used throughout the experiments

8. att. Dažādu *Bacillus* sp. kultūru atšķirīgais nomācošas iedarbības aktivitātes līmenis.  
Augšējais celms tika izmantots eksperimentos

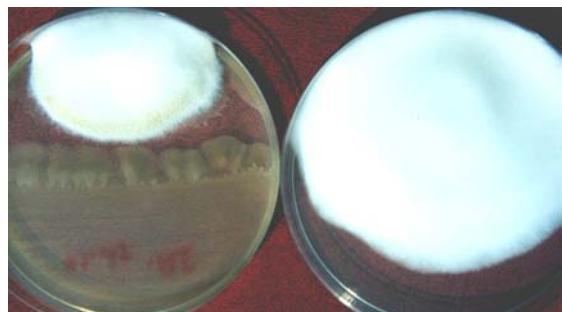
##### 5.3.1.1.2. Assessment of the *in vitro* activity of the isolates

Growth of *A. apis* on the test plates was totally inhibited whereas normal fungal growth was observed on the control plates (Illustration 9-12). Fungal growth was inhibited by a diffusible metabolite of the *Bacillus* sp. (Illustration 13-14). All the isolates of *A. apis* grew normally after transfer to SDA plates which have not been exposed to the bacterium. Inhibition of fungal growth by the *Bacillus* sp. was not influenced by the presence of decomposing larvae.



Ill. 9. Left: direct inhibitory activity of the *Bacillus* sp. Day 5, right - control

9. att. Pa kreisi: *Bacillus* sp. tiešā nomācošā iedarbība pēc 5 dienām; pa labi – kontrole



Ill.10. Left: direct inhibitory activity of the *Bacillus* sp. Day 6.

Note: onset of degenerative process of *A. apis* hyphae in vicinity of the *Bacillus* sp.; right - control

10. att.: Pa kreisi: *Bacillus* sp. tieša nomācoša iedarbība pēc 6 dienām; *A. apis* degenerācija; pa labi – kontrole



Ill.11. Left: direct inhibitory activity of the *Bacillus* sp. Day 7.

Note: advance of the degenerative process of *A. apis* hyphae in vicinity of the *Bacillus* sp.; right – control

11. att. Pa kreisi: *Bacillus* sp. tieša nomācoša iedarbība pēc 7 dienām; *A. apis* degenerācijas progress; pa labi – kontrole



Ill.12. Left: direct inhibitory activity of the *Bacillus* sp. Day 8.

Note: destruction of *A. apis* hyphae; right - control

12. att. Pa kreisi: *Bacillus* sp. nomācoša iedarbība pēc 8 dienām; *A. apis* pilnīga sabrukšana; pa labi – kontrole



Ill.13. Right: indirect inhibition by the *Bacillus* sp. Day 1. Right: plate with inverted medium. Note: layer of the *Bacillus* sp. on the bottom side of medium; left - control

13. att. Pa labi: *Bacillus* sp. netieša nomācošā iedarbība 1. dienā; *Bacillus* sp. slānis atrodas barotnes apakšpusē; pa kreisi – kontrole



III.14. Right: indirect inhibition by the *Bacillus* sp. Day 7. No fungal growth on plate with the *Bacillus* sp. cultured on the bottom side of the medium; left - control  
14. att. Pa labi: *Bacillus* sp. netieša nomācoša iedarbība pēc 7 dienām. *Bacillus* sp. slānis atrodas barotnes apakšpusē. *A. apis* augšanu nenovēro; pa kreisi – kontrole

### 5.3.1.1.3. Characterization of the bacterium

MIDI system: The Israeli isolate had characteristics similar to *Bacillus amyloliquefaciens*, whereas the Thai isolate could not be significantly related to any of the bacteria included in the system's database although *B. amyloliquefaciens* was the most likely identification. A similarity index higher than 0.5 is considered as a positive identification. The index for the Israel isolate was 0.457 and for the Thai strain 0.156.

BIOLOG system: Only the Israeli isolate was submitted. The strain could not be identified, although *B. amyloliquefaciens* was the most likely identification (0.326).

API 50 CHB system: The isolate was identified after 48 hours incubation at a “Very good identification” level (%ID=99%, T=0.71) as *B. licheniformis*. The only test against was the Urease test, which was positive but should be so in only 3% of *B. licheniformis* strains.

No indication of the presence of plamids was found.

The isolate was found to be susceptible to penicillin, ampicillin, cephalothin, amoxicillin/clavulanic acid, sulphonamides with and without trimethoprim, tetracyclines, ciprofloxacin, gentamicin and streptomycin. The isolate was resistant to cefotaxime.

Both the Israeli and the Thai *Bacillus* sp. isolates inhibited all the *A. apis* strains independently of the fungus' country of origin.

### 5.3.1.2. In-vivo: Assessment of the anti-*A. apis* activity of the Israeli isolate of *Bacillus* sp. in honey bee colonies

#### 5.3.1.2.1. Israel

##### 5.3.1.2.1.1. Healthy bee larvae

No differences between the test and the control groups were observed. The results of this experiment were confirmed by repeating it twice using the highest concentration of the *Bacillus* sp. suspension. The results are presented in Table 1.

**Table 1**  
**1.tabula**

**Assessment of the effect of the *Bacillus* sp. isolate upon healthy bee larvae**  
***Bacillus* sp. ietekmes novērtējums uz veseliem bišu periem**

<b>Group</b> <b>Grupa</b>	<b>Number</b> <b>Skaits</b>	<b>Alive day 2</b> <b>2. dzīves diena</b>	<b>Alive day 4</b> <b>4. dzīves diena</b>	<b>Alive day 10</b> <b>10. dzīves diena</b>
<b>Experiment 1 . eksperiments</b>				
<b>Control</b>	150	143	142	138
<b>H<sub>2</sub>O</b>	150	140	138	137
<b>10 CFU*</b>	150	135	134	131
<b>10<sup>3</sup> CFU</b>	150	134	134	134
<b>10<sup>5</sup> CFU</b>	150	131	129	127
<b>Experiment 2 . eksperiments</b>				
<b>Control</b>	100	93	93	92
<b>H<sub>2</sub>O</b>	100	86	86	84
<b>10<sup>5</sup> CFU</b>	164	134	134	133
<b>Experiment 3 . eksperiments</b>				
<b>Control</b>	100	100	100	100
<b>H<sub>2</sub>O</b>	100	52	50	49
<b>10<sup>5</sup> CFU*</b>	116	100	100	100

\*CFU – kolonijas veidojošās vienības

#### **5.3.1.2.1.2. Spray treatment of *A. apis* infected hives**

The results of the clinical examination and mummy count indicate a decrease of the infection level in the treated hives while no change was observed in the control hives (Table 2 & Figure 1): while pretreatment count averages showed a similar infection level in the 2 groups, at the end of the experiment (9 weeks) the average of the treated groups decreased and was only 41.4% of the control group. Interestingly, after 4 weeks, a temporary decrease in infection levels of both groups was observed (Table 2 & Figure 1). This might be the result of cleaning behavior stimulation by the spraying.

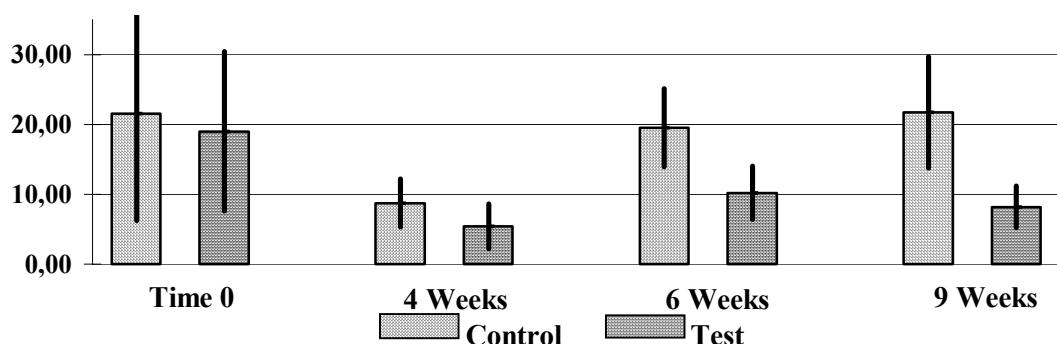
**Table 2**  
**2. tabula**

**Spray treatment with *Bacillus* sp. of honey bee colonies naturally infected with  
*Ascospheara apis*. Count of infected mummies/colony**

**Ar *A. apis* dabīgi inficētu bišu koloniju apsmidzināšana ar *Bacillus* sp.**

**Inficēto mūmiju skaits saimē**

<b>Control group / Kontroles grupa</b>				
Hive no. Stropa nr.	Time 0 Sākums	4 Weeks Pēc 4 nedēļām	6 Weeks Pēc 6 nedēļām	9 Weeks Pēc 9 nedēļām
1	15	9	14	13
2	10	4	17	19
3	17	10	20	23
4	44	12	27	32
<b>Average Vidēji</b>	21.5	8.75	19.5	21.75
<b>S.D. S.N</b>	15.29	3.40	5.57	7.97
<b>Treated group / Skartā grupa</b>				
Hive no. Stropa nr.	Time 0 Sākums	4 Weeks Pēc 4 nedēļām	6 Weeks Pēc 6 nedēļām	9 Weeks Pēc 9 nedēļām
1	12	3	6	5
2	10	2	10	10
3	14	5	7	5
4	21	7	13	11
5	38	10	15	10
<b>Average Vidēji</b>	20.75	6	11.25	9
<b>S.D. S.N.</b>	11.40	3.21	3.83	2.95



**Fig.1: Spray treatment with *Bacillus* sp. of honey bee colonies naturally infected with *A. apis*. Count of infected mummies/colony**

**1. grafiks: Ar *A. apis* dabīgi inficētu bišu koloniju apsmidzināšana ar *Bacillus* sp.;  
inficēto mūmiju skaits saimē**

The results of the ELISA plate counts support the clinical findings that while the infection levels decreased in the treated group, they increased in the control group (Table 3 & Figure 2). The differences observed at 4, 6 and 9 weeks were statistically significant.

The statistical significance increased with time (Table 3), indicating that the efficacy of the treatment does not decrease for at least 5 weeks after the last administration of the *Bacillus* sp.

**Table 3**  
**3. tabula**

**Spray treatment with *Bacillus* sp. of honey bee colonies naturally infected with  
*Ascospaera apis*. Count of infected mummies/larvae (ELISA plates)  
Ar *A. apis* dabīgi inficētu bišu koloniju apsmidzināšana ar *Bacillus* sp.**

**Inficēto mūmiju skaits peros (ELISA plates)**

<b>Control group / Kontroles grupa</b>				
<b>Hive no. Stropas nr.</b>	<b>Time 0 Sākums</b>	<b>4 Weeks Pēc 4 nedēļām</b>	<b>6 Weeks Pēc 6 nedēļām</b>	<b>9 Weeks Pēc 9 nedēļām</b>
1	6/ 50 (12.0%)	7/ 49 (14.3%)	8/ 46 (17.4%)	7/ 45 (15.5%)
2	14/ 50 (28.0%)	16/ 50 (32.0%)	13/ 50 (26.0%)	14/ 48 (29.1%)
3	17/ 48 (35.4%)	15/ 50 (30.0%)	14/ 49 (28.6%)	16/ 50 (32.0%)
4	12/ 46 (26.0%)	9/ 48 (18.8%)	11/ 50 (22.0%)	13/ 49 (26.5%)
<b>Total Kopā</b>	<b>49/194 (25.4%)</b>	<b>47/197(23.8%)</b>	<b>46/195 (23.5%)</b>	<b>50/192 (25.7%)</b>
<b>Treated group / Skartā grupa</b>				
<b>Hive no. Stropas nr.</b>	<b>Time 0 Sākums</b>	<b>4 Weeks Pēc 4 nedēļām</b>	<b>6 Weeks Pēc 6 nedēļām</b>	<b>9 Weeks Pēc 9 nedēļām</b>
1	5/ 49 (10.2%)	5/ 49 (10.2%)	3/ 49 ( 6.1%)	3/ 49 ( 6.1%)
2	13/ 47 (27.6%)	7/ 50 (14.0%)	6/ 49 (12.2%)	8/ 47 (17.0%)
3	17/ 50 (34.0%)	12/ 49 (24.5%)	10/ 50 (20.0%)	7/ 50 (14.0%)
4	14/ 50 (28.0%)	8/ 50 (16.0%)	9/ 49 (18.4%)	10/ 46 (21.7%)
5	12/ 48 (25.0%)	6/ 47 (12.8%)	8/ 48 (16.7%)	5/ 48 (10.4%)
<b>Total Kopā</b>	<b>61/244 (25.0%)</b>	<b>38/245 (15.5%)</b>	<b>36/245 (14.7%)</b>	<b>33/240 (13.8%)</b>
<b>Significance / Datu būtiskums</b>				
	p=0.96	p=0.036	p=0.024	p<0.002

The temporary decrease after 4 weeks observed at the direct examination of the hive, was not observed in the ELISA plate counts, confirming the assumption that this phenomenon was related to stimulation of the bee's cleaning behavior.

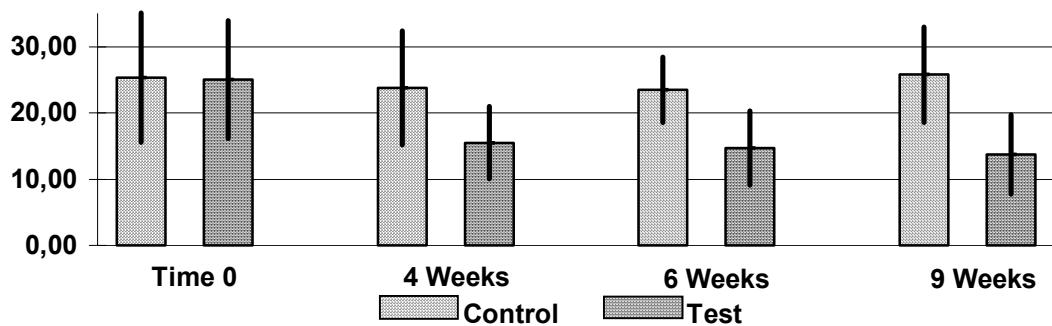


Fig. 2. Spray treatment with *Bacillus* sp. of honey bee colonies naturally infected with *A. apis*. Count of infected mummies/larvae (ELISA plates)

2. grafiks. Ar *A. apis* dabīgi inficētu bišu saimju apsmidzināšana ar *Bacillus* sp.; inficēto mūmiju skaits peros (ELISA plates)

### 5.3.1.2.1.3. Oral treatment

#### Series 1

The results of the clinical examination and mummy count indicate that while infection levels were similar at the onset of the experiment, they decreased in the treated hives and increased in the control hives (Table 4 & Figure 3).

