

Исайшиимийе Эрик Вилли

**УСКОРЕННАЯ ДИАГНОСТИКА МИКОЗОВ ПЧЕЛ И
ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ТЕРРИТОРИЙ ДЛЯ ВЕДЕНИЯ
ПЧЕЛОВОДСТВА**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и
иммунология

06.02.05 – ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и
ветеринарно-санитарная экспертиза

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» и ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности».

Научные руководители: **Шуралев Эдуард Аркадьевич**,
кандидат ветеринарных наук
Мукминов Малик Нилович,
доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Саттаров Венер Нуруллович**
доктор биологических наук, доцент,
профессор кафедры биоэкологии и
биологического образования ФГБОУ ВПО
«Башкирский педагогический университет»
Якупов Талгат Равилевич
доктор ветеринарных наук, доцент кафедры
биологической и неорганической химии
ФГБОУ ВПО «Казанская государственная
академия ветеринарной медицины им.
Н.Э.Баумана»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет» (г.Уфа)

Защита диссертации состоится «24» ноября 2015 года в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д-220.012.01 при ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (420075, г. Казань, Научный городок-2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань). Электронный вариант автореферата и текста объявления о защите размещен на официальном сайте ВАК РФ www.vak2.ed.gov.ru, текст диссертации, автореферата и отзывы научных руководителей – на официальном сайте ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» www.vnivi.rf.

Автореферат разослан «__» сентября 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

В.И.Степанов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Аспергиллез и аскофероз пчел причиняют огромный ущерб пчеловодству, а своевременная индикация возбудителей этих микозов в ульях и объектах окружающей пасеки среды остается актуальной задачей. Грибы родов *Aspergillus* и *Ascospaera* являются основными возбудителями микозов пчел [6; 19]. Род *Ascospaera* представлен одним специфичным для пчел видом *A.apis*. Наиболее часто причиной заболеваний пчел аспергиллезом являются возбудители рода *Aspergillus*: *A.flavus*, *A.fumigatus*, *A.niger*.

Лабораторная диагностика микозов пчел, индикация и идентификация их возбудителей основываются на оценке культурально-морфологических свойств выделяемых культур грибов [9; 12]. Однако этот метод является длительным по времени и не всегда позволяет провести точную идентификацию выросшей культуры. Одним из перспективных способов выявления возбудителей этих заболеваний представляется использование молекулярно-биологических подходов [7; 13; 15], а разработка ПЦР позволит проводить раннюю индикацию и дифференциацию биопатогенов как в организмах, так и объектах окружающей среды.

Известно, что в результате многофакторного и многократного загрязнения окружающей среды тяжелые металлы и другие экотоксиканты накапливаются в почве и по трофической цепи передаются через растения в организм медоносных пчел и продукты пчеловодства, в том числе и в мёд [2-4]. Это особенно актуально в Замбии, где запущен проект «Пчеловодство для снижения уровня бедности» [18], а окружающая среда многих районов страны подвергается воздействию выбросами горнодобывающей промышленности и рудных проявлений [17]. Попадая в организм пчел, экотоксиканты образуют токсичные метаболиты, угнетающие защитные механизмы взрослых особей и их личинок [5]. Немаловажное значение имеет и радиационный фон территорий [1], где пчелы собирают нектар. Суммарная радиация сильно возрастает из-за аккумуляции радиоактивных изотопов в

перге, что приводит к возникновению мощных ионизирующих излучений в пчелином гнезде, а это зависит от уровня загрязнения ими почвы [8], так как миграция этого радионуклида идет по цепочке: почва - медоносные растения - мед, обножка - пищеварительный аппарат личинки - кал личинки - соты.

Степень разработанности темы. Ученые Университета Edith Cowan [17] установили значительно высокие концентрации Co, Cu, Pb, Se и Zn в образцах, взятых у жителей провинции Коппербелт, проживающих в районах добычи Cu. Ученые Университета Хоккайдо [20] провели сравнительный анализ концентрации тяжелых металлов в тканях свободновыгульных и коммерческих бройлерных цыплят в г. Кабвэ (Замбия, провинция Центральная). Средние концентрации Pb и Cd превышали ПДК для потребления человеком в некоторых органах, включая мышечную ткань у кур, содержащихся на свободном выгуле. За два года до этого эта же группа ученых опубликовала результаты сравнительного анализа уровня накопления металлов в придорожной почве и тканях дикой крысы (*Rattus sp.*) вблизи свинцово-цинковых шахт г. Кабве [21]. ГИС-анализ указывал, что источником загрязнения является горно-металлургическая деятельность.

Ученые Sri Venkateswara University [10] указывают, что термитники, являясь обильными компонентами окружающей среды Tummalapalle, области уранового оруденения, проявили выраженные кумулятивные свойства этого элемента.

Индикация и идентификация возбудителей микозов методом ПЦР могут быть выполнены непосредственно на пчелах, в том числе на бессимптомных особях [11]. Точная идентификация видов обычно опирается на секвенирование ДНК грибов, что требует дорогостоящего оборудования. Nasri T. et al. [16] разработали недорогой ПЦР-тест, позволяющий дифференцировать представителей рода *Aspergillus* на видовом уровне. Libert X. et al. [14] разработали SYBR® green real-time PCR-анализ, основанный на специфической детекции и идентификации *A. versicolor*.

В связи с этим нарастает необходимость контроля возникновения и распространения микозов пчел и оценки экологического состояния в условиях предполагаемого размещения пасек на территории Республики Замбия, что особенно важно в связи с широко развитой горнодобывающей промышленностью. Однако вопросы комплексной оценки пригодности территорий Республики Замбия для устойчивого развития пчеловодства и дифференциальной индикации возбудителей основных микозов пчел остаются не решенными.

Цель и задачи исследований. Исходя из вышеизложенного, нами была поставлена цель: разработать ускоренный метод индикации и дифференциации возбудителей основных микозов пчел и провести ветеринарно-санитарную оценку территории Республики Замбия для ведения пчеловодства.

