

## ЕКОЛОГИЯ

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА МИКРОФЛОРАТА НА МЕДОНОСНАТА ПЧЕЛА  
*APIS MELLIFERA* L. С ОГЛЕД ОЦЕНКАТА Ѐ КАТО ПРЕНОСИТЕЛ НА  
ПАТОГЕННИ МИКРООРГАНИЗМИ**

ТЕОДОРА П. ПОПОВА, АДЕЛИНА Б. ГЕНЧЕВА\*

Лесотехнически университет, Факултет по ветеринарна медицина - София

\*Нов български университет - София

Медоносната пчела *Apis mellifera* L. е разпространена по целия свят и играе много важна роля в природата и селското стопанство за опрашването на растенията, включително на селскостопанските култури и тези по пасищата. С това тя допринася за запазването и увеличението на биологичното разнообразие в природата. Жизнената активност на пчелите е свързана с ежедневно изминаване на големи разстояния и контакти с различни обекти от околната среда. Това поведение обаче е предпоставка за срещи с микроорганизми от различни групи и възможност за тяхното пренасяне и разпространение.

Нарастващите загуби на пчелни семейства в Европа, САЩ и Канада през последните години са сериозно основание за тревога както сред широката общественост, така и сред селскостопанските специалисти, пчеларите и учените. Причините за тези загуби не са напълно изяснени, но най-вероятно те се дължат на комплексното действие на множество фактори, предимно патогени, лошо хранене, широкото приложение на агрохимични препарати (Flenniken, 2014), нарастващото замърсяване на природата, а вероятно и на неблагоприятните електромагнитни въздействия, произтичащи от човешката

дейност. Основни патогени за тези насекоми са паразитът *Varroa destructor*, някои вируси и причинителите на европейския и американския гнилец *Paenibacillus alvei* и *Paenibacillus larvae* (Попова, 2011; Datta et al., 2013).

Според Francis et al. (2013) поради активната си дейност в природата медоносните пчели биха могли да приемат и разпространяват различни видове бактерии, гъби, протозои, вируси и дори микроскопични инсекти. Това би могло да се осъществява не само чрез повърхността на тялото и храносмилателния тракт, но и по полов път. Установено е, че в храносмилателната система на медоносната пчела има характерен набор от бактерии, предимно строги анаероби. През 2013 г. Engel et al. изолират и идентифицират един от тези специфични видове, като го наричат *Frischella perrara*. В нашата страна обаче няма данни за проучвания на микрофлората на медоносната пчела *Apis mellifera* през последните години.

Целта на настоящата работа бе извършване на изследвания за изолиране и идентифициране на микроорганизми от пчели от вида *Apis mellifera* и техни продукти с оглед преценка на възможната им роля като преносители на патогенни или полезни микроорганизми.

**Благодарности:** Настоящата разработка е финансирана от ФНИ в резултат на изпълнение на Проект FFNIPO-12-01283 „Екологизация на агроекологични системи и повишаване на енергийната им ефективност чрез прилагане на преработени биоорганични отпадъци за торене, интродуциране на енергийни култури и комплексно използване на биомасата като енергоносител” (Договор ДФНИ-Е01/3 от 27.11.2012 г.).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

**Пчели и пчелна пита.** Извършени бяха микробиологични изследвания на екземпляри от медоносна пчела *Apis mellifera* от района на гр. София. За определяне на повърхностната микрофлора бе приготвена суспензия от 10 екземпляра в 10 ml стерилен физиологичен разтвор (ФР) с рН 7.4 от целите пчели. За изолиране на микрофлората от вътрешността на тялото, включително и тази на храносмилателния тракт, беше приготвена суспензия чрез хомогенизиране в 10 ml стерилен ФР след промивки в стерилна дестилирана вода за отстраняване на външната микрофлора. За определяне на микроорганизмите в пчелната пита бе приготвена суспензия чрез хомогенизиране на 1 g в 10 ml стерилен ФР. От всяка от получените суспензии бяха отделени по 5 ml, които бяха подложени на обработка при 80°C за 20 – 30 min с цел изолиране на спорообразуващите аеробни и анаеробни бактерии. От суспензиите с по 0.1 ml бяха правени посеви на избраните среди.

**Хранителни среди.** Използвани бяха следните селективни, елективни и диференциращи хранителни среди за аеробни, факултативно и облигатно анаеробни бактерии, както и за гъби: Eosin Methylene Blue agar за Грам-отрицателни бактерии; *Salmonella-Shigella* agar; Cetrimide agar за *Pseudomonas* sp.; Chapman Stone agar за стафилококи; агар на Mueller-Hinton; по Сабуро (Antisel, Sharlau Chemie S. A., Spain); Фолиево-азидна среда за ентерококи; Кръвен агар; по Цайслер (БУЛ БИО - НЦЗПБ ЕООД – София); Селективен агар за *Clostridium perfringens* (Biolab Zrt., Budapest).

