

УДК 638.154.3:579.873.13

Климко Т.И., магистр сельскохозяйственных наук
Зинина Н.В., кандидат биологических наук
Архипова Н.В., кандидат ветеринарных наук

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского», г. Минск, Республика Беларусь

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *BIFIDOBACTERIUM* ИЗ КИШЕЧНИКА РАЙОНИРОВАННОЙ ПЧЕЛЫ

Резюме

В статье приведены данные о выделении бактерий *Bifidobacterium asteroides* из кишечника районированной пчелы и изучении их антагонистической активности. В результате исследований были выделены и идентифицированы три штамма *Bifidobacterium asteroides*: BG9, BG21 и BG24. Идентифицированные штаммы продемонстрировали значительную антагонистическую активность по отношению к возбудителям таких заболеваний пчел, как гафниоз (*Hafnia alvei* 9760 B-57), европейский гнилец (*Streptococcus pluton*, *Melissococcus pluton* B-11115) и американский гнилец (*Penibacillus alvei* B-5247).

Ключевые слова: кишечник медоносной пчелы, *Bifidobacterium*, гнилец американский, гнилец европейский, гафниоз.

Summary

The article presents data on the isolation of the bacteria *Bifidobacterium asteroides* from the intestines of a zoned bee and the study of their antagonistic activity. As a result of the research, three strains of *Bifidobacterium asteroides* were isolated and identified: BG9, BG21 and BG24. The identified strains demonstrated significant antagonistic activity against pathogens of bee diseases, such as hafniosis (*Hafnia alvei* 9760 B-57), European foulbrood (*Streptococcus pluton*, *Melissococcus pluton* B-11115) and American foulbrood (*Penibacillus alvei* B-5247).

Keywords: honey bee intestines, bifidobacteria, American foulbrood, European foulbrood, hafniosis.

Поступила в редакцию 07.05.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

Как свидетельствуют археологические данные, человек занимается пчеловодством на протяжении уже 6000 лет. Принципиально за это время ничего не изменилось: пчел содержат для получения продуктов пчеловодства. Но проблема в том, что процессы интенсификации повлияли на качество этих продуктов. В качественных продуктах пчеловодства не должны содержаться вещества, не свойственные их природному составу (токсичные и радиоактивные элементы, остатки лекарственных препаратов). При этом у пчел регистрируется более 20 инфекционных заболеваний, и пусковым механизмом большинства из них являются стресс-факторы, причем избежать абсолютно всех неблагоприятных условий на практике невозможно. Самые распространенные причины ослабления семей – заклещеванность, резкая смена температуры, влажность, перенаселение, голод, плохой корм, недостаток кислорода, гормональный дисбаланс, химические препараты,

лекарства, а также ультрафиолетовый свет, X-лучи, манипуляции с семьей пчел, беспокойство во время зимовки. С учетом вышесказанного абсолютно логичным желанием пчеловодов является использование поддерживающих пчелосемьи лекарственных средств для получения стабильно высокого количества пчелопродукции. Самым простым решением проблемы инфекционных заболеваний являются антибиотики и антибиотикоподобные вещества, которые, к огромному сожалению конечного потребителя, накапливаются в продуктах пчеловодства [3].

Во всех отраслях сельского хозяйства специалисты заняты поиском безопасной замены антибиотикам. Одним из перспективных методов достижения этой цели является использование пробиотиков. Они представляют собой живые микроорганизмы, которые, поступая в организм пчел, способны оказывать благоприятное воздействие на иммунную и репродуктивную системы.

Нормальная микрофлора кишечника обеспечивает широкий спектр метаболических, трофических и защитных функций медоносной пчелы, которые играют важную роль в защите от патогенных микроорганизмов. В последнее время в пчеловодстве актуальным является использование полезной микробиоты в составе пробиотических препаратов [2].

В период весеннего развития при недостаточном поддерживающем медосборе пчеловоды применяют побудительные подкормки, основу которых составляет сахарный сироп, обогащенный препаратами аминокислот, витаминов, микроэлементов [1].

Считается, что пробиотические препараты, добавляемые в стимулирующие подкормки для пчел, могут значительно улучшить микробиоценоз их кишечника за счет подавления роста патогенных бактерий и стимуляции размножения симбиотических микроорганизмов. В результате этого улучшается пищеварение, повышается иммунитет и снижается вероятность заболеваний [3]. Пробиотические препараты могут положительно влиять на продуктивность пчелиных семей, репродуктивные показатели маток. Улучшенное пищеварение и повышенная иммунная функция могут привести к увеличению количества собираемого меда, а также к повышению качества других продуктов пчеловодства. Пробиотические микроорганизмы могут отличаться по механизму действия на организм животного. Исследованиями установлено, что бактерии родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* оказывают антибактериальное действие посредством продуцирования органических кислот (молочной и уксусной), перекиси водорода, диацетила (продукт ферментации углеводов с антибактериальной активностью) и бактериоцинов (пептиды, обладающие антимикробной активностью).

