УДК 638.154.3+579.62

© Ефименко Т.М.

МІКРОБІОТА СТІЛЬНИКІВ З БДЖОЛИНИХ СІМЕЙ, УРАЖЕНИХ ГНИЛЬЦЕМ

Т.М. Єфіменко[1], О.М. Ярошко[2], М.С. Галата[2], В.В. Шепелевич[2], Л.Г. Степура[2], Л.М. Гриценко[2], Н.В. Яворська[2], В.М. Святецька[2], С.І. Войчук[3], Г.В. Односум[4]

[1] ННЦ «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича», вул. Акад. Д.К. Заболотного, 19, Київ, Україна, 03680

[2] ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, Київ, Україна, 01601

[3]Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, вул. Акад. Д.К. Заболотного, 154, Київ, Україна, 03143

[4]Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, Київ, Україна, 03041, Tatjana-Vladimir@yandex.ru

Досліджено мікробіоту стільників з ураженим бджолиним розплодом. На основі візуальних, імунохроматографічного, культурально-морфологічних, біохімічних, електронно-мікроскопічних методів виділено та попередньо ідентифіковано мікроорганізми-збудники хвороб бджіл: *Paenibacillus larvae* — американського гнильцю; *Bacillus paraalvei* — парагнильцю; *Melissococcus pluton* — європейського гнильцю. Окрім того, в зразках стільників виявлені коки, спороутворювальні палички і дріжджі, які, зазвичай, є нормальною мікрофлорою бджіл, однак, їх кількість достовірно збільшується при вірусних та бактеріальних інфекціях.

Ключові слова: бактеріальні хвороби бджіл, мікробіота зі стільників з ураженим розплодом бджіл, Paenibacillus larvae, Bacillus paraalvei, Melissococcus pluton.

Микробиота сотов с пчелиных семей, пораженных гнильцом

Т.М. Ефименко, О.Н. Ярошко, М.С. Галата, В.В. Шепелевич, Л.Г. Степура, Л.М. Гриценко, Н.В. Яворская, В.Н. Святецкая, С.И. Войчук, А.В. Односум

Исследована микрофлора пчелиных сотов с пораженным пчелиным расплодом. На основе визуальных, иммунохроматографического, культурально-морфологических, биохимических, электронно-микроскопических методов выделено и предварительно идентифицировано ряд микроорганизмов-возбудителей болезней у пчел: *Paenibacillus larvae* — американского гнильца; *Bacillus paraalvei* — парагнильца; *Melissococcus pluton* — европейского гнильца. Кроме того, в образцах сотов выявлены коки, спорообразующие палочки и дрожжи, представляющие, обычно, нормальную микрофлору пчел, однако начинающих увеличиваться количественно при вирусных и бактериальных инфекциях.

Ключевые слова: бактериальные болезни пчёл, микрофлора пчелиных сотов с пораженным пчелиным расплодом, Paenibacillus larvae, Bacillus paraalvei, Melissococcus pluton.

The microbiota of honeycombs with affected bee brood

T.M Yefimenko, O.M. Yaroshko, M.S. Halata, Shepelevych, L.G. Stepura, V.V. Grytsenko, N.V. Yavorska, V.M. Svyatetska, S.I. Voychuk, H.V. Odnosum[4]

Honey bees' diseases is the result of infraction of the normal bees' life, caused by the changes in morphofunctional processes of individuals or groups under the influence of unfavorable external and internal factors. Knowledge of these factors and the ability to manage them is the basis for maintenance of the strong and highly productive bee colonies. Bacterial bees` diseases is a common phenomenon on the apiaries, where bee colonies had a high degree of infestation of bees` mite Varroa destructor. Samples of the brood were taken exactly from those apiaries, affected by foulbrood. The microbiota of honeycombs with affected bee brood was investigated. On the basis of visual, immunochromatographic, cultural-morphological, biochemicals, electron-microscopic methods there were isolated and previously identified the number of microorganisms - pathogens of bee diseases: *Paenibacillus larvae* - American foulbrood; *Basillus paraalvei* – parafoulbrood; *Melissococcus pluton* - European foulbrood. In addition, in two samples of honeycombs there were found cocci, spore forming coli and yeasts, which commonly represent normal bees microflora, but its number significantly increases in case of viral and bacterial infections.