Посевките бяха култивирани при 28°C и 37°C за 24 – 72 h при аеробни и анаеробни условия (с анаероб пак с палидий катализатор – H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> – БУЛ БИО - НЦЗПБ ЕООД – София).

**Идентифицирането** на изолираните микроорганизми бе извършено чрез микроскопско изследване на нативни (за подвижност) и оцветени по Грам и Пфайфер препарати, отчитане на културалните особености върху твърди и в течни среди, както и на биохимичните свойства с помощта на Polymicrotest (БУЛ БИО - НЦЗПБ

ЕООД – София) и проби за оксидаза и каталаза. Изолирането и идентифицирането на бактериите беше проведено в съответствие с Международния определител на Bergey (Holt et al., 1994), както и по Beattie and Williams (1999).

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от извършените микробиологични изследвания са представени в табл. 1, както и на фиг. 1 и 2.

Изолирани са общо 4 вида микроорганизми. Не са установени Грам-отрицателни бактерии, както и анаеробни спорообразуващи видове. Не са изолирани представители на сем. *Enterobacteriaceae*.

От повърхността на изследваните пчели, както и от питата са изолирани *Bacillus coagulans*, *Bacillus brevis* и *Enterococcus hirae*. В тези обекти не са установени овални и нишковидни гъби. Както се вижда от представените в таблицата резултати, бактериите по повърхността на изследваните екземпляри са повече по видове, а също и по количества в сравнение с микрофлората във вътрешността им. Микрофлората на храносмилателния тракт е представена само от *Bacillus coagulans* и *Bacillus brevis*. Установен е и растеж на *Aspergillus fumigatus* (Fresenius) - само една колония, но не и на *Enterococcus hirae*, който е изолиран от повърхността на пчелите и от питата.

Изолираните видове микроорганизми от изследваните от нас пчели са значително по-малко, отколкото при други членестоноги като листни въшки по овощните и други растения (*Aspidiotus nerii* Bouché, 1833, *Chrysomphalus aonidum* (Linnaeus, 1758), *Icerya purchasi* (Maskell, 1879), *Pseudaulacaspis pentagona* (Targioni-Tozzetti), картофения молец (*Phthorimaea operculella* Zeller) и особено в сравнение с бразилската хлебарка (*Blaberus giganteus*) (Попова и сътр., 2010 а; Попова и сътр., 2010 б; Попова и сътр., 2011; Попова и сътр., 2013). Малкото видово разнообразие на изолираните от пчелите и питата микроорганизми и особено липсата на Грам-отрицателни бактерии (които са основна част от микрофлората

Таблица 1. Резултати от микробиологичните изследвания на пчели и пчелна пита  
 Table 1. Results of microbiological studies of honeybees and honeycomb

Групи - Groups		Изолирани микроорганизми – Isolated microorganisms		
		от повърхността from the surface	от вътрешността from inside	от питата from honeycomb
Грам-отрицателни бактерии Gram-negative bacteria	Ентеробактерии <i>Enterobacteria</i>	-	-	-
	Други - Others	-	-	-
Грам-положителни бактерии Gram-positive bacteria	Коки - Cocci <i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus hirae</i>	-	<i>Enterococcus hirae</i>
	Спорообразуващи Spore-forming <i>Bacillus brevis</i>	<i>Bacillus brevis</i>	<i>Bacillus brevis</i>	<i>Bacillus brevis</i>
	Други - Others <i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
Гъби Fungi	Овални - Oval	-	-	-
	Нишковидни Filamentous <i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-



Фиг. 1. Резултати от биохимичното диференциране на изолираните микроорганизми – от горе надолу: *Bacillus brevis*, *Bacillus coagulans* и *Enterococcus hirae*.

Fig. 1. Results of biochemical differentiation of the isolated microorganisms - from above/from the top downwards: *Bacillus brevis*, *Bacillus coagulans* and *Enterococcus hirae*.

рата на други членестоноги като посочените по-горе) вероятно се дължи на бактерицидните свойства на пчелните продукти като прополис и др. Прави впечатление и липсата на овални гъби, които са изолирани като част от микрофлората на други членестоноги у нас (посочените по-горе). Установените бактерии са спорообразуващи непатогенни бацили, както и ентерококи, за които също няма данни за патогенни

свойства. Те обикновено се изолират от почва, както и от различни обекти от околната среда. Бацилите могат в продължение на десетилетия да се запазват жизнеспособни при неблагоприятни условия, а ентерококите са сред най-устойчивите на химични и физични въздействия неспорообразуващи бактерии. Вероятно за това те преживяват в присъствие на пчелните продукти, както и патогенните за пчели *P. alvei* и *P. larvae*.



