

УДК 595.799

А. В. Лопатин, М. Ю. Сыромятников

**ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЦВЕТОЧНОЙ ПЫЛЬЦЫ, СОБРАННОЙ
МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛОЙ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕСТОВ
НА РАБОЧИХ ОСОБЯХ ЗЕМЛЯНОГО ШМЕЛЯ**

Воронежский государственный университет, г. Воронеж,
e-mail: lopatin@bio.vsu.ru; mihan.vrn@mail.ru

Ключевые слова: *Bombus terrestris*, *Apis mellifera*, *биотесты пыльцы*.

При искусственном разведении шмелей в качестве белкового корма используется паста, приготовленная из смеси замороженной обножки, собранной медоносной пчелой, и сахарного сиропа. В России и на Украине заготовка пыльцевой обножки осуществляется в мае-августе в период массового цветения растений-медоносов. Свойства пыльцевого сырья – основной фактор, влияющий на питательную ценность корма для шмелей. Обножка также используется как биологически активная добавка к пище человека. Контроль качества данного продукта – сложная задача, методика решения которой до настоящего времени недостаточно разработана.

Химический состав пыльцы сильно варьирует у разных видов растений [1, 6]. Кроме того, качество пчелиной обножки определяется рядом факторов: экологической обстановкой в местах сбора, условиями хранения и транспортировки. Следствием низкого содержания в корме питательных веществ, присутствия ядов и болезнетворных микроорганизмов могут быть нарушения в развитии расплода, заболевания и гибель взрослых особей шмелей.

В пыльцеуловителях обножка может загрязняться трупами взрослых пчел и их личинок, погибших от инфекционных болезней. Намокание пыльцы в дождливую погоду и несвоевременная заморозка способствуют размножению микроорганизмов. Несоблюдение температурного режима, многократное размораживание и замораживание, длительное хранение вызывают снижение питательных свойств пыльцы. Пыльца на цветках растений в большей или меньшей степени загрязнена микроорганизмами, в том числе патогенными штаммами, которые переносятся домашними пчелами и другими антофильными насекомыми.

Опасность для шмелей представляют пиретроиды, неоникотиноиды и др. инсектициды, а также некоторые фунгициды [4, 8]. Не исключена аккумуляция в пыльце тяжелых металлов, радиоактивных веществ и других опасных примесей. Выявление партий некачественной пыльцы – необходимое условие организации высоко рентабельного производства по выращиванию шмелей. При этом посев микроорганизмов на селективные питательные среды и инструментальные методы оценки содержания

различных веществ в пыльце требуют проведения многочисленных и достаточно дорогостоящих исследований.

Цель данной работы: разработка и практическое испытание методики оценки качества пыльцы, используемой при приготовлении белкового корма для шмелей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для оценки пригодности пыльцы в качестве компонента белкового корма для шмелей использовали комплекс методов: световую микроскопию, спектрофотометрию, флуорометрию и биотесты на рабочих особях земляного шмеля.

Искусственно сформированные колонии используются в научных целях и при промышленном разведении шмелей [2, 3]. Биологическое тестирование пыльцы на шмелях позволяет оценить широкий спектр свойств пыльцевой обножки. Тестирования пыльцы проводили на микроколониях, состоящих из 4 рабочих особей шмелей, размещенных в цилиндрических садках диаметром 14 см, высотой 7 см с решётчатым дном и крышкой. В качестве углеводного корма для них использовали 62% инвертированный сахарный сироп, белкового корма – пасту, приготовленную из тестируемой пробы пыльцы и сахарного сиропа. Для комплектования каждой искусственной колонии использовали рабочих особей, извлеченных из 2–4 крупных лабораторных колоний земляного шмеля (*Bombus terrestris* (L.)). 1–2 раза в неделю осуществляли кормление, промежуточную оценку состояния колоний и очистку садков. При однородных условиях данные по группе, состоящей из 7–10 садков, позволяют оценить качество пыльцы.