Для достижения намеченной цели были выдвинуты следующие задачи:

1. Выделить и определить родовую принадлежность основных возбудителей микозов пчел классическими микологическими методами.
2. Создать методическое обеспечение программы микологического мониторинга пчел, продуктов пчеловодства и компонентов окружающей среды на основе молекулярно-биологических методов.
3. Установить уровень чувствительности и специфичности разработанной методики в сравнении со стандартными микологическими исследованиями.
4. Определить содержание тяжелых металлов и мышьяка и охарактеризовать уровень загрязнения абиотических и биогенных компонентов окружающей среды выбросами горнодобывающей промышленности в Республике Замбия.
5. Оценить пространственное распределение уровня радиоактивности почв на территории Республика Замбия.
6. Оценить пригодность исследуемых территорий для устойчивого развития пчеловодства.

Научная новизна. Впервые разработана методология индикации и дифференциации возбудителей аспергиллеза и аскофероза пчел методом полимеразно-цепной реакции в реальном времени с высокой чувствительностью и специфичностью, с использованием сконструированных высокоспецифичных праймеров. Проведена оценка состояния окружающей среды территории Республики Замбия с точки зрения пригодности ее для устойчивого развития пчеловодства, выявлены районы подверженные загрязнению выбросами горнодобывающей промышленности. На основе биогеохимических исследований, на территории Республики Замбия впервые выявлена аккумуляция в термитниках кобальта, хрома, меди, железа, никеля, молибдена и цинка, которая может быть предложена в качестве их биоиндикаторов в окружающей среде.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты дают основания для выдвижения новых подходов в изучении экологии возбудителей микозов пчел. Теоретически обосновываются рекомендации для устойчивого развития пчеловодства в Замбии.

Практическая значимость заключается в применении разработанного метода дифференциальной индикации возбудителей микозов пчел. Своевременная диагностика этих заболеваний позволит принять эффективные меры борьбы с этими заболеваниями. Выявлены районы Замбии с повышенным уровнем содержания ряда тяжелых металлов, что предложено учитывать как неблагоприятный фактор при планировании размещения пасек.

Результаты проведенных исследований вошли в две методические рекомендации. Отдельные разделы диссертации используются в учебном процессе подготовки специалистов по направлениям 022000 «Экология и природопользование» и 360301 «Ветеринарно-санитарная экспертиза». Рекомендации внедрены и применяются в практике пчеловодства Республики Татарстан.

Методология и методы исследования. Объектами исследования служили образцы почв, донных отложений, пчел, термитов, продуктов пчеловодства, термитников. Предметом исследования являлись экотоксиканты, олигонуклеотидные последовательности генома возбудителей аскофероза и аспергиллеза пчел. Использовали методы эколого-географических, микологических, молекулярно-биологических, химико-аналитических и радиационных исследований.

При выполнении отдельных этапов диссертационной работы оказывали практическую и консультативную помощь: д.х.н., проф. В.З.Латыпова; д.б.н., проф. Т.Х.Фаизов; к.ф.-м.н., доц. О.Р.Бадрутдинов; к.г.н., доц. О.В.Никитин; к.б.н., с.н.с. Н.И.Хаммадов; за что выражаем им сердечную благодарность.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Методами биоинформатики произведен дизайн новых праймеров и зондов, специфичных к возбудителям аспергиллеза и аскофероза пчел, для применения в ПЦР.

2. Методом абсорбционной спектрометрии выявлено накопление тяжелых металлов в почве, донных отложениях, термитах и термитниках. Для устойчивого развития пчеловодства в Замбии важным фактом является то, что некоторые районы загрязнены тяжелыми металлами, на которых размещение пасек не рекомендуется.

3. Высокие накопительные функции термитников на территории Республики Замбия определяют их использование в качестве биоиндикаторов загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами.

Степень достоверности и апробация материалов диссертации. Исследования проводились на достаточном количестве материала, согласно утвержденному плану НИР. Основные результаты диссертационной работы автором получены лично. Автор принимал непосредственное и активное участие в постановке цели и задач работы, в их реализации, а также участвовал непосредственно в обсуждении результатов, их описании и подготовке к публикации.

Результаты исследований доложены на Междунар. науч.-практ. конф. «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК» (Щелково, 2012); Междунар. науч.-практ. конф. «Биотехнологии в решении экологических проблем природы, общества и человека в Евразии: взгляд молодых ученых и специалистов» (Казань, 2013); II Всероссийской науч. конф. с междунар. участ. «Окружающая среда и устойчивое развитие регионов» (Казань, 2013); 3rd European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Congress (Пиза, Италия, 2014); Междунар. симпозиуме «Евразийские научные чтения: экология и медицина» (Казань, 2014); Третьем международном микологическом форуме (Москва, 2015); Всеросс. науч.-практ. конф. с междунар. участ. «Инновационные технологии в пчеловодстве и проблемы сохранения генофонда медоносных пчел» (Уфа, 2015).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 2 методические рекомендации и 3 работы в изданиях, определенных перечнем ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 123 страницах печатного текста и включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, заключение, список литературы; 4 приложения. Список литературы содержит 181 источник (108 отечественных и 73 иностранных). Диссертация иллюстрирована 17 таблицами и 25 рисунками.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследования

Исследования проводили в 2011-2015гг., в т.ч. в 2012г. в ходе экспедиционного выезда в Республику Замбия сотрудников института экологии и природопользования КФУ согласованно с факультетом природных ресурсов Университета Коппербелт (г.Китве, Замбия) с последующим лабораторным исследованием отобранных проб на кафедре

прикладной экологии и на базе аккредитованной лаборатории экологического контроля КФУ. Часть микологических и молекулярно-биологических исследований проводились в научно-инновационном центре ФГБУ «ФЦТРС-ВНИВИ» в соответствии с госзаданием Минсельхоза России (рег. № 01200202603). Исследования проводились по двум направлениям, представленным в таблице 1.

Таблица 1 Этапы исследований

План исследований	
Ветеринарно-санитарная оценка территории Республики Замбия для ведения пчеловодства	Разработка ускоренной дифференциальной диагностики микозов пчел и индикации и идентификации их возбудителей
<ol style="list-style-type: none"> 1. Экологическая характеристика исследуемых районов 2. Уровень загрязнения почв и донных отложений выбросами горнодобывающих предприятий (тяжелые металлы и мышьяк) 3. Аккумуляция тяжелых металлов в биогенных компонентах окружающей среды 4. Пространственное распределение уровня радиоактивности почв 5. Обобщение результатов ветеринарно-санитарной оценки 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Выделение культуры грибов из патматериала для сравнительного анализа классического и разрабатываемого методов индикации 2. Конструирование специфических праймеров возбудителей микозов 3. Биоинформационный анализ сконструированных праймеров 4. Оптимизация условий ПЦР для дифференциальной диагностики микозов пчел

Исследованию подвергали пробы в количествах, представленных в таблице 2. При отборе проб пользовались следующими нормативными документами: ГОСТ 17.4.3.01-83, ГОСТ 17.1.5.01-80, ГОСТ 19792-2001, ГОСТ 20728-75.