**Table 4**  
**4. tabula**

**Oral treatment with *Bacillus* sp. of honey bee colonies naturally infected with *A. apis*. Count of infected mummies/colony**  
Ar *A. apis* dabīgi inficētu bišu koloniju iebarošana ar *Bacillus* sp.  
Inficēto mūmiju skaits uz saimi

Control group / Kontrole grupa				
Hive no. Stropas nr.	Time 0 Sākums	4 Weeks Pēc 4 nedēļām	6 Weeks Pēc 6 nedēļām	9 Weeks Pēc 9 nedēļām
1	12	17	26	37
2	14	28	36	108
3	8	32	36	84
4	108	96	145	132
5	129	150	138	112
6	94	64	115	145
7	70	96	121	102
<b>Average Vidēji</b>	62.14	69	88.14	102.86
<b>S.D S.N</b>	50.68	47.95	52.94	35.19

#### 4. tabulas nobeigums

Treated group / Skartā grupa				
Hive no. Stropas nr.	Time 0 Sākums	4 Weeks Pēc 4 nedēļām	6 Weeks Pēc 6 nedēļām	9 Weeks Pēc 9 nedēļām
1	15	12	6	5
2	17	17	5	4
3	11	4	6	4
4	117	36	22	4
5	106	54	17	6
6	108	64	32	12
7	38	12	6	4
<b>Average</b>	58.86	28.43	13.43	5.57
<b>S.D</b>	49.02	23.25	10.55	2.94

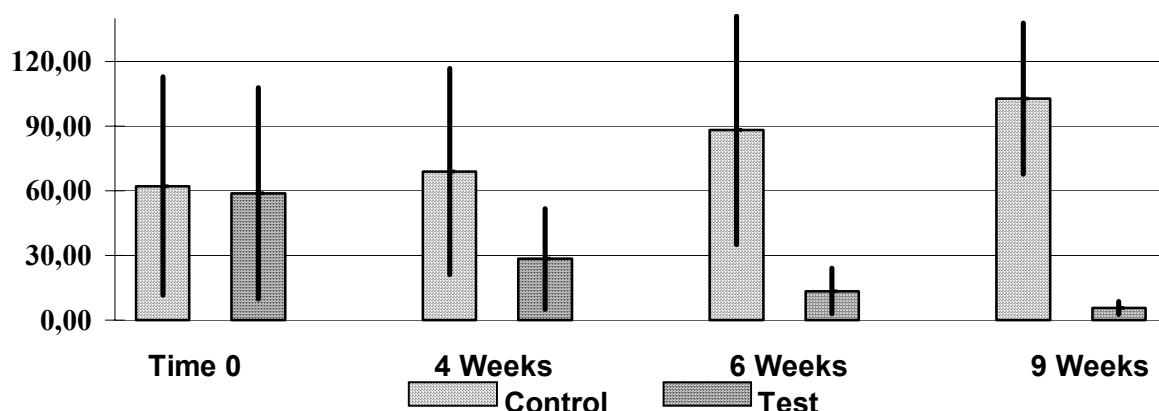


Fig. 3. Oral treatment with *Bacillus* sp. of honey bee colonies naturally infected with *A. apis*. Count of infected mummies/colony  
 3. grafiks. Ar *A. apis* dabīgi inficētu bišu saimju iebarošana ar *Bacillus* sp.; inficēto mūmiju skaits uz saimi

The inhibitory activity of the *Bacillus* sp. upon *A. apis* infection was confirmed at the ELISA plate count (Table 5 & Figure 4). The differences between treated and control group averages was statistically highly significant ( $p<0.001$ ) at all the observation points.

**Table 5**  
**5. tabula**

**Oral treatment with *Bacillus* sp. of honey bee colonies naturally infected with  
*Ascospaera apis*: count of infected mummies/larvae (ELISA plates)**  
**Ar *A. apis* dabīgi inficētu bišu saimju iebarošana ar *Bacillus* sp.**  
**Inficēto mūmiju skaits peros (ELISA plates)**

<b>Control group / Kontroles grupa</b>				
<b>Hive no. Stropas nr.</b>	<b>Time 0 Sākums</b>	<b>4 Weeks Pēc 4 nedēļām</b>	<b>6 Weeks Pēc 6 nedēļām</b>	<b>9 Weeks Pēc 9 nedēļām</b>
1	8/ 48 (16.6%)	10/ 50 (20.0%)	7/ 46(15.2%)	15/ 50 (30.0%)
2	7/ 50 (14.0%)	9/ 50 (18.0%)	10/ 47 (21.2%)	20/ 50 (40.0%)
3	6/ 50 (12.0%)	7/ 48 (14.5%)	6/ 47 (12.8%)	14/ 50 (28.0%)
4	14/ 50 (28.0%)	16/ 46 (34.7%)	18/ 50 (36.0%)	20/ 47 (42.5%)
5	21/ 50 (42.0%)	20/ 49 (40.8%)	17/ 50 (34.0%)	16/ 46 (34.7%)
6	17/ 46 (36.9%)	14/ 50 (28.0%)	19/ 49 (38.7%)	21/ 49 (42.8%)
7	16/ 47 (34.0%)	20/ 50 (40.0%)	22/ 47 (46.8%)	25/ 46 (54.3%)
<b>Total Kopā</b>	<b>89/343 (26.2%)</b>	<b>96/343 (28.0%)</b>	<b>99/336 (29.2%)</b>	<b>131/238 (38.9%)</b>
<b>Treated group / Skartā grupa</b>				
<b>Hive no. Stropas nr.</b>	<b>Time 0 Sākums</b>	<b>4 Weeks Pēc 4 nedēļām</b>	<b>6 Weeks Pēc 6 nedēļām</b>	<b>9 Weeks Pēc 9 nedēļām</b>
1	7/ 50 (14.0%)	5/ 50 (10.0%)	5/ 50 (10.0%)	5/ 50 (10.0%)
2	6/ 47 (12.7%)	2/ 46 ( 4.3%)	2/ 47 ( 4.4%)	2/ 48 ( 4.1%)
3	9/ 50 (18.0%)	1/ 50 ( 2.0%)	3/ 50 ( 6.0%)	4/ 50 ( 8.0%)
4	14/ 48 (29.1%)	3/ 46 ( 6.5%)	3/ 47 ( 6.4%)	3/ 50 ( 6.0%)
5	17/ 49 (34.7%)	9/ 50 (18.0%)	8/ 49 (16.3%)	6/ 50 (12.0%)
6	25/ 46 (54.0%)	10/ 46 (21.7%)	8/ 50 (16.0%)	8/ 49 (16.3%)
7	12/ 47 (25.5%)	9/ 50 (18.0%)	6/ 49 (12.2%)	6/ 50 (12.0%)
<b>Total Kopā</b>	<b>90/337 (26.8%)</b>	<b>39/338 (11.5%)</b>	<b>35/342 (10.2%)</b>	<b>34/347 ( 9.8%)</b>
<b>Significance / Datu būtiskums</b>				
	p=0.83			p<0.001

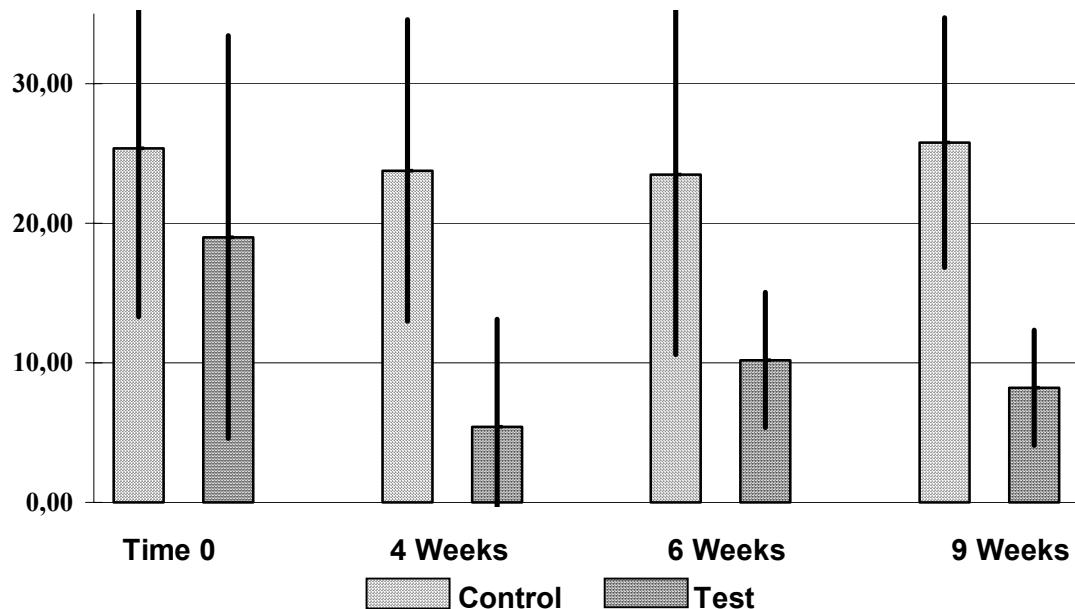


Fig. 4. Oral treatment with *Bacillus* sp. of honey bee colonies naturally infected with *Ascospaera apis*. Count of infected mummies/larvae (ELISA plates)

4. grafiks: Ar *A. apis* dabīgi inficētu bišu saimju iebarošana ar *Bacillus* sp.; inficēto mūmiju skaits peros (ELISA plates)

## Series 2

The results of these experiments are presented in Table 6 and Figures 5-8. A t-test analysis of the observation show that there were no differences between the control and test groups at the onset of the experiment.

**Three weeks** after the first treatment a significant decrease ( $p<0.05$ ) in the number of mummies and percent of infected larvae was observed. Changes in the number of populated combs and percent of infected frames were not significant.

**Six weeks** after the first treatment all the parameter showed a significant change: the number of populated combs increased ( $p<0.01$ ), whereas the number of mummies, the percent of infected larvae decreased ( $p<0.01$ ), as did the percent of infected frames ( $p<0.05$ ).

**Seven weeks** after the first treatment the mean number of mummies and percent of infected larvae in the treated group was 27.36 and 14.45% respectively whereas in the control groups the values were 67 and 31.9% respectively. In both cases the differences between the 2 groups was highly significant ( $p<0.01$ ). The significance of the decrease in the percentage of infected frames increased to  $p=0.01$ . Although the number of populated combs in both groups decreased, the bee population was significantly higher in the treated group ( $p<0.01$ )

**Table 6: Oral treatment with *Bacillus* sp. of honey bee colonies naturally infected with *Ascospaera apis*, Series 2 experiment  
6. tabula Ar *Ascospaera apis* dabīgi inficētu bīsu sāmiju iebarošana ar *Bacillus* sp. 2. eksperimentālā serīja**

Hive No.	Time 0 Sākums				3 Weeks Pēc 3 nedēļām				6 Weeks Pēc 6 nedēļām				7 Weeks Pēc 7 nedēļām			
	Pop. Combs	Inf. Frames (%)	Mum-mies	Infected larvae (percent)	Pop. Combs	Inf. Frames (%)	Mum-mies	Infected larvae (percent)	Pop. Combs	Inf. Frames (%)	Mum-mies	Infected larvae (percent)	Pop. Combs	Inf. Frames (%)	Mum-mies	Infected larvae (percent)
4*	10	2(20.0)	15	16/47 (34.04)	10	3(30.0)	72	49/14 (28.57)	8	3(37.5)	76	50/16 (32.00)	7	4(57.1)	82	49/18 (36.73)
11*	9	6(66.7)	35	12/50 (24.00)	8	5(62.5)	89	50/9 (18.00)	7	4(57.1)	91	46/9 (19.57)	7	4(57.1)	85	47/10 (21.28)
17*	10	3(30.0)	35	6/46 (13.04)	8	3(37.5)	38	47/8 (17.02)	8	4(50.0)	54	52/9 (17.31)	7	3(42.9)	64	51/8 (15.69)
21*	10	8(80.0)	102	8/51 (15.69)	9	8(88.9)	121	52/13 (25.00)	7	5(71.4)	98	50/15 (30.00)	7	4(57.1)	87	50/17 (34.00)
22*	9	3(33.3)	45	11/48 (22.92)	8	4(50.0)	47	51/15 (29.41)	7	4(57.1)	55	48/17 (35.42)	6	3(50.0)	53	44/16 (36.36)
28*	8	7(87.5)	78	9/52 (17.31)	6	6(100.0)	105	42/22 (52.38)	6	5(83.3)	111	45/23 (51.11)	4	2(50.0)	49	46/24 (52.17)
31*	10	4(40.0)	54	5/47 (10.64)	8	5(62.5)	64	48/21 (43.75)	6	4(66.7)	59	44/14 (31.82)	5	3(60.0)	52	48/13 (27.08)
<b>Mean</b>	<b>9.43</b>	<b>4.71</b>	<b>52</b>	<b>19.66</b>	<b>8</b>	<b>4.86</b>	<b>76.57</b>	<b>30.59</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>78</b>	<b>31.03</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>67</b>	<b>31.90</b>
<b>SD</b>	<b>0.79</b>	<b>2.29</b>	<b>29.37</b>	<b>7.99</b>	<b>1.21</b>	<b>1.77</b>	<b>30.22</b>	<b>13.09</b>	<b>0.82</b>	<b>0.69</b>	<b>22.83</b>	<b>11.14</b>	<b>1.21</b>	<b>0.76</b>	<b>16.84</b>	<b>11.96</b>
1	10	2(20.0)	10	12/46 (26.09)	10	2(20.0)	6	46/9 (19.57)	10	2(20.0)	7	49/7 (14.29)	9	0(0.0)	0	47/3 (6.38)
3	10	3(30.0)	21	5/50 (10.00)	9	4(44.4)	14	44/4 (9.09)	9	4(44.4)	5	51/5 (9.80)	9	3(33.3)	11	51/4 (7.84)
6	10	6(77.8)	62	11/44 (25.00)	10	3(30.0)	51	51/9 (17.65)	9	3(33.3)	25	47/6 (12.77)	8	2(25.0)	17	49/7 (14.29)
7	9	8(88.9)	72	3/50 (6.00)	9	7(77.8)	50	50/3 (6.00)	9	5(55.6)	25	52/1 (1.92)	8	4(50.0)	49	50/7 (14.00)
8	9	3(33.3)	34	7/40 (17.50)	9	4(44.4)	39	43/9 (20.93)	9	3(33.3)	37	49/6 (12.24)	8	2(25.0)	15	50/8 (16.00)
9	9	7(77.8)	45	10/43 (23.26)	9	6(66.7)	44	52/7 (13.46)	9	4(44.4)	40	46/9 (19.57)	9	4(44.4)	34	50/10 (20.00)
14	10	2(20.0)	32	11/53 (20.75)	10	1(10.0)	15	50/13 (26.00)	9	2(22.2)	7	46/8 (16.67)	8	2(25.0)	3	46/7 (15.22)
15	10	4(40.0)	64	25/50 (50.00)	9	2(22.2)	50	45/21 (46.67)	8	3(37.5)	24	48/15 (31.25)	8	3(37.5)	27	49/17 (34.69)
16	8	7(87.5)	138	14/46 (30.43)	8	5(62.5)	108	48/11 (22.92)	8	3(37.5)	61	44/12 (27.27)	7	2(28.6)	61	44/11 (25.00)
19	9	4(44.4)	54	13/47 (27.66)	8	3(37.5)	43	44/7 (15.91)	8	2(25.0)	20	41/3 (7.32)	8	0(0.0)	0	50/4 (8.00)
20	8	6(75.0)	79	7/52 (13.46)	8	7(87.5)	50	40/4 (10.00)	8	5(62.5)	54	50/6 (12.00)	7	5(57.4)	47	50/7 (14.00)
23	8	8(100.0)	89	8/50 (16.00)	8	5(62.5)	70	50/5 (10.00)	7	4(57.1)	71	51/6 (11.76)	6	3(50.0)	54	47/4 (8.51)
25	10	3(30.0)	64	5/49 (10.20)	10	2(20.0)	48	51/6 (11.76)	8	1(12.5)	36	47/3 (6.38)	8	2(25.0)	38	49/2 (4.08)
30	10	4(40.0)	21	9/47 (19.15)	9	1(11.1)	24	47/6 (12.77)	9	2(22.2)	12	45/5 (11.11)	8	3(37.5)	27	49/7 (14.29)
<b>Mean</b>	<b>9.29</b>	<b>4.79</b>	<b>56.07</b>	<b>21.11</b>	<b>9.0</b>	<b>3.71</b>	<b>43.71</b>	<b>17.34</b>	<b>8.6</b>	<b>3.07</b>	<b>30.29</b>	<b>13.88</b>	<b>7.9</b>	<b>2.50</b>	<b>27.36</b>	<b>14.45</b>
<b>SD</b>	<b>0.83</b>	<b>2.15</b>	<b>33.41</b>	<b>11.03</b>	<b>0.78</b>	<b>2.05</b>	<b>25.65</b>	<b>10.22</b>	<b>0.76</b>	<b>1.21</b>	<b>20.75</b>	<b>7.84</b>	<b>0.83</b>	<b>1.40</b>	<b>20.51</b>	<b>8.08</b>