После создания искусственных микроколоний у изолированных от маток рабочих шмелей развиваются яичники, они начинают откладывать яйца и выращивать личинок. Рабочие не оплодотворены и способны откладывать только гаплоидные яйца, из которых развиваются самцы. После отрождения самцов подсчитывается число выживших рабочих особей, отродившихся самцов и преимагинальные фазы: ячейки с мелкими личинками и яйцами, крупные личинки и куколки. Эксперимент прекращается после отрождения самцов и отбраковки всех садков, в которых расплод не развивается. На основании данных о скорости развития и численности потомства выполняется анализ содержания питательных и токсичных веществ в корме.

Садки со шмелями размещали в лабораторном шкафу-инсектарии с автоматизированной системой поддержания микроклимата. Воздух внутри шкафа постоянно прокачивается через отделение воздухоподготовки, оснащенное фильтрующими элементами и бактерицидным облучателем [5]. Таким образом, поддерживаются благоприятные условия для развития расплода шмелей: температура 27–28,5°C, относительная влажность

воздуха 55–68 % [7]. В оптимальных условиях на 4–5 неделе эксперимента из куколок отрождаются самцы. Скорость развития расплода отражает динамику процессов, зависящих от качества белкового корма: скорости развития овариовзрослых особей, скорости развития личинок и куколок. Данный показатель позволяет оценить содержание в корме питательных веществ и токсинов. О содержании в корме болезнетворных микроорганизмов и токсинов также позволяет судить выживаемость рабочих особей, личинок и куколок.

Достоинства метода: комплексный анализ тестируемого субстрата на питательную ценность, токсичность, присутствие возбудителей болезней и относительная дешевизна. Недостатки: сложность идентификации фактора, влияющего на развитие шмелей и достаточно длительные сроки проведения биотеста (до 5–7 недель).

Также для оценки качества пыльцы использовали световую микроскопию и биохимические исследования. При помощи световой микроскопии оценивали присутствие посторонних включений и микроорганизмов, а также разнообразие флористического состава (по морфотипам пыльцы). Сортировка гранул пыльцевой обножки выполнялась под стереомикроскопом MC-2-ZOOM. Микроскопическое исследование пыльцы проводили с помощью микроскопа Микромед 3 (увеличение объективов $\times 10$, $\times 40$, $\times 100$). Фотографирование микропрепаратов выполнено видеоокуляром DCM-510 SCOPE. Влажность образцов пыльцы оценивали по изменению массы после сушки при температуре 60–100°C в течение 3,5–5 часов.

Флуорометрический анализ водно-спиртового раствора пыльцы (50% воды/50% спирт) был проведён на флуориметре Hitachi F-7000. Содержание нуклеиновых кислот определяли с помощью флуоресцентного красителя акридиновый оранжевый. Для облучения использовались 3 длины волны: 280 нм, 320 нм, 400 нм. Содержание фенольных соединений определяли с помощью реактива Фолина на спектрофотометре. Концентрацию белка – с помощью коммерческого набора Bio-Rad и бычьего сывороточного альбумина в качестве контрольного белка. Для этого брали 20 мкл раствора пыльцы (7,5 мг на мл) и растворяли в 1 мл приготовленного раствора. Затем мерили оптическую плотность при 600 нм.

Биологическое тестирование пыльцы на рабочих особях и преимагинальных фазах шмелей выполнено для 55 проб пыльцы, собранной в России (Воронежская, Смоленская, Майкопская области) и в Украине в 2011–2012 гг.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влажность образцов сушеной пыльцы составила 3–3,6 %. Влажность большинства образцов замороженной пыльцы 10,5–22,2 % (мин. – 8,4 %,

макс. – 36.7 %, средняя – 15.8 %).

При тестировании пыльцы на искусственных микроколониях шмелей группы различали по скорости развития расплода.

