

УДК 663.087.8:638.1:602(476)

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МИКРОБИОЦЕНОЗА
КИШЕЧНОГО ТРАКТА ПЧЕЛ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ
ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ *BACILLUS
SUBTILIS* С РАЗЛИЧНЫМИ БИОДОБАВКАМИ**

**И. М. Лойко, А. Г. Щепеткова, Т. М. Скудная, Н. В. Халько,
Е. Г. Смолей, М. Ч. Маркевич**

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail:
ggau@ggau.by)

Ключевые слова: пробиотическая культура *Bacillus subtilis*, медоносные пчелы, побудительные подкормки, кишечный микробиоценоз.

Аннотация: Проведена сравнительная оценка эффективности использования пробиотического препарата на основе спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* в сочетании с различными биодобавками в составе углеводной подкормки пчелиным семьям после зимовки. Установлено, что использование экспериментальных композиционных составов пробиотического препарата на основе спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* в комплексе с кобальтом и дрожжевым экстрактом и в сочетании с пыльцой позволяет в большей степени нормализовать кишечный биоценоз рабочих пчел в сторону снижения условно-патогенной микрофлоры и повышения лактобактерий, профилактировать у них диарейные заболевания.

**COMPARATIVE EVALUATION OF MICROBIOCENOSIS OF THE
INTESTINAL TRACT OF BEES WHEN USING A PROBIOTIC
PREPARATION BASED ON *BACILLUS SUBTILIS* WITH
DIFFERENT SUPPLEMENTS**

**I. M. Loiko¹, A. G. Shchapiatkova¹, T. M. Skudnaya¹, M. V. Khalko¹,
A. G. Smalei, M. Ch. Markevich**

EI «Grodno state agrarian University»

Grodno, Republic of Belarus

(Republic of Belarus, 230008, Grodno, 28 Tereshkova st.; e-mail:
ggau@ggau.by)

Key words: probiotic culture *Bacillus subtilis*, honeybees, incentive feeding, intestinal microbiocenosis.

Summary: A comparative evaluation of the effectiveness of the use of probiotic preparation based on spore-forming bacteria *Bacillus subtilis* in combination with various supplements in the carbohydrate feeding bee families after wintering. It was found that the use of experimental compositions of probiotic preparation based on spore-forming bacteria *Bacillus subtilis* in combination with cobalt and yeast

extract and in combination with pollen allows to normalize the intestinal biocenosis of working bees in the direction of reducing the opportunistic microflora and increase lactobacilli, prevent diarrhoeal diseases.

(Поступила в редакцию 01.06.2018 г.)

Введение. На благополучие пасаки, состояние каждой отдельной пчелосемьи и качество производимой продукции негативно влияет целый комплекс факторов: загрязнение окружающей среды, массовое применение химических пестицидов и гербицидов в растениеводстве, присутствие возбудителей инфекционных и инвазионных болезней, неконтролируемое применение антибактериальных препаратов. Это приводит к снижению резистентности пчел и формированию благоприятных условий для развития бактериальных и инфекционных заболеваний [2, 4]. Кроме того, из-за недостаточного количества медоносов кормовые запасы пчел необходимо периодически пополнять с помощью углеводсодержащих подкормок. Традиционно для этой цели используется 50%-й сахарный сироп, применение которого способствует стимулированию физиологической активности пчел [3]. В качестве углеводных подкормок может также использоваться канди на основе сахарозы [5], инулин, фруктоза, мальтоза, левулоза, глюкоза или лигнин. В то же время из-за отсутствия в таких подкормках витаминов, белковых и минеральных веществ при употреблении углеводных сиропов пчелы вынуждены их кондиционировать, т. е. приближать состав и консистенцию к таковым у меда, что приводит к преждевременному износу организма, сокращению продолжительности жизни пчел, плохому развитию глоточных и восковых желез, получению ослабленного расплода [1, 6].

Кроме того, существует особая проблема после зимовки пчелиных семей, т. к. в желудочно-кишечном тракте рабочих пчел превалирует гнилостная, условно-патогенная микрофлора. Ослабленный организм медоносных пчел именно в весенний период нуждается в стимуляции пластических процессов, обеспечивающих нормальное функционирование клеток тканей и органов.