Pop. Combs: populated combs / Apdzīvoto rāmīsu skaitis Infected larvae (percent) Infekcijas kājani, %  
 Inf. Frames: infected frames Infekcētie rāmīsi \*: control group colonies / kontroles grupas sāmē

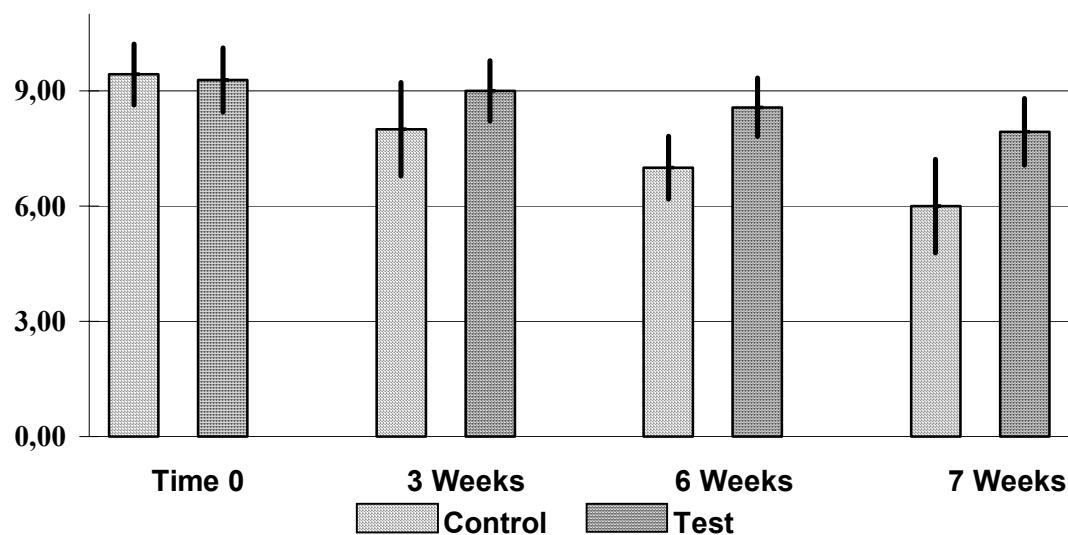


Fig. 5. Oral treatment with *Bacillus* sp. of honey bee colonies naturally infected with *A. apis*.; % of populated combs  
 5. grafiks. Ar *A. apis* dabīgi inficētu bišu saimju iebarošana ar *Bacillus* sp.; apdzīvoto rāmīšu procents

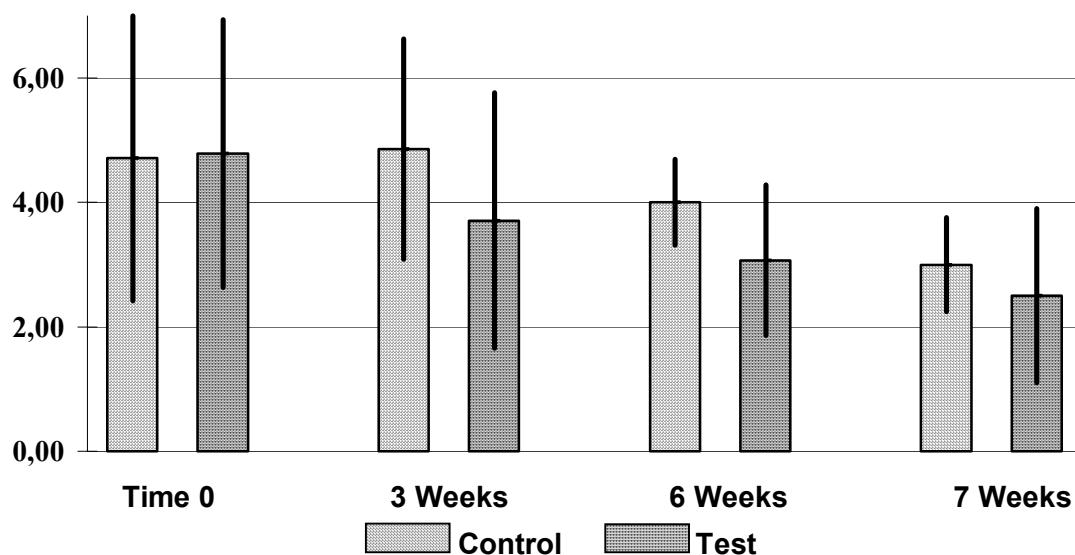


Fig. 6. Oral treatment with *Bacillus* sp. of honey bee colonies naturally infected with *A. apis*.; % of infected frames  
 6. grafiks. Ar *A. apis* dabīgi inficētu bišu saimju iebarošana ar *Bacillus* sp.; inficēto rāmīšu procents

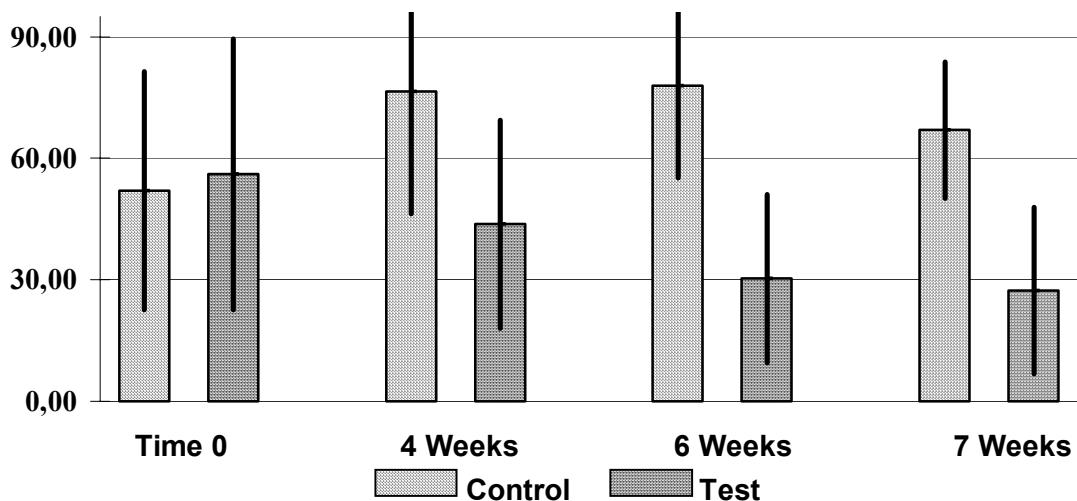


Fig. 7. Oral treatment with *Bacillus* sp. of honey bee colonies naturally infected with *A. apis*; Count of infected mummies/colony  
 7. grafiks. Ar *A. apis* dabīgi inficētu bišu saimju iebarošana ar *Bacillus* sp.; inficēto mūmiju skaits uz saimi

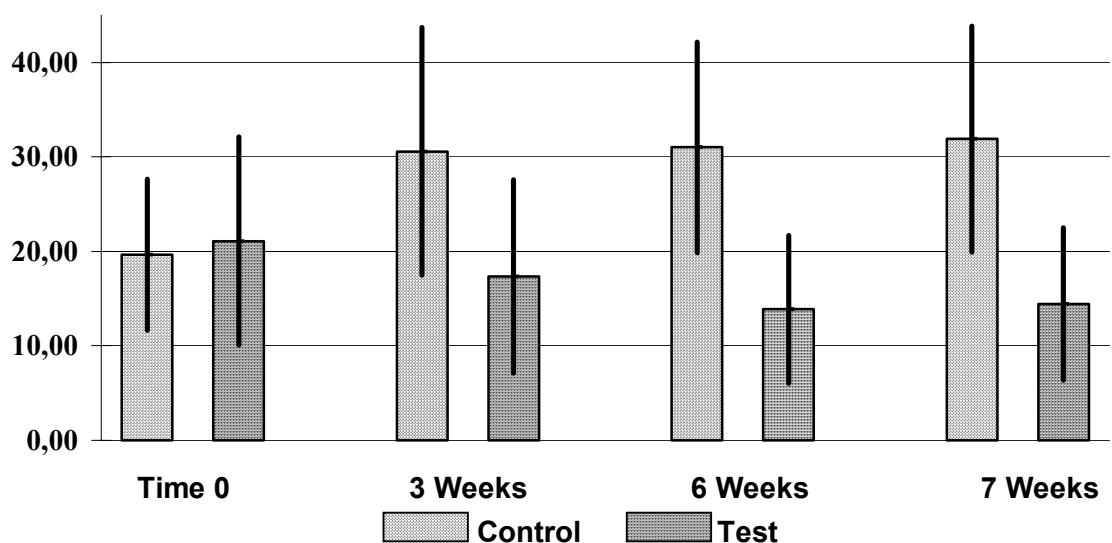


Fig. 8. Oral treatment with *Bacillus* sp. of honey bee colonies naturally infected with *A. apis*. % of infected larvae  
 8. grafiks. Ar *A. apis* dabīgi inficētu bišu saimju iebarošana ar *Bacillus* sp.; inficēto peru procents

### 5.3.1.2.3. Thailand

**Series 1:** The percentages of infested bee brood in the experimental groups are presented in Table 7 and Figure 9. The infestation rate of brood was calculated from a random sample of 48 bee larvae per colony. Repetitions were conducted consecutively with different colonies during a period of three month.

**Table 7  
7.tabula**

***In vivo activity of the *Bacillus* sp. following 2 modes of application in Thailand.***

**% chalkbrood infected brood**

***Bacillus* sp. *in vivo* aktivitātē pēc 2 veidu apstrādes Taizemē: ar *A. apis* inficētie peri procentos**

	Colony A Strops A	Colony B Strops B	Colony C Strops C	Average Vidēji	STD Standart novi rize	Treatment average Vidēji	
<b>Treatment group 1 (combined oral &amp; spray treatment)</b>							
<b>1. apstrādes grupa (kombinētā barošana un apsmidzināšana)</b>							
<b>Repetition 1</b>	8.30	8.30	35.4	17.3	15.6	13.4	
<b>Repetition 2</b>	12.5	10.4	12.5	11.8	1.2		
<b>Repetition 3</b>	18.8	6.3	8.3	11.1	6.7		
<b>Treatment group 2 (oral treatment)</b>							
<b>2. apstrādes grupa (barošana)</b>							
<b>Repetition 1</b>	2.1	16.7	20.8	13.2	9.8	15.3	
<b>Repetition 2</b>	10.4	18.8	14.6	14.6	4.2		
<b>Repetition 3</b>	12.5	18.8	22.9	18.1	5.2		
<b>Control group</b>							
<b>Kontroles grupa</b>							
<b>Repetition 1</b>	43.8	35.4	37.5	38.9	4.4	34.5	
<b>Repetition 2</b>	31.3	18.8	35.4	28.5	8.7		
<b>Repetition 3</b>	33.3	43.8	31.3	36.1	6.1		
<b>Number of colonies examined: 27</b>							
<b>Izmeklēto stropu skaits</b>							
<b>Number of larvae examined: 1296</b>							
<b>Izmeklēto peru skaits</b>							

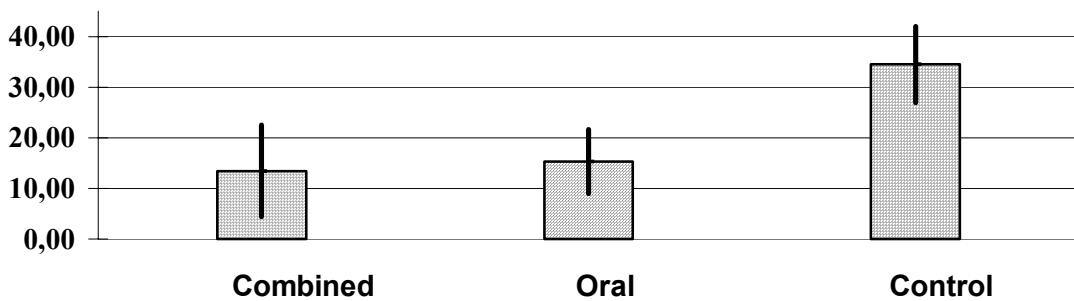


Fig.9. *In vivo* activity of the *Bacillus* sp. following 2 modes of application in Thailand. % chalkbrood infected brood

9. grafiks. *Bacillus* sp. *in vivo* aktivitāte pēc 2 veidu apstrādes Taizemē: ar *A. apis* inficētie peri procentos

Chi square tests ( $\alpha = 0.1 \%$ ) between treatment and control groups revealed significant differences between the treatment groups and the controls in each repetition when compared to an expected equal distribution of infestations. When the results from single colonies in the treatment group were compared to controls only 2 out of 9 colonies per treatment group had no significant difference to the control colonies ( $\text{Chi}^2 \alpha = 5 \%$ ; treatment group 1, Repet. 1C; 2B ; treatment group 2, Repet. 2B; 3C). No significant differences occurred between the two treatment groups in 5 out of 9 colonies per group ( $\text{Chi}^2 \alpha = 5 \%$ ).

Series 1 clearly shows that the bacterial treatment reduces larval infestations with chalkbrood by about 50 %. The artificial infestation pressure by feeding *A. apis* spores to the adult bees resulted in a loss of up to 43.8 % of the bee brood in the control colonies.

**Series 2:** The percentages of larval infestation with chalkbrood are presented in Table 8. The infestation rate of brood in series 2 was calculated as percentage from a random sample of 40 bee larvae per colony.

Table 8  
8. tabula

***In vivo* activity of the *Bacillus* sp. following oral application in Thailand.  
% chalkbrood infected brood (%)**

***Bacillus* sp. *In vivo* aktivitāte pēc bišu barošanas Taizemē: ar *A. apis* inficētie peri procentos**

Colony	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Av.	STD
Treated	35.0	40.0	20.0	37.5	42.5	22.5	17.5	20.0	27.5	45.0	30.8	10.4
Control Kontrole	70.0	47.5	87.5	77.5	62.5	47.5	67.5	80.0	45.0	57.5	64.3	14.9

Number of colonies examined: 20 Izmeklēto stropu skaits

Number of larvae examined: 800 Izmeklēto Peru skaits

The difference between treatment and control colonies is very significant ( $\text{Chi}^2 \alpha = 0.1 \%$ , U-test on significant difference of medians  $\alpha = 0.1 \%$ ). The second trial reconfirms the results from trial I but on a remarkably higher level of infestation that was

experimentally induced by feeding *A. apis* spores to adult bees. While in the first trial (March -May) the feeding of spores resulted in an average infection of 34.5 % of the bee brood, the bee brood of the control group in series 2 suffered from an average of 64 % infested brood. Series 2 experiments confirmed that the method of oral application of the bacteria solution is sufficient for a significant reduction of chalkbrood infections in the *A. mellifera* colonies.

#### **5.3.4. Characterization of *A. apis* isolated in Thailand, Germany and Israel**

Rate of growth: The biggest differences could be stated at a pH value of 6. Extremely considerable differences were found at the *A. apis* strain from Israel, which grew the fastest, followed by, in this order, the Thai and the German isolates.