Key words: bacterial diseases of bees, microbiota of honeycombs with affected bee brood, Paenibacillus larvae, Bacillus paraalvei, Melissococcus pluton.

Вступ. Хвороби медоносних бджіл — результат порушення нормальної життєдіяльності бджолиної сім'ї, зумовлений змінами морфофункціональних процесів в особинах чи угрупованнях під впливом несприятливих зовнішніх і внутрішніх факторів. Знання цих факторів і вміння управляти ними є основою утримання на пасіках сильних і високопродуктивних бджолиних сімей (Гробов и др., 1992; Кокорев, Чернов, 2002).

Значної шкоди бджільництву завдають патогенні мікроорганізми. Серед збудників бактеріальних захворювань бджіл найбільш небезпечним є американський гнилець (злоякісний гнилець) **—** інфекційне захворювання бджолиних сімей, що супроводжується загибеллю дорослих личинок і передлялечок. У заражених стільниках спори зберігаються протягом 35 років, в вуликах і в вощині **—** 20, в медогонці **—** 5 років. Збудником цього захворювання є *Paenibacillus larvae*. Представники родів *Bacillus* та *Paenibacillus* є збудниками й інших бактеріальних хвороб бджіл: європейського гнильцю (*Paenibacillus alvei*; *Brevibacillus laterosporus*; *Paenibacillus apiaries)*; парагнильцю (*Bacillus paraalvei*), порошкоподібного розплоду (*Paenibacillus larvae pulvifaciens*) (Alippi, 1995; Heyndrickx et al., 1996; Tomkies et al., 2009; Flesar et al., 2010; Neuendorf et al., 2013).

Показано, що збудниками європейського гнильцю, крім бацил, можуть бути такі мікроорганізми як: *Melissococcus pluton*; *Enterococcus faecalis*. Збудниками сальмонельозу (паратифу) **—** інфекційної хвороби бджолиних сімей, що супроводжується загибеллю дорослих бджіл, є *Salmonella thyphimurium, S. pullorum, S. gallinarum.* Збудником колібактеріозу **—** інфекційної хвороби бджолиних сімей, що супроводжується загибеллю дорослих бджіл, є *Esherichia coli*, а спіроплазмозу (травнева хвороба, пилковий токсикоз) **—** *Spiroplasma apis* та інші види спіроплазм (Keskin, 1989; Reybroek et al., 2012).

Метою нашої роботи було: визначити та охарактеризувати мікробіоту стільників з ураженим закритим розплодом бджіл.

Матеріали і методи. Робота виконана на основі договору про творчу співпрацю між лабораторією технологічних та спеціальних заходів профілактики хвороб бджіл ННЦ «Інститут бджільництва ім. Прокоповича» та НДЛ «Мікробіологічних та імунологічних проблем біотехнології» ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Об'єктами досліджень були 10 зразків стільників з запечатаним розплодом, відібрані в травні-серпні 2012-2014 рр. на приватних пасіках в Київській та Житомирській областях. При візуальному огляді наданих зразків патологічного матеріалу вивчали стан розплоду (відкритий чи закритий), наявність строкатості розплоду, хворих і загиблих личинок, їх розміщення в комірках, консистенцію і запах (Руденко, 2001). Імунохроматографічне дослідження зразків проводили за допомогою комерційного набору тест-систем «Bio Test» згідно інструкції. Для бактеріальних досліджень патологічного матеріалу із комірок із хворим розплодом готували діагностичний змив. У відібрані 15–20 комірок, які містили загиблі личинки або їх залишки, вносили стерильний фізіологічний розчин і залишали на 20 – 30 хвилин. Ретельно перемішували вміст комірок і переносили у стерильні пробірки. Для виділення спорових бактерій, при підозрі на змішану форму захворювання розплоду, матеріал в одній пробірці нагрівали до 70°С протягом 3–4 хвилин, фільтрували через фільтрувальний папір. Отриманий фільтрат центрифугували при 5000 об./хв. впродовж 10-ти хвилин або відстоювали 30–40 хвилин, знову прогрівали за 70°С не більше 3-х хвилин. Із нижньої частини вмісту пробірки