Проведение весенних стимулирующих подкормок пчелиных семей на пасеках – непереносимое условие их высокой медовой продуктивности. В этом случае корма должны содержать все необходимые компоненты в пропорции, соответствующей физиологической потребности организма пчелы [1, 4].

Цель работы – оценить эффективность пробиотического препарата на основе спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* с различными биостимулирующими добавками в составе углеводной подкорм-

ки для пчел после зимовки на формирование микробиоценоза их кишечного тракта.

Материал и методика исследований. Исследования проводили в условиях учебно-опытной пасеки и лаборатории кафедры микробиологии и эпизоотологии УО «Гродненский государственный аграрный университет». Для оценки эффективности пробиотического препарата на основе спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* с различными биостимулирующими добавками было сформировано 8 групп по 6 пчелосемей в каждой. Формирование групп проводили в соответствии с «Методическими указаниями к постановке экспериментов в пчеловодстве» [8]. Группы пчелиных семей подбирали по принципу пар-аналогов с учетом силы пчелиных семей, количества печатного расплода и корма, возраста и происхождения маток. Для опыта подбирали пчелосемьи, у которых сила семей составляла 7-10 улочек, количество корма в гнезде – 8 кг, печатного расплода – 140 квадратов, открытого расплода – 126 квадратов. Матки во всех семьях были в возрасте 1 года. Все подопытные пчелиные семьи содержались в типовых ульях (рамки размером 435x300 мм).

Семьи контрольной группы получали только 50%-й сахарный сироп, в углеводную подкормку пчелосемьям первой опытной группы вводили пробиотический препарат с сахарозой, пчелам второй опытной группы скармливали пробиотик в сочетании с кобальтом, третьей – пробиотик с дрожжевым экстрактом, четвертая опытная группа пчелосемей получала в составе сахарного сиропа пробиотический препарат в комплексе с кобальтом и дрожжевым экстрактом, пчелам пятой опытной группы задавали в составе сахарного сиропа пробиотик в сочетании с пыльцой, пчелиные особи шестой опытной группы получали добавку из пробиотика с сухим обезжиренным молоком, пчелосемьи седьмой опытной группы получали пробиотический препарат в сочетании с соевой мукой.

Препараты вводили в гнездо методом скармливания с сахарным сиропом. Подкормку готовили в день применения. Содержимое флакона – 1 г сухой пробиотической добавки смешивали с сахарным сиропом (из расчета на 1 л углеводного корма). Экспериментальные композиционные добавки скармливали в дозе 1000 мл сиропа на одну пчелиную семью через каждые семь суток в период со 2 апреля по 14 мая.

Для определения влияния пробиотического препарата в сочетании с различными биодобавками на количественный и качественный состав микрофлоры кишечного тракта пчел от каждой исследуемой пчелосемьи проводили отбор живых насекомых (по 10 особей), которых усыпляли, и от каждой особи извлекали кишечник, помещали в

стерильный бюкс, взвешивали, после чего тщательно гомогенизировали в стерильной фарфоровой ступке в физрастворе в соотношении 1:100 и готовили ряд последовательных 10-кратных разведений на 0,9%-м хлорида натрия. Из полученных разведений с помощью градуированной пипетки на поверхность хорошо подсушенных селективных питательных сред делали посева в объеме 0,1 мл. Посев производили на соответствующие агаризированные питательные среды в чашках Петри в объеме 0,1 мл суспензии содержимого кишечника различных разведений в зависимости от предполагаемого количества тех или иных микроорганизмов. Для выделения лактобактерий использовали лактобакагар, энтеробактерий – агар Эндо-ГРМ. С целью выделения плесневых грибов использовали среду Сабуро. Учет результатов посева осуществлялся через 24, 48 ч.