Для определения содержания тяжелых металлов использовали метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии на ICPE 9000. Альфа- и бета-радиоактивность определяли на УМФ-2000. Определение радионуклидного состава источников излучений проводили в измерительном комплексе

«Прогресс 2000» , определяли содержание цезия-137, радия-226, тория-232 и калия-40.

Таблица 2 Общее количество отобранных образцов проб

вид образца		количество проб
абиотические	почва	228
	донные отложения	7
биотические	пчелы	481
	термиты	6
биогенные	продукты пчеловодства	86
	термитники	24

Для выделения культур возбудителей проводили посевы на агар Чапека, среду Сабура, картофельно-декстрозный агар с дрожжевым экстрактом и сусловый агар. Дизайн нуклеотидных последовательностей праймеров выполняли в программе Vector NTI версия 9.1.0, с использованием баз данных GenBank и PubMed NCBI. Для определения параметров сконструированных нуклеотидных последовательностей использовали «Олиго Кальк: Программа для расчёта свойств олигонуклеотидов (праймеров)». Для выявления степени совпадений с искомыми и нежелательными организмами использовали программу BLASTIN 2.2.30+, NCBI. ПЦР ставили в режиме реального времени по общепринятой методике. Детекцию проводили на амплификаторах «ДТ-322» и «DTlite-4».

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 8.0.

2.2 Ветеринарно-санитарная оценка территории

Республики Замбия

2.2.1 Экологическая характеристика исследуемых районов.

Республика Замбия имеет самую высокую плотность диких пчелиных семей в мире, что предопределяет их использование и в культурном пчеловодстве.

Страна разделена на 9 провинций, которые представлены различными природными богатствами. Богатая флора лесных массивов Замбии создает предпосылки развития отрасли пчеловодства в этом регионе с устойчивым лесопользованием. Медоносы широко представлены такими источниками нектара, как растения родов Брахистегия, Джулбернардия и Изоберлиния подсемейства Цезальпиниевые, семейства Бобовые, которые предпочитают дикие пчелы. Страна богата природными ресурсами, такими как медь, кобальт, цинк, свинец и т.д.

Наши исследования проводились в 4-х провинциях Замбии: Коппербелт, Центральная, Лусака и Южная. Провинция Коппербелт характеризуется крупными месторождениями медных и медно-никелевых руд, добычей цветных металлов, развитием и обслуживанием горно-обогатительных предприятий, рудников, горнометаллургического комбината. В провинции Центральная располагались рудники по добыче свинца и цинка, которые закрылись в 1990-х годах, а район Кабве входит в десятку самых загрязненных мест на планете по уровню загрязнения тяжелыми металлами. В районе Кафуэ провинции Лусака развита металлургия, является левым берегом реки Кафуэ, берущей начало в районах горнодобывающей промышленности провинции Коппербелт. Провинция Южная характеризуется развитием туризма и сельского хозяйства.

Таким образом, территория Замбии характеризуется высоким экологическим потенциалом устойчивого развития пчеловодства, что заключается в обширном охвате территорий и разнообразии растений – медоносов, привязанности к ним большой популяции диких пчел, как потенциальный природный ресурс пчеловодства Замбии. Однако необходимо учитывать тот факт, что некоторые районы подвержены загрязнению выбросами горнодобывающей промышленности и рудных проявлений.

2.2.2 Уровень загрязнения почв и донных отложений выбросами горнодобывающих предприятий (тяжелые металлы и мышьяк). В провинции Коппербелт были выявлены превышающие ПДК концентрации

Со в образцах проб почв г. Китве и района Кулулуши – 5,5 мг/кг и 12,8 мг/кг, соответственно. Высокий уровень Си отмечался в г. Китве и районах Чилилабомбве и Кулулуши – 645,8 мг/кг, 129,6 мг/кг и 145,0, соответственно. На загрязнение территорий г. Китве и района Чилилабомбве Рb указывают его высокие концентрации в пробах почв – 2,4 мг/кг и 14,5 мг/кг, соответственно. В районах Чилилабомбве, Ндола и Масаити слегка завышены были концентрации Сг – 7,5 мг/кг, 15,3 мг/кг и 8,2 мг/кг, соответственно. А Fe определялось на сравнительно высоком уровне в районах Кулулуши и Ндола – 25060 мг/кг и 22679 мг/кг, соответственно.

Во всех исследованных районах Центральной провинции выявлено высокое содержание Ni – 15,4-74,6 мг/кг. Остальные элементы находились в концентрациях ниже ПДК.

Провинция Лусака характеризовалась следующими показателями: в пробах почв на выезде из г.Лусака выявлено увеличенное содержание Cd – 1,1мг/кг, Сг – 14,7мг/кг, Си – 29,3мг/кг, Fe – 19594мг/кг и Ni – 29,8мг/кг, при этом последний элемент также был выявлен и вблизи г.Кафуэ на уровне 41,9мг/кг.

Cd в высоких концентрациях был выявлен в почве двух районов провинции Южная – Мазабука и Монзе, 0,7мг/кг и 1,3мг/кг, соответственно. В Монзе также была выявлена Си на уровне 21,0мг/кг, особенно высокий уровень которой в провинции отмечался в районах Ливингстон и Сиавонга – до 116,6мг/кг. Район Монзе – единственное место провинции, где в обоих пунктах была выявлена Hg – 0,4мг/кг. Если в районах Монзе и Чома отмечался сравнительно невысокий уровень Ni (0,0-4,4мг/кг), то на остальных исследованных территориях провинции он был на уровне 11,0-51,5мг/кг. Рb был выявлен только в районе Казунгула, на уровне 1,2-9,2мг/кг. Fe в среднем по провинции выявлялось на уровне 8314мг/кг, высокий уровень отмечался в районах Ливингстон и Сиавонга до 27843мг/кг. Помимо этого в этих районах выявлен и Sr, уровень которого достигал 32,7-98,2мг/кг,

а в одной точке пробоотбора в районе Сиавонга также отмечалось высокое содержание Zn – 88,6 мг/кг.