Фиг. 2. Колония на *Aspergillus fumigatus*, изолирана от вътрешността на изследваните пчели  
 Fig. 2. Colony of *Aspergillus fumigatus*, isolated from the inside of the tested bees

Нишковидната гъба *Aspergillus fumigatus* е известна като причинител на микози, а токсигенните шамове - на микотоксикози при бозайниците, птиците и пчелите. Гъбите от този род могат да причиняват вторични микотични инфекции при насекоми (Draganova, 2004). *Aspergillus fumigatus* е повсеместно разпространен сапрофит в почвата и по разлагащи се растителни материи. Спорите на гъбата могат да предизвикват и алергии при хора (Onions, 1966; Kozakiewicz, 1995). У нас той е изолиран и от други членестоноги – от картофения молец (*Phthorimaea operculella* Zeller) (Попова и сътр., 2010 а), от установените и у нас чуждоземните видове щитоносни въшки *Aspidiotus nerii* Bouché (Hemiptera: Diaspididae) и *Icerya purchasi* Maskell (Hemiptera: Monophlebidae) (Попова и сътр., 2011), както и от листните въшки *Pseudaulacaspis pentagona* (Targioni-Tozzetti) (Попова и сътр., 2013). Вероятно той е представител на микрофлората на някои членестоноги.

Изолираните от нас микроорганизми не са патогенни за животни и растения. При социални насекоми като пчелите груповият начин на живот може да улесни предаването не само на паразити, но и на полезни микроорганизми. Има предположения, че вертикално предавани микробни симбионти играят роля за защита на насекомите срещу вирусни, бактериални и

дори еукариотни паразити. Неподходящото съобщество на бактерии в червата им обаче може да се отрази негативно в здравословен аспект (Koch and Schmid-Hempel, 2011). Намалението на числеността на пчелните колонии през последните години (средно с 32% годишно от 2006 г. насам според Flenniken, 2014) е тревожен факт в екологичен аспект. Това се свързва основно с честотата и изобилието на патогенни и вредни фактори от различно естество, но също и с нарастващата роля на вирусите в загубите на пчелните колонии. Flenniken (2014) например установява, че тютюневият вирус TRSV се размножава и в медоносни пчели и води до намаляване на числеността им. Li et al. (2014) също доказват, че РНК-вируси, самостоятелно или в съчетание с други фактори или патогенни микроорганизми, причиняват загуби на пчелни колонии.

Малкото видове, изолирани от пчелите и питата, микроорганизми може да се обясни с антимикробни (бактерицидни) свойства на пчелните продукти по отношение на много групи микроорганизми с изключение на особено устойчивите бацили и ентерококи. Липсата на патогенни за животните и човека бактерии по повърхността и във вътрешността на изследваните от нас пчели показва, че тези насекоми не са преносители на инфекции. Това, както и неустановяването на такива микроорганизми в



пчелната пита също така е показател, че терапевтичното приложение на пчелните продукти и пчелния подмор не крие опасност от инфектиране на пациентите.

## ИЗВОДИ

Изолираните в нашето изследване от пчелите и пчелната пита видове бактерии са малко на брой: *Bacillus coagulans*, *Bacillus brevis* и *Enterococcus hirae* и не включват патогенни видове. Не се установяват Грам-отрицателни бактерии, представители на сем. *Enterobacteriaceae*, както и анаеробни спорообразуващи видове.

Бактериите по повърхността на изследваните екземпляри *Apis mellifera* са повече по видове и количества в сравнение с микрофлората във вътрешността им.

*Aspergillus fumigatus* (Fresenius) е част от микрофлората на храносмилателния тракт на пчелите, както и *Bacillus coagulans* и *Bacillus brevis*.

Медоносните пчели *Apis mellifera* и техните пчелни пити не са носители на патогенни за животните и човека бактерии, което доказва, че консумацията на пчелни продукти и пчелен подмор не крие опасност от инфектиране.

## ЛИТЕРАТУРА

**1. Попова, Т. П., К. Г. Тренчева, Р. И. Томов, Г. Тренчев,** 2010а. Изследване върху микрофлората на картофения молец (*Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae) с оглед оценка на значението му като преносител на патогенни микроорганизми. Растениевъдни науки, 47, 4: 317-320.

**2. Попова, Т. П., К. Г. Тренчева, Р. И. Томов,** 2010б. Изследване на микрофлората на бразилската хлебарка (*Blaberus giganteus*) с оглед оценка на епизоотологичното ѝ значение. Екология и бъдеще, IX, 3: 30 – 33.