стерильно відбирали 1–2 мл і робили висіви на підготовлені середовища. Другу партію пробірок зі змивом прогрівали на водяній бані за температури 96–98°С протягом 3–5-ти хвилин (Gregorc, Bowen, 1992; Alippi, 1995). Підготовлені змиви висівали на живильні середовища: Томашеца, Черепова, Бейлі, МПА та МПА з 10%-ною нормальною конячою сироваткою, тіогліколеве середовище. Культивували в термостаті за температури 35–37°С. Мікроскопіювання пофарбованих за Грамом клітин здійснювали за допомогою світлового мікроскопу фірми Micromed, для зйомки мікропрепаратів використовували насадку цієї фірми; для перегляду фотографій використовували комп'ютерну програму TSView. Для спороутворювальних мікроорганізмів проводили електронномікроскопічні дослідження за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEM 1400 (Jeol, Японія) при напрузі 80кв та інструментальному збільшенні 600 - 10000. Використовували мідні сіточки (Sigma, США) з плівкою підкладкою з формвара (Serva, Німеччина), контрастером слугував 2% розчин ураніл-ацетату. Визначення культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей вилучених культур проводили за стандартними методами (Gregorc, Bowen, 1992; Alippi, 1995; Руденко, 2001).

Результати і обговорення. У результаті проведених досліджень було проаналізовано 10 зразків стільників з запечатаним розплодом, люб'язно наданих лабораторією патології бджіл ННЦ «Інститут бджільництва ім. Прокоповича».

У зразках №1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10 загиблий розплід переважно знаходився в запечатаних, а у зразках №3 та 9 у відкритих комірках. Кришечки мали темне забарвлення з отвором і конусоподібним заглибленням у центрі. Розплід являв собою тістоподібну, тягучу масу з запахом гнилі. Уражені личинки недорозвинені, темного кольору, розм'якшені, при витяганні з комірок легко розривалися на частини і мали неприємний гнилісний запах і жовтувато-сіру рідину всередині (рис. 1 А, В). В зразку № 4 уражені лялечки були білого кольору, розм'якшені, мали неприємний гнилісний запах (рис.1 Б, В). Вміст лялечок являв собою молочно-білу рідину.

Як показали дослідження, склад мікробіоти різних зразків стільників суттєво відрізнявся між собою. Так, лише у двох зразках стільників №1 та №4 були виявлені дріжджі (рис. 2). Колонії були молочно-білого кольору з рівними краями, розміром 1-5 мм, не ферментували сахарозу, маніт, лактозу, не містили каталазу.

Відомо, що дріжджі можуть виступати продуцентами вітаміну В в кішківнику бджіл (Gilliam, 1997).

В той же час, дріжджі у великій кількості найчастіше знаходять у бджіл, які мали одноманітний раціон харчування, а саме: за умови їх утримання на штучних кормах, або на меді, який отриманий з монокультури, або коли бджоли переробляли нектар, зібраний з рослин, оброблених пестицидами, чи у тих бджіл, яких лікували антибіотиками. Тобто, присутність в кишковнику бджіл дріжджів може бути індикатором стресових умов, яких зазнали бджоли. Серед дріжджів у бджіл знаходять таких представників як: *Torulopsis magnoliae, T. glabrata, Candida parapsilopsis, Hansenula anomala* (Gilliam et al., 1974).

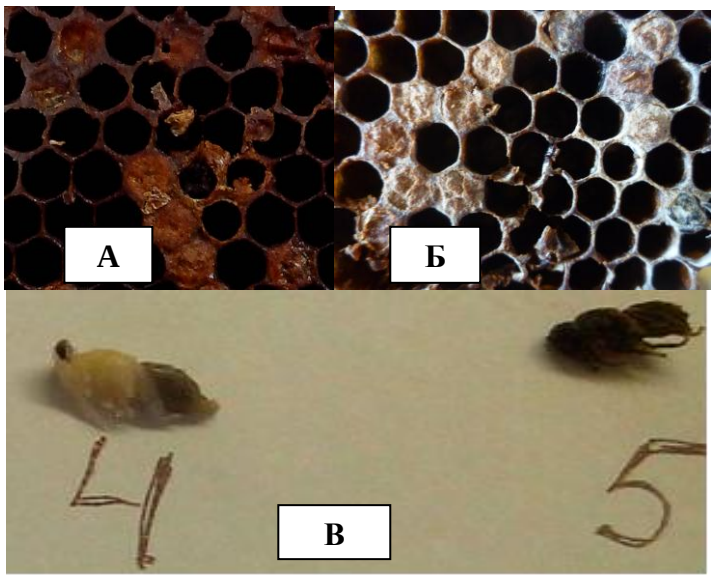


Рис.1. Зразок стільників № 4 (А) і №5 (Б) з розплодом та вилучені з запечатаних комірок передлялечки (В).
Fig. 1. The sample of comb № 4 (A) and №5 (Б) with brood and removed from the sealed cells propupaes (B).