Коэффициент накопления Co и Cu в донных отложениях устья реки Кафуэ составил 3,7 и 6,0, соответственно, что указывает на загрязнение воды отходами горнодобывающих предприятий провинции Коппербелт. Это, несомненно, влияет и на загрязнение реки Замбези, в которую впадает река Кафуэ. Однако исследования реки Замбези выше по течению от места впадения реки Кафуэ показали, что этот показатель для обоих металлов был значительно выше – 21,7 и 101,5, соответственно. Это означает, что река Замбези подвергается загрязнению тяжелыми металлами не только за счет впадающей в нее реки Кафуэ, а источниками загрязнения являются не только горнодобывающие предприятия провинции Коппербелт. Помимо Co ($50,85 \pm 30,95$ мг/кг) и Cu ($2264,53 \pm 879,08$ мг/кг) в донных отложениях реки Кафуэ были выявлены Cr – $3,78 \pm 1,38$ мг/кг, Ni – $20,90 \pm 6,66$ мг/кг и Fe – $12168,35 \pm 2383,39$ мг/кг.

Нашими исследованиями подтверждается существование экологической проблемы, связанной с загрязнением реки Кафуэ, что особенно проявляется в кумуляции Cu и Co в донных отложениях. Установлен повышенный уровень техногенной нагрузки и естественно-фоновых значений содержания ряда тяжелых металлов в почвах таких районов как Ливингстон и Сиавонга провинции Южная, а также Китве, Чилилабомбе и Калулуши провинции Коппербелт, что указывает на неблагоприятные условия для размещения пасек на этих территориях.

2.2.3 Аккумуляция тяжелых металлов в термитниках загрязненных территорий. Биогенные компоненты окружающей среды могут быть хорошими индикаторами ее загрязнения благодаря их выраженной аккумулятивной способности. Взаимосвязь уровней загрязнения компонентов окружающей среды и биотических и биогенных компонентов выражается кумулятивными свойствами термитников (табл. 3).

Таблица 3 Среднее содержание металлов в образцах термитников (Ст, мг/кг сух.веса) в провинции Южная (Республика Замбия) и коэффициенты биологического поглощения (КБП)

Металл	Показатель	Районы провинции Южная, Замбия					
		Монзе	Каломо	Казунгула	Ливингстон	Сиавонга	Мазабука
Cd	С _т	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
	КБП	-	-	-	-	-	-
Co	С _т	< 0,5	10,6±2,3	< 0,5	572,0±45,4	< 0,5	5,4±1,8
	КБП	-	10,60	-	33,06	-	5,40
Cr	С _т	< 0,5	62,4±18,6	< 0,5	41,00±16,4	22,5±6,7	43,8±5,4
	КБП	-	62,40	-	1,65	0,24	10,95
Cu	С _т	< 0,5	51,4±21,6	< 0,5	15112,8±1825,3	22,9±6,4	33,6±8,9
	КБП	-	51,40	-	165,35	0,20	24,00
Ni	С _т	7,6±1,4	247,8±24,4	50,4±8,6	36,8±10,5	19,0±1,9	72,2±15,1
	КБП	1,73	9,21	4,58	0,88	0,37	2,75
Pb	С _т	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
	КБП	-	-	-	-	-	-
Zn	С _т	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	10,7±2,2
	КБП	-	-	-	-	-	10,70
Hg	С _т	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
	КБП	-	-	-	-	-	-
As	С _т	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
	КБП	-	-	-	-	-	-

Такие элементы, как Cr, Cu и Ni были также обнаружены в концентрациях выше, чем в почвах, в пробах самих термитов. Однако вопрос использования этих насекомых как организмов-биоиндикаторов остается открытым ввиду недостаточного объема объектов исследования. Биогенные же компоненты окружающей среды, а именно термитники, вполне могут обладать биоиндикаторными признаками загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами, что и доказывает наша работа.

Таким образом, выявленные высокие кумулятивные свойства термитников на территории Республики Замбия позволяют предложить их использование в качестве биоиндикаторов в отношении 7 элементов: Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Mo и Zn.

2.2.4 Пространственное распределение уровня радиоактивности почв на территории Республики Замбия. В целом по стране средний уровень активности α -излучателей в пробах почв составил 1,4 Бк/кг с вариациями от 0,1 до 2,7 Бк/кг. Средний уровень активности β -излучателей – 1,01 Бк/кг в диапазоне от 0,02 до 2 Бк/кг (рис. 1).

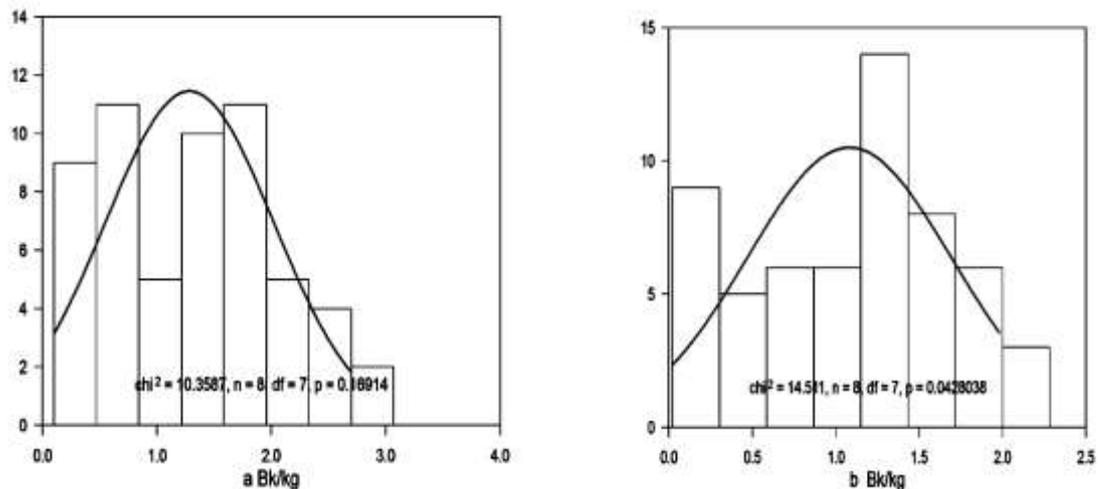


Рис. 1 Статистическое распределение активности альфа и бета излучателей в пробах почв Замбии

Особо хочется отметить, что исследованиями образцов, полученных с термитников, установлено значительное в них превышение уровня α - и β -излучателей по сравнению с результатами, полученными на образцах почв. Причем средний уровень для β -излучателей составил 270 Бк/кг, а для α -излучателей – 38 Бк/кг. Максимальные значения составляют 430 Бк/кг и 68 Бк/кг соответственно. Это указывает на потенциальную возможность использования термитов как биоиндикаторов радиационного загрязнения территорий.