1) Быстро развивающиеся группы (питались пыльцой высокого качества):

- самцы во всех садках отродились на 4–5 неделе;

- самцы в 80–90 % садков отродились на 5 неделе, на 6 неделе – во всех садках;

2) Группы со средней скоростью развития на 5 неделе самцы отродились менее чем в 80 % садков, к 6–7 неделе – во всех садках (питались пыльцой с пониженными питательными свойствами).

3) Группы с низкой скоростью развития (питались пыльцой низкого качества):

- на 6 неделе самцы отродились менее чем в 80 % садков, во всех садках – к 7 неделе;

- самцы в большинстве садков отродились к 8 неделе.

4) группы, в которых личинки гибли, не достигнув стадии куколки (питались пыльцой непригодной для питания шмелей).

В наиболее успешно развивающихся группах через 2–2.5 недели в большинстве садков появляются куколки, через 3 недели куколки появляются почти во всех садках; через 4 недели в большинстве садков отрождаются самцы, через 5 недель самцы отрождаются во всех садках. К завершению теста средняя численность выживших рабочих особей не менее 3.5 экз. Средняя численность отродившихся самцов не менее 6 экз., максимальная – 29 экз. В группах со средней скоростью развития расплода, в 30–40 % садков наблюдалась задержка развития колоний на 1 неделю. Повышенной смертности личинок и куколок в этих группах не отмечено.

Высокая и средняя скорость развития расплода наблюдалась в 47 из 55 групп. Низкая скорость развития расплода отмечена в группах № 7, 8, 10, 23, 48 (табл. 1). В группе № 23 в 57 % садков молодые особи отродились только на 6 неделе. Наиболее низкая скорость развития отмечена в группах, получавших пыльцу, собранную 2011 г. и хранившуюся более полутора лет. В группе № 8 в большинстве садков отмечена задержка развития расплода на 1–2 недели.

Высокая скорость развития расплода отмечена для нескольких проб с высоким содержанием микроорганизмов. Например, при питании пастой из пыльцы №4, которая, вероятно, намокла при сборе (влажность 36,7 %) и хранилась в тепле, к 4 неделе почти во всех садках появились куколки, а к 5 – взрослые самцы. Смертность взрослых шмелей при питании данной пыльцой была относительно низкой.

Таблица 1. Скорость развития расплода и выживаемость рабочих особей в группах колоний шмелей, питавшихся пыльцой различного качества

№	Регион сбора пыльцы	Неделя отрождения самцов		Ср. число выживших рабочих
		в 80–90 % садков	во всех садках	
1	Майкоп	5	6	2,5
2	Украина	6	6	3,3
3	Смоленск	4	5	3,9
4	Воронеж	5	6	3,8
5	Воронеж	4	5	3,5
6	Воронеж*	6	6	2,8
7	Воронеж*	6	7	3,3
8	Украина	6	7	3,6
9	Украина	погибли		3,8
10	Украина	6	7	3,3
11	Украина	погибли		3,7
12	Воронеж	5	7	2,9
13	Воронеж	4	5	3,5
14	Воронеж	4	4	3,8
15	Воронеж	5	6	3,7
16	Воронеж	5	5	3,7
17	Воронеж	6	6	4
18	Воронеж	5	5	4
19	Воронеж	5	6	3,6
20	Воронеж	5	5	3,5
21	Украина	5	5	3,6
22	Украина	4	4	3,8
23	Смоленск	6	6	3,7
24	Украина	4	5	3,8
25	Украина	4	5	3,8
26	Украина	6	6	3,9
27	Украина	5	6	3,9
28	Украина	5	6	4
29	Украина	5	6	4
30	Украина	5	6	3,7
31	Украина	4	5	4
32	Украина	5	5	4
33	Украина	5	5	3,9
34	Украина	6	6	3,9
35	Майкоп	5	5	3,9
36	Майкоп	5	5	3,7
37	Майкоп	5	5	4
38	Майкоп	5	5	4
39	Майкоп	4	5	3,9
40	Смоленск	погибли		3,6
41	Смоленск	5	6	3,9
42	Смоленск	5	5	4
43	Украина	5	5	3,7
44	Украина	5	5	4
45	Украина	5	5	4
46	Украина	6	6	3,9
47	Майкоп	5	5	3,4
48	Воронеж*	7	8	3,7
49	Воронеж*	5	5	4