З дев'яти досліджуваних зразків були виділені 11 штамів паличкоподібних аеробних спороутворювальних бактерій. Більшість культур на середовищі МПА формували однотипні колонії, на першу добу культивування — невеликі білуваті, з рівним краєм, розміром від 1 до 3 мм. При подальшому культивуванні, протягом 7 діб, утворювались розплющені великі шорсткі колонії з нерівними краями, розміром 8-10мм. На МПБ спостерігали поверхневий ріст у вигляді товстої плівки, яка з часом опускалась на дно.

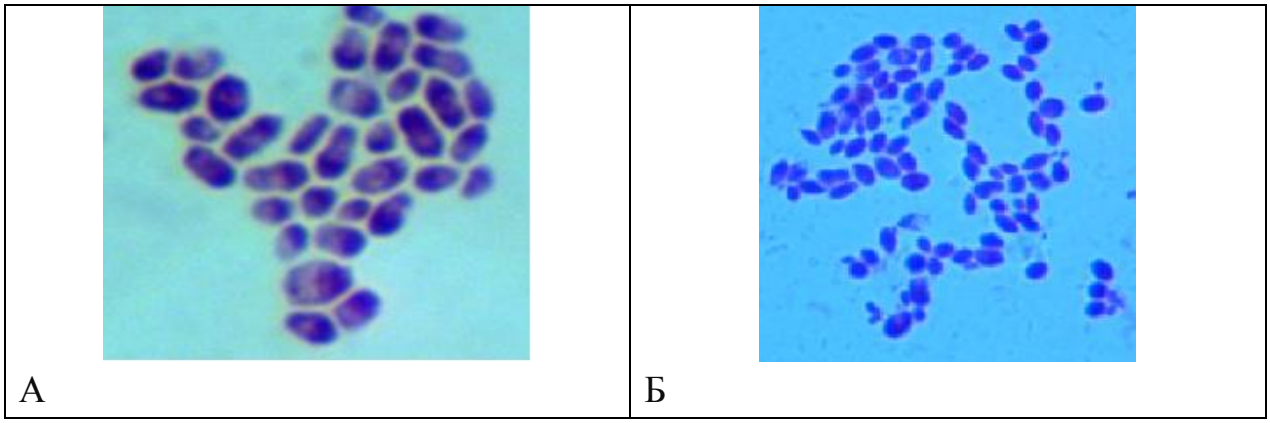
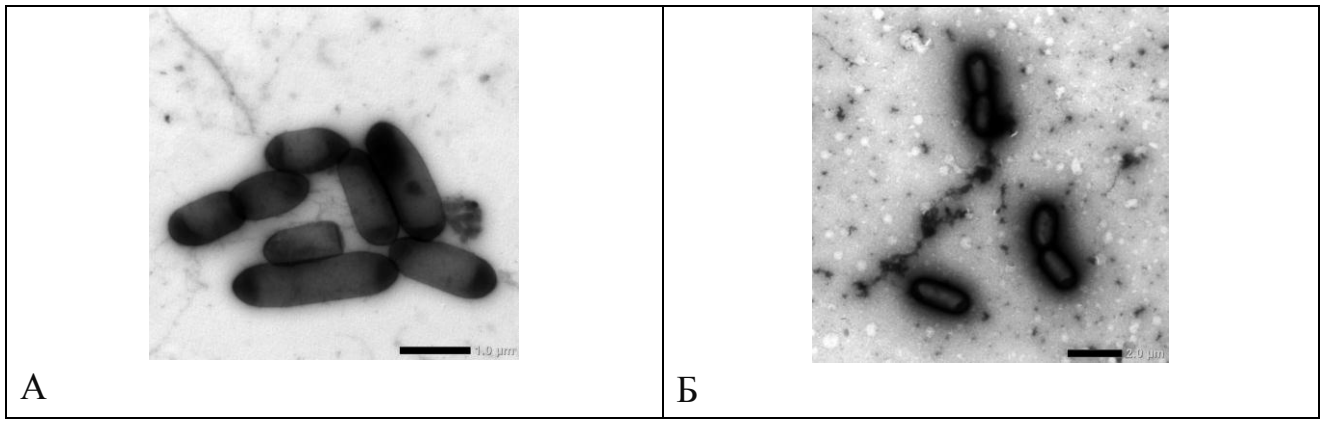