##### **5.3.4.1. Enzymatic characteristics**

Differences between the isolates were found in 9 enzymes: Esterase, Lipase, Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\beta$  glucosidase and N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase. The most significant differences were found to be an extremely low titer for the Israeli strain for  $\beta$  glucuronidase and N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase and the Thai strain for cystine arylamidase and N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase, when compared to the German strains.

The isoelectric-focussing assay revealed that the protein bands of the isoenzymes leucine and aminopeptidase are identical in all strains examined. Differences were minimal with the alkaline phosphatases. Different protein patterns were observed with the esterases. Those differences were found not only between the strains from Germany and Thailand but also within the ones from Germany. Concerning the strain from Israel the protein patterns of some individual fungus strains were similar to those from Thailand and Germany.

The enzyme patterns of the teleomorphs was also quite similar. However, when the enzyme patterns of anamorphs and teleomorphs were compared, clear differences could be recognized: while teleomorphs produced lipase's, the anamorphs did not. On the other hand, valin-arylamidase was produced by anamorphs but not by teleomorphs.

These results confirmed the study of Gilliam<sup>63</sup> that valin-arylamidase is the best marker for the determination of the mycelial forms of *A. apis*.  $\beta$ -galactosidases and  $\alpha$ -mannosidases, produced by all strains examined and most of the strains tested by Alonso et al (1993)<sup>3</sup> and Gilliam and Lorenz (1993)<sup>59</sup>, can also serve as marker enzymes to differentiate *A. apis* from other mold fungi of the honey bee, as these enzymes are produced only by few hyphomycetes present in the hive.

Upon examining the isoenzyme-characteristics of the different isolates, 3-6 bands could be observed by focusing within a narrow acid range. Two protein bands of high concentration were seen in each isolate. All the variations could be identified by the additional bands marked with esterases A, B and C.

These polymorph main groups were partially classified even more precisely because of slight variations in the band pattern. So, for example, main group A showed 2 dominating bands. Two isolates, however, showed 4 main bands with moderate variations in the auxiliary bands (B1, B2, B3). Main group C differed from this pattern again. There were no, or only small differences in the band pattern of the different strains from the same region like all strains from South Germany which were very similar and all strains from Northern Thailand which showed certain similarities.

The polymorphism of the esterase isoenzymes patterns of different *A. apis* strains could be classified in 3 main groups. The differences of these zymograms showed that

the method is suitable for the differentiation of the individual strains of *A. apis* (Figure 12).

#### 5.3.4.2. Mating experiments

The examinations showed that the different sexes of all *A. apis* strains tested were able to mate with each other. These results confirm the results of Christensen and Gilliam (1983) regarding *A. apis* strains from Europe and North America.

#### 5.3.5. Host-parasite relations between *Apis mellifera* and *A. apis*

##### 5.3.5.1. Virulence tests

The LD<sub>50</sub> values varied from 136 spores for the strain "Thailand 3" to 1144 with the strain "South Germany 1". This difference was significant at the 5% level (PROC Probit-analysis). Generally, the virulence of *A. apis* strains from Thailand tended to be higher than that of the other ones. The LD<sub>50</sub> values of the strains "Israel" and "Northern Germany 2" were close to the LD<sub>50</sub> values of all strains from Thailand (Table 9).

**Table 9**  
**9. tabula**

**Virulence (LD<sub>50</sub>) of *A. apis* strains**  
***A. apis* celmu virulence (LD<sub>50</sub>).**

Strain Celms	Spores/10µl
<b>North Germany 1</b>	526
<b>Ziemeļvācija 1</b>	
<b>North Germany 2</b>	378
<b>Ziemeļvācija 1</b>	
<b>Middle Germany</b>	600
<b>Vidussvācija</b>	
<b>South Germany</b>	1144
<b>Dienvidvācija</b>	
<b>Israel</b>	250
<b>Izraēla</b>	
<b>Thailand 1</b>	225
<b>Taizeme 1</b>	
<b>Thailand 2</b>	209
<b>Taizeme 2</b>	
<b>Thailand 3</b>	136
<b>Taizeme 3</b>	

It is extraordinary that the LD<sub>50</sub> values of the strains from Germany varied quite considerably whereas the LD<sub>50</sub> values of all strains from Thailand, originating from different apiaries but from the same region, were similar.

##### 5.3.5.2. Effect of tetracycline treatment on the susceptibility of *Apis mellifera* to infection by *A. apis*

Mortality was highest in group b) (spores+OT): 25%-36%, followed by group a) (spores alone): 12%-26.7%. Mortality in all control groups was below 10%. The

detailed results of this experiment are presented in Table 24. Statistical analysis of the results (chi-square) indicate highly significant differences ( $P<0.0001$ ) between the group given spores alone and the group given spores and OT. Moreover, significant ( $P<0.0001$ ) differences were found between these two groups and the control groups.

#### 5.4. DISCUSSION

The main goal of this research was to develop a method of biological control of chalkbrood disease caused by *A. apis*. We have achieved this goal by isolating a microorganism a *Bacillus* sp. that was able to combat this fungal disease. Moreover, we demonstrated that this microorganism could be successfully used as a practical antifungal agent under field conditions. Our results also show that antifungal activity of the *Bacillus* sp. is highly efficacious under different climatic and epidemiological conditions existing in three different countries in two continents, and also under different beekeeping management practices. In addition, this therapeutic method was equally effective against genetically different strains of *A. apis*. Attempts to use microorganisms for chalkbrood control have been carried out by several investigators (Gilliam, 1978, 1990 and Gilliam *et al.*, 1978). However, despite isolating and testing almost one thousand different microorganisms from hives and honeybees, no single agent has been shown to be effective against the disease under field conditions (Heath, 1982).

Since this work is the first and so far the only one that describes an effective control of chalkbrood disease by a biological method, this discussion will consider the different parameters within the new experimental system. The only systems employing microorganisms for fungal disease control have been described in plants (Howarth, 1991; Gibert *et al.*, 1991; Osburn *et al.*, 1995; Cook, 1993 and Limsden *et al.*, 1995).

The main feature of our biological method of control is the inhibitory activity of the *Bacillus* microorganism against *A. apis*. After isolating a number of strains exhibiting anti- *A. apis* activity *in vitro* the most active strain for subsequent *in vivo* experiments was chosen. For precise identification of this isolate, gas chromatographic analysis was employed to establish a characteristic spectrum of lipids. Further identification was carried out by the API 50 CHB (Goor, *et al.*, 1984) and Biolog systems (Bochner, *et al.*, 1996). Both these systems discriminate between different spp. of microorganisms according to their characteristic spectra of enzymatic activities. As a result it was possible to identify our strain as a Gram positive *Bacillus* sp, most close to (at a 99% identification level), but not identical to, *Bacillus amyloliquefaciens*. It was also determined that the anti-fungal activity of our strain is not plasmid borne and therefore is apparently stably chromosomally inherited. Most of the known anti-fungal antibiotics are episomally encoded (Murray, *et al.*, 1999). The stable, apparently chromosomal, inheritance is a very useful feature expressed during the multiplication in honeybee hives. The genetic stability of this strain is a prerequisite for any large-scale fermentation that will be required for development and potential commercialization of this novel biological means of control. This was recently demonstrated convincingly in plants by using *Bacillus thuringiensis* (Powell and Jutsum, 1993), *Bacillus subtilis* (Turner and Backman, 1991) and *Bacillus cereus* (Osburn *et al.*, 1995, Handelsman *et al.*, 1990, He *et al.*, 1994 ) to control fungal spp.

An additional advantage of this *Bacillus* sp. strain as a candidate for developing into a marketable and stable product is its ability to form heat and desiccation resistant spores. These spores can be readily formulated as products. This situation is in marked contrast to that when non-sporulating Gram-negative bacteria, such as *Pseudomonas*

spp., are considered as fungicides (Slininger *et al.*, 1996). The only way bacteria such as *Pseudomonas* can be formulated is as a frozen cell pellet that must be kept on dry ice until application.

There is a substantial base of industrial experience over many decades with *Bacillus* sp. that have been used for insect biocontrol, industrial enzyme production, and antibiotic production. This experience can be applied to members of the same genus for biocontrol to overcome potential obstacles to successful fermentation, formulation, and storage. Some of these organisms have been the subject of intense study at the genetic and biochemical level, providing a basis for study of them as biological control agents. Moreover, a few biological control systems involving Gram-positive bacteria have been studied intensively in the field and laboratory, providing a knowledge base that can be used to develop the bacteria into effective products and to identify potential sources of failure.

Gram-positive bacteria have received less attention by scientists compared to the fluorescent pseudomonads for biocontrol, in part because the Gram-positive organisms have been less tractable for genetic study and less is known about the mechanisms by which they suppress disease (Handelsman, and Stabb, 1996). However, their efficacy is striking. Many surveys of soil bacteria have identified strains of *Streptomyces* and *Bacillus* as potential biocontrol agents (Crawford *et al.*, 1993; Michereff *et al.*, 1994; Korsten *et al.*, 1995; Mari *et al.*, 1996).

An important factor determining the clinical efficacy of a given biocontrol method is its mode of application (Lumsden *et al.*, 1995). This study compared two methods, one being spraying of hive combs with lyophilized *Bacillus* sp. spores in aqueous solution, and the second, feeding an equal amount of spores in a sugar solution vehicle. While the spraying method initially produced good results, in the long term the feeding method was deemed superior, being significantly less laborious, better adapted to field conditions and almost as effective as the spraying method. It is concluded that application by feeding should be the method of choice in beekeeping practice.

It should be noted that we have frequently observed an increase in honeybee colony strength and vigor. This could be a consequence of either inhibition of the pathogenic effect of *A. apis* or some probiotic effect of the *Bacillus* sp. microorganism on *Apis mellifera*, or both. A similar effect was described recently with *Bacillus subtilis* (Montesinos *et al.*, 2002). This property of *Bacillus* sp. may therefore be used for developing honeybee colony strength-enhancing probiotic products.

An essential aspect of this study is its wide geographical scope. It was shown in this study that this biocontrol method was equally effective in different geo-climatic conditions and under various beekeeping practices. The efficacy of the method was sustained over the period of three consecutive years in countries as different as Thailand, Germany and Israel. Such robustness of the method suggests its potential for world-wide application.

In order to obtain maximum efficacy of a biocontrol agent, the application protocol should be tailored to specific epidemiological, climatic and honeybee management practices existent in a given locality. Therefore, we have also focused on epidemiological aspects of chalkbrood in Thailand, Germany and Israel. This study revealed, for example, that co-infecting agents such as mites (*Varroa* and *Tropilaelaps*), viruses (acute paralysis virus) and microsporidia (*Nosema*) exert differing effects on the severity of *A. apis* disease and efficacious *Bacillus* sp. treatment.

Another factor to be considered is the wide use of acaricides and antibiotics to combat these mites, protozoa and bacterial brood diseases. This results in a significantly higher larval susceptibility towards chalkbrood infestations as shown in the experiments

carried out in Thailand. Mites induce a considerable stress in *Apis mellifera*, e.g. loss of nutrition, irritation by phoresy, shortened life span, and changes in behavior with loss of brood and multiplied cleaning efforts of combs and bees.

It is believed that valid success of a biocontrol approach can be only achieved when it is accompanied by avoidance of feeding with antibiotics. Alternative methods to confront brood diseases should be adopted.(Goodwin and Van Eaton, 1999; Hansen and Brodsgaard, 1999).

*Apis mellifera* colonies vary considerably in their susceptibility towards chalkbrood infestations. This variation in susceptibility may be interpreted as being due to the presence of bee-associated bacteria or due to genetic properties of a colony, or both.

Bees can be selected with greater than average resistance towards brood and mite diseases in general, and towards chalkbrood in particular (Spivak and Gilliam, 1998; Boecking and Spivak, 1999; Gilliam *et al.* 1983, Oldroy, 1996; Thompson, 1994; Palacio *et al.*, 2000). The efficacy of the hygienic behavior of adults in removing diseased larvae was further divisible into a factor for uncapping the cells and a factor for removing the larvae (Spivak and Gilliam, 1998; Spivak and Downey, 1998; Spivak and Reuter, 1998).

In experiments designed to examine the hygienic behavior of honeybees, colonies that removed significantly more freeze-killed brood had significantly less chalkbrood (Taber, 1982; Taber and Gilliam, 1993).

We suggest that the combination of honeybee selection towards disease resistance together with utilization of the *Bacillus* sp. biocontrol approach may result in an almost total control of chalkbrood.

This study uncovered a previously unknown aspect of chalkbrood disease pathogenesis. We have shown (Results 5.3.5.6) that feeding of chalkbrood mummies is more infective than the spores of *A. apis* themselves. The contamination of young brood stages with premummy material had an almost immediate lethal effect. In the light of this finding it is strongly recommended that hives be thoroughly cleaned manually, and that mummies be removed as thoroughly as possible from the bottom board of the hive before each biocontrol application.

This work has revealed a significant heterogeneity of *A. apis* strains isolated in Thailand, Germany and Israel regarding their biochemistry and virulence. Similar results were reported in USA (Gilliam, 1996). Despite this heterogeneity, all strains tested exhibited approximately the same susceptibility to the antifungal activity of the biocontrol *Bacillus* sp. agent.

The elimination of *A. apis* infected larvae from the hive is part of the housekeeping function of bees. Infestation beyond a certain level will weaken the colony, decrease its ability to remove infested larvae, and thus worsen the infestation. The use of biological control, as shown in this research, although unable to completely eliminate the fungus from the hive, is expected to decrease the infestation level, thus reversing the above-mentioned vicious circle and, supplemented by the housekeeping of the bees, will bring about a significant reduction of the infestation.

## CONCLUSIONS

1. *Ascospshaera apis* is a fungus which causes a disease known as "chalkbrood" in the honey bee (*Apis mellifera*). The disease has a widespread incidence in Israel and other countries causing economic damage to the beekeeping industry, so the development of a method for treatment is a matter of highly practical importance.
2. Analysis of the literature showed that no efficacious chemical treatment for chalkbrood exists. Even if such methods were developed, problems with chemical residues in honey, wax and others bee by-products might preclude the use of such substances in the commercial sector. Therefore we focused on developing a practical biological control preparation using *Bacillus* sp., such as are found naturally in beehives. The *Bacillus* sp. was identified as *B. amyloliquefaciens* with a probability of 99%. The activity of the *Bacillus* sp. was found *in vitro* to be fungistatic
3. Several isolates of *Bacillus* sp. having inhibitory activity on *A. apis* were isolated and identified (in Israel and Thailand), but only one of them, the most potent one, was used for *in vitro* and *in vivo* experiments.
4. The most efficacious technique found for application of the *Bacillus* sp. to the beehive was by feeding the colony the bacterial preparation suspended in a sugar syrup. The optimal way to store the *Bacillus* sp. preparation is to keep the lyophilized bacterial culture frozen at -20°C.
5. Successfully reintroduction of *Bacillus* sp. to a beehive is preferable to trying to limit the fungus using an active substance isolated from the *Bacillus* sp. In addition to having a longer-lasting effect, this will also restore the natural microbial balance of the hive without reducing bee product quality.
6. The *Bacillus* sp. isolated and used in this research was shown to be susceptible to two of the most widely used antibiotic drugs in apiculture, i.e. streptomycin and tetracycline, strengthening our assumption that higher levels of chalkbrood infestation are related to an altered microbial balance in the hive.