Оценку результатов высева проб на плотные питательные среды проводили после появления учитываемых колониеобразующих единиц (КОЕ) по всей площади поверхности чашки Петри. Подсчет КОЕ и их дифференциацию проводили с учетом особенностей культуральных свойств микроорганизмов (форма, цвет колонии и т. п.). Количество бактерий в 1 г экскрементов определяли по числу колоний, выросших на соответствующей питательной среде с пересчетом на количество посеянного материала и степень его разведения. Ориентировочную идентификацию лактобактерий проводили микроскопическим методом (окраска мазка по Граму), который позволяет оценить морфологию клеток. Для родовой идентификации энтеробактерий использовали питательные среды Гисса с глюкозой, Гиса с сахарозой, Гиса с лактозой, Гиса с маннитом, Гиса с мальтозой, цитратный агар Симмонса. Родовую принадлежность плесневых грибов определяли с учетом их морфологических и культуральных особенностей. В ходе опыта определяли количество лактобацилл, энтеробактерий, дрожжеподобных грибов в содержимом кишечного тракта пчел.

Результаты исследований и их обсуждение. В ходе исследований установлено, что изменения в составе углеводного корма по-разному сказались на микробиологической структуре кишечного биоценоза подопытных пчел. Проведенная сравнительная оценка эффективности использования пробиотического препарата в сочетании с различными биостимуляторами в составе 50%-го сахарного сиропа пчелиным семьям после зимовки показала, что наиболее оправданными являются композиционные составы пробиотического препарата в комплексе с кобальтом и дрожжевым экстрактом и пробиотика в сочетании с пыльцой, обеспечивающие более интенсивное формирование

микробиоценоза кишечного тракта пчел в сторону снижения условно-патогенной микрофлоры и повышения лактобактерий (таблица).

В ходе эксперимента установлено, что в содержимом кишечного тракта пчелиных особей 4-й и 5-й опытных групп, получавших пробиотический препарат на основе спорообразующих бактерий в комплексе с кобальтом и дрожжевым экстрактом и композиционный состав пробиотика с пыльцой, численность лактобактерий составила в среднем $6,0 \times 10^7$ КОЕ/г и $2,0 \times 10^7$ КОЕ/г соответственно и была выше по сравнению с контрольной группой (таблица). При этом введение данных биостимуляторов в углеводную подкормку позволило замедлить колонизацию кишечного тракта насекомых энтеробактериями и дрожжеподобными грибами.

Таблица – Результаты бактериологического исследования кишечного тракта пчел при использовании пробиотического препарата в сочетании с различными биодобавками

Микроорганизмы	Группы насекомых	Количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г кишечного содержимого пчел, КОЕ/г
Лактобактерии	Контрольная	$8,0 \times 10^6$
	Опытная-1	$2,3 \times 10^7$
	Опытная-2	$1,6 \times 10^7$
	Опытная-3	$1,0 \times 10^7$
	Опытная-4	$6,0 \times 10^7$
	Опытная-5	$2,0 \times 10^7$
	Опытная-6	$6,0 \times 10^6$
Энтеробактерии	Контрольная	$2,2 \times 10^7$
	Опытная-1	$5,0 \times 10^6$
	Опытная-2	$3,5 \times 10^8$
	Опытная-3	$2,5 \times 10^{10}$
	Опытная-4	$4,0 \times 10^6$
	Опытная-5	$1,0 \times 10^6$
	Опытная-6	$1,0 \times 10^8$
Дрожжеподобные грибы	Контрольная	$1,8 \times 10^7$
	Опытная-1	$1,7 \times 10^8$
	Опытная-2	$3,2 \times 10^8$
	Опытная-3	$1,7 \times 10^8$
	Опытная-4	$1,5 \times 10^7$
	Опытная-5	$8,0 \times 10^6$
	Опытная-6	$3,0 \times 10^8$
Опытная-7	$2,1 \times 10^8$	

К концу опыта уровень энтеробактерий у пчел 4-й и 5-й опытных групп составил в среднем $4,0 \times 10^6$ КОЕ/г и $1,0 \times 10^6$ КОЕ/г соответствен-

но, дрожжеподобных грибов – $1,5 \times 10^7$ КОЕ/г и $8,0 \times 10^6$ КОЕ/г соответственно в сравнении с контролем (таблица).

