

УДК 579.26

СРАВНЕНИЕ ПЕЙЗАЖА ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ *APIS MELLIFERA MELLIFERA L.* В ПЕРИОД ЗИМОВКИ И АКТИВНОГО МЕДОСБОРА

© 2010 г.

У.Е. Чечёткина, Н.И. Евтеева, А.И. Речкин

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

ulyana.85@mail.ru

Поступила в редакцию 01.04.2010

Представлены результаты исследования состава представителей семейства *Enterobacteriaceae* у медоносных растений и пчел в период зимовки и активного медосбора. Показана общность видов энтеробактерий у пчел и медоносных растений. Установлено постоянное присутствие, но меньшее разнообразие энтеробактерий у пчел в зимний период. Наиболее часто обнаруживались штаммы *Klebsiella oxytoca*, что может свидетельствовать об их физиологической роли.

Ключевые слова: пчелы, медоносные растения, энтеробактерии, *Klebsiella oxytoca*.

Введение

В последнее десятилетие международное сообщество всё в большей степени признает важное значение опылителей как одного из элементов разнообразия сельского хозяйства, поддерживающего жизнедеятельность человека. Вместе с тем появляется все больше и больше доказательств потенциально серьезного сокращения популяций опылителей, прежде всего медоносных пчел. Значимость роли пчел в функционировании агросистем трудно переоценить. Пчелы способствуют повышению как урожайности, так и качества разнообразных сельскохозяйственных культур. Двумя основными причинами сокращения численности медоносной пчелы в глобальном масштабе являются паразитические клещи (*Varroa jacobsoni* и *Acarapsis woodi*) и возбудители бактериальных инфекций [1].

Известно, что в состав микрофлоры медоносных пчел могут входить микроорганизмы различных физиологических групп, выполняющие определенные функции. В.И. Полтевым составлен перечень микроорганизмов, обнаруживаемых у пчел, в том числе и в кишечнике [2].

В связи с вышесказанным, безусловный интерес представляет исследование путей формирования, состава и численности прокариотных участников консорции: пчелиная семья – медоносные растения. Исследование имеет и практическую (эпидемиологическую) значимость, поскольку именно пчел, в силу их полезности, человек приблизил к своему дому [3]. Активно посещая разнообразные субстраты, они могут

участвовать в формировании микробного пейзажа среды обитания человека.

Одним из возможных, важных элементов микробиоценозов пчел могут быть энтеробактерии (*Enterobacteriaceae*)

Сообщения о том, что микрофлора пчел может содержать условно-патогенные бактерии, заставляет рассматривать их как потенциальных участников циркуляции энтеробактерий в природе и в окружении человека.

Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* регулярно выделяются из почвы и воды, сохраняют жизнеспособность в широком диапазоне абиотических факторов среды, нередко обладают патогенностью для многих беспозвоночных и позвоночных животных, и человека. Способность утилизировать углеводы, спирты, аминокислоты, целый комплекс циклических органических соединений; участие в процессах нитрификации, денитрификации, аммонификации, азотфиксации позволяют энтеробактериям занимать различные местообитания [4].

В ряде работ сообщается о патогенности некоторых энтеробактерий и для пчел. Так, известно заболевание пчел, вызываемое бактериями *Nafnia alvei*. При этом микроорганизмы этого рода могут успешно сохранять свою жизнеспособность в меду до 300 и более дней [5].

Чрезвычайно патогенными для насекомых Э. Штейнхауз [6] считает *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*. В патологии насекомых отмечаются виды: *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia intermedium*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* [7]. Бактерии родов *Citrobacter*, *Enterobacter* и *Klebsiella*

выделены из обножки и трутневого расплода. Установлена реакционность пчел к патогенной микрофлоре за счет хитиновых покровов насекомых. Обнаружена патогенная микрофлора на внутренней поверхности ульев. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о необходимости строгого санитарно-бактериологического контроля продуктов пчеловодства, используемых при изготовлении пищевых продуктов [8].

Безусловно, источниками формирования спектра бактерий у пчел являются субстраты, которые они посещают, в первую очередь медоносные растения, видовое разнообразие и доступность которых напрямую зависят от природно-климатических условий.

Таким образом, цель данной работы – исследование состава энтеробактерий пчел в период зимовки и активного медосбора и медоносных растений.