Таким образом, уровень источников α - и β -излучений в почвах в среднем по стране составил 2,1 Бк/кг и 0,015 Бк/кг соответственно, а суммарный показатель загрязнения почв составил 22,32 Бк/кг по Ra-226, 26,01 Бк/кг по Th-232, 181 Бк/кг по K-40, а Cs-137 не был обнаружен.

2.3 Разработка ускоренной дифференциальной диагностики микозов пчел и индикации и идентификации их возбудителей

2.3.1 Выделение культуры грибов из патматериала для сравнительного анализа классического и разрабатываемого методов индикации. Микологические и микроскопические исследования патологического материала, отобранного из пчелосемей, имеющих признаки заболеваний грибной этиологии, показали наличие возбудителей аскофероза и аспергиллеза. Родовую и видовую принадлежность возбудителей определяли по росту на элективных питательных средах.

На основании результатов проведенных исследований, были выделены и идентифицированы изоляты грибов родов *Ascospaera* – *A.apis* и *Aspergillus* – *A.fumigatus*, *A.niger* и *A.flavus*. Они послужили в дальнейшем материалом для оценки эффективности разрабатываемого метода ускоренной индикации и идентификации возбудителей микозов пчел.

2.3.2 Конструирование специфических праймеров возбудителей микозов. Использование программы Vector NTI 9.1.0 позволило осуществить дизайн праймеров и их зондов и выявить их параметры. В ходе исследований к параметрам, которые учитывались при конструировании каждого праймера и зонда, были сформулированы и выдвинуты единообразные требования (табл. 4). Это являлось необходимым условием в связи с тем, что дальнейшей целью наших исследований было создание оптимальных условий для разработки способа дифференциальной диагностики аспергиллеза и аскофероза пчел методом ПЦР.

В результате поисковых исследований в базах данных GenBank и PubMed NCBI были отобраны приведенные ниже олигонуклеотиды праймеров и зондов, отвечающие выдвинутым требованиям (с обозначениями для маркеров: fp – прямой праймер, rp – обратный праймер, hr – зонд). Для маркировки зонда, с целью использования его как визуализирующего компонента ПЦР, к сконструированным нуклеотидным

последовательностям с 5'-конца добавлялись такие метки, как Fam, ROX, CY5, R6G, а с конца-3' – BHQ, варианты 1, 2 и 3.

Таблица 4 Требования к параметрам праймеров и зондов, выдвинутые в ходе исследования

Праймер	Зонд
<ul style="list-style-type: none"> - размер PCR-продукта: около 50 нп; - температура плавления: 59°C; - длина праймера: 20-30 нп; - GC состав: 20-80%; - вторичная структура: по минимуму; - димеры: нежелательны; - минимум G/C на 3' конце праймеров (не более трех из пяти последних нуклеотидов) 	<ul style="list-style-type: none"> - GC состав: 20-80%; - температура плавления: 64-70°C; - минимум одинаковых нуклеотидов подряд (особенно G: не более 4-х подряд); - выбор той цепи ДНК, на которой будет чаще встречаться C, чем G; - на 5'-конце не должно быть G; - флуоресцентная метка: FAM, ROX, HEX или R6G; - тушитель: TAMRA или BHQ, в соответствии с флуоресцентной меткой (Blackhole)

Следующие праймеры и зонды были сконструированы для дальнейших исследований:

Для индикации *A.apis*:

- fpAsc1 5'→3': 5'-atgtgtgtctgtgcccctaggtg-3';
- rpAsc1 5'→3': 5'-cgaagcaacaggtaaggtagacaagg-3';
- hpAsc1 5'→3': Fam-ctgccgcccactcccaccctt-BHQ1.

Для индикации *A.fumigatus* вариант 1:

- fpAspFum1 5'→3': 5'-attggtgccgctttctggtatgt-3';
- rpAspFum1 5'→3': 5'-tgatacccatgacagtgaggctgaa-3';
- hpAspFum1 5'→3': Fam-ttggatgacgggtgattgggatctctc-BHQ1.

Для индикации *A.fumigatus* вариант 2:

- fpAspFum2 5'→3': 5'-caagaacctcatcggtggtgga-3';
- rpAspFum2 5'→3': 5'-gaggaacacttacggcatcgga-3';
- hpAspFum2 5'→3': ROX-ttcaaccagtgtccaagctggacctc-BHQ2.

Для индикации *A.flavus*:

- fpAspFla 5'→3': 5'-cacggccttgacggctcc-3';

- rpAspFla 5'→3': 5'-tgccgtcagatccattccaactt-3';
- hpAspFla 5'→3': CY5-atacacctcgaacgaacgacgaccatagg-BHQ3.

Для индикации *A.flavus* «отрицательные» праймеры:

- fpAspFla(-) 5'→3': 5'-ctttcttgatcttttgatggtggtg-3';
- rpAspFla(-) 5'→3': 5'-aacgcgaccgggctatttaa-3';
- hpAspFla(-) 5'→3': R6G-ttagttggtggagtgattgtctgctttattgc-BHQ1.

Для индикации *A.niger* вариант 1:

- fpAspNig1 5'→3': 5'-aaccaaatcggctgctttctg-3';
- rpAspNig1 5'→3': 5'-ctgaactcaagctgagatagcctaagagac-3';
- hpAspNig1 5'→3': Fam-ttccatccccaatccaaaggcagttgtat-BHQ1.

Для индикации *A.niger* вариант 2:

- fpAspNig2 5'→3': 5'-tctggacggttgagtgctttt-3';
- rpAspNig2 5'→3': 5'-aagtcgagacactccgcacatca-3';
- hpAspNig2 5'→3': ROX-ctcgtcgctgggtgctgcc-BHQ2.