Полученная картина кишечного микробиоценоза при введении в сахарный сироп данных экспериментальных композиционных составов, на наш взгляд, представляется наиболее физиологической, поскольку среди микробиоты преобладали кислотопродуцирующие сахаролитические бактерии, которые участвуют в процессах расщепления сахаров, поступающих с пищей, и обеспечивают кислое значение водородного показателя в пищеварительном тракте пчел, что исключает предпосылки для развития поносов.

Как показали результаты бактериологического исследования содержимого кишечного тракта пчелиных особей, при скармливании пробиотической культуры *Bacillus subtilis* в сочетании с пыльцой и в комплексе с кобальтом и дрожжевым экстрактом условно-патогенные для медоносных пчел энтеробактерии, относящиеся к родам *Hafnia*, *Citrobacter*, не выделялись.

В ходе проведения опыта у пчелиных особей 1, 2 и 3-й опытных групп, получавших пробиотический препарат в сочетании с сахарозой, кобальтом, дрожжевым экстрактом, также наблюдалось закономерное увеличение количества лактобактерий и составило в среднем $2,3 \times 10^7$ КОЕ/г, $1,6 \times 10^7$ КОЕ/г и $1,0 \times 10^7$ КОЕ/г соответственно в сравнении с контролем (таблица). Однако фоновое значение энтеробактерий и дрожжеподобных грибов у пчел данных опытных групп определялось на более высоком уровне по сравнению с насекомыми контрольной группы. Энтеробактерии, изолированные нами из кишечного тракта пчел данных опытных групп, были представлены родами *Hafnia* и *Citrobacter*, что свидетельствует об устойчивости данных микроорганизмов к исследуемым экспериментальным стимуляторам.

В ходе испытаний установлено, что скармливание пчелам пробиотического препарата в сочетании с сухим обезжиренным молоком и в комплексе с соевой мукой в составе сахарного сиропа привело к значительному повышению количества условно-патогенной микрофлоры и снижению уровня лактобактерий. Бактериологические исследования кишечного тракта пчел показали, что концентрация лактобактерий у пчелиных особей 6-й и 7-й опытных групп, получавших пробиотический препарат с данными белковыми заменителями, составила $6,0 \times 10^6$ КОЕ/г и $4,0 \times 10^6$ КОЕ/г соответственно и была ниже контрольного уровня. Количество энтеробактерий на фоне введения данных экспериментальных препаратов составила в среднем $1,0 \times 10^8$ КОЕ/г и $3,8 \times 10^8$ КОЕ/г соответственно, дрожжеподобных грибов – $3,0 \times 10^8$ КОЕ/г и $2,1 \times 10^8$ КОЕ/г соответственно, что значительно превысило аналогич-

ный показатель у пчелиных особей контрольной группы (таблица). При этом в посевах преобладали энтеробактерии рода *Klebsiella*. Эти же бактерии выделялись и в содержимом кишечного тракта пчел контрольной и четвертой опытной групп. Частое обнаружение клебсиелл еще не свидетельствует о наличии заболевания, а позволяет предположить их физиологическую роль, связанную со способностью активно утилизировать сахарозу [7]. Однако при исчезновении естественных антагонистов возбудителей инфекционного процесса они способны индуцировать развитие заболевания.