### 3. KOPSAVILKUMS

Sēnītes *Ascospaera apis* izraisītā bišu kaļķu Peru infekcija Izraēlā un citās valstīs ir plaši izplatīta un rada nozīmīgus zaudējumus biškopībā, līdz ar to tās apkarošanai ir liela praktiska nozīme. Biškopības prakse pierāda, ka ķīmisko ārstniecības līdzekļu un antibiotiku pielietošana šīs slimības apkarošanā nav efektīva, pie tam biškopības produkti tiek piesārņoti ar cilvēkiem kaitīgām atliekvielām. Tāpēc saviem pētijumiem izvirzījām uzdevumu izstrādāt jaunu kaļķu Peru apkarošanas metodi, izmantojot uz *Bacillus* sp. bāzes radītu biopreparātu.

Zinātniski – pētniecisks darbs “Bišu kaļķu Peru bioloģiskā apkarošana” veikts Izraēlā, Taizemē, un Vācijā.

*Bacillus* sp. izolēta no medus bišu kāpuriem Izraēlā un izmēģināta kaļķu Peru bioloģiskajā ārstēšanā.

Pētījumu agrīnajā stadijā izdalītā *Bacillus* sp. *in vitro* aizturēja un nomāca sēnīšu *A. apis* celma augšanu, kas iegūts Izraēlā, Vācijā un Taizemē. Pēc mūsu pētijumiem *Bacillus* sp. aktivitāti *in vitro* nodrošina difūzijas substance.

Bioloģiskais preparāts (*Bacillus* sp.) klīniski pārbaudīts arī Vācijas un Taizemes apstākļos, kuri atšķiras kā klimata, tā arī biškopības tehnoloģiju ziņā.

Pierādīts, ka *in vivo* preparāts nav bīstams bitēm un ievērojami pazemina inficēšanās līmeni ar sēnīti uz bišu saimes dabiskā mikroorganismu līdzsvara atjaunošanas pamata. Pozitīvie rezultāti iegūti, izsmidzinot preparātu tieši uz kārēm ar bitēm un bišu periem, kā arī to izbarojot 50% cukura šķidumā. Ērtākais un efektīvākais *Bacillus* sp. preparāta aplikācijas veids ir izbarot to bišu saimēm ar cukura ūrupu, ko apstiprina triju gadu laikā veikti eksperimenti Izraēlā, Vācijā un Taizemē.

Kaļķu Peru epidemioloģisko izmeklējumu salīdzinoša analīze, kas veikta trijās valstīs, liecina, ka pastāv atšķirības slimības intensitātē un slimības sezonālitātē. Izraēlā bišu kaļķu peri ir visnozīmīgākā medus bišu Peru slimība. Vācijā mūsu pētījumu periodā, dravu inficēšanas procents ar *A. apis* bija zems (1-15%), droši vien bitēm labvēlīgie klimatiskie apstākļi minētajā periodā nomāca šīs slimības manifestāciju. Taizemē, atsevišķi ķēmētā 30 m<sup>2</sup> izvietotajā dravā, ar kaļķu periem bojāto saimju pētījumi demonstrē ievērojamas saimju inficēšanas līmena atšķirības (neatkarīgi no gada laika). Taizemē visaugstākais inficēšanas līmenis ar kaļķu periem konstatēts mitrā un karstā laikā - no jūnija līdz oktobra mēnesim.

Noskaidrots, ka pirmās pakāpes (F1) bišu mātes, kuras importētas Izraēlā no Austrālijas un Jaunzēlandes, vairāk izturīgas pret bišu pamatslimībām, izņemot kaļķu perus un akarapidozi (*Acarapis woodi*).

Izraēlā, Vācijā un Taizemē izolēto *A. apis* celmu salīdzinoša analīze parāda zināmas atšķirības sēnīšu fermentu aktivitātē un sēnīšu augšanas intensitātē uz barotnēm. Eksperimentos konstatēta šo sēnīšu celmu krustošanas iespēja. Zigmogrammu statistiskie izmeklējumi uzrāda lielas atšķirības starp Izraēlas, Vācijas un Taizemes celiem, salīdzinājumā ar viena ģeogrāfiska rajona celiem.

Virulences pētījumi parāda, ka celi, kas izdalīti Taizemē, ievērojami vairāk lipīgi bišu kāpuriem, nekā Vācijas dienvidos izdalītie, bet ievērojami mazāk lipīgi, nekā celi no Vācijas ziemējiem un Izraēlas.

Taizemē konstatējām, ka tajos gadījumos, kad medus bites *Apis mellifera* un *Apis cerana* bija inficētas ar *Nosema apis*, kaļķu Peru infekcija noritēja smagāk.

Dažādu ķīmoterapeitisko preparātu pielietošana paaugstina bišu jutību uz inficēšanos ar *A. apis*. Eksperimentāli to apstiprina *Apis mellifera* kāpuru apstrādāšana ar oksitetraciklinu *in vitro*.

Darba bišu un bišu Peru virusoloģiskie pētījumi parāda pozitīvu sakarību starp kaļķu Peru slimības izpausmi, akūtas paralīzes vīrusiem (APV) un maisiņu Peru puvi (SV).

Ar dažāda genotipa bišu saimju krustveidīgo inficēšanu apstiprinājās *Apis mellifera* dabiskais izturības fenomens pret inficēšanos ar *A. apis*.

Pētot eksperimentāli bišu kāpuru inficēšanas patoģēnēzi, konstatējām, ka ir iespējama kāpuru inficēšana caur apvalku (kutikulu).

Barojot jaunu darba biti ar kaļķu Peru kāpuru mūmijām, konstatēts, ka tās ir vairāk inficēt spējīgas nekā sēnīšu sporas, kas iegūtas laboratorijas apstākļos.

#### 4. PĒTNIECĪBAS PROJEKTA MĒRKI

1. Izstrādāt biopreparātu bišu kaļķu Peru infekcijas apkarošanai.
2. Noteikt no bišu periem izdalīto baktēriju spēju nomākt *A. apis* un izdalīt aktīvāko *Bacillus* sp. celmu.
3. Veikt *A. apis* infekcijas profilaksi un ārstēšanu, apstrādājot stropus ar izdalīto *Bacillus* sp. kultūru.
4. Noskaidrot *A. apis* un citu slimību ierosinātāju (ērces, vīrusi un vienšūnu organismi) mijiedarbību.
5. Salīdzināt izdalītā *A. apis* celmus Izraēlā, Vācijā un Taizemē.

##### 4.1. Zinātniskā pētījuma izvērtējums

Galvenais pētījuma mērķis bija mēģinājums cīnīties ar kaļķu Peru infekciju. Papildus uzdevums - pētīt bišu slimību epidemioloģiju 3 izmēģinājumos iesaistītajās valstīs un aplūkot saimnieka - parazīta mijiedarbības un dažādus savstarpējus *A. apis* un bišu aspektus.

Pētījumu gaitā tika sasniegti visi šie mērķi. *Bacillus* sp. saturoša biopreparāta pielietošana *A. apis* infekcijas ierobežošanā ir efektīva metode cīņā ar šo slimību. Mikroorganisma izmantošana acīmredzot būs īpaši lietderīga Trešās pasaules valstīs ar ierobežotām iespējām. *Bacillus* sp. kultivēšana ir tieša un tai nav nepieciešamas ne sarežģītas iekārtas, ne augsti kvalificēts personāls. Biopreparāta sagatavošana un transportēšana arī nerada īpašas problēmas.

Epidemioloģiskā informācija, kas iegūta 3 valstīs, kā arī informācija, kas saistīta ar saimnieka - parazīta (bišu un *A. apis*) savstarpējām attiecībām dos ieguldījumu racionālu ārstēšanas programmu izveidē un *A. apis* apkarošanā. Tas ir sevišķi svarīgi, ņemot vērā sezonālas atšķirības un vides faktoru nozīmi, kas raksturīgas bišu kaļķu Peru infekcijai.

Bišu dabīga izturība pret kaļķu Peru infekciju norāda uz to, ka piemērota ģenētiskā materiāla izvēle var ierobežot šīs slimības izplatīšanos un tās radītos ekonomiskos zaudējumus.

*A. apis* bioloģiskās apkarošanas metode īpaši nozīmīga bioloģiskās lauksaimniecības attīstības aspektā.

Dotajā brīdī *Bacillus* sp. biopreparāts atrodas rūpnieciskās izstrādes stadijā.

##### 4.2. Rezultātu matemātiskā apstrāde

Atšķirības starp apstrādātiem un neapstrādātiem stropiem tika statistiski analizētas ar chi<sup>2</sup> testu.

### **4.3. Pētījumu praktiskā nozīme**

*A. apis* infekcijai medus bišu kolonijās ir liela praktiskā un ekonomiskā nozīme daudzās valstīs. Darbs parādīja, ka:

1. Ľoti augsts bišu bojāejas procents stropos ir novērojams tieši kaļķu Peru infekcijas rezultātā.
2. Pārmērīga antibiotiku lietošana palielina Peru uzņēmību pret *A. apis* un tādēļ to lietošana būtu jāierobežo.
3. Mēģinājumi apkarot slimību ar ķīmiskiem līdzekļiem nav devuši gaidāmos rezultātus.
4. Bioloģiskā ārstēšanas metode novērš risku, ko rada zāļu atliekvielu esamība medū, vaskā un citos bišu produktos.
5. Selekcijas rezultātā iespējams izveidot pret kaļķu Peru infekciju izturīgas medus bites.

### **4.4. Pētījumu rezultātu aprobācija**

Pētījumi tika veikti no 1993.g. līdz 1997.g. Vācijas – Izraēlas zinātniskā projekta ietvaros (GIARA, Project No. 93-4) Kimrona Veterinārā institūta Patoloģijas nodaļā Izraēlā.

Pētījumu rezultāti regulāri atspoguļoti zinātniskajās konferencēs Koretas Veterinārmedicīnas skolā, Jeruzalemes Ebreju universitātē, kā arī starptautiskajās konferencēs (Dienvidslāvijā, Ēģiptē, Belģijā, Taizemē, Kiprā, Kanadā, ASV, Čehijā un Latvijā). Zinātnisko darbu sarakstā autoram ir 100 publikācijas, atbilstoši tēmai publicēti 26 darbi, tai skaitā starptautiski atzītos žurnālos (American Bee Journal 1991, 1997, 2000; Eksperimental And Applyied Acarology 2000).

## **5. ZINĀTNISKAIS ZIŅOJUMS**

### **5.1. Ievads**

*A. apis* ir sēnīte, kas izraisa medus bites (*Apis mellifera*) Peru slimību pazīstamu ar nosaukumu “kaļķu peri”. Sēnītes sporas ir mikroorganisma infekcīozā stadija. Peri inficējas galvenokārt norijot sporas, bet inficēšanās var notikt arī sēnītei izaugot cauri kutikulai. 3 līdz 4 dienu veci peri ir visuzņēmīgākie pret sēnīšu infekciju (1.attēls). Sporas parasti dīgst zarnās. Pēc tam, kad šūnas tiek aizvākotas, sporu micēlijs attīstās Peru vai priekšķūniņas aizmugures zarnā un galu galā inficē visu biti (2.attēls).

Bojā gājušie peri sākumā pārklājas ar pūkainu, baltu, augošu micēliju. Vēlāk mumificētie pēri izķūst, kļūst cieti, saraujas un kļūst kaļķīgi (3.attēls).

Mumificētie peri paliek balti vai arī kļūst pelēki un pat melnā krāsā. Bālas nokrāsas mūmijas norāda uz to, ka peri tika inficēti tikai ar viena dzimuma sēnīti, turpretī krāsainas mūmijas liecina par abu dzimumu invāziju. Melnā krāsa rodas sporām, ražojot sporu lodītes, kas ir divu dzimumu pārošanās rezultāts (4.attēls).

Bites sajūt bojā gājušos perus aizvākotajās šūnās un izgrauž tajās mazus caurumiņus. Šie caurumiņi parasti ir pirmā klīniskā inficēšanās pazīme ar *A. apis*. Vēlāk bites aizvāc aizvākojumu un bojā gājušos perus no šūnām. Parasti mūmijas tiek aizvāktas no šūnām mazāk kā desmit dienu laikā (5.attēls), lai gan šķiet, ka atsevišķo saimju spēja sajust un aizvākt mūmijas ir atšķirīga. Tas tomēr vedina uz domām, ka ģenētiskie faktori ietekmē bišu uzvedību attiecībā uz higiēnu.

Pētījumi liecina, ka inficēšanās, inkubācijas un infekcijas izplatīšanās procesā ir iesaistīti daudzi faktori (ar sporām saindēti ziedputeķšņi, bišu māšu ģenētiskā iedzīmtība, vēsa un mitra vide, no inficētām kolonijām ieklīdušas bites, iepriekš inficēto koloniju sporu līmenis šūnās, kā arī ar sporām inficēti ūdens, nektārs un medus).

Domājams, ka pārlieku plašās antibakteriālo preparātu lietošanas rezultātā izjauktais mikrobioloģiskais līdzsvars ir arī inficēšanās priekšnoteikums.

Izrādās, ka kaļķu Peru infekcija ir stresa izraisīta slimība, jo infekcija tika konstatēta, kad eksistē viens vai vairāki sekojoši apstākļi: pārmērīgs mitrums stropā, vēsi un mitri laika apstākļi, nabadzīgi barošanās apstākļi, vājas saimes, slikta aprūpe vai arī sekundāri pievienojas citas bišu slimības (maisiņu Peru puve un nozematoze).

*A. apis* sporas ir izturīgas pret vides apstākļiem un saglabājas inficētos stropos pat līdz 15 gadiem ilgi.

Pēdējo gadu laikā kaļķu Peru infekcijas ekonomiskie zaudējumi biškopībā visā pasaulei ir palielinājušies. Lai gan šī slimība ir plaši pētīta, šobrīd nav izdevies atklāt efektīvu līdzekli cīņā ar *A. apis*. Vienīgie apkarošanas līdzekļi patreiz ir bišu apkopes uzlabošana, inficētu saimju stiprināšana ar jaunām pret šo slimību neuzņēmīgākām bitēm, kā arī bišu mātes nomaiņa. Vēl arī jāizvairās no šūnu pārvietošanas no inficētām saimēm uz neinficētām saimēm, kā arī inficētu ziedputekšņu izmantošanas. Arī Kanādā un ASV kaļķu Peru infekcijas gadījumu skaits ir palielinājies. Taizemē šīs slimības gadījumu skaits ir krasī palielinājies pēdējo gadu laikā, kas ietekmē galvenokārt Peru pienīņa ražošanu. Izraēlā pirmā ziņa par šīs slimības gadījumu konstatēta 1984.gadā. Ja līdz 1989.gadam tika novērota neliela šīs slimības izplatība, tad pašreiz praktiski katrā drava ir zināmā mērā inficēta ar *A. apis*, bet dažās dravās 50% stropos konstatē šīs slimības klīniskās pazīmes. Vācijā kaļķu Peru infekcija kļūst par arvien lielāku problēmu.

Lai gan slimība ir plaši izplatīta pasaulei, tomēr dažādās valstīs izdalītā *A. apis* atšķirības ir ļoti maz izpētītas. Taizemē, Izraēlā un Vācijā sastopamās dzimtas nav salīdzinātas neauglības, morfoloģijas un bioķīmisko īpašību aspektos.

Kā liecina literatūras dati, pasaule tiek veikti pētījumi par mikroorganismu, baktēriju un sēņu nomākšanas īpašībām *in vitro*. *In vivo* eksperimenti ar sēnīšu antagonistiem pašreiz notiek Francijā (M.Gilliam 1990). Līdzīgi eksperimenti ar baktērijām vai to metabolītiem vēl līdz šim nav veikti. Mēs esam izdalījuši *Bacillus* sp., kas ir spējīgs nomākt *A. apis* augšanu *in vitro* un *in vivo*. *Bacillus* sp. izdalīšana, kā arī citu pētnieku iegūtie rezultāti, strādājot ar līdzīgām baktērijām un pelējuma sēnītem rada iespēju perspektīvai bioloģisku apkarošanas līdzekļu izstrādei.