Рядом исследований показано, что состав микробиоты кишечника медоносных пчел может изменяться в зависимости от времени года и доступности корма. Сезонные изменения в растительности и погодных условиях могут влиять на видовой состав микроорганизмов, которые пчелы получают с нектаром и пыльцой.

Установлено, что нектар, собранный пчелами, может содержать не только пита-

тельные вещества, но и различные микроорганизмы, как полезные, так и патогенные [4]. Но в то же время в мировом научном сообществе доказано относительное постоянство состава кишечной микробиоты взрослой пчелы. В кишечнике рабочих пчел *Apis mellifera* преобладают бактерии 8 видов, составляющие более 95 % от общего количества бактерий у большинства особей [5]. Эти виды одинаковы для пчел во всем мире, но варьируют в количественном соотношении штаммов в зависимости от территории, где обитает данное насекомое. Отсюда следует вывод, что нужно учитывать территориальный аспект при выборе штамма для пробиотика, и самым логичным объектом для выделения штамма является местная пчела.

Также имеются данные, что кишечник взрослой пчелы колонизируется типичными видами кишечных бактерий в течение первых нескольких дней после выхода из стадии куколки. Колонизация кишечника происходит в результате контакта молодых пчел с пчелами-кормилицами и с окружающей средой улья. Личинка же не имеет этих микроорганизмов, и у них выделяют микроорганизмы, которые попали в кишечник с кормом. Этим же путем попадает и патогенная микробиота. Логичным является заселение кишечника личинки и пространства улья пробиотическим местным штаммом.

Выделение и включение новых пробиотических культур в практику пчеловодства может привести к улучшению здоровья пчел и стабильности пчелиных колоний, что, в свою очередь, способствует сохранению биоразнообразия и устойчивости экосистем. Данное направление открывает новые перспективы для улучшения здоровья пчел и устойчивости пчеловодства, что требует углубленных исследований и внедрения полученных знаний в практику.

Разработка новых пробиотических продуктов для пчеловодства, которые могут улучшить здоровье пчел, повысить их устойчивость к болезням и, следовательно, увеличить продуктивность пчелиных семей, является актуальным направлением пчеловодства.

Целью исследования было выделение бактерий рода *Bifidobacterium* из ки-

пчелника медоносной пчелы с последующей оценкой их антагонистической активности к возбудителям болезней пчел (гафниоз, американский и европейский гнильцы).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа по выделению и идентификации бактерий рода *Bifidobacterium* проводилась совместно РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси».

Отбор материала для выделения бифидобактерий проводили на экспериментальной пасеке и в лаборатории болезней пчел РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Культуры бактерий рода *Bifidobacterium* выделяли из средней и задней кишки местных здоровых рабочих пчел *A. mellifera carnica*. Для проведения исследования живых пчел усыпляли в морозильной камере. Отбирали по 10 пчел каждой исследуемой семьи и в стерильных условиях препарировали кишечник, состояние которого сразу же оценивали по бальному методу, предложенному Шагун Л.А. (1983).

Затем кишечник с содержимым тщательно гомогенизировали и готовили 3-кратное разведение в изотоническом растворе хлорида натрия. Каждое полученное разведение (по 100,0 мкл) высевали с помощью шпателя Дригальского на поверхность селективных питательных сред: бифидум-среды (Оболенск) и среды MRS (Codalab). Через 72–96 ч инкубации в анаэробных условиях при температуре 37 °С осуществляли учет выросших колоний.

Идентификацию выделенных культур бактерий осуществляли по морфологическим, культуральным, биохимическим и тинкториальным признакам, а также на основании данных анализа белковых профилей с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией (МАЛДИ-ВПМС). Подготовку культур для МАЛДИ-ВПМС осуществляли по стандартной методике. Снятие спектров проводили в автоматическом режиме на масс-спектрометре MALDI Biotyper MicroFlex (Bruker Daltonics, Германия). Полученные спектры анализировали с использованием системы управления базами данных MALDI BioTyper для идентификации микроорганизмов.

Антагонистическую активность выделенных культур бифидобактерий оценивали методом лунок, используя в качестве тест-культур штаммы *Hafnia alvei* 9760 B-57 (возбудитель гафниоза), *Melissococcus plutonius* (*Streptococcus pluton*, *Melissococcus pluton*) B-11115 (возбудитель европейского гнильца) и *Penibacillus alvei* B-5247 (возбудитель американского гнильца). Для этого на «газоне» патогенных микроорганизмов прокалывали лунки диаметром 9 мм и вносили в них культуральную жидкость объемом 0,1 мл.