В ходе исследований установлено, что пчелиные особи, получавшие пробиотический препарат с сухим обезжиренным молоком и пробиотик в сочетании с соевой мукой, испытывали дискомфорт, проявляющийся излишним возбуждением и диспепсическими расстройствами. В связи с этим можно заключить, что использование данных экспериментальных составов в качестве весенних побудительных подкормок не эффективно, т. к. приводит к нарушению физиологического равновесия в пчелиных семьях и развитию дисфункции пищеварительного тракта насекомых вплоть до выраженных анатомических дефектов. Кроме того, поедаемость пчелами кормов с данными белковыми наполнителями была в два раза меньше по сравнению с другими экспериментальными добавками. Следовательно, можно констатировать, что такие корма недостаточно привлекательны для пчел.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования показали, что использование экспериментальных композиционных составов пробиотического препарата на основе спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* в комплексе с кобальтом и дрожжевым экстрактом и в сочетании с пыльцой позволяет в большей степени нормализовать кишечный биоценоз рабочих пчел после зимовки в сторону снижения условно-патогенной микрофлоры и повышения лактобактерий, профилактировать у них диарейные заболевания. Однако в связи с тем, что использование пыльцы, в отличие от дрожжевого экстракта, требует особых условий хранения ($t-50^{\circ}\text{C}$) во избежание потери ею полезных свойств, а также по причине значительной вариабельности состава пыльцы в зависимости от производителя, наиболее предпочтительным является применение пробиотика в комплексе с кобальтом и дрожжевым экстрактом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зинченко, Е. В. Иммунобиотики в ветеринарной практике / Е. В. Зинченко, А. Н. Панин. – Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2000. – 164 с.
2. Ишемгулов, А. М. Производство высококачественных экологических чистых продуктов пчеловодства в Республике Башкортостан / А. М. Ишемгулов // Современные технологии в пчеловодстве. – 2004. – С. 132-135.

3. Корм для пчел: пат. RU 2173046 С1/ Н. Г. Билаш, Е. А. Бетева; заявитель Государственное учреждение Научно-исследовательский институт пчеловодства. – № RU2000118193А; заяв. 13.07.2000; опубл. 10.09.2001.
4. Пашаян, С. А. Экологические и морфофизиологические основы, определяющие резистентность пчел к заболеваниям / С. А. Пашаян // Автореферат диссертации доктора биологических наук, Екатеринбург. – 2012. – 40 с.
5. Подкормка для пчел: пат. RU 1822689 С, А01К53/00 / Э. В. Чаусова, Л. С. Холодная, И. А. Левченко; заявитель Киевский государственный университет им. Т. Г. Шевченко (SU), Украинский Научно-Исследовательский Технологический Институт Пчеловодства (SU), SU 19914928524. – № 4928524/15; заявл. 18.10.1991; опубл. 23.06.1993.
6. Сердюченко, И. В. Влияния кормовой добавки «гидрогемол» на микрофлору пищеварительного тракта медоносных пчел / И. В. Сердюченко, А. Г. Кошаев // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. – 2016.
7. Четечкина, У. Е. Энтеробактерии в составе микрофлоры пищеварительной системы медоносных пчел в различные сезоны года / У. Е. Четечкина, Н. И. Евтеева, А. И. Речкин, А. А. Радаев // Вестник Нижегородского госуниверситета им. Н. И.Лобачевского. – 2011. – № 2. – Ч. 2 (2). – С. 149-153.
8. Шагун, Я. Л. Методические указания к постановке экспериментов в пчеловодстве / Я. Л. Шагун. – М.: Россельхозакадемия, 2000. – 10 с.

УДК 663.087.8:638.1:602(476)

ПОКАЗАТЕЛИ ЗИМОВКИ РАБОЧИХ ПЧЕЛ НА ФОНЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

**И. М. Лойко¹, А. Г. Щепеткова¹, Т. М. Скудная¹, Н. В. Халько¹,
Е. В. Болотник², И. И. Гапонова², Н. А. Старикова¹,
Е. И. Авсиевич¹, М. Ч. Маркевич¹**

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: ggau@ggau.by)

² – Институт микробиологии НАН Беларуси

г. Минск, Республика Беларусь (bolotnik_allena@mbio.bas-net.by)

Ключевые слова: зимовка пчел, пробиотики, каловая нагрузка кишечника пчел, сила пчелосемей.

Аннотация. Установлена высокая выживаемость спорообразующих пробиотических бактерий в составе углеводной подкормки пчел канди; наработаны образцы канди с различными пробиотическими добавками для подготовки пчелиных семей к зимовке. Установлено, что сила пчелиных семей, получавших канди с пробиотическими добавками, на конец зимовки составляла 5,7-6,2 улочки, что на 11,8-21,6% больше по сравнению с контролем. Показано, что использование осенних подкормок канди, обогащенных пробиотическими препаратами на основе *B. subtilis*, способствует снижению каловой нагрузки пчел на 5,1-34,4%.