

МИКРОБИОТА ПЫЛЬЦЕВОЙ ОБНОЖКИ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ КАК ИНДИКАТОР СОСТОЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ПЧЕЛОВОДСТВА ЗАЛЕСОВСКОГО РАЙОНА АЛТАЙСКОГО КРАЯ

Осинцева Л.А.

Рассмотрено использование апимониторинга для оценки состояния биологических ресурсов пчеловодства (медоносной флоры, состояния окружающей природной среды). Результаты санитарно-микробиологической оценки пыльцевой обножки медоносных пчёл, полученной в течение 2003-2009г.г. на пасеках МУПП «Таежный мед» Залесовского района Алтайского края, свидетельствуют о микробиологической безопасности изученных районов и продукции пчеловодства, производимой на этой территории.

Интенсивно разрабатываемым в настоящее время направлением в области мониторинга экосистем является анализ показателей безопасности получаемой продукции с целью оценки состояния природных условий ее получения. Апимониторинг – метод интегрального контроля загрязнения окружающей среды с использованием медоносных пчел и пчелопродуктов. Пасеки представляют собой готовую мониторинговую сеть: в России одна пчелиная семья приходится в среднем на 4 км² территории. Но в Алтайском крае, где разнообразие и обилие медоносной флоры и акклиматизация интродуцированных медоносных пчёл являются богатейшим биологическим ресурсом пчеловодства, количество пчелиных семей достигает 170 тысяч. Продукты пчеловодства и пчелы могут дать широкий комплекс экологической характеристики местности, так как эти насекомые обычно заносят в улей находящиеся в окружающей среде поллютанты, в том числе и микроорганизмы, с нектаром, падьёю, пыльцой, смолой деревьев, водой с площади в радиусе 2–3 км от их гнезда.

Анализ количественных и качественных характеристик микробиоты продуктов пчёл может обеспечить интегральный показатель состояния микробиоценозов прилегающей к пасеке территории, поскольку специфика микробных сообществ, характерных для продуктов медоносных пчёл, определяется и теми микробиоценозами, которые формируются под влиянием определённых природно-климатических и экологических условий местообитания, которые посещают медоносные пчёлы. Это показано при изучении микробиоты пыльцевой обножки, собираемой пчёлами с различных территорий и в разные периоды вегетационного сезона[1-4]. Поэтому изучение динамики таксономической структуры микробиоты обножки – продукта, получаемого пчёлами в условиях максимально длительного контакта с растениями и атмосферным воздухом, позволяет проследить изменения видовой структуры микробных сообществ во времени и пространстве биоценозов в зависимости от меняющихся экологических условий. По результатам наших предыдущих исследований наиболее перспективным индикатором в апимониторинге экосистем представляется пчелиная обножка (цветочная пыльца).

Во-первых, пчелиная обножка в равной мере, как и организм пчел, накапливает или содержит те поллютанты, которые находятся в ценозе, в отличие от других пчелопродуктов, которые или вырабатываются пчелами или являются результатом значительных биохимических преобразований.

Во-вторых, возрастает заготовка этого продукта, что определяется повышенным спросом, обусловленным терапевтическими и иммуностимулирующими свойствами пчелиной обножки. В настоящее время в России заготавливают более 40 т обножки.

В-третьих, отбор пчелиной обножки производится, как правило, до заноса ее в гнездо пчелиной семьи и поэтому она не подвергается воздействиям специфических факторов микроклимата гнезда.

В-четвёртых, спектр растений, с которых пчелы собирают пыльцу, намного шире, чем количество медоносных видов.

В настоящее время наиболее разработанным и успешно реализуемым подходом в мониторинге экосистем, основанном на микробиологической индикации, является использование почвенных микромицетов [5-6]. И если принять во внимание роль почвы в формировании микоценозов всех других местообитаний микромицетов, очевидной становится задача изучения возможности использования микробиоты пыльцевой обножки, формируемой взаимосвязанными, опосредованными или независимыми факторами. Одновременно с мониторингом состояния природных экосистем, изучение микробиоты продуктов пчеловодства позволяет подойти к решению проблемы диагностики экологического неблагополучия на основе оценки

микологической безопасности продукта. Последнее возможно при выявлении в микобиоте обножки микромицетов – индикаторов экологического неблагополучия.