Уровень антагонизма бактерий рода *Bifidobacterium* определяли по зоне задержки роста (ЗЗР) при культивировании патогенов. Если ЗЗР составляла 5–10 мм, то уровень антагонистической активности считался слабым, 10–20 – средним, больше 20 – высоким. Учет результатов проводили через 24 ч культивирования при оптимальной температуре в термостате 37 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выделенные из кишечника медоносных здоровых рабочих пчел чистые культуры бактерий по морфологическим, тинкториальным и биохимическим признакам схожи с представителями рода *Bifidobacterium*. Как видно из данных таблицы 1, исследуемые культуры с наибольшей вероятностью относятся к виду *Bifidobacterium asteroides*. Параметр достоверности идентификации для штаммов BG9 и BG21 составил 2,082 и 2,072, соответственно, что указывает на точную идентификацию до рода, вероятную идентификацию до вида. Для штамма BG24 параметр достоверности равнялся 1,97, что указывает на вероятную идентификацию до рода (таблица 1).

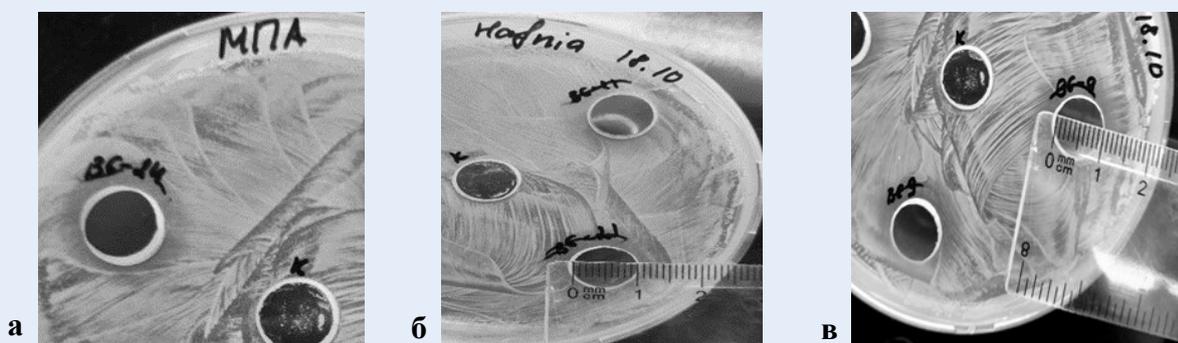
Результаты исследования антагонистической активности штаммов *B. asteroides* BG24, BG21 и BG9 в отношении чистой культуры патогена *H. alvei* 9760 приведены на рисунке 1. Можно увидеть, что штамм BG9 при культивировании *H. alvei* 9760 дал ЗЗР 14 мм, а штаммы BG 24 и BG 21 – по 12 мм. Эти показатели ЗЗР соответствуют среднему уровню антагонистической активности.

Результаты исследования антагонистической активности штаммов *B. asteroides* BG9, BG21 в отношении чистой культуры патогена *M. plutonius* B-11115 представлены на рисунке 2.

Таблица 1 – Результаты видовой идентификации культур бактерий, выделенных из кишечника пчел

Штамм	Видовая принадлежность	Параметр достоверности
BG9	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	2,082
BG21	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	2,072
BG24	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	1,97

Примечание – 2,300...3,000 – точная идентификация до вида; 2,000...2,299 – точная идентификация до рода, вероятная идентификация до вида; 1,700...1,999 – вероятная идентификация до рода; 0,000...1,699 – ненадежная идентификация

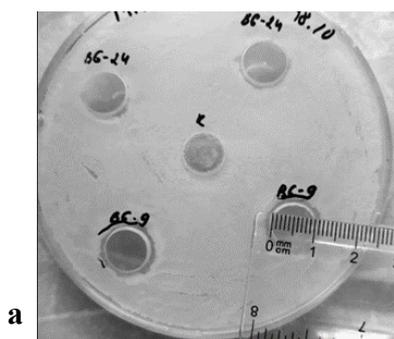


а – штамм BG24; б – штамм BG21; в – штамм BG9

Рисунок 1 – Антагонистическая активность штаммов *B. asteroides* в отношении *H. alvei* 9760

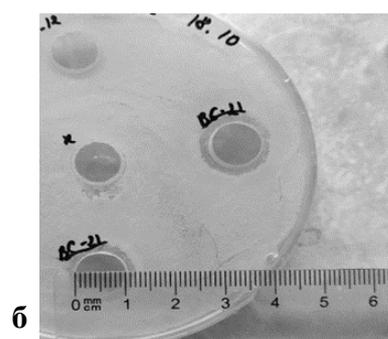
При изучении антагонистической активности выделенных штаммов *B. asteroides* против возбудителя европейского гнильца *M. plutonius B-11115* (рисунок 2) нами были установлены ЗЗР для двух изо-

лятов: BG9 и BG21 – соответственно, 11 и 12 мм. Данные величины зоны задержки роста *M. plutonius B-11115* характеризуют антагонистическую активность штаммов как среднюю.