Для индикации *A.niger* вариант 3:

- fpAspNig3 5'→3': 5'-ttgaccaaggacctggaacatctttat-3';
- rpAspNig3 5'→3': 5'-catggctttggcaacattccc-3';
- hpAspNig3 5'→3': CY5-taccatctcgcaaggcacasaagaagta-BHQ3.

Таким образом, были сконструированы праймеры и зонды ко всем искомым возбудителям микозов пчел.

2.3.3 Биоинформационный анализ сконструированных праймеров.

Для эффективной работы создаваемых ПЦР тест-систем одним из основных требований является обязательная специфичность всех трех компонентов: прямого и обратного праймеров и зонда. Сконструированные праймеры подверглись анализу, для чего использовали калькулятор свойств олигонуклеотидов, результаты которого представлены в таблице 5. С использованием программы BLASTIN 2.2.30+ была выявлена высокая степень совпадения сконструированных праймеров с различными штаммами искомым организмов.

Таблица 5 Параметры сконструированных праймеров и зондов

Наименование	Длина, нп	Молекулярная масса, г/моль	Содержание GC, %	Температура плавления, °С	Наличие димеров
fpAsc1	23	7158	57	59	Нет
rpAsc1	26	8111	50	60	Нет
hpAsc1	21	7274	71	62	Нет
fpAspFum1	23	7068	48	55	Нет
rpAspFum1	25	7715	48	58	Нет
hpAspFum1	27	9453	52	61	Нет
fpAspFum2	22	6785	55	57	Нет
rpAspFum2	23	7107	52	57	Нет
hpAspFum2	27	9418	56	63	да (2)
fpAspFla	18	5437	72	57	Нет
rpAspFla	23	6935	48	55	Нет
hpAspFla	29	9947	52	63	Нет
fpAspFla(-)	26	8020	42	56	Нет
rpAspFla(-)	21	6455	52	54	да (2)
hpAspFla(-)	33	11292	39	61	Нет
fpAspNig1	23	7015	48	55	Нет
rpAspNig1	30	9233	47	62	да (2)
hpAspNig1	29	9872	45	60	Нет
fpAspNig2	23	7108	48	55	Нет
rpAspNig2	23	6987	52	57	Нет
hpAspNig2	21	7644	76	64	Нет
fpAspNig3	27	8259	41	57	Нет
rpAspNig3	21	6357	52	54	Нет
hpAspNig3	30	10235	47	62	Нет

Таким образом, проведенный биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей участков ДНК грибов рода *Ascosphaera* – *A.apis* и рода *Aspergillus* – *A.flavus*, *A.fumigatus*, *A.niger* позволил сконструировать оптимальные праймеры и зонды с целью дальнейшего их использования в разработке ПЦР тест-системы для дифференциальной индикации возбудителей аскофероза и аспергиллеза пчел. Определена их

высокая специфичность и чувствительность в отношении различных штаммов биопатогенов микозов пчел.

2.3.4 Оптимизация условий ПЦР для дифференциальной индикации возбудителей аспергиллеза и аскофероза. Для проведения ПЦР нами был разработан набор реагентов, рассчитанный для исследования 100 образцов, который включает следующие комплекты: комплект для выделения ДНК из исследуемого материала, комплект для ПЦР-амплификации ДНК в режиме реального времени и комплект контрольных образцов, согласно разработанной нами методике.

Подготовку ПЦР-смеси1 ASP и ПЦР-смеси2 ASC проводили следующим образом. Все компоненты смешивались в отдельном флаконе в строгом порядке и объемах компонентов согласно таблице 6 (из расчета на 9 образцов, в т.ч. положительный и отрицательный контроли).

Таблица 6 Подготовка ПЦР-смеси

№№ п.п.*	Компоненты ПЦР-смеси	Объем, мкл
1.	dd H ₂ O	55
2.	10x ПЦР Буфер (Б)	20
3.	MgCl ₂	20
4.	Прямой праймер	10
5.	Обратный праймер	10
6.	Зонд	10
7.	Dntp	20
8.	Syn Taq ДНК-полимераза (Т+)	5

* - компоненты вносятся строго в указанном порядке

В каждую подготовленную пробирку вносили подготовленные пробы исследуемых образцов и соответствующих контролей по 5 мкл, затем соответствующие ПЦР-смеси по 15 мкл.

Благодаря выдвинутым в ходе исследования требованиям к параметрам праймеров и зондов, которые были соблюдены, в дальнейшем упростилась задача создания диагностического набора, реагенты которого работают в оптимальных условиях ПЦР в реальном времени. Используемые режимы при постановке ПЦР представлены в таблицах 7, 8.

Таблица 7 Режим амплификации для грибов рода *Aspergillus*

Наименование	Время, с.	Количество циклов	Температура, °С
fpAspFum1 rpAspFum1 hpAspFum1	300	1	95
	15	5	61*
	35	45	61*
	Хранение		10
fpAspFum2 rpAspFum2 hpAspFum2	300	1	95
	15	5	61*
	35	45	61*
	Хранение		10
fpAspFla rpAspFla hpAspFla	300	1	95
	15	5	61*
	35	45	61*
	Хранение		10
fpAspFla(-) rpAspFla(-) hpAspFla(-)	300	1	95
	15	5	61*
	35	45	61*
	Хранение		10
fpAspNig1 rpAspNig1 hpAspNig1	300	1	95
	15	5	61*
	35	45	61*
	Хранение		10
fpAspNig2 rpAspNig2 hpAspNig2	300	1	95
	15	5	61*
	35	45	61*
	Хранение		10
fpAspNig3 rpAspNig3 hpAspNig3	300	1	95
	15	5	61*
	35	45	61*
	Хранение		10

* - регистрация результатов

Таблица 8 Режим амплификации для грибов рода *Ascosphaera*

Наименование	Время, с.	Количество циклов	Температура, °С
fpAsc1 rpAsc1 hpAsc1	300	1	95
	15	5	59*
	35	45	59*
	Хранение		10

* - регистрация результатов

Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующего амплификатора ДТ-322: регистрацию сигнала флуоресценции проводили прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводили в соответствии с инструкцией к используемому прибору. Учет и интерпретацию результатов осуществляли автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором.