Существенную долю в микофлоре пыльцевой обножки составляют оппортунистические микромицеты, что определяет несомненную актуальность вопроса, касающегося их потенциальной опасности для человека, их вирулентных свойств, допустимого уровня их присутствия и сохранности в продуктах пчеловодства [7-8].

Вопрос видового разнообразия микобиоты в продуктах пчеловодства связан с решением проблемы выявления микроорганизмов, устойчивых к воздействию бактерицидных факторов смешанного растительно-животного происхождения, и оценки их санитарно-гигиенической роли в составе продуктов питания и биологически активных добавок, созданных на основе пчелопродуктов. Уровень контаминации микромицетами и специфика видового представительства определяются следующими факторами: 1– ботаническое происхождение пыльцевой обножки; 2– погодные условия, как сбора обножки, так и периода цветения растений-пыльценосов, предшествующего сбору пыльцы пчёлами; 3– характер и степень грибной обсеменённости растений-пыльценосов, атмосферного воздуха, поверхности тела пчел. Интеграция этих факторов отражает состояние сообществ микромицетов в микроценозах тех местообитаний, с которыми происходит контакт при формировании обножки пчёлами.

В свете вышеизложенного мониторинг экосистем с использованием микобиоты пыльцевой обножки медоносных пчёл позволяет решить, во-первых, задачи мониторинга экосистем и, во-вторых, прогнозировать качество и безопасность продуктов пчеловодства на начальной стадии их получения

Наши исследования, проведенные в аккредитованной микробиологической лаборатории Сибирского НИИ переработки сельскохозяйственной продукции Россельхозакадемии, являются приоритетными так как отсутствует информация о экологии микроорганизмов продуктов пчеловодства и, в частности, пчелиной обножки, о факторах, определяющих видовое разнообразие микробных сообществ пыльцевой обножки и их роли в формировании качества, безопасности и возможного целевого использования продуктов пчеловодства.

Пыльцевая обножка пчел была собрана из пыльцеуловителей на пасеках МУПП «Таёжный мёд» Залесовского района Алтайского края в июне 2003-2009 гг. Микробиологическую оценку нативной обножки проводили по показателям, регламентированным СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов», и в соответствии с требованиями ГОСТов по определению количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), бактерий группы кишечной палочки (БГКП коли-формы), патогенных бактерий р. *Salmonella*, *Staphilococcus aureus*, *Bacillus cereus*, грибов и дрожжей.

Для выделения грибов использовали стандартный метод глубинного посева 1 мл суспензии, разведенной в 10 и 10² раз, в плотные питательные среды Сабуро с левомицетином (НПО «Питательные среды» г.Махачкала), Чапека, МПА (ООО БиоКомпас-С, г.Углич) и капустный агар. Инкубировали в течение 5 дн. в термостате при 25 °С и далее при комнатных условиях. Отсевали морфо-культуральные типы колоний грибов и дрожжей, появляющихся на указанных средах в разные сроки, с учетом темпов их роста и развития. Таксономическую принадлежность определяли по совокупности общепринятых морфологических показателей с использованием соответствующих руководств. Микроморфологию выделенных штаммов изучали по нативным препаратам чистых 48-часовых культур, формирование ростовых трубок – на предметных стеклах с голодным агаром, тип и характер репродуктивных структур – по нативным препаратам чистых культур со сред выделения. В работе использовали фазово-контрастную микроскопию (микроскоп Микромед-2) и окулярный винтовой микрометр МОВ-1-16.

Сообщества микобионтов обножки оценивали по частоте встречаемости и частоте доминирования представителей различных родов. Частота встречаемости (%) определялась, как доля образцов, в которых обнаружен данный род, от общего числа проанализированных образцов. По частоте встречаемости в образцах роды грибов были ранжированы по 4 группам: 1. Типичные доминирующие (частота встречаемости составляет более 70%). 2. Типичные частые (от 50% до 70%). 3. Типично редкие (от 30% до 50%). 4. Случайные (менее 30%).