Экспериментальная часть

Пробы пчел отбирали на пасеках Нижегородской области в летний и зимний периоды. Непосредственно перед бактериологическим посевом насекомых усыпляли хлороформом, обрабатывали в 70%-ном этаноле и промывали в стерильном физиологическом растворе. Затем насекомых по пять особей растирали с 2 мл физиологического раствора. Из исходных суспензий готовили десятикратные разведения до 10^6 включительно.

Пробы цветов медоносных растений были собраны в разных районах Нижегородской области во время посещения их пчелами. В лабораторных условиях готовилась суспензия путем измельчения цветов с физиологическим раствором. По 0.1 мл полученных суспензий засеивали на дифференциально-диагностические среды Эндо и *Chromocult* («Merck», Германия). Посевы инкубировали при 37°C в течение 24 ч.

Все исследования проводили в соответствии со схемами идентификации, представленными в определителе бактерий Берджи [9]. Изучали биохимические свойства выделенных культур.

Для определения азотфиксирующих свойств штаммов *Klebsiella oxytoca* оценивали способность роста на безазотистой среде Эшби.

Результаты и их обсуждение

Спектр энтеробактерий в составе микробиоценоза пчел в период активного медосбора оказался более разнообразным, чем описывалось

ранее [10], и включал 19 видов, представителей 10 родов семейства *Enterobacteriaceae*, среди них наиболее часто изолированы *Erwinia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* (таблица). Такое разнообразие еще не свидетельствует о заболевании пчел, наличие большого числа различных энтеробактерий, возможно, обуславливает формирование нормальной микрофлоры насекомых, в то время как сдвиг микрофлоры в сторону какого-либо одного микроорганизма может привести к заболеванию. Еще Штейнхауз [10] отмечал наличие энтеробактерий в составе нормальной микрофлоры насекомых, в то время как попадание этих же бактерий в гемолимфу особи может привести к гибели последней.

В составе энтерофлоры (микрофлоры энтеробактерий) медоносных растений обнаружены 14 видов, представители девяти родов семейства *Enterobacteriaceae*. Общими для всех исследуемых нами видов растений и пчел стали бактерии родов *Hafnia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*. Меньшее разнообразие энтеробактерий у растений можно объяснить тем, что пчелы посещают не только цветы растений, но и другие субстраты.

В летний период пчелы наиболее массивно обсеменены эрвиниями (*Erwinia herbicola*), что косвенно может свидетельствовать о контаминации пчел в период посещения медоносных растений. Обращает на себя внимание превалирование у пчел эрвиний, возможно поступающих к ним с цветов, а также бактерий родов *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, которые могут вызывать как заболевания самих пчел, так и быть потенциально-опасными для человека. Особый интерес представляет обнаружение бактерий р. *Klebsiella*. Ряд авторов отмечали способность клебсиелл колонизировать растительный материал, в том числе и живые растения [11].

У зимующих пчел состав энтерофлоры был беднее и включал в себя представителей 6 родов семейства *Enterobacteriaceae*. Проведенные нами исследования подтвердили постоянное присутствие энтеробактерий у пчел в течение всего периода зимовки, что согласуется с данными других авторов [12]. Среди них наиболее часто обнаруживалась *Klebsiella (Klebsiella oxytoca)*. Наряду с *Klebsiella oxytoca* обнаружены и другие энтеробактерии – *Citrobacter*, *Providencia*, *Proteus*, *Hafnia alvei*, *Escherichia coli*. При этом количество колониеобразующих единиц (КОЕ), обнаруженное у пчел одной семьи, варьировало у разных особей и в зависимости от срока зимовки.

Бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, выделенные от пчел и медоносных растений

Таблица

Исследуемый субстрат	Количество обследованных проб	Количество проб, содержащих энтеробактерии	Количество проб, содержащих бактерии вида, %																		
			<i>Erwinia herbicola</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia adecarboxylata</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter intermedium</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Morganella morganii</i>
Пчелы	89	82 (92%)	33	16	8	1	8	6	8	4	–	17	2	2	1	22	12	12	17	4	4
Медоносные растения	205	130 (63%)	79	3	16	–	3	2	–	3	2	9	–	2	2	2	3	6	9	2	–
Зимующие пчелы	10	10 (100%)	–	20	–	–	60	50	–	30	–	–	–	–	–	0	90	30	–	–	–

Виды энтеробактерий, обнаруженные у пчел, обладают широким спектром ферментативных возможностей, что может обеспечивать переваривание и доступность для усвоения углеводов в пищеварительной системе насекомых. Обнаруженные нами штаммы *Klebsiella oxytoca* успешно сбраживают сахарозу – основной продукт подкормки зимующих пчел.