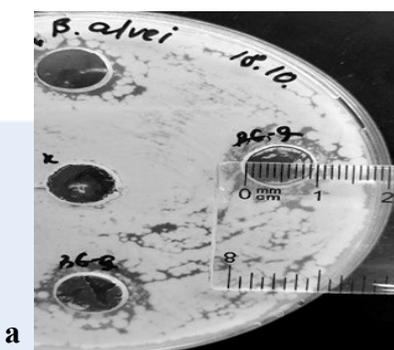
а – штамм BG9; б – штамм BG21

Рисунок 2 – Антагонистическая активность штаммов *B. asteroides* в отношении патогена *M. plutonius B-11115*



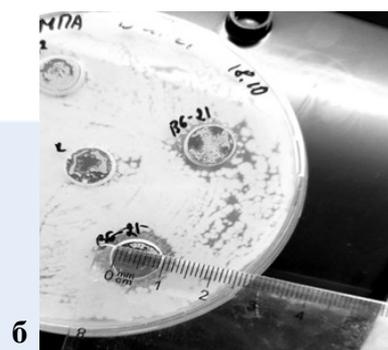
Полученные нами результаты исследования антагонистической активности штаммов *B. asteroides* BG9, BG21 в отноше-

нии чистой культуры патогена *P. alvei B-5247* приведены на рисунке 3.



а – штамм BG9; б – штамм BG21

Рисунок 3 – Антагонистическая активность штаммов *B. asteroides* в отношении патогена *P. alvei B-5247*



Результаты изучения антагонистической активности штаммов BG9 и BG21 *B. asteroides* в отношении возбудителя американского гнильца (*P. alvei* B-5247) (рисунок 3) показали ЗЗР по 12 мм каждый. Полученные данные указывают на среднюю антагонистическую активность штаммов к данному возбудителю.

Полученные результаты исследования свидетельствуют о том, что штаммы *Bifidobacterium asteroides* BG9, BG21 и BG24 обладают потенциальными пробиотическими свойствами. Это открывает возможности для разработки новых пробиотических продуктов для пчеловодства, которые могут улучшить здоровье пчел, повысить их устойчивость к болезням и, следовательно, увеличить продуктивность пчелиных семей.

Идентификация новых штаммов *Bifidobacterium asteroides* BG9, BG21 и BG24 представляет собой важное достижение, так как эти микроорганизмы могут играть ключевую роль в поддержании здоровья пчел. Учитывая, что такие заболевания пчел, как гафниоз и гнилец, являются серьезными угрозами для пчелиных семей, открытие эффективных антагонистических агентов среди естественной микрофлоры

пчел имеет большое значение для профилактики и лечения этих заболеваний.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение механизмов действия этих штаммов, а также на их применение в различных условиях пчеловодства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования кишечника местных пчел *A. mellifera carnica* были выделены и идентифицированы три штамма *Bifidobacterium asteroides*: BG9, BG21 и BG24. Выделенные штаммы продемонстрировали значительную антагонистическую активность по отношению к возбудителям заболеваний пчел, таких как гафниоз, европейский и американский гнилец. Полученные результаты указывают на перспективность использования данных штаммов в качестве пробиотических культур в пчеловодстве.

Авторы благодарят заведующего лабораторией коллекции микроорганизмов, канд. биол. наук, доцента А.В. Сидоренко и научного сотрудника лаборатории коллекции микроорганизмов А.Д. Герасимович Института микробиологии НАН Беларуси за методическую помощь в выделении и идентификации культур бифидобактерий.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Билай, Н. Г. Сравнительный анализ белковых заменителей / Н. Г. Билай // Пчеловодство. – 2003. – № 1. – С. 53–54.
2. Мишуковская, Г. С. Применение пробиотиков для повышения продуктивности темной лесной пчелы бакирской популяции / Г. С. Мишуковская // Темная лесная пчела *Apis mellifera mellifa* L. – Уфа : Изд. Гилем, 2015. – С. 193–197.
3. Викуль, С. И. Антибиотики в меде – пути попадания, характеристика и особенности определения / С. И. Викуль // Напої. Технології та інновації. – 2016. – № 1-2. – С. 54–55.
4. Сердюченко, И. В. Количественная оценка микрофлоры пищеварительного тракта пчел до и после зимовки / И. В. Сердюченко // Молодой ученый. – 2017. – № 2. – С. 157–166.
5. Moran, N. A. Genomics of the honey bee microbiome / N. A. Moran // Curr. Opin. Insect Sci. – 2015. – Vol. 10. – P. 22–28.