**3. Попова, Т. П.,** 2011. Антибактериална активност *in vitro* на билков препарат „Екофил-Р”, предназначен за метафилактика и терапия на болести по пчелите. Селскостопанска наука, 44, 5: 43-49.

**4. Попова, Т. П., К. Г. Тренчева, Р. И. Томов,** 2011. Изследване върху микрофлората на щитоносните въшки *Aspidiotus nerii* Bouché, 1833, *Chrysomphalus aonidum* (Linnaeus, 1758) и *Icerya purchasi* Maskell, 1879 с цел оценка на ролята им като преносители на патогенни микроорганизми. Растениевъдни науки, 48, 5: 484-490.

**5. Попова, Т. П., К. Г. Тренчева, Н. Василева,** 2013. Изследване върху микрофлората на черничевата щитоносна въшка *Pseudaulacaspis pentagona* (Targioni-Tozzetti) (Hemiptera: Diaspididae) с оглед значението ѝ като преносител на патогенни микроорганизми. Растениевъдни науки, 50: 98-106.

**6. Beattie, S. H., A. G. Williams,** 1999. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. Letters in Applied Microbiology, 28, 3: 221-225.

**7. Datta, S., J. C. Bull, G. E. Budge, M. J. Keeling,** 2013. Modelling the spread of American foulbrood in honeybees. J. R. Soc. Interface, 10, 20130650.

**8. Draganova, S.,** 2004. New record of a fungal pathogen on white peach scale *Pseudaulacaspis pentagona* (Targ.-Tozz.) (Homoptera: Diaspididae) in Bulgaria. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 10: 453-455.

**9. Engel, P., W. K. Kwong, N. A. Moran,** 2013. *Frischella perrara* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from the gut of the honeybee, *Apis mellifera*. IJSEM, vol. 63, no. Pt 10: 3646-3651, doi: 10.1099/ijss.0.049569-0.

**10. Flenniken, M. L.,** 2014. Honey bee-infecting plant virus with implications on honey bee colony health. mBio, 5, 2: doi:10.1128/mBio.00877-14.

**11. Francis, R. M., S. L. Nielsen, P. Kryger,** 2013. Patterns of viral infection in honey bee queens. Journal of General Virology, 94: 668–676.

**12. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneart, J. T. Staley, S. T. Williams,** 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology, Ninth edition, Williams & Wilkins, 112-168, 202-252, 534-593.

**13. Koch, H. and P. Schmid-Hempel,** 2011. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. PNAS, vol. 108, 48: 19288–19292.

**14. Kozakiewicz, Z.,** 1995. *Aspergillus fumigatus*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. IMI

Descriptions of Fungi and Bacteria, 126, Sheet 1252.

15. Li, J. L., R. S. Cornman, J. D. Evans, J. S. Pettis, Y. Zhao, C. Murphy, W. J. Peng, J. Wu, M. Hamilton, H. F. Boncristiani Jr., L. Zhou, J. Hammond, Y. P. Chen, 2014. Systemic

Spread and Propagation of a Plant-Pathogenic Virus in European Honeybees, *Apis mellifera*. mBio 5(1), doi:10.1128/mBio.00898-13.

16. Onions, A. H. S., 1966. *Aspergillus fumigatus*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, 10, Sheet 92.

#### STUDY OF MICROFLORA OF HONEYBEE *APIS MELLIFERA* L. TO ASSESS IT AS A POSSIBLE CARRIER OF PATHOGENIC MICROORGANISMS

T. P. Popova, A. B. Gencheva\*

University of Forestry, Faculty of Veterinary Medicine - Sofia

\*New Bulgarian University - Sofia

#### SUMMARY

Microbiological tests of specimens of honeybee *Apis mellifera* L. from the region of Sofia, as well as of honeycomb were carried out. Four species of microorganisms were isolated: *Bacillus coagulans*, *Bacillus brevis*, *Enterococcus hirae* and *Aspergillus fumigatus* (Fresenius). Gram-negative bacteria, as well as aerobic and spore-forming species were not found. From the surface of the studied bees and from the honeycomb were isolated only bacteria - *Bacillus coagulans*, *Bacillus brevis* and *Enterococcus hirae*. The microflora of the digestive tract is presented by *Bacillus coagulans*, *Bacillus brevis* and *Aspergillus fumigatus* (Fresenius).

The isolated bacteria from the tested materials are not pathogenic for humans and animals, which demonstrates that the honeybees and their products are not carriers of infections. This is an indication that the prophylactic and therapeutic use of bee products does not carry risk of infection to consumers.

**Key words:** honeybee *Apis mellifera*, microflora

**Correspondence:** Phone - office ++359 2 / 934-43-71; GSM 0886 531 550;

E-mail: dr\_tpopova@abv.bg