В образцах, содержащих ДНК рода *Aspergillus*, программа фиксировала положительный результат для рода *Aspergillus*. В образцах, содержащих ДНК рода *Ascosphaera*, программа фиксировала положительный результат для рода *Ascosphaera*. В образцах, не содержащих ДНК рода *Aspergillus*, программа фиксировал отрицательный результат для рода *Aspergillus*. В образцах, не содержащих ДНК рода *Ascosphaera*, программа фиксировала отрицательный результат для рода *Ascosphaera*. По завершению амплификации, результаты учитываются на экране монитора в режиме реального времени.

Таким образом, созданная ПЦР тест-система может быть внедрена в ветеринарную практику для ранней диагностики основных микозов пчел, а также мониторинга их возбудителей в окружающей среде, в том числе в объектах пчеловодства.

Далее была проведена апробация созданной тест-системы в лабораторных условиях. Результаты разработанного ускоренного метода индикации и дифференциации возбудителей микозов пчел в образцах почвы, пчел и меда коррелировали с результатами микологических исследований, что подтверждает высокую чувствительность и специфичность разработанной методики.

3 Заключение

1. На неблагополучных по микозам пчел пасеках были выделены и идентифицированы изоляты грибов рода *Ascospaera* – *A.apis* и *Aspergillus* – *A.fumigatus*, *A.niger* и *A.flavus*.

2. Создано научно-методическое обеспечение программы микологического мониторинга пчел, продуктов пчеловодства и компонентов окружающей среды с использованием метода ПЦР: сконструированы праймеры возбудителей основных микозов, биоинформационным анализом показана их специфичность.

3. Разработаны оптимальные режимы постановки ПЦР в реальном времени с использованием сконструированных праймеров, позволившие обеспечить ее высокую чувствительность и специфичность при дифференциальной индикации возбудителей микозов пчел.

4. Впервые методом абсорбционной спектрометрии определено содержание тяжелых металлов (Cd, Pb, Zn, Cu, Hg, Co, As, Fe) в абиотических (почва, донные отложения), биотических (термиты) и биогенных (термитники) компонентах окружающей среды территории четырех провинций Республики Замбия и дана сравнительная оценка уровня загрязнения районов с различной антропогенной нагрузкой.

5. Установлено высокое содержание тяжелых металлов в организме термитов и термитниках на территориях, загрязненных выбросами рудных проявлений и горнодобывающей промышленности, что позволяет предложить их использование в качестве биоиндикаторов кобальта, хрома, ртути, свинца, никеля, молибдена, цинка, железа и меди.

6. На основе исследования радиоактивности почв на территории Республики Замбия общий фон оценивается в пределах от 0,1 Бк/кг до 2,7 Бк/кг для α -излучений и от 0,02 Бк/кг до 2 Бк/кг – для β -излучений. Методом измерения суммарной альфа- и бета- активности выявлено отсутствие цезия¹³⁷ на территории Республики Замбия.

7. Установлен повышенный уровень техногенной нагрузки и естественно-фоновых значений содержания ряда тяжелых металлов в почвах таких районов как Ливингстон и Сиавонга провинции Южная, а также Китве, Чилилабомбе и Калулуши провинции Коппербелт, что является неблагоприятными условиями для размещения пасек на этих территориях.

4 Список использованной литературы

1. Ангелов, С. Радиация и пчелы / С. Ангелов // Пчеловодство. – 2007. – №5. – С. 8-10.
2. Билалов, Ф.С. Апимониторинг в системе контроля загрязнения окружающей среды / Ф.С. Билалов, Л.А. Скребнева, В.З. Латыпова, М.Н. Мукминов, О.Р. Бадрутдинов. – Казань: Изд-во КГУ, 2010. – 188 с.
3. Еськов, Е.К. Аккумуляция тяжелых металлов в теле пчел / Е.К. Еськов, Г.С. Ярошевич, М.Д. Еськова, Г.А. Кострова, Г.М. Ракипова // Пчеловодство. – 2014. – №2. – С. 14-16.
4. Ковальчук, И.И. Содержание тяжелых металлов в организме пчел и их продукции / И.И. Ковальчук // Пчеловодство. – 2012. – №2. – С. 6-7.; Пашаян, С.А. Свойства миграции тяжелых металлов / С.А. Пашаян // Пчеловодство. – 2006. – № 9. – С. 12-13.
5. Любимов, А.И. Экологические факторы, влияющие на жизнедеятельность пчел / А.И. Любимов, Л.М. Колбина, С.Л. Воробьева // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2014. – Т.220. – С. 157-159.
6. Мирзоев, Д.М. Индикация возбудителя аскофероза в цветочной пыльце и перге / Д.М. Мирзоев, А.А. Негматов // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». – 2013. – №2(10). – С. 26-28.
7. Мукминов, М.Н. Индикация возбудителей аспергиллеза пчел методом ПЦР / М.Н. Мукминов, Л.И. Зайнуллин // Вестник РАСХН. – 2004. – №5. – С. 61-63.
8. Разанов, С.Ф. Распределение радионуклидов в вертикальном почвенном профиле медоносных угодий / С.Ф. Разанов // Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва. – 2013. – №10. – С. 85-88.
9. Шевченко, Е.В. Выделение возбудителя аскофероза пчел и изучение его культурально-морфологических свойств / Е.В. Шевченко // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – №4. – С. 375.
10. Arveti, N. Fluoride incidence in groundwater: a case study from Talupula, Andhra Pradesh, India / N. Arveti // Environ Monit Asses. – 2011. – V.172. – P. 427-443.
11. James, R.R. PCR diagnostic methods for *Ascosphaera* infections in bees / R.R. James, J.S. Skinner // J. Invertebrate Pathology. – 2005. – V. 90, №2. – P. 98-103.
12. Jensen, A.B. Standard methods for fungal brood disease research / A.B. Jensen, K. Aronstein, J. M. Flores, S. Vojvodic, M.A. Palacio, M. Spivak // J Apic Res. – 2013. – V.52, №1: 10.3896/IBRA.1.52.1.13.
13. Klinger, E.G. A multi-gene phylogeny provides additional insight into the relationships between several *Ascosphaera* species / E.G. Klinger, R.R. James, N.N. Youssef, D.L. Welker // J Invertebr Pathol. – 2013. – V.112, №1. – P. 41-48.
14. Libert, X. Development and performance assessment of a qualitative SYBR® green real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus versicolor* in indoor air / X. Libert, C. Chasseur, S. Bladt, A. Packeu, et al. // Appl Microbiol Biotechnol. – 2015. – V.99, №17. – P.7267-7282.
15. Maxfield-Taylor, S.A. First detection of the larval chalkbrood disease pathogen *Ascosphaera apis* (Ascomycota: Eurotiomycetes: Ascosphaerales) in adult bumble bees / S.A. Maxfield-Taylor, A.B. Mujic, S. Rao // PLoS One. – 2015. – V.10, №4. – e0124868.