Санитарно-микробиологическая оценка пыльцевой обножки медоносных пчел
(Залесовский район, Алтайский край)

| Годы сбора | Исследуемый показатель, КОЕ/г | | | |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------|
| | КМАФАнМ | Грибы и дрожжи | Bacillus sp. | БГКП в 0,01 г |
| 2003 | $(8,10 \pm 2,82) \times 10^2$ | $(9,81 \pm 0,96) \times 10^2$ | $(2,35 \pm 2,89) \times 10^2$ | Не обнаружено |
| 2004 | $(4,44 \pm 0,94) \times 10^3$ | $(1,60 \pm 0,49) \times 10^3$ | $(4,09 \pm 1,83) \times 10^2$ | Обнаружено |
| 2005 | $(2,24 \pm 0,20) \times 10^4$ | $(1,9 \pm 0,58) \times 10^4$ | $(2,00 \pm 0,78) \times 10^2$ | Не обнаружено |
| 2006 | $(1,45 \pm 0,50) \times 10^4$ | $(1,81 \pm 0,66) \times 10^2$ | $(8,50 \pm 0,61) \times 10^2$ | Не обнаружено |
| 2007 | $(3,95 \pm 0,98) \times 10^5$ | $(3,51 \pm 1,34) \times 10^3$ | $(5,00 \pm 2,20) \times 10^2$ | Обнаружено. |
| 2008 | $(3,46 \pm 0,25) \times 10^4$ | $(3,27 \pm 0,75) \times 10^2$ | $(2,60 \pm 1,08) \times 10^2$ | Не обнаружено |
| 2009 | $(3,68 \pm 0,25) \times 10^5$ | $(9,77 \pm 1,30) \times 10^3$ | $(2,69 \pm 1,78) \times 10^2$ | Не обнаружено |

Уровень общей микробной контаминации обножки возрастает по годам исследований, но не превышает уровня, определяемого для филлосферы медоносных растений. Контаминация обножки спорообразующими бактериями наиболее стабильна по годам (табл.).

Для нативной пыльцевой обножки характерен высокий уровень контаминации грибами ($n \times 10^2 \dots n \times 10^4$ КОЕ/г) и присутствие в микобиоте токсиногенных видов микромицетов. Это свидетельствует о необходимости снижения влажности продукта или применения какого-либо другого способа его консервации с целью предотвращения развития плесеней.

Грибы-микромицеты являются неотъемлемой составляющей природных экосистем и фитоценозов. Стрессовые для растений факторы (климатические, географические, биологические, антропогенные) способствуют поселению на них сапротрофных микромицетов. С другой стороны, многообразие средообразующих факторов формирования микробиоты обножки позволяет провести оценку микробиологических условий её сбора пчелами. Плановый анализ микробиоты на образцах пыльцевой обножки с пасек Залесовского района проводили с 2003 г. по настоящее время. Большинство видов, идентифицированных в комплексе микромицетов обножки, являются эвритопами и выделяются из различных местообитаний всех биогеоценозов средней полосы России и Сибири. Анализ результатов показывает, что по пространственной и временной встречаемости в микобиоте обножки доминируют виды родов *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, частыми являются виды родов *Mucor*, *Cladosporium*, редкими, но типичными – виды *Absidia*, *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, случайными – виды родов *Ascosphaera*, *Candida*, *Dematophora*, *Fusarium*, *Microsporum*, *Rhizopus*, *Stemphylium*, *Trichoderma*. К доминирующей группе относятся оппортунистические и потенциально токсиногенные виды микромицетов (*Aspergillus flavus* Link., *A. niger* van Tieghem., *Penicillium verrucosum* Dierkx). Установленные различия комплексов микромицетов пыльцевой обножки разных сроков сбора обусловлены, как правило, представительством случайных видов, которое отражает специфику экологических условий получения этого продукта пчеловодства. Выявление в структуре микромицетов обножки видов-биоиндикаторов (*Alternaria alternata* (Fries) Keissler, *Penicillium citrinum* Thom; *Cladosporium herbarum* (Peesoon) Link, *Mucor racemosus* Fres.) в качестве типичных доминантных и частых видов может свидетельствовать об отсутствии критических уровней накопления химических поллютантов в районах сбора обножки [9].