Dažādi faktori (temperatūras izmaiņas, palielināts mitrums) rada priekšnoteikumus kaļķu Peru infekcijai. Citu bišu slimību ierosinātāju (*Nosema apis* un vīrusi) nozīme slimības attīstībā vēl tomēr nav pietiekami skaidra, tāpēc svarīgi turpināt pētījumus par sakarību starp šiem mikroorganismiem un *A. apis*.

## 5.2. MATERIĀLS UN METODES

### 5.2.1. *A. apis* bioloģiskā nomākšana

#### 5.2.1.1. *In vitro*

##### 5.2.1.1.1. Dravu izvēle nolūkā pētīt baktērijas, kurām piemīt *A. apis* nomākšanas īpašība

Apsekotas divdesmit dravas dažādās vietās Izraēlā, lai identificētu inficētos stropus ar dažādu inficēšanās pakāpi. Septiņās dravās atradās gan inficēti, gan neinficēti stropi. Katrā dravā tika ņemti paraugi no 5 klīniski neinficētiem un 5 klīniski inficētiem stropiem 3 līdz 5 dienam veciem periem. No katras stropa laboratoriski izmeklēti 20 peri. Kopā izmeklēti 1400 Peru (35 inficēti un 35 neinficēti stropi). *A. apis* infekcija konstatēta ar mikoloģiskajām metodēm.

Peri, kuriem nebija klīnisko *A. apis* infekcijas pazīmju, bakterioloģiski izmeklēti, lai izdalītu baktērijas ar antifungālām īpašībām. Peri tika iegremdēti 70% alkoholā uz 1 minūti un tad ar gaisu nožāvēti. Katru Peru sasmalcināja un uzsēja uz barojošā agarā, asins agarā, Makkonki agarā (McConkey) un Saburo dekstrozes agarā (SDA). Agara plates (izņemot SDA plati) pēc tam ievietoja inkubatorā uz 48 stundām 37°C temperatūrā, SDA plates turēja 7 dienas 28°C temperatūrā. Visas kultūras pārbaudīja katru dienu. No periem izdalītās baktērijas audzēja barojošā agarā un turēja tālākai izmeklēšanai 4°C temperatūrā.

#### 5.2.1.1.2. Nomākšanas darbība

Baktēriju iedarbība izvērtēta uz 6 Izraēlas, 1 Taizemes un 3 Vācijas *A. apis* celmiem, kuri izdalīti no dažādu medus bišu (*Apis mellifera*) dravām un viena celma, kurš izdalīts no Izraēlas kamenes (*Bombus terrestris*). Tika pētītas sēnītes bezdzimuma un dzimuma (sporu veidošanas) stadijas.

Lai izvērtētu celma iedarbības modeli tiešā kontaktā ar sēnīti, vai arī vielmaiņas produktu difūziju, *Bacillus* sp. tika vienmērīgi izsmērēts ar sterilu vati uz SDA plates. Plati pēc tam ievietoja inkubatorā 28°C temperatūrā uz 7 dienām, pēc tam agaru apgāza citā sterilā Petri traukā, atklājot neuzsēto virsmu. Šo virsmu sterilizēja ar UV starojumu (20 Biohazard Laminar Flow ierīcē). Pēc tam 0,5 x 0,5 cm izmēra *A. apis* kultūru uzlika uz atklātās virsmas. Līdzīgi rīkojāmies arī ar SDA platēm, bet plates bez baktēriju uzsējuma kalpoja par kontroli.

Lai izpētītu vai izolētās kultūras iedarbība uz *A. apis* ir mikostatiska vai mikocīdiska, sēnīte tika pakļauta baktēriju iedarbībai 3, 5 vai 7 dienas. Pēc tam izolētās *A. apis* kultūras pārvietoja uz SDA platēm, ievietota inkubatorā 28°C temperatūrā un katru dienu izmeklēja uz sēnītes augšanu.

Papildus augstākminētajiem eksperimentiem tika izvērtēta baktērijas tiesā iedarbība uz *A. apis* Peru kāpuriem (iespējamā nomākšanas iedarbības dezaktivācija Peru sadalīšanās iespaidā). Izraēlas 6 dravās ķemtie Peru paraugi, inficēti ar sēnītes dzimuma stadiju (melno) vai bezdzimuma stadiju (balto), tika sadalīti divās daļās. Vienu daļu novietoja uz apgāztām SDA platēm, kas sagatavotas augstākminētajā veidā, turpretī otrā daļa tika novietota uz parastas SDA plates.

Divas izdalītās baktērijas, kuras uzrādīja stiprāko pretsēnīšu iedarbību tika izvēlētas tālākai izpētei. Lai izvairītos no turpmākajām izmaiņām izdalīto kultūru pretsēnīšu iedarbībā celmus liofilizēja.

Četrpadsmit Taizemē izdalītie *Bacillus* sp. celmi uzrādīja *A. apis* nomācošu iedarbību. Tālākajiem pētījumiem tika izvēlēts *A. apis* nomākšanas iedarbībā visaktīvākais celms. Bez tam izvērtēja šī celma *in vitro* un Izraēlā izdalītās kultūras nomākšanas iedarbību uz *A. apis* 4 Izraēlā un 4 Taizemē izdalītajām kultūrām.

#### 5.2.1.1.3. Baktēriju raksturojums

Viena no Izraēlā un Taizemē izdalītām *Bacillus* sp. kultūrām tika izmeklēta ar gāzes hromatogrāfu (MIDI system). Tikai Izraēlā izdalīto kultūru varēja identificēt (vidējā varbūtības līmenī) un tāpēc identifikācija veikta tikai attiecībā uz šo izolēto kultūru. Tālākie mēģinājumi identificēt izolētās kultūras sugu veikti pielietojot API 50 CHB un Biolog sistēmas.

Iespējams, ka *Bacillus* sp. izdalītās kultūras radītie bakteriocīni ir plazmīdu izraisīti. Izraēlas celms tika pārbaudīts uz ārpus hromosomu ģenētisko materiālu ar Birnboina metodi. *Bacillus* sp. izdalītās kultūras uzņēmība tika izvērtēta ar standartmetodi.

## **5.2.1.2 Izraēlā izdalītās *Bacillus* sp. kultūras iedarbības izvērtējums uz *A. apis* medus bišu saimēs *in vivo***

### **5.2.1.2.1 Veseli bišu cirmeņi**

Pirmajā izmēģinājumā *Bacillus* sp. suspensija ( $10^5$  CFU) un 20 ml destilētā ūdens ( $5 \times 10^6$  CFU/ml) daudzumu ar mikropipeti uzpilināja uz 150 bišu cirmeņiem 3-4 dienu vecumā. Veseli bišu cirmeņi kalpoja kā negatīvā kontroles grupa. Uz rāmīša novietoja caurspīdīgu plastikātu, tādejādi iezīmējot cirmeņus, kurus pārbaudīja vienu reizi divās dienās.

### **5.2.1.2.2. Ar *A. apis* inficēto stropu apstrāde ar izsmidzināšanu**

Kimrona Veterinārajā institūtā deviņus dabīgi ar *A. apis* inficētus stropus sadalīja divās grupās. Piecus stropus apstrādāja ar *Bacillus* sp., bet četri kalpoja kontrolei. Liofilizētā *Bacillus* sp. rehidratāciju un baktēriju dzīvotspēju novērtēja ar koloniju skaitu. *Bacillus* sp. suspensiju atšķaidīja ar 50 ml destilētā ūdens ( $4 \times 10^4$  CFU/ml). Šo suspensiju izsmidzināja uz stropu kārēm, šūnām un bitēm. Kontroles grupā izsmidzināja tikai ekvivalentu destilēta ūdens daudzumu. Izsmidzināšanu veica 1., 7., 14. un 21. eksperimenta dienā.

### **5.2.1.2.3. Ar *A. apis* inficēto stropu apstrāde ar piebarošanu**

Eksperiments veikts 1996. gada maija - jūnijs mēnešos (1. izmēģinājums).

Kimrona Veterinārā institūta 14 dabīgi inficētus ar *A. apis* stropus sadalīja divās grupās - 7 stropos pielietoja piebarošanu, bet 7 stropi kalpoja kā kontroles grupa. Liofilizētā *Bacillus* sp. suspensija un 1000 ml 60% cukura šķīdums ( $4 \times 10^4$  CFU/ml) veidoja galīgo šķidrumu. Līdzīgi kā iepriekšējā izmēģinājumā *Bacillus* sp. rehidratāciju un baktēriju dzīvotspēju novērtēja ar koloniju skaitu. Suspensiju ievietoja plastmasas maisiņā, kam bija 25 atveres 18. izmēra šķirces adatas lielumā. Plastmasas maisiņu novietoja virs kārēm. Bišu kolonijām izbaroja šo suspensiju 1., 7., 14. un 21 eksperimenta dienā. Kontroles grupā izbaroja līdzīgu cukura šķīduma daudzumu. Eksperimentu atkārtoja 1997. gadā (2. izmēģinājums). Bišu saimes apstrādātas 4 reizes ar 10 dienu intervālu un pārbaudītas eksperimenta sākumā, tad 3., 6. un 7. nedēļā pēc pirmās apstrādes. Otrajā eksperimentā papildus noteica bišu skaitu kolonijās, kā arī inficēto rāmīšu skaitu.

### **5.2.1.2.4. Iegūto rezultātu novērtējums**

Bišu kolonijas izmeklēja klīniski un noteica kopējo mūmiju skaitu saimē, kuras izskaitīja pirms pirmās apstrādes, 21., 42. un 63. dienā.

Papildus klīniskajiem izmeklējumiem brīvi izvēlētos 50 cirmeņus pārvietoja Elisa platēs (6.attēls) un inkubēja  $35^{\circ}\text{C}$  līdz tie iekūņojas. Peri, kuri attīstījās kūniņas stadijā bija veseli, bet pēc inficēšanas ar *A. apis* novēroja micēlija veidošanos priekškūniņas ķermenī (7. attēls). Būtiskas atšķirības starp apstrādātajam un neapstrādātajām saimēm tika analizētas ar  $\chi^2$  testu.

## **5.2.2. Taizemē, Vācijā un Izraēlā izdalītā *A. apis* raksturojums**

### **5.2.2.1. Fermentatīvais raksturojums**

Dažādās valstīs iegūtā *A. apis* augšanas tempa un augošo celmu uzvedības izpēte (2 celmi no Vācijas, 1 celms no Izraēlas un 1 no Taizemes).

Dažādu *A. apis* celmu sievišķie un vīrišķie micēliji tika audzēti atsevišķi. Izolēto kultūru bioķīmiskie raksturojumi tika izvērtēti, pētot 18 dažādu fermentu klātbūtni un titru ar API ZYM diagnostikumu:

Izmēģinājumus veica atsevišķiem dzimumiem un sapārotiem micēlijiem. Tika izmeklēti trīs izofermenti (esterāze, leicīns, aminopeptidāze) un skābā fosfotāze. To veica, atdalot proteīnu 10% dabīgā akril-amid-gelā un pēc tam iekrāsojot. Tomēr novēroja tikai dažas proteīna saites. Tādejādi labākai proteīna atdalīšanai piemēroja izolektrisko fokusēšanu.

API ZYM fermentu tests parādīja, ka šī metode ir piemērota testēšanas materiāla izvērtēšanai dažādiem fermentiem.

*A. apis* celmu izofermentu raksturojums precīzēts ar izolektriskās fokusēšanas (IEF) rezultātā iegūto zimogrammu palīdzību. Visu sēņu celmu micēliji un sporas tika savāktas un homogenizētas. Cietās daļījas no homogenizētās masas atdalītas ar centrifugēšanu zemā temperatūrā. Pēc proteīna koncentrācijas noteikšanas, dažādas izolētās kultūras saturotie šķīdumi tika uzlikti uz amfolīna fokusēšanas gēla, kura pH fokusēšanas diapazons ir no 4.0 – 6.5. Fokusēšana ilga trīs stundas un tad fermentus individuāli identificēja pēc specifiskām krāsu reakcijām. Iepriekšējie testi parādīja, ka esterāzes pārbaude ir pielietojama celmu atšķiršanai ar dažādiem saišu modeļiem.

### **5.2.2.2. Pārošanas eksperimenti**

*A. apis* ir sēnīte, kurai ir dzimuma stadija. Tādēļ var testēt hibridizācijas spēju, lai pārbaudītu vai dažādas izcelsmes *A. apis* celmu dzimumi ir savienojami. Nepāroti, sākotnēji 12 dažādu celmu micēliji tika kultivēti atsevišķi un identificēti ar mīnus nepārotu celmu. Dažāda dzimuma micēliji tika klasificēti kā pārošanas tips(+) un pārošanas tips(-). Pārošanās spēju noteica Petri traukos. Pārošanās tips tika noteikts balstoties uz *A. apis* sporu lodīšu attīstību.

### **5.2.2.3. Virulences tests**

Bišu peri inficējas ar dažādiem sēnīšu celmiem. Perus kultivēja inkubatorā saskaņā ar Rembolta metodi. Perus pārvietoja no šūnām uz mākslīgām šūnām L2 līdz L3 vecuma stadijā. Perus baroja un viņu augšana kontrolēta ar regulāriem intervāliem. No L3 līdz L4 vecuma stadijās perus baroja ar barību, kas inficēta ar noteiktu daudzumu *A. apis* sporu. Piecas sporu koncentrācijas ( 10 līdz  $10^5$  uz ml ) tika pielietotas kā barības šķīdumi. Pēc iekūnošanās, peru attīstība tika periodiski pārbaudīta. Balstoties uz šiem novērojumiem aprēķināta letālā deva (LD50).

### **5.2.2.4. Saimes dinamika**

Tika novērotas trīsdesmit ar kaļķu Peru infekciju aptvertas kolonijas ( 3 dravās). Šajā nolūkā piemērota Libefeldā (Šveice) izstrādātā aprēķina metode. Šī metode, kas balstās uz vienas atsevišķas medus kāres bišu skaita aprēķina un aizvākoto un neaizvākoto Peru telpu izmēriem, ir diezgan sarežģīta, bet nodrošina ļoti precīzu lielumu iegūšanu. Šādus aprēķinus veica 4 reizes gadā.

### **5.2.3. Saimnieka (*A. mellifera*) un parazīta (*A. apis*) savstarpējās attiecības**

#### **5.2.3.1. Tetraciklīna pielietošanas ietekme uz *A. mellifera* uzņēmību pret *A. apis* infekciju**

Četras L4 vecuma stadijas Peru grupas tika ārstētas šādi:

- a)  $5 \times 10^5$  *A. apis* sporas ievietotas šķīdumā, kas sastāv no 1% glikozes un 1% rauga ekstrakta destilētā ūdenī.
- b) 0.005% oksitetraciklīna (OT) tika pievienots iepriekš sagatavotajai barībai.
- c) Šķīdums, kas sastāv no 1% rauga ekstrakta destilētā ūdenī.
- d) Šķīdums, kas sastāv no 1% glikozes un 1% rauga ekstrakta destilētā ūdenī ar 0.005% OT.
- e) Piekta grupa kalpoja par neārstētu Peru kontroles grupu un tika barota kā parasti bez piedevām.