16. Nasri, T. PCR-RFLP on β -tubulin gene for rapid identification of the most clinically important species of *Aspergillus* / T. Nasri, M.T. Hedayati, M. Abastabar, A.C. Pasqualotto, et al. // *J Microbiol Methods*. – 2015. – V.117. – P.144-147.
17. Ndilila, W. Environmental and toenail metals concentrations in copper mining and non mining communities in Zambia / W. Ndilila, A.C. Callan, L.A. McGregor // *Int J Hyg Environ Health*. – 2014. – V.217, №1. – P. 62-69.
18. Project: Beekeeping for poverty alleviation. // Transformation Business Network. 2015. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.tbnetwork.org/projects/agriculture-sectors/bee-keeping-zambia/>.
19. Reynaldi, F.J. *Ascospaera apis*, the entomopathogenic fungus affecting larvae of native bees (*Xylocopa augusti*): First report in South America / F.J. Reynaldi, M. Lucia, M.L. Genchi Garcia // *Rev Iberoam Micol*. – 2015. – V.3. – P. S1130-1406.
20. Yabe, S. *Sphingobacterium thermophilum* sp. nov., of the phylum Bacteroidetes, isolated from compost / S. Yabe, Y. Aiba, Y. Sakai, M. Hazaka, K. Kawahara, A. Yokota // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2013. – V.83, № 5. – P. 1584-1588.
21. Yabe, S. *Thermogemmatispora onikobensis* gen. nov., sp. nov. and *Thermogemmatispora foliorum* sp. nov., isolated from fallen leaves on geothermal soils, and description of *Thermogemmatisporaceae* fam. nov. and *Thermogemmatisporales* ord. nov. within the class Ktedonobacteria / S. Yabe, Y. Aiba, Y. Sakai, M. Hazaka, A. Yokota // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. – 2011. – V.61. – P. 903-910.

5 Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ:

1. **Ндайишимийе, Э.В.** Биоинформационный анализ олигонуклеотидов праймеров для индикации возбудителей аспергиллеза и аскофероза пчел / **Э.В. Ндайишимийе**, Н.И. Хаммадов, К.А. Осянин, Т.Х. Фаизов, Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов // *Ветеринарный врач*. – 2015. – №2. – С. 3-9.
2. **Ндайишимийе, Э.В.** Выявление возбудителей аспергиллеза и аскофероза пчел в ряде регионов России / **Э.В. Ндайишимийе** // *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана*. – 2015. – Т.222. – С. 166-169.
3. **Ндайишимийе, Э.В.** Оценка территории провинции Коппербелт Республики Замбия для ведения пчеловодства по уровню полиметаллического загрязнения / **Э.В. Ндайишимийе**, О.В. Никитин, М.Н. Мукминов, Э.А. Шуралев // *Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии*. – 2015. – №3. – С. 80-84.

Методические рекомендации:

1. Индикация и дифференциация грибковых патогенов родов *Aspergillus* и *Ascospaera* в объектах окружающей среды, пчелах и продуктах пчеловодства. Методические рекомендации / Н.И. Хаммадов, **Э.В. Ндайишимийе**, К.А. Осянин, Т.Х. Фаизов, А.А. Иванов, Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов. – Казань: ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 2015. – 16 с. (Одобрены НМС и утверждены директором ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 04.03.2015г.)

2. Методические рекомендации по определению массовой доли тяжелых металлов (Cd, Pb, Zn, Fe, Ni, Cu) в цветочной пыльце, меде и организме пчел методом масс спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, одобренные УМС и утвержденные директором Института экологии и природопользования КФУ 15.12.2014г.

Публикации в других изданиях:

1. **Ндайишимийе, Э.В.** Состояние экологической и ветеринарно-санитарной безопасности в Бурунди / **Э.В. Ндайишимийе**, О.В. Никитин, Э.А. Шуралев // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК. Материалы международной научно-практической конференции, 5-7 декабря 2012. – Щелково, 2012. – С. 561-566.

2. **Ндайишимийе, Э.В.** Естественная радиоактивность природных объектов Республики Замбия / **Э.В. Ндайишимийе**, С.Е. Оразбекова, О.Р. Бадрутдинов, О.В. Никитин, Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов // Окружающая среда и устойчивое развитие регионов. Том I: Теория и методы изучения и охраны окружающей среды. Экологические основы природопользования / Под ред. проф. Латыповой В.З., проф. Ермолаева О.П., проф. Роговой Т.В., проф. Зарипова Ш.Х. – Казань: Изд-во «Отечество», 2013. – С.121-122.

3. **Ндайишимийе, Э.В.** Молекулярно-генетическая индикация и дифференциация основных микозов пчел / **Э.В. Ндайишимийе**, Н.И. Хаммадов, К.А. Осянин // Матер. междунар. науч.-практ. конф. «Евразийские научные чтения: экология и медицина». – Казань, 2014. – С. 24-26.

4. Mukminov, M.N. Molecular test system for the express detection of honeybee aspergillosis / M.N. Mukminov, **E.W. Ndayishimiye**, E.A. Shuralev, L.I. Zaynullin, N.I. Khammadox, K.V. Usoltsev, T.Kh. Faizov // 3rd EAVLD Congress, Pisa (Italy), 12-15 October, 2014. Abstract book. – 2014. – P.202.

5. Шуралев, Э.А. Молекулярно-генетическая дифференциальная индикация грибов родов *Aspergillus* и *Ascosphaera* / Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов, **Э.В. Ндайишимийе**, Н.И. Хаммадов, К.А. Осянин, Е.А. Петрова, Т.Х. Фаизов // Современная микология в России. – 2015. – Т.4, Вып. 1. – С.14-15.

6. **Ндайишимийе, Э.В.** Эколого-географические условия развития пчеловодства в Республике Замбия / **Э.В. Ндайишимийе** // Инновационные технологии в пчеловодстве и проблемы сохранения генофонда медоносных пчел: Мат. Всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Уфа: БГАУ, 2015. – С. 151-155.