Постоянное обнаружение *Klebsiella oxytoca* у зимующих пчел позволяет предположить их физиологическую роль, что, безусловно, требует дальнейшего изучения.

Проведенные исследования показали, что обнаруженные нами штаммы *Klebsiella oxytoca* активно размножаются на безазотистой среде Эшби. Это также может свидетельствовать о роли клебсиелл в качестве источника связанного азота как для микробного сообщества пчелы, так и для насекомого.

Заключение

Таким образом, в ходе исследования от пчел выделены 19 видов, представители 10 родов семейства *Enterobacteriaceae*. Общность видов энтеробактерий у пчел и медоносных растений может свидетельствовать о контаминации пчел в период сбора пыльцы и нектара.

Установлено постоянное присутствие энтеробактерий у пчел в разные сроки зимовки. Проведенный сравнительный анализ состава энтеробактерий у зимующих пчел и в период активного медосбора показал большее разнообразие энтеробактерий в летний период, что, вероятно, объясняется посещением пчелами различных субстратов, в первую очередь медоносных растений.

Частое обнаружение штаммов *Klebsiella oxytoca* как в летний, так особенно в зимний период и активное размножение их на безазотистой среде Эшби, а также способность активно утили-

зировать сахарозу позволяют предположить их физиологическую роль. В частности, возможно участие клебсиелл в утилизации субстратов корма (сахароза) и в формировании депозитов связанного азота в организме насекомого.

Список литературы

1. <ftp://ftp.fao.org/ag/agn/planttreaty/gb3/gb3i10r.pdf> (дата обращения: 25.03.2010)
2. Микрофлора насекомых / Под ред. В.И. Полтева, И.Н. Гриценко, А.И. Егоровой и др. Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1969. 271 с.
3. Поправко С.А. Растения и пчелы. М.: Агропромиздат, 1985. 240 с.
4. Современная микробиология: прокариоты / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. В 2 т. М.: Мир, 2005.
5. Салимов Р.М. Выделение и выживаемость гафний и шигелл в различных медах // В сб. науч. тр.: «Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных». Приморский сельхозинститут, 1978. Вып. 47. С. 60–66.
6. Штейнхаус Э. Патология насекомых. М.: Иностранная литература, 1952. 840 с.
7. Африкян Э.К. Энтомопатогенные бактерии и их значение. Ереван: Изд-во АН Армянской ССР, 1973. 362 с.
8. Хисматуллин Р.Г. Свойства природных компонентов пчеловодства в процессах бактерицидной реактивности пчел, в технологиях косметических производств. Автореферат дис. ... канд. техн. наук. М.: Моск. гос. ун-т пищ. пр-ва, 2002. 23 с.
9. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. В 2 т. М.: Мир, 1997.
10. Штейнхаус Э. Микробиология насекомых. М.: Иностранная литература, 1950. 767 с.
11. Маркова Ю.А., Романенко А.С., Духанина А.В. Выделение бактерий семейства *Enterobacteriaceae* из растительных тканей // Микробиология. 2005. Т. 74. № 5. С. 663–666.
12. Ляпунов Я.Э., Кузьев Р.З., Хисматуллин Р.Г., Безгодова О.А. Энтеробактерии кишечника зимующих пчел *Apis mellifera mellifera* L. // Микробиология. 2008. Т. 77. № 3. С. 421–428.

COMPARISON OF THE COMPOSITION OF ENTEROBACTERIA IN HONEY BEES *APIS MELLIFERA MELLIFERA* L. DURING THE WINTERING AND IN THE ACTIVE HONEY SEASON

U.E. Chechetkina, N.I. Evteeva, A.I. Rechkin

The results of the study are presented of the species composition of the family Enterobacteriaceae in bee plants and in honey bees during hibernation and the active honey season. Species commonality of enterobacteria in honey bees and bee plants is shown. The permanent presence but with a smaller variety of enterobacteria in honey bees has been found in the winter period. Strains of *Klebsiella oxytoca* have most frequently been found, which may testify to their physiological role.

Keywords: bees, bee plants, enterobacteria, *Klebsiella oxytoca*.