Visiem periem izbaroja 10 ml šķīduma. Pirms un pēc ēdināšanas peri tika turēti  $33^{\circ}\text{C}$ , 80% relatīvā mitruma apstākļos, lai nodrošinātu to, ka tie ir izēduši iepriekš doto barību un varēs tās lielāko daļu sagremot, pirms tie tiks nogādāti atpakaļ uz Peru izcelsmes saimi. Šūnas novērotas 3 dienas pēc to aizzīmogošanas ar vasku. Attīstības stadijā, kad parādās baltacainas kūniņas, peri tika uzskatīti kā neinficēti ar kaļķu Peru infekciju. Veica četras secīgus eksperimentu atkārtojumus.

## **5.3. PĒTĪJUMU REZULTĀTI**

### **5.3.1. *A. apis* bioloģiska nomākšana**

#### **5.3.1.1. *In vitro***

##### **5.3.1.1.1. Dravu apsekošana nolūkā izdalīt baktērijas ar nomākšanas iedarbību uz *A. apis*.**

Daži baktēriju celmi, kas izdalīti no veseliem bišu periem Izraēlā un Taizemē uzrādīja nomākšanas ietekmi *in vitro* uz *A. apis* augšanu. Tika izvēlti visaktīvākie celmi eksperimentiem *in vivo* (8.attēls).

##### **5.3.1.1.2. Izdalīto kultūru iedarbības novērtējums *in vitro***

*A. apis* augšana uz testēšanas platēm tika pilnībā nomākta, turpretī novērota normāla sēnītes augšana uz kontroles platēm (9.-12.attēls). Sēnītes augšanu nomāca *Bacillus* sp. difūzijas vielmaiņas produkti (13.-14.attēls). Visas izdalītās *A. apis* kultūras auga normāli pēc to pārvietošanas uz SDA platēm, kuras nebija pakļautas baktērijas iedarbībai. *Bacillus* sp. radīto nomākšanas ietekmi uz sēnītes augšanu neiespaidoja sadalīšanās procesā esošo Peru klātbūtni.

### **5.3.1.1.3. Baktēriju raksturojums**

MIDI sistēmā: Izraēlā izdalītās baktērijas raksturojums ir līdzīgs *Bacillus amyloliquefaciens* (ar varbūtību 99%) , turpretī Taizemes analogu nevar kaut cik nozīmīgā mērā attiecināt uz nevienu no sistēmas datu bāzē ietvertajām baktērijām. Līdzības indekss, kas ir augstāks par 0.5 tiek uzskatīts par pozitīvu identifikācijas rādītāju. Izraēlā izdalītās kultūras indekss bija 0.457, bet Taizemes celmam – 0.156.

BIOLOG sistēmā: Izraēlā izolētā celma kultūras identifikācijas līdzības indekss *B. amyloliquefaciens* bija 0.326.

API 50 CHB sistēmā: Izdalītā kultūra tika identificēta pēc 48 stundu ilga inkubācijas perioda “loti labā identifikācijas “ līmenī (%ID=99%, T=0.71) kā *B. licheniformis*. Vienīgais ar pretēju iedarbību bija ureāzes tests, kas bija gan pozitīvs, bet tikai *B. licheniformis* celmam 3% gadījumos.

Pētījumos netika konstatētas nekādas plazmīdu klātbūtnes pazīmes.

Tika atklāts, ka izdalītā kultūra ir uzņēmīga pret penicilīnu, ampicilīnu, cefalotīnu, amoksicilīnu, klavulanikskābi, sulfanilamīdiem ar un bez trimetoprima, tetraciklīniem, ciprofloksacīnu, gentamicīnu un streptomicīnu. Izolētā kultūra bija izturīga pret cefotaksīnu.

Gan Izraēlā, gan Taizemē izdalītā *Bacillus* sp. kultūra nomāca visus *A. apis* celmus neatkarīgi no sēnītes izcelsmes valsts.

### **5.3.1.2. *In vivo*: Izraēlā izdalītās *Bacillus* sp. kultūras iedarbības izvērtējums ar *A. apis* medus bišu kolonijās**

#### **5.3.1.2.1. Izraēla**

##### **5.3.1.2.1.1. Veselīgi bišu peri**

Netika novērotas nekādas atšķirības starp eksperimentālajām un kontroles grupām. Šī eksperimenta rezultāti tika apstiprināti, tos divas reizes atkārtojot un piemērojot vislielāko *Bacillus* sp. suspensijas koncentrāciju. Rezultāti atspoguļoti 1.tabulā.

##### **5.3.1.2.1.2. Ar *A. apis* inficēto stropu ārstēšana pielietojot izsmidzināšanu**

Klīnisko izmeklējumu rezultāti un mūmiju kopskaits norāda, ka apstrādātajos stropos infekcijas līmenis samazinās, turpretī nav nekādu izmaiņu kontroles stropos (2.tabula un 1. grafiks). Pirms stropu apstrādes vidējais inficēto Peru kopskaits liecināja par līdzīgu inficēšanās līmeni abās grupās, taču eksperimenta beigās (9 nedēļas) apstrādātajās grupās vidējais kopskaits samazinājās un sastādīja tikai 41,4% no kontroles grupas inficēto Peru kopskaita. Interesanti atzīmēt, ka pēc 4 nedēļām, īslaicīgs infekcijas līmeņa samazinājums bija novērojams abās grupās (2.tabula un 1.grafiks). Tas varētu būt tādēļ, ka izsmidzināšana ir stimulējusi bites labāk attīrīt stropus kaļķu periem (stimulē tīrīšanas uzvedību).

ELISA plašu baktēriju kopskaits apstiprina klīniskos rezultātus, ka laikā, kad infekcijas līmenis apstrādātajā grupā samazinājās, tas palielinājās kontroles grupā (3.tabula un 2. grafiks). Atšķirības 4., 6. un 9 nedēļās bija statistiski ticamas. Statistiskā ticamība laika gaitā palielinājās (3.tabula un 2. grafiks), norādot, ka apstrādes efektivitāte nesamazinās vismaz 5 nedēļas pēc *Bacillus* sp. pielietošanas.

Īslaicīgs samazinājums pēc 4 nedēļām tika novērots tiešā veidā izmeklējot stropu, ko nevarēja konstatēt ELISA platēs, tādejādi apstiprinās pieņēmums, ka šīs parādības cēlonis ir attiecināms uz bišu tīrīšanas uzvedības stimulēšanu.

### **5.3.1.2.1.3. Bišu saimju piebarošana**

#### **1.sērija**

Klīnisko izmeklējumu rezultāti un mūmiju kopskaits norāda, ka infekcijas līmeņi bija līdzīgi eksperimenta sākumā, bet tie samazinājās apstrādātajos stropos un palielinājās kontroles stropos (4.tabula un 3. grafiks).

*Bacillus sp.* nomākšanas iedarbība uz *A. apis* izraisīto infekciju tika apstiprināta ar ELISA plates baktēriju kopskaitu (5.tabula un 4. grafiks). Atšķirības starp apstrādātās un kontroles grupas baktēriju kopskaitu bija statistiski nozīmīgas ( $p<0.001$ ) visos novērojumu punktos.

#### **2.sērija**

Šo eksperimentu rezultāti sniegti 6.tabulā un 5.-8. grafiki. Novērojumu t-testa analīzes norāda, ka nav nekādu atšķirību starp kontroles un eksperimentālo grupu izmēģinājuma sākumā.

Pēc trīs nedēļām pēc pirmās apstrādes tika novērots nozīmīgs mūmiju skaita un inficēto peru procentuālais samazinājums. Apdzīvoto šūnu skaita izmaiņas un inficēto kāru procents bija nenozīmīgs.

Pēc sešām nedēļām pēc pirmās apstrādes visi parametri parādīja nozīmīgas izmaiņas: apdzīvoto šūnu skaits palielinājās ( $p<0.01$ ), turpretī mūmiju skaits un inficēto peru skaits samazinājās ( $p<0.01$ ), kā arī % samazinājās inficēto kāru skaits ( $p<0.05$ ).

Pēc septiņām nedēļām pēc pirmās apstrādes mūmiju skaits un inficēto peru procents apstrādātajā grupā bija attiecīgi 27.36 un 14.45%, turpretī kontroles grupās šie lielumi bija attiecīgi 67 un 31.9%. Abos gadījumos atšķirības starp 2 grupām bija būtiskas ( $p<0.01$ ). Inficēto kāru procentuālais samazinājums bija statistiski ticams ( $P<0.01$ ). Lai gan apdzīvoto šūnu skaits abās grupās samazinājās, apstrādātajā grupā bišu populācija bija ievērojami lielāka ( $p<0.01$ ).

### **5.3.1.2.3. Taizeme**

#### **1. sērija**

Inficēto peru procents eksperimentālajā grupā atspoguļots 7. tabulā un 9. grafikā. Peru inficēšanās apjoms tika aprēķināts no brīvi izvēlēta parauga, ko veidoja 48 peri no katras stropa. Izmeklējumu atkārtojumi tika izdarīti secīgi dažādos stropos trīs mēnešu periodā.

Pielietojot Chi<sup>2</sup> testu ( $\alpha = 0.1\%$ ) apstrādātajās un kontroles grupās konstatēja ievērojamas atšķirības infekcijas izplatībā starp apstrādātām un kontroles grupām katrai atkārtojumā. Salīdzinot atsevišķus apstrādāto un kontroles grupu stropus tikai 2 no 9 stropiem apstrādājamā grupā nebija ievērojamu atšķirību salīdzinājumā ar kontroles stropiem (Chi<sup>2</sup>  $\alpha = 5\%$ ; 1. apstrādājamā grupa , atkārtojums 1C; 2B; 2.apstrādājamā grupa, atkārtojums 2B; 3C). Nebija novērojamas arī atšķirības divās apstrādājamās grupās (Chi<sup>2</sup>  $\alpha = 5\%$ ).

1.sērija skaidri parāda, ka bakterioloģiskā apstrāde samazina Peru inficēšanos ar kaļķu Peru infekciju par aptuveni 50%. Mākslīgi inficējot (izbarojot *A. apis* sporas pieaugušajām bitēm), kontroles stropos bojā aizgāja 43% Peru.

## 2. sērija

Peru inficēšanās procents atspoguļots 8.tabulā. Peru inficēšanās apmērs 2.sērijā aprēķināts no nejauši izvēlēta parauga, kuru veidoja 40 peri no katra stropa.

Atšķirība starp apstrādājamo un kontroles stropu ir ļoti ievērojama ( $\text{Chi}^2 \alpha = 0.1\%$ , U-tests  $\alpha = 0.1\%$ ). Otrs izmēģinājums apstiprināja pirmā izmēģinājuma rezultātus par ievērojami augstāku inficēšanas līmeni, kas tika eksperimentāli izraisīts, izbarojot *A. apis* sporas pieaugušajām bitēm. Ja pirmajā izmēģinājumā (martā - maijā) sporu izbarošana izraisīja vidēji 34.5% peru inficēšanu, tad 2.sērijā kontroles grupā vidēji 64% bišu peri bija inficēti. 2.sērijas eksperimenti apstiprināja, ka biopreparāta šķīduma izbarošana ir pietiekoša kaļķu peru infekcijas ievērojamai samazināšanai *Apis mellifera* stropos.

### 5.3.4. Taizemē, Vācijā un Izraēlā izdalītā *A. apis* raksturojums

Augšanas temps: Lielākās atšķirības var konstatēt pie pH 6. Īpaši ievērojamas atšķirības tika konstatētas *A. apis* Izraēlas celmā, kas auga visātrāk, tam sekoja Taizemē un Vācijā izdalītās kultūras.

#### 5.3.4.1. Fermentatīvais raksturojums

Atšķirības izdalītajās kultūrās konstatēja 9 fermentiem: esterāzei, lipāzei, leicīnarilamidāzei, valīnarilamidāzei, naftol-AS-BI-fosfohidrolāzei,  $\beta$  glikozidāzei un N-acetil- $\beta$ -glikozaminidāzei. Visnozīmīgākās atšķirības konstatētas attiecībā uz īpaši zemo Izraēlas celma titru  $\beta$  glikozidāzei un N-acetil- $\beta$ -glikozaminidāzei un Taizemes celmam - cistīnarilamidāzei un N-acetil- $\beta$ -glikozaminidāzei, tos salīdzinot ar Vācijas celmiem.

Izoelektriskās fokusēšanas raudze atklāja, ka izofерmenta leicina un aminopeptidāzes proteīna saites ir identiskas visos izmeklētajos celmos. Minimālās atšķirības bija sārmainajai fosfotāzei. Esterāzēs tika novēroti dažādi proteīna modeļi. Šīs atšķirības tika konstatētas ne tikai Vācijas un Taizemes celmiem, bet arī starp Vācijas celmiem. Jāatzīmē, ka Izraēlas celmiem, dažu atsevišķu sēnīšu celmu proteīna modeļi līdzinājās Taizemes un Vācijas analogiem.

Teleomorfu fermentu modeļi arī bija diezgan līdzīgi. Tomēr, kad tika salīdzināti anamorfi un teleomorfi fermentu modeļi, varēja redzēt skaidras atšķirības: ja teleomorfs radīja lipāzes, tad anamorfs to nedarīja. Un otrādi - anamorfs un nevis teleomorfs veidoja valīnarilamidāzi.

Šie rezultāti apstiprināja M. Džiliama (M. Gilliam, 1983) pētījumus, ka valīnarilamidāze ir labākais markieris *A. apis* micēliju formu noteikšanai.  $\beta$ -galaktonizidāzes un  $\alpha$ -mannozidāzes, kuras veidoja visi pētītie celmi un lielākā daļa autoru (Alonso et al., 1993; Lorenz, 1993) uzskata, ka pētītie celmi arī var kalpot kā markējamie fermenti *A. apis* atšķiršanai no citām medus bišu pelējuma sēnītēm, tā kā šos fermentus veido tikai dažas hyphomycetes sēnīšu grupas, kuras atrodas stropā.

Pētot dažādo izdalīto kultūru izofermentu īpašības var novērot 3-6 saites tās fokusējot šaurā skābes diapazonā. Divas augstas koncentrācijas proteīna saites bija redzamas katrā izdalītā kultūrā. Visus variantus varēja identificēt ar papildu saišu palīdzību, kas markētas ar A, B un C esterāzēm.

Polimorfās pamatgrupas daļēji klasificētas nēmot vērā to, ka saišu modeļos bija nelielas atšķirības. Tā piemēram, galvenajā A grupā dominēja 2 saites. Divās izdalītajās kultūrās tomēr bija 4 saites ar nelielām izmaiņām papildsaitēs (B1, B2, B3). Galvenā C grupa atšķirās no šī modeļa. Tajā nebija vai arī tika novērotas nelielas izmaiņas dažādu celmu līdzīgo reģionu saišu modelī - līdzīgi visiem Dienvidvācijas celmiem. Šie celmi savukārt bija ļoti līdzīgi visiem Ziemeļtaizemes celmiem.

Dažādu *A. apis* celmu esterāzes izofermentu modeļu polimorfismu var klasificēt 3 galvenajās grupās. Zimogrammu atšķirības parādīja, ka minētā metode ir piemērota *A. apis* individuālu celmu diferenciācijai.

#### 5.3.4.2. Pārošanas eksperimenti

Izmeklējumi parādīja, ka visu testēto *A. apis* celmu atšķirīgie dzimumi bija spējīgi pāroties. Šie rezultāti apstiprina M. Džiliama (M. Gilliam, 1983) iegūtos rezultātus attiecībā uz *A. apis* celmiem, kas iegūti Eiropā un Ziemeļamerikā.