Рис.2 Клітини дріжджів, виділені з зразка №1 (А) та №4 (Б). (Збільшення х480).
Fig.2 The cells of yeasts isolated from the sample №1 (A) and №4 (B). (Increase x 480)

Досліджувані спороутворювальні бактерії відрізнялись між собою за розмірами, характером розташування після поділу та біохімічними особливостями. Клітини мали заокруглені кінці і розташовувалися одиночно, парами (штами, виділені із зразків № 1, 2, 4, 9, 10) або утворювали ланцюжки (штами, виділені із зразків № 5, 6). Розмір клітин варіював в межах від 0,6-0,9х1-2 мкм. до 1,0-1,2х2-4 мкм. Культури були рухливими, продукували каталазу, не засвоювали мальтозу, лактозу, сахарозу, маніт. Спори у всіх виділених культур були овальні, розміщувались центрально і не перевищували розмір вегетативної клітини.

За даними електронної мікроскопії штам 1.2, виділений із зразка №1, відрізнявся від інших культур наявністю чітко-вираженої капсули навколо клітинної стінки та активним продукуванням екзометаболітів (рис. 3 А, Б).



А Б

Рис 3. Електронна мікроскопія штамів 1.1 та 1.2, виділених із зразка №1.
Fig. 3. Electron microscopy of the strains 1.1 and 1.2, isolated from the sample № 1.

За результатами світлової і електронної мікроскопії, за морфологічними ознаками колоній, біохімічними дослідженнями можна припустити, що виділені штами з зразків № 1, 2, 4, 5, 6, 9, 10 є представниками роду *Bacillus*.

В кишківнику бджіл виявляють різні види спороутворювальних бактерій, такі як: *B. megaterium, B. subtilis, B. pumilus, B. licheniformis, B. circulans, B. alvei, B. coagulans, B. brevis, B. cereus, B. sphaericus, B.firmus, B. laterosporus, B. polymyxa*, що є їх нормальною мікробіотою. Відомо, що бацили можуть виступати як антагоністи *Ascosphaera apis*, що є збудником такого захворювання як вапняний розплід. Бацили є продуцентами антибіотичних речовин, жирних кислот, ензимів і сприяють перетравлюванню крохмалю, білків, цукрів, целюлози (Gilliam, Morton, 1978).

Із зразка № 3 була виділена грампозитивна спороутворювальна бактерія, що мала ряд особливостей. Ріст мікроорганізмів спостерігали після висіву прогрітих до 98°С змивів на середовищі МПА з додаванням сироватки та середовищі Томашеца. Культура не росла на середовищі МПА. На третю добу культивування спостерігали утворення сіро-жовтих шорстких колоній з нерівними краями. На МПБ з сироваткою ріст культури супроводжувався помутнінням середовища з подальшим утворенням осаду.

Мікроскопія вирослих колоній показала, що виділені бактерії мають розміри клітин 0,5-0,8 х 2-3 мкм. і вони розташовуються ланцюжками у фіксованих препаратах (рис. 4 А). Культура ферментувала глюкозу з виділенням кислоти, не ферментувала лактозу, сахарозу, галактозу, арабінозу, мальтозу, ксилозу, маніт, сорбіт, дульцит, інозит. Спостерігали розрідження желатини, пептонізацію молока, відсутність каталази та гемолітичної активності.

Результати імунохроматографічного дослідження підтвердили наше припущення про наявність в зразку №3 збудника американського гнильцю *Paenibacillus larvae*.