Ни в одном из изученных образцов не выявлено патогенных бактерий, в т.ч. рода *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*. В образцах, полученных в 2004 и в 2007 гг., содержание бактерий группы кишечной палочки (коли-формы) превышало уровень, регламентированный для данного продукта, но не являлось критичным с точки зрения санитарно-микробиологической оценки растительных субстратов.

На основании анализа состояния микробиоты пыльцевой обножки медоносных пчел с пасек Залесовского района Алтайского края можно судить о микробиологической безопасности биологических ресурсов пчеловодства этой территории.

Литература

1. Stendifer J.N. Biochemistry and microbiology of pollen collected by honey bees from almond *Prunus Dulcis*/ J.N. Stendifer, W.F/W. McCaughey. S.E. Dixon // *Apidologie*. – 1980. - V.II. - №7. – P.163-171.
2. Руденко Е.В. Микологическая оценка некоторых продуктов пчеловодства / Е.В. Руденко, И.Г. Маслий // *Апитерапия сегодня (Сб-к V): Мат-лы V научно-прак. конф. по апитерапии*. Сочи, 9-12 окт. 1996 г. - Рыбное, 1997. - С. 65-67.
3. Осинцева Л.А. Влияние сроков сбора пыльцевой обножки на родовую структуру её микобиоты / Л.А. Осинцева, Г.П. Чекрыга, К.Я. Мотовилов // *Вестник КрасГАУ*. – Красноярск, 2007. – Вып.1. - С. 131-133.
4. Осинцева Л.А. Формирование микробиоты обножки медоносных пчел в зависимости от ее пыльцевого состава / Л.А. Осинцева, М.В. Волкова // *Биология: теория, практика, эксперимент: Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения Сапожниковой Е.В.* / В 2-х кн. / редкол.: Р.В. Борченко (отв. ред.). [и др.] - Мордовский гос. ун-т. – Саранск, 2008. Кн. 1. – С.124–126.
5. Марфенина О.Е. Антропогенная экология почвенных грибов. – М.: Медицина для всех, 2005. – 195 с.
6. Терехова В.А. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем. - М.: Наука, 2007. - 145 с.
7. Medina A. Bee Pollen, a Substrate that Stimulates Ochratoxin A Production by *Aspergillus ochraceus* Wilh./Á. Medina, G. González, J. M. Sáez, R.o Mateo, M. Jiménez // [Systematic and Applied Microbiology](#). - 2004. – [V. 27](#), [№ 2](#). - P. 261-267.
8. Осинцева Л.А. Оценка токсичности микромицетов пыльцевой обножки / Л.А. Осинцева Г.П. Чекрыга, К.Я. Мотовилов. - Вестн. НГАУ. - №4. – 2006. – С. 77-81
9. Осинцева Л.А. Грибы пыльцевой обножки медоносных пчел / Л.А. Осинцева, Г.П. Чекрыга // *Микология и фитопатология*. – Т. 5. – 2008. - С. 464-469

MICROBIOTA OF BEE POLLEN AS THE INDICATOR OF A CONDITION OF BIOLOGICAL RESOURCES OF BEEKEEPING OF ZALESOVSKOGO AREA OF ALTAI

Osintseva L.A.

Use apimonitoring for an estimation of a condition of biological resources of beekeeping (honey plants, a condition of environment) is considered. Results of a sanitary - microbiological estimation bee pollen, received current 2003-2009. on apiaries «Taiga honey» Zalesovskogo area of Altai territory, testify to microbiological safety of the investigated areas and production of beekeeping made in this territory. The natural mycobiota occurring in bee pollen is studied in the present report with special attention to analyze the fungal species that are potential producers of mycotoxins and indicators of polluti