#### 5.3.5. Saimnieka (*Apis mellifera*) un parazīta (*A. apis*) savstarpējās attiecības

##### 5.3.5.1. Virulences raudze

LD50 lielums svārstījās no 136 sporām "Taizeme 3" celmā līdz 1144 "Dienvidvācija 1" celmā. Šī atšķirība bija nozīmīga 5% līmenī (PROC Probit-analīze). Kopumā Taizemes *A. apis* celmu virulencei ir tendence pārsniegt pārējos celmus. LD50 lielumi celmiem "Izraēla" un "Ziemeļvācija 2" bija tuvu visiem Taizemes celmu LD50 lielumiem (9.tabula).

Pārsteidzoši, ka LD50 lielumi Vācijas celmiem diezgan ievērojami atšķirās viens no otra, turpretī LD50 lielumi Taizemes celmiem, kuru izcelsme bija dažādas dravas, bet vienā reģionā, bija līdzīgi.

##### 5.3.5.2. Tetraciklīna pielietošanas iedarbība uz *Apis mellifera* uzņēmību pret *A. apis* radīto infekciju

Augstāka Peru bojāeja grupā B (sporas+OT) sastādīja 25%-36%, bet grupā A (tikai sporas) - 12%-26.7%. Peru bojāeja kontroles grupās bija zemāka par 10%. Eksperimenta detalizēti rezultāti sniegti 24.tabulā. Rezultātu statistiskā analīze ( $\chi^2$ ) norāda uz nozīmīgām atšķirībām ( $P<0.0001$ ) starp grupu, kas radīja tikai sporas un grupu, kas radīja sporas un OT. Bez tam nozīmīgas atšķirības tika konstatētas starp šīm divām grupām un kontroles grupām.

### 5.4. DISKUSIJA

Pētījuma galvenais mērķis bija izstrādāt biopreparātu *A. apis* izraisītai bišu kaļķu Peru slimības apkarošanai. To sasniedzām, izolējot *Bacillus* sp. ar antifungālām īpašībām. Pētījumi pierādīja, ka šo preparātu var sekmīgi izmantot kā praktisku antifungālu līdzekli dabīgos apstākļos. Iegūtie rezultāti parāda, ka *Bacillus* sp. antifungālā iedarbība ir augsti efektīva dažādos klimatiskos un epidemioloģiskos apstākļos trīs dažādās valstīs divos kontinentos, kā arī atšķirīgas biškopības saimniekošanas praksē: Izraēlā, Taizemē, Vācijā. Terapijas metode bija vienādi efektīva pret ģenētiski dažādiem *A. apis* celmiem.

Izmantot mikroorganismus kaļķu Peru slimības ierobežošanai ir mēginājuši vairāki pētnieki (Gilliam, 1978; 1990; Gilliam et al., 1978). Tomēr, neraugoties uz to, ka no stropiem un medus bitēm tika izolēti un pārbaudīti gandrīz tūkstotis dažādu mikroorganismu, neviens mikroorganismi nav bijis efektīvs pret slimības ierosinātāju dabīgos apstākļos (Heath, 1982, u.c.).

Mūsu darbs ir pirmsais un līdz šim vienīgais, kurā izstrādāta efektīva kaļķu Peru ārstēšana ar bioloģisku metodi. Mikroorganismu izmantošana sēnēšu slimību apkarošanai ir aprakstīta tikai augiem (Howarth, 1991; Gibert et al., 1991; Osburn et al., 1995; Cook, 1993; Limsden et al., 1995).

Mūsu bioloģiskās apkarošanas metodes galvenā īpatnība ir *Bacillus* sp. mikroorganisma nomācošā iedarbība uz *A. apis*. Pēc tam, kad bija izolēti vairāki *Bacillus* mikroorganismu celmi ar iedarbību pret *A. apis in vitro*, tika izvēlēts aktīvākais celms eksperimentam *in vivo*. Šī izolāta identificēšanai, lai noteiktu lipīdu raksturīgo spektru, tika izmantota gāzes hromatogrāfijas analīze. Turpmākā aktīvāka celma identifikācija veikta ar API 50 CHB (Goor et al., 1984) un Biolog sistēmām (Bochner et al., 1996), kas diferencē dažādas mikroorganismu sugas pēc fermentu darbības raksturīgā spektra. Rezultātā bija iespējams noteikt izvēlēto mikroorganisma celmu kā grampozitīvu *Bacillus* sp., kas ir ļoti tuva (ar 99 % identifikācijas līmeni), bet ne identiska *Bacillus amyloliquefaciens*. Tika konstatēts, ka sugas antifungālā darbība nav plazmīdu izcelsmes un ir, acīmredzami, stabili pārmantota ar hromosomām. Vairums līdz šim zināmās antifungālās antibiotikas ir episomāli kodētas (Murray et al., 1999). Stabilā, hromosomālā iedzīmība ir ļoti vēlama īpašība, kas izpaužas vairošanās procesā medus bišu stropā. Šī celma ģenētiskā stabilitāte ir priekšnosacījums jebkurai plaša mēroga fermentācijai. Tas nepieciešams jaunā biopreparāta izstrādāšanai un potenciālai rūpnieciskai ražošanai. Nesen, augu sēnīšu slimību ārstēšana pārliecinoši pierādīta izmantojot *Bacillus thuringiensis* (Powell un Jutsum, 1993), *Bacillus subtilis* (Turner un Backman, 1991) un *Bacillus cereus* (Osburn et al., 1995; Handelsman et al., 1990; He et al., 1994).

*Bacillus* sp. celmu saturoša biopreparāta rūpniecisku ražošanu nodrošina tā spēja veidot pret karstumu un izķūšanu izturīgas sporas. Tā ir šī preparāta papildus priekšrocība, kas nepiemīt nesporulējošām gramnegatīvām baktērijām, piemēram, tādam kā *Pseudomonas* sugas (Slininger et al., 1996). Vienīgais veids, kā *Pseudomonas* baktērijas var izmantot kā preparātu ir sasaldēti zirnīši, kas jāuzglabā uz sausā ledus līdz aplikācijai.

Daudzu gadu laikā ir uzkrāta ražošanas pieredze un izveidots zināms pamats darbā ar *Bacillus* sugām, kuras izmantotas insektu nomākšanai, rūpnieciskai enzīmu un antibiotiku ražošanai. Šo pieredzi var izmantot tās pašas ģints pārstāvju nomākšanai, lai pārvarētu iespējamos šķēršļus sekmīgā fermentācijā, izveidošanā un uzglabāšanā. Daži no organizmiem ir bijuši daudzu pētījumu subjekts ģenētikas un bioķīmijas līmenī, veidojot pamatu ārstniecisko līdzekļu pētīšanai. Zinātnieki mazāku uzmanību pievērsuši grampozitīvām baktērijām biopreparātu izstrādē salīdzinājumā ar fluorescentām pseidomonām. Tas ir daļēji tāpēc, ka grampozitīvie organismi ir bijuši mazāk izsekojami ģenētiskiem pētījumiem un ir mazāk zināms par mehānismiem, ar kuriem tie nomāc slimības ierosinātāju (Handelsman un Stabb, 1996). Tomēr to efektivitāte ir pārsteidzoša. Daudzos pārskatos ir identificētas augsnēs baktēriju *Streptomyces* sp. un *Bacillus* sp. sugas kā iespējamie ārstēšanas līdzekļi (Crawford et al., 1993; Michereff et al., 1994; Korsten et al., 1995; Mari et al., 1996).

Svarīgs faktors, nosakot ārstēšanas efektivitāti ar biopreparātu, ir tās pielietošanas veids (Lumsden et al., 1995). Pētījumā salīdzinātas divas metodes – viena, izsmidzinot stropos liofilizētas *Bacillus* sp. sporas ūdens šķīdumā, un otra – izbarojot sporas cukura šķīdumā vienādā daudzumā. Ja sākumā izsmidzināšanas metode deva labus rezultātus, tad vēlāk ilglaicīgā barošanas metode izrādījās pārāka. Tā, būdama ievērojami mazāk darbietilpīga, labāk pielāgojama dabīgos apstākļos un ir gandrīz tikpat efektīva kā izsmidzināšanas metode. Izdarīts secinājums, ka biškopības praksē izbarošanas pielietošanai jābūt kā izvēles metodei.

Jāatzīmē, ka mūsu pētījumu gaitā bieži novērojām bišu saimes spēka un energijas pieaugumu. Tā varētu būt kā *A. apis* patoģenetiskā efekta nomākšana vai kāda probiotiskā *Bacillus* sp. ietekme uz *Apis mellifera*, vai abi šie faktori. Nesen ir aprakstīta *Bacillus subtilis* (Montesinos et al., 2002) līdzīga iedarbība.

Pētījuma būtisks aspekts ir tā rezultātu plašas ģeogrāfiskās izmantošanas iespējas. Konstatēts, ka pielietotā bioloģiskās ārstēšanas metode bija vienlīdz efektīva dažādos ģeoklimatiskos apstākļos un dažādās biškopības praksēs. Izstrādātais biopreparāts trīs gadus pēc kārtas efektīvi pielietots tik atšķirīgās valstīs - Taizemē, Vācijē un Izraēlā. Metodes vienkāršība dod iespēju to plaši izmantot pasaulē.

Lai iegūtu biopreparāta maksimālu iedarbību, jāizstrādā tā izmantošanas kārtība, kas būtu piemērota epidemioloģiskiem, klimatiskiem apstākļiem un biškopības praksei, kas pastāv noteiktā apvidū. Tāpēc arī pievērsta uzmanība kaļķa Peru epidemioloģiskiem aspektiem Taizemē, Vācijā un Izraēlā. Pētījumos atklāts, ka blakus infekcijas ierosinātāji tādi kā ērces (*Varroa* un *Tropilaelaps*), vīrusi (akūtas paralīzes vīrus) un mikrosporīdijas (*Nosema*) iedarbojas dažādi uz *A. apis* slimības smagumu un terapijas efektivitāti ar *Bacillus* sp.

Vēl viens faktors, kas jāņem vērā, lai ierobežotu ērces, protozojos un bakteriālas Peru slimības, ir plaša akarīcīdu un antibiotiku lietošana. Tās rezultātā, kā noskaidrojās veiktajos eksperimentos Taizemē, ievērojami paaugstinās kāpuru uzņēmība pret kaļķa Peru infekciju. Ērces rada *A. mellifera* ievērojamu stresu, piemēram, barības vielu zudumu, uzbudinājumu forēzes rezultātā, saīsinātu dzīves ilgumu, pārmaiņas uzvedībā sakārā ar Peru zudumu un palielinātām pūlēm šūnu un bišu tīrīšanai.

Jāņem vērā, ka ar bioloģisku apkarošanas metodi ticamus panākumus var sasniegt tikai tad, ja neizbaro antibiotikas. To atzīmē arī citi autori (Goodwin un Van Eaton, 1999; Hansen un Brodsgaard, 1999).

*A. mellifera* saimes pēc to uzņēmības pret kaļķa Peru infekciju ievērojami atšķiras. Uzņēmības dažādību var izskaidrot ar bitēm koeksistējošo baktēriju klātbūtni vai saimes ģenētiskajām īpašībām, vai abējādi.

Bites var selekcionēt ar lielāku nekā vidēju rezistenci pret Peru un ērču slimībām vispār un it īpaši pret kaļķa Peru ifekciju (Spivak un Gilliam, 1998; Boecking un Spivak, 1999; Gilliam et al., 1983; Oldroy, 1996; Thopson, 1994; Palacio et al., 2000).

Eksperimentos konstatējām, ka saimes, kuras intensīvāk aizvāc bojā gājušos perus, ir ievērojami mazāk kaļķa Peru. Tas saskan ar Taber (1982) un Taber un Gilliam (1993) novērojumiem. Ar *A. apis* inficēto kāpuru izvākšana no stropa ir viena no bišu higienas uzvedības funkcijām saimē (Spivak un Gilliam, 1998; Spivak un Downey, 1998; Spivak un Reuter, 1998). Infekcija, kas pārsniedz noteiktu līmeni, novājina saimi, samazina spēju izvākt inficētos kāpurus un tādējādi pasliktina tās stāvokli. Kaut arī ar bioloģiskās ārstēšanas metodi, kā parādīts pētījumā, nevar stropā pilnīgi likvidēt *A. apis* infekciju, tās izmantošana, kas papildināta ar stropa apkopes uzlabošanu un selekcijas pasākumiem, palīdz ievērojami samazināt infekcijas līmeni.

Pētījums atklāja arī līdz šim nezināmu kaļķa Peru slimības patoģēnes aspektu. Rezultāti rāda (5.3.5.6 rezultāti), ka mumificējušos Peru izbarošana ir daudz inficēt spējīgāka, nekā laboratorijā iegūtās *A. apis* sporas. Jauno Peru kontaminācijai ar mumificēto materiālu ir gandrīz momentālas letālas sekas. Saskaņā ar iegūtajiem rezultātiem, stingri iesakām stropus rūpīgi iztīrīt un aizvākt visus beigtos perus, un tikai pēc tam izmantot biopreparātu.

Konstatēts, ka Taizemē, Vācijā un Izraēlā izolēto *A. apis* celmu bioķīmiskās īpašības un virulence ir ievērojami atšķirīga. Līdzīgi rezultāti iegūti ASV (Gilliam, 1996). Neraugoties uz heterogenitāti, visi pārbaudītie celmi uzrādīja aptuveni vienādu jutīgumu pret *Bacillus* sp. antifungālo iedarbību.

Kombinējot bišu rezistences spēju paaugstināšanu ar selekcijas palīdzību un izmantojot *Bacillus* sp. saturošu biopreparātu, var panākt gandrīz pilnīgu kaļķa Peru slimības apkarošanu.

## 6. SECINĀJUMI

1. Sēnītes *Ascospaera apis* izraisītā bišu kaļķa Peru infekcija Izraēlā un citās valstīs ir plaši izplatīta un biškopībā rada ievērojamus ekonomiskus zaudējumus, tāpēc tās apkarošanai ir liela praktiska nozīme.
2. Dažādu autoru veikto pētījumu analīze parāda, ka ķīmisko līdzekļu pielietošana šīs infekcijas apkarošanā nav efektīva un izraisa nevēlamas blakus parādības, tajā skaitā zāļu atliekvielu nokļūšanu medū, vaskā un citos biškopības produktos. Tāpēc izstrādājam jaunu, ērti pielietojamu biopreparātu uz izdalītā *Bacillus* sp. pamata, identificējot kuru, konstatēts, ka ar 99% ticamību tas atbilst *Bacillus amyloliquefaciens*.
3. Izraēlā un Taizemē izdalītas un identificētas vairākas *Bacillus* sp. kultūras, ar nomācošu iedarbību uz sēnītes *A. apis* infekciju, bet tikai viena no tam ar vislielāko potenci izmantota eksperimentos *in vitro* un *in vivo*. *Bacillus* sp. iedarbība uz sēnīti *A. apis* *in vitro* ir fungistatiska.
4. Ērtākais un efektīvākais *Bacillus* sp. preparāta aplikācijas veids ir izbarot to bišu saimēm ar cukura sīrupu. *Bacillus* sp. preparātu vislabāk uzglabāt liofilizētā veidā - 20°C temperatūrā.
5. Izstrādātā preparāta ievadīšana ar *A. apis* inficētajās bišu saimēs ierobežo sēnītes vairošanas (to pilnīgi neiznīcinot), stiprina saimes veselību un atjauno līdzsvaru starp saimnieku un patogēno mikroorganismu, nesamazinot biškopības produktu kvalitāti.
6. Izolētais un pētījumā lietotais *Bacillus* sp. ir jūtīgs pret divām biškopībā visvairāk izmantotām antibiotikām – streptomicīnu un tetraciklīnu, kuru lietošana izjauc dabīgo mikroorganismu līdzsvaru saimē un paaugstina iespējas kaļķu Peru infekcijai attīstīties un izplatīties.