На середовищі МПА з сироваткою, із зразка №7, була виділена спороутворювальна бактерія, що утворювала дрібні колонії і росла дуже повільно. На середовищі Томашеца і МПА з сироваткою спостерігали шорсткі колонії з сірим відтінком, що характеризувались повзучим ростом. На МПБ культура утворювала осад на дні пробірки. Виділений мікроорганізм являв собою грампозитивну паличку розміром 0,5-0,7 х 2,4-3,5 мкм. Клітини

розміщувалися поодиноко або парами (рис. 4 Б). Даний мікроорганізм не ферментував глюкозу, рафінозу, маніт, не містив каталазу і цистеїндесульфгідразу та був нездатним розщеплювати ароматичні амінокислоти, був рухливим, мав протеолітичну активність, містив казеїназу, колагеназу, еластазу, желатиназу, не утворював зон гемолізу на кров'яному агарі. Найбільш імовірно, що цей мікроорганізм є *Bacillus paraalvei* – збудник парагнильцю бджіл.

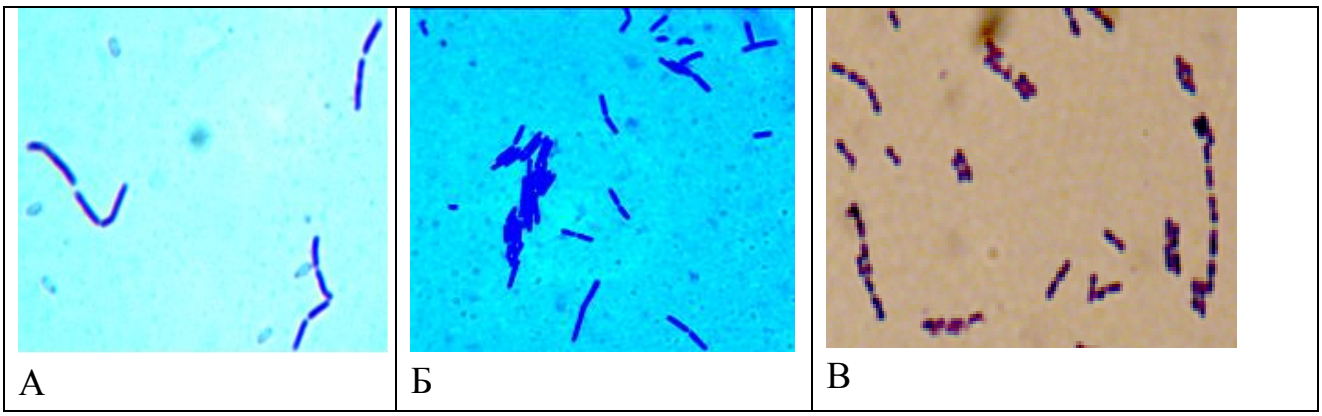


Рис. 4. Культури бактерій, виділені із зразків: №3 (А), №7(Б), №8(В). (Збільшення х 1200)
Fig. 4. Cultures of bacteria isolated from the samples: № 3 (A), № 7 (B), № 8 (C).(Increase x 1200)

Грамнегативна поличкоподібна бактерія із загостреними кінцями була виділена із зразка №8. Культура на агаризованих середовищах утворювала жовті колонії (4-5 мм) з рівним краєм. Культура не утворювала спор, не засвоювала лактозу, сахарозу, маніт, не містила цистеїндесульфгідразу, не розщеплювала ароматичні амінокислоти.

Окрім дріжджів і паличкоподібних бактерій із чотирьох уражених стільників на середовищі МПА були виділені коки. Так у зразку № 3, №5 та №6 виявили грампозитивні коки, які у фіксованих препаратах розташовувалися у вигляді скупчень і нагадували грона винограду. Бактерії були грампозитивними, засвоювали мальтозу, лактозу, сахарозу, маніт, містили цистеїндесульфгідразу, були нерухливими та містили еластазу.

Відомо, що коки зустрічаються у здорових бджіл. В кишківнику бджіл можуть бути присутні представники таких родів*: Staphylococcus, Stomatococcus, Micrococcus, Deinococcus* (Gilliam, Morton, 1978).

Зі зразку №8 були виділені грампозитивні коки, що росли лише на середовищах Черепова та Бейлі. На цих середовищах виділений штам утворював дрібні (1 мм) білі або прозорі колонії з рівними краями. В рідкому середовищі культура росла у вигляді рівномірного помутніння і пристінкового кільця. Грампозитивний мікроорганізм являв собою ланцетовидні коки розміром 0,7-1,5 мкм, одиночні, в ланцюжках різної довжини, чи в скупченнях (рис. 4 В).