№	Регион сбора пыльцы	Неделя отрождения самцов		Ср. число выживших рабочих
		в 80–90 % садков	во всех садках	
50	Воронеж*	5	6	3,7
51	Воронеж*	5	7	2,7
52	Воронеж*	5	5	3,4
53	Смоленск	5	6	3,6
54	Майкоп	6	7	3,9
55	Майкоп	5	7	3,9

Воронеж* – сушеная пыльца

В группах, питавшихся пыльцой, не пригодной для кормления шмелей, личинки гибли, не достигнув стадии куколки. Со второй недели в группе № 11 остановилось развитие личинок. Они достигали только мелкого и среднего размера, а к 4 неделе, когда в успешно развивающихся колониях началось отрождение молодых самцов, в данной группе наблюдалась массовая гибель личинок. К 5 неделе в группе № 11 погибло подавляющее большинство средних и все крупные личинки. По смертности взрослых рабочих особей данная группа не превосходила группы, питавшиеся качественной пыльцой.

В группе № 9 задержка развития расплода в большинстве садков составила 2–3 недели. В 1/3 садков к 8 неделе молодые особи не отродились. В данной группе отмечена очень высокая (до 27 экз. в неделю) смертность личинок и куколок. В итоге численность отродившихся самцов была крайне низкой (в 6 раз ниже, чем у успешно развивающихся групп). Вероятно, данная пыльца содержит возбудителей, опасных для шмелей инфекционных болезней или токсины.

Группа № 10, питавшаяся кормом, приготовленным из 25% пыльцы № 9 и 75% пыльцы № 21, по всем основным параметрам (скорости развития и численности расплода) значительно уступала контролю. Таким образом, даже относительно небольшая примесь некачественной пыльцы вызывает заметное ухудшение развития шмелей.

В группе № 40 наблюдалась наибольшая смертность куколок, к 7 неделе самцы не отродились ни в одном садке. Вероятно, данная пыльца бедна необходимыми для развития личинок питательными веществами. Задержка развития расплода во всех садках составила не менее 3 недель. Группа № 53, питавшаяся кормом из 25% пыльцы № 40 и 75% пыльцы № 21, мало уступала контролю.

Содержание фенольных соединений в пыльце незначительно и носит следовой характер. Различий между образцами пыльцы в содержании фенольных соединений и белка не обнаружено. Флуорометрический анализ водно-спиртового раствора пыльцы также не позволил идентифицировать факторы, негативно влияющие на развитие шмелей.

Пчелиная обножка, состоящая из пыльцы различных видов растений-медоносов, независимо от точки сбора, сходна по аминокислотному составу, и в ней присутствуют все необходимые аминокислоты. В наибольшей степени варьирует содержание глицина, глутаминовой кислоты и пролина [9]. Содержание белка определено в 3 пробах

качественной обножки (№ 18, 20, 24) и 2 пробах некачественной (№ 9, 11) (табл. 2). Образцы пыльцы низкого качества характеризовались сниженной концентрацией белка. Однако, данные различия невелики.

Таблица 2. Содержание белка в пробах пчелиной обножки

Номер пробы	Массовая доля белка
9	0,37
11	0,4
18	0,46
20	0,44
24	0,45

Микроскопия пыльцы выполнена для проб пыльцы различного качества. Трупов взрослых медоносных пчел и личинок, а также гифов грибов и значительного количества проросших пыльцевых зёрен ни в одной из проб не обнаружено.

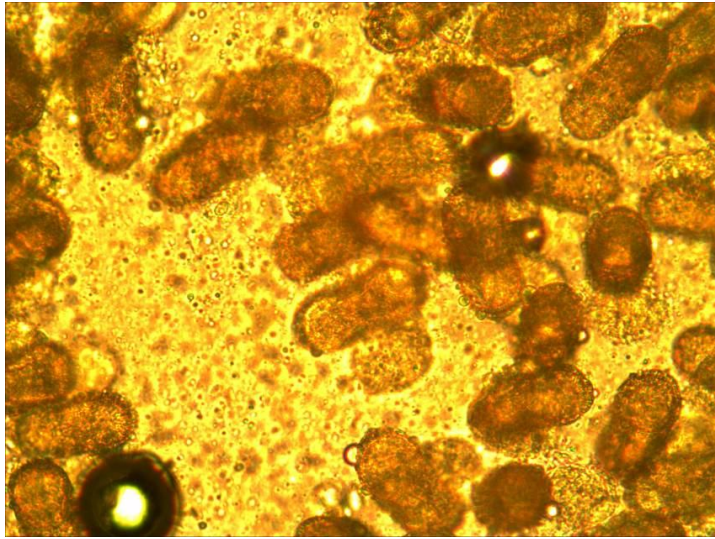
При анализе проб некачественной пыльцы выявлен ряд отличий от пыльцы, пригодной для кормления шмелей. Как правило, данные партии пыльцы (например, № 9, 40) отличаются высокой долей обножки одного цвета, содержащей пыльцу, принадлежащую к одному морфотипу. В пробе № 11 пыльцы одного морфотипа более 70%. В пробах высокого качества пыльцы одного морфотипа обнаружено не более 50%.

Большинство проб некачественной пыльцы характеризуются высокой обсемененностью микроорганизмами (№ 9, 40). Но в пробе № 11, при питании которой гибли все личинки, не обнаружено повышенного содержания микроорганизмов и проросших пыльцевых зерен. Поэтому маловероятно, чтобы пыльца испортилась в результате хранения в тепле. Одна из проб № 9 содержала около 10% распавшихся гранул обножки, и именно эта фракция отличалась обилием микроорганизмов. Пробы с пониженной питательной ценностью также отличались от высококачественной пыльцы высокой или средней степенью обсемененности микроорганизмами.

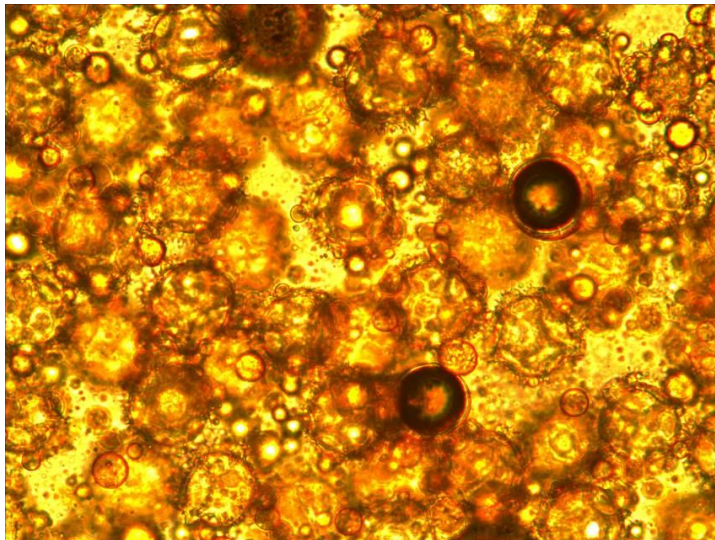
Большинство проб высококачественной пыльцы характеризуются следующими качествами: относительно высоким разнообразием морфотипов пыльцы и низкой обсемененностью микроорганизмами (за исключением № 29). Однако при питании кормом из пробы пыльцы, имевшей максимальную влажность и обсемененность микроорганизмами, наблюдалось быстрое развитие расплода и относительно невысокая смертность шмелей.

При микроскопии не выявлено очевидных признаков порчи пыльцы № 11. Повышенной смертности взрослых шмелей при питании данной пыльцой не отмечено. Поэтому маловероятно присутствие в ней пиретроидов, неоникотиноидов, фосфор- хлорорганических, а также других токсинов подобного действия. Присутствие возбудителей опасных инфекционных болезней взрослых особей и личинок также маловероятно, т. к. не отмечено заражение шмелей из экспериментальных групп,

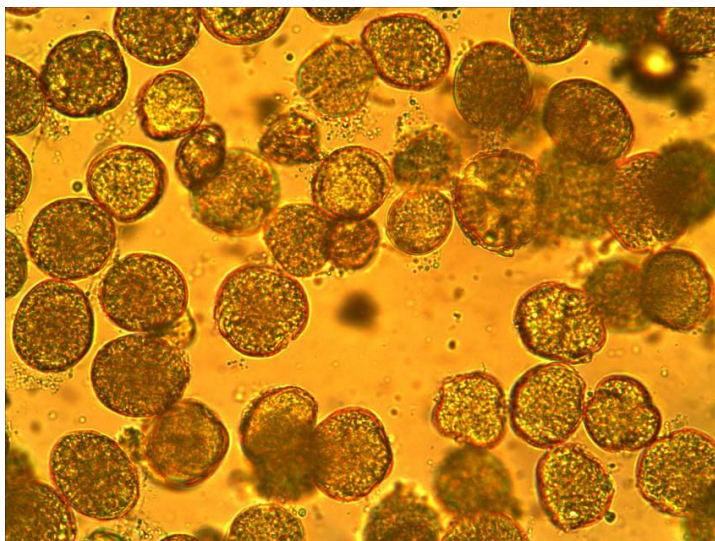
контактировавших с группой, питавшейся пылью № 11. Возможно, в образце присутствуют вещества, влияющие на метаморфоз личинок.



Высокий уровень
бактериального
загрязнения. Проба № 1.



Средний уровень
бактериального загрязнения.
Проба № 11.



Низкий уровень
бактериального загрязнения.
Проба № 22.

Рис. 1. Пыльца с различным уровнем бактериального загрязнения (увеличение × 40 крат).

При проведении биотестов на искусственных микроколониях шмелей необходимо учитывать комплекс факторов, описывающих их состояние, т. к. отдельные признаки не выявляют всех параметров, определяющих качество корма.

ВЫВОДЫ

1. 85,5 % образцов пыльцы, собранной в различных регионах России и Украины, обладают высокими питательными свойствами. При кормлении данной пыльцой отмечена высокая или средняя скорость развития расплода шмелей. 5 образцов обножки имели пониженные питательные свойства.

2. Выявлено 3 образца некачественной обножки (№ 9, 11 и 40), непригодной для питания шмелей. В группах, питавшихся этой пыльцой, отмечена высокая смертность личинок и куколок. В 30–100 % садков к 8 неделе молодые особи не отродились. Вероятно, данная пыльца содержит патогенные для шмелей микроорганизмы или токсины, либо бедна необходимыми для развития личинок шмелей питательными веществами. Даже небольшая (25 %) примесь некачественной пыльцы вызывает заметное ухудшение развития личинок шмелей.

3. Из 7 групп искусственных колоний шмелей, питавшихся образцами сухой пыльцы, в 2 наблюдалась низкая скорость развития личинок. Остальные образцы были пригодны для кормления шмелей.

4. При микроскопии проб некачественной пыльцы не выявлено признаков, надежно отличающих ее от пыльцы высокого качества. Также не было обнаружено значительных отличий между пробами пыльцы в содержании нуклеиновых кислот, фенольных соединений и белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колесников М.П. Биохимический состав и кремний растительной пыльцы и пчелиной перги // Успехи современной биологии. – 2000. – Т. 120, вып. 3. – С. 374–382.
2. Лопатин А.В. Лабораторное содержание и разведение примитивно-эусоциальных пчел (Hymenoptera, Halictidae, Apidae) для биологических исследований и опыления сельскохозяйственных культур // Состояние и проблемы экосистем среднерусской лесостепи. – Тр. биол. учеб.-науч. центра ВГУ “Веневитиново”; Вып. XXI. – Воронеж, 2008. – С. 99–105.
3. Лопатин А.В. Формирование искусственных колоний шмеля *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae) из матки и куколок, либо матки и взрослых рабочих особей // Состояние и проблемы экосистем среднерусской лесостепи. – Тр. биол. учеб.-науч. центра ВГУ “Веневитиново”; вып. XXIV. – Воронеж, 2010. – С. 81–89.
4. Лопатин А.В., Солдатова Н.В., Сыромятников М.Ю., Пономарев В.А. Воздействие пестицидов на шмелей в условиях защищенного грунта. – Воронеж: Роза ветров, 2012. – 52 с.
5. Лопатин А.В., Сыромятников М.Ю., Востриков Д.В., Герасимов Д.М., Попов В.Н. Шкаф-инсектарий для выращивания шмелей и объектов биологической защиты

- растений от вредителей // Патент на полезную модель. – Входящий № 031385. Регистрационный № 2013121285. – Дата подачи заявки 13.05.2013.
6. Наумкин Е.П. Аминокислотный состав пыльцы // Пчеловодство. – 1984. – Вып. 10. – С. 23–24.
 7. Пономарев В.А. Экология шмелей рода *Bombus* (Latr.) и использование шмелей для опыления сельскохозяйственных культур закрытого грунта // Под редакцией Ю.Ф.Петрова. – Иваново, 2004. – 143 с.
 8. Сыромятников М.Ю., Попов В.Н., Горбачева Т.М., Лопатин А.В., Солдатова Н.В., Бабкина О.В. Влияние пестицидов на дыхание митохондрий летательных мышц земляного шмеля // Пчеловодство. – 2012. – № 6. – С. 60–61.
 9. Сыромятников М.Ю., Фоменко О.Ю., Лопатин А.В., Горбачева Т.М., Попов В.Н. Исследование аминокислотного состава кормовой пыльцы для шмелей с использованием сверхпроизводительной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ) // Сорбционные и хроматографические процессы: науч. журн. – Т. 12, вып. 4. – Воронеж, 2012. – С. 592–597.

А.В. Лопатин, М.Ю. Сыромятников
ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЦВЕТОЧНОЙ ПЫЛЬЦЫ, СОБРАННОЙ
МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛОЙ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕСТОВ
НА РАБОЧИХ ОСОБЯХ ЗЕМЛЯНОГО ШМЕЛЯ

Ключевые слова: Bombus terrestris, Apis mellifera, биотесты пыльцы

Обножку, собранную медоносной пчелой в различных регионах России и Украины, тестировали на искусственных микроколониях, состоящих из рабочих шмелей, извлеченных из разных семей. Установлено, что около 15% образцов обладает пониженной питательной ценностью или непригодно для кормления шмелей.

A.V. Lopatin, M. Yu. Syromyatnikov
EVALUATION OF THE QUALITY OF POLLEN COLLECTED BY
HONEY BEES USING BIOTESTS ON WORKERS OF BUMBLEBEE
BOMBUS TERRESTRIS

Keywords: Bombus terrestris, Apis mellifera, pollen biotests

The pollen collected by honey bees in different regions of Russia and Ukraine was tested in artificial microcolonies consisting of bumblebee workers from different colonies. The findings show that about 15% of the samples have low nutritional value or are not suitable for bumblebee feeding.