

УДК 579.62: 638.154.3

© Ярошко О.М., Шепелевич В.В., Степура Л.Г.,
Гриценко Л.М., Яворська Н.В., Святецька В.М.,
Єфіменко Т.М., Односум Г.В.

АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТІВ КВІТІВ ЩОДО МІКРООРГАНІЗМІВ, ВИДІЛЕНИХ З ЛИЧИНОК МЕДОНОСНИХ БДЖІЛ, УРАЖЕНИХ ГНИЛЬЦЯМИ

О.М. Ярошко¹, В.В. Шепелевич¹, Л.Г. Степура¹, Л.М. Гриценко¹,
Н.В. Яворська¹, В.М. Святецька¹, Т.М. Єфіменко², Г.В. Односум³

¹ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені
Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, Київ, Україна, 01601;

²ННЦ «Інститут бджільництва імені П. І. Прокоповича»,
вул. Акад. Д.К. Заболотного, 19, Київ, Україна, 03680;

³Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, Україна, 03041
e-mail: yefimenkotatiana@gmail.com

Досліджено антибактеріальні властивості квітів рослин-нектароносів щодо культур, виділених зі стільників з ураженим гнильцями розплодом бджіл. Антибактеріальна активність спиртових екстрактів квітів, щодо виділених штамів мікроорганізмів, досліджена з використанням мікробіологічних, культурально-морфологічних, біохімічних, електронно-мікроскопічних та статистичних методів. Антибактеріальний ефект до штаму *Melissococcus pluton* 8.1 проявили екстракти квітів 14 видів рослин, а до бактерій роду *Bacillus* — екстракти квітів 27 видів ранньоквітучих рослин. Отримані дані дозволяють рекомендувати для дослідження на бджолиних сім'ях, уражених гнильцями, протигнильцеві властивості таких рослин-нектароносів, як: глуха кропива біла, клен польовий, вишня войлочна, цибуля ріпчаста, чорнобривець розлогий, спірея японська, деревій звичайний, вереск звичайний, м'ята перцева, липа дрібнолиста, волошка лучна, вербозілля лучне. Результати експериментів на культурі мікроорганізмів, виділених зі стільників хворих на гнильці сімей, свідчать про те, що вказані рослини можуть бути ефективними для профілактики та лікування бактеріальних хвороб бджіл.

Ключові слова: рослини-нектароноси, бактеріальні хвороби бджіл, мікробіота стільників з ураженим розплодом бджіл, антибактеріальна активність, *Bacillus*, *Melissococcus pluton*.

Антибактериальная активность экстрактов цветов относительно микроорганизмов, выделенных с личинок медоносных пчел, пораженных гнильцами

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

Исследованы антибактериальные свойства цветков растений-нектароносов относительно культур, выделенных из сотов, с пораженным гнильцами расплодом пчел. Антибактериальная активность

спиртовых экстрактов цветков относительно выделенных штаммов микроорганизмов исследована с использованием микробиологических, культурально-морфологических, биохимических, электронно-микроскопических, статистических методов. Антибактериальный эффект по отношению к штамму *Melissococcus pluton* 8.1 проявили экстракты цветков 14 видов растений, относительно бактерий рода *Bacillus* — экстракты цветков 27 видов растений, цветение которых приходится на раннюю весну. Полученные результаты позволяют рекомендовать для исследований на пчелиных семьях, пораженных гнильцами, противогнильцовые свойства 12 растений-нектароносов: глухая крапива белая, клен полевой, вишня войлочная, лук репчатый, бархатцы мелкоцветные, спирея японская, тысячелистник обыкновенный, вереск обыкновенный, мята перечная, липа мелколистная, василек луговой и вербейник монеточный. Результаты экспериментов на культуре микроорганизмов, выделенных из сотов, больных гнильцами семей, свидетельствует о том, что указанные растения могут быть эффективными для профилактики и лечения бактериальных болезней пчел.

Ключевые слова: растения-нектароносы, бактериальные болезни пчел, микробиота сотов с пораженным расплодом пчел, антибактериальная активность, *Bacillus*, *Melissococcus pluton*.

Antibacterial activity of flower extracts on microorganisms isolated from the larvae of honey bees affected by fowlbroods

O.M. Yaroshko, V.V. Shepelevych, L.G. Stepura, L.M. Hrytsenko, N.V. Yavorska, V.M. Svyatetska, T.M. Yefimenko, H.V. Odnosum

It is known that bee colonies at certain diseases are able for “self-curing” and it coincides with the beginning of mass blooming of the melliferous plants. In other words, the phenomenon of “self-curing” may be related with therapeutic and health improving properties of the honey flora. Additionally, the flower nectar contains not only sucrose, fructose and glucose, but also dextrin, organic acids, minerals and enzymes, glycosides, essential oils, tannins, saponins, derivatives of phenol and flavones. That is why it is recommended to take out bee colonies out of places of forbs blooming to prevent and treat the bees’ diseases. We investigated the antibacterial properties of plant extracts of melliferous flowers against cell cultures, isolated from the bee’s honeycombs affected by fowlbrood. Antibacterial activity of ethanol extracts of flowers on isolated strains of microsporidia were investigated using microbiological, cultural-morphological, biochemical, electron microscopy, and statistical methods. The antibacterial effect on the strain *Melissococcus pluton* 8.1 showed flower extracts of 14 species of plants, on bacteria of the *Bacillus* genus - flower extracts of 27 species of early blooming plants. The obtained data can be used in research on bee families affected by fowlbrood, with fowlbrood properties of such melliferous plants as: *Lamium album*, *Acer campestre*, *Prunus tomentosa*, *Allium cepa*, *Tagetes patula*, *Spiraea japonica*, *Achillea millefolium*, *Calluna vulgaris*, *Mentha piperita*, *Tilia cordata*, *Centaurea jacea*, *Lysimachia nummularia*. The results of experiments on the culture of microorganisms isolated from honeycombs of the bee families affected by fowlbrood indicate that these plants can be effective for prevention and treatment of bacterial bee’s diseases.

Key words: melliferous plants, bacterial disease of bees, microbiota of combs with affected bee brood, antibacterial activity, *Bacillus*, *Melissococcus pluton*.

Відомо, що за деяких бактеріальних хвороб бджолині сім’ї здатні до «самовиліковування», і це співпадає з початком масового цвітіння нектароносів. Тобто явище «самовиліковування» може бути пов’язане з лікувальними та оздоровчими властивостями медоносної флори. Адже нектар квітів у своєму складі, крім сахарози, фруктози і глюкози, містить також декстрини, органічні кислоти, мінеральні солі і ферменти, глікозиди, ефірні олії, дубильні речовини, сапоніни, похідні фенолу і флавоноів (Алексєєв, 2013). Серед мікроелементів присутні К, Са, Мп, Fe, Mg, Cu, Zn, Co, Cr, Al, V, Se, Ni, Sr, Pb, В. Для профілактики та лікування захворювань рекомендується розміщати вулики з бджолами в місцях з різнотрав’ям квітучих рослин (Flesar et al., 2010; González, Marioli, 2010; Reybroeck et al., 2012).

В науковій літературі достатньо даних по впливу рослинних екстрактів на збудників бактеріальних, грибкових та мікроспорідіальних хвороб бджіл. Так в лабораторії технологічних та спеціальних заходів профілактики хвороб бджіл (ННЦ «Інституті

бджільництва ім. П.І. Прокоповича») досліджено на культурі гриба *Ascosphaera apis* (in vitro) протиаскосферозні властивості більше ніж 500 видів рослин флори України. В подальшому на бджолах (in vivo), штучно заражених спорами *Nosema apis*, досліджено протинозематозні властивості екстрактів з тих рослин, які виявили протиаскосферозний ефект. В результаті відібрані рослини, екстракти з яких мають комплексні протинозематозно-аскосферозні властивості, і які можуть бути основою екологічно-безпечних рослинних препаратів для лікування бджіл від нозематозу та аскосферозу (Дульнев та ін., 2002; Боднарчук та ін., 2003). Багато досліджень присвячено вивченню впливу фітонцидів рослин, зокрема, часнику та цибулі, на збудників бактеріальних хвороб бджіл. В результаті досліджень, проведених американською групою вчених, з часнику було отримано антибіотичну речовину – алліцин, що утворюється при пошкодженні цибулини з сірковмісною амінокислотою (+)-S-аліл-l-цистеїнсульфоксид. Було показано, що алліцин пригнічував ріст *Paenibacillus larvae* – збудника американського гнильцю, а зони затримки росту становили 45–50 мм (Flesar et al., 2010). В.І. Полтев вивчав антибактеріальну дію фітонцидів сосни і рекомендував їх використовувати для лікування інфекційних хвороб бджіл (по Шабаршову, 1986). Проте дані про вплив екстрактів з квітів рослин-нектароносів на збудників бактеріальних хвороб бджіл в літературі відсутні.

Раніше нами було показано, що екстракти квітів 38 видів рослин проявляли антибактеріальні властивості до музейної культури *Bacillus subtilis* УКМ В-90, зони затримки росту до всіх досліджуваних екстрактів становили 7–21 мм. При цьому найбільший бактерицидний ефект проявляли екстракти квітів цибулі ріпчастої (*Allium cepa* Linnaeus, 1753) – діаметр зони затримки росту становив 21 мм, жовтушника лакфіолевидного (*Erýsimum cheiranthoides* Linnaeus, 1753) – 17 мм, ехінацеї пурпурової (*Echinacea purpurea* Moench, 1794) та горошку мишачого (*Vicia cracca* Linnaeus, 1753) – 16 мм (Ярошко та ін., 2013). Метою даної роботи було дослідити антибактеріальні властивості квітів рослин-нектароносів щодо культур, виділених з личинок медоносних бджіл, уражених гнильцями.

Матеріали і методи

Робота виконана на основі творчої співпраці лабораторії технологічних та спеціальних заходів профілактики хвороб бджіл ННЦ «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича» та НДЛ «Мікробіологічних та імунологічних проблем біотехнології» ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Об'єктами досліджень слугували 10 штамів бактерій, виділених з 10 зразків стільників із запечатаним розплодом, відібрані в травні-серпні 2012–2014 рр. у Київській і Житомирській областях (Yaroshko et al., 2015). Культури зберігали за температури +4°C на середовищі м'ясо-пептонного агару (МПА) під шаром вазелінової олії. Для досліджень застосовували добову культуру мікроорганізмів. В роботі використано спиртові екстракти квітів 153 видів рослин, зібраних у 2012–2015 рр. в різних регіонах України. Антибіотичну активність екстрактів квітів вивчали за допомогою диско-дифузійного методу (Methods..., 1998). Спиртові екстракти квітів готували за наступною методикою: до 1 г квітів додавали 2 мл 96% етилового спирту і ретельно гомогенізували. Отримані спиртові екстракти наносили на паперові диски діаметром 6 мм. В якості контролю використовували паперові диски, оброблені сумішшю фізіологічного розчину зі спиртом (1:2). Дослідні та контрольні диски висушували в ламінарному боксі за кімнатної температури. Готували суспензію добової культури досліджуваних мікроорганізмів на стерильному фізіологічному розчині до концентрації 1×10^9 КУО/мл. Висівали 0,1 мл приготовленої суспензії газомом на поверхню чашки Петрі з середовищем Мюллера-Хілтона. Диски з екстрактами розкладали на поверхню середовища із засіяними мікроорганізмами, культивували 24 год. в термостаті за 37°C, після чого реєстрували зони затримки росту мікроорганізму. Результати статистичної обробки представляли у вигляді довірчих інтервалів,

побудованих за допомогою програми Statistica.

Результати та їх обговорення

При вивченні антибактеріальної активності спиртових екстрактів квітів щодо штаму *Melissococcus pluton* 8.1 використовували спиртові екстракти квітів 125 видів рослин, з них 11 – городніх рослин, 44 – декоративних рослин, 70 – дикорослих рослин. Показано, що з усіх досліджуваних екстрактів, лише 14 проявляли антибактеріальну активність щодо *Melissococcus pluton* 8.1 – збудника європейського гнильцю (рис. 1).

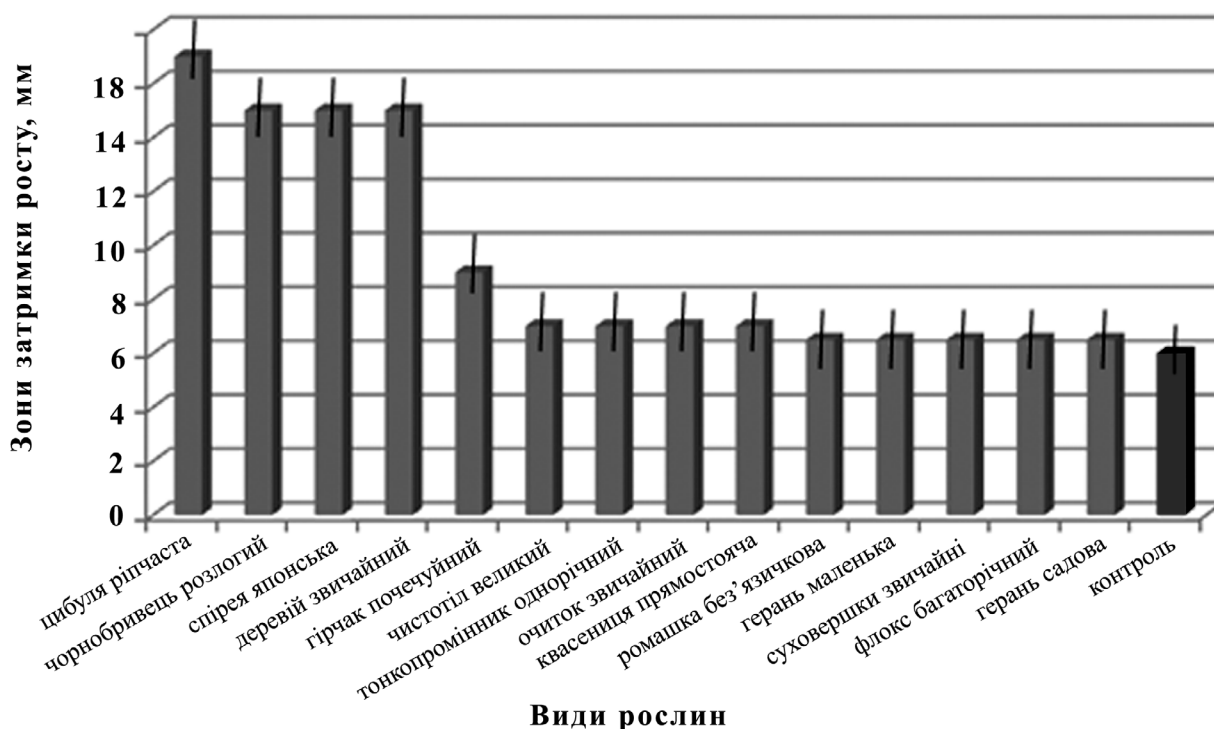


Рис. 1. Антибактеріальна активність спиртових екстрактів квітів щодо штаму *Melissococcus pluton* 8.1

Fig.1. Antibacterial activity of the ethanol flower extracts on the strain *Melissococcus pluton* 8.1

Найбільш активними виявилися екстракти квітів: цибулі ріпчастої (17 мм), чорнобривця розлогого (15 мм), спіреї японської (15 мм), деревію звичайного (15 мм). Антибактеріальна дія до штаму *Melissococcus pluton* 8.1 була виявлена у однієї городньої рослини, п'яти декоративних рослин, восьми дикорослих рослин.

В якості тест-культур використовували також мікроорганізми роду *Bacillus*, які були виділені зі стільників з ураженим розплідом (Yaroshko et al., 2015), оскільки представники саме цього роду часто є збудниками захворювань бджіл: американського гнильцю (*Paenibacillus larvae*), європейського гнильцю (*Paenibacillus alvei*; *Brevibacillus*; *Paenibacillus apiarius*); парагнильцю (*Bacillus paraalvei*), порошкоподібного розпліду (*Paenibacillus larvae pulvifaciens*) (Алексеєнко и др., 1988; Гробов, Лихотин, 1989).

Показано, що екстракти 27 видів рослин проявляли антибактеріальну активність щодо досліджуваних мікроорганізмів, а зони затримки росту становили 7–15 мм. Найбільш активними виявилися екстракти квітів клену польового (89%), вишні войлочної, пузирниці східної, грициків звичайних (67%) щодо усіх досліджених штамів. Екстракти квітів чистяка весняного затримували ріст 56%, фіалки триколірної, розхідника звичайного, форзиції європейської – 44% усіх досліджених штамів (рис.2).