Культура засвоювала глюкозу і фруктозу з утворенням кислоти без газу. Не ферментувала лактозу, сахарозу, галактозу, мальтозу, рафінозу, маніт, сорбіт, інозит. Не містила цистеїндесульфгідразу, каталазу, казеїназу, колагеназу, еластазу, желатиназу, не розщеплювала ароматичні амінокислоти. Отримані дані дозволяють припустити, що виділений штам може бути збудником європейського гнильцю, а саме: *Melissococcus pluton*.

Висновки. На основі візуальних, культурально-морфологічних, електронно-мікроскопічних, біохімічних методів виділено та попередньо ідентифіковано ряд мікроорганізмів, а саме: *Paenibacillus larvae* — збудника американського гнильцю; *Bacillus paraalvei*

— збудника парагнильцю бджіл; *Melissococcus pluton* — збудника європейського гнильцю. Більшість виділених культур була представлена аеробними спороутворювльними паличкоподібними бактеріями, які не є збудниками хвороб бджіл, але зустрічаються як вторинна мікрофлора при вірусних і бактеріальних інфекціях. У трьох зразках патологічного матеріалу виявлені коки, які представляють нормальну мікрофлору бджіл, але у хворих комах, їх кількість суттєво зростає.

Література

Гробов О.Ф, Гузева Л.Н., Родионова З.Э и др. Опасные болезни и вредители пчел. – М.: Нива России, 1992. – 160 с.

Кокорев Н.М., Чернов Б.Я. Болезни, вредители и хищники медоносных пчел. – М.: Нива России, 2002. – 271 с.

Руденко Є.В. Методичні вказівки з диференційної діагностики інфекційних хвороб розплоду бджіл. – К.: Обнова, 2001. – 35 с.

Alippi, A. M. Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium // Microbiologia. – 1995. – 3. – P. 43-50.

Flesar J., Havlik J., Kloucek P., Rada V., Titera D., Bednar M., Stropnicky M., Kokoska L. In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus larvae* and their acute oral toxicity to adult honey bees // Vet Microbiol. – 2010. – 28. – P. 129-133.

Gilliam M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees // FEMS Microb. Lettrs. – 1997. – 155. – P. 1-10.

Gilliam M., Morton H.L. Bacteria belonging to the genus *Bacillus* isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2,4-D and antibiotics // Apidologie. – 1978. – 9. – P. 213-222.

Gilliam M., Wickerham L.J., Morton H.L., Martin R.D. Yeasts isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2,4-D and antibiotics // Invertebr. Pathol. – 1974. – 24. – P. 349-356.

Gregorc A., Bowen I. Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (Apis mellifera L.) after infection with Bacillus larvae, the causative agent of American foulbrood disease // Cell Bio: Manual. N. Y. Cell Bio Inst., 1998. 137 p.

Heyndrickx M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Janssen P., Kersters K., de Vos P., Logan N. A., Ali N., Berkeley R. C. Reclassification of Paenibacillus (formerly Bacillus) pulvifaciens (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of Paenibacillus (formerly Bacillus) larvae (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of P. larvae, with emended descriptions of P. larvae as P. larvae subsp. larvae and P. larvae subsp. Pulvifaciens // Syst. Bacteriol. – New York: Stone Island Holdings Ltd., 1996. – 279 p.

Keskin N. Staphylococcus aureus infection in Apis mellifera L. (Honeybees) // Mikrobiyol Bul. Turkish. – 1989. –3. – P. 251.

Neuendorf S., Hedtke K., Tangen G., Genersch E. Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae subsp. larvae*, a Honey bee bacterial pathogen: manual // Hohen Neuendorf: Länderinstitut für Bienenkunde, 2013. – 35 p.

Reybroeck W., Daeseleire E., De Brabander H.F., Herman L. Antimicrobials in beekeeping // Vet Microbiol., N. Y. – 2012. – 6. – P. 158.

Tomkies V. et al. Development and validation of a novel field test kit for European foulbrood // Apidologie. – 2009. – 40. – P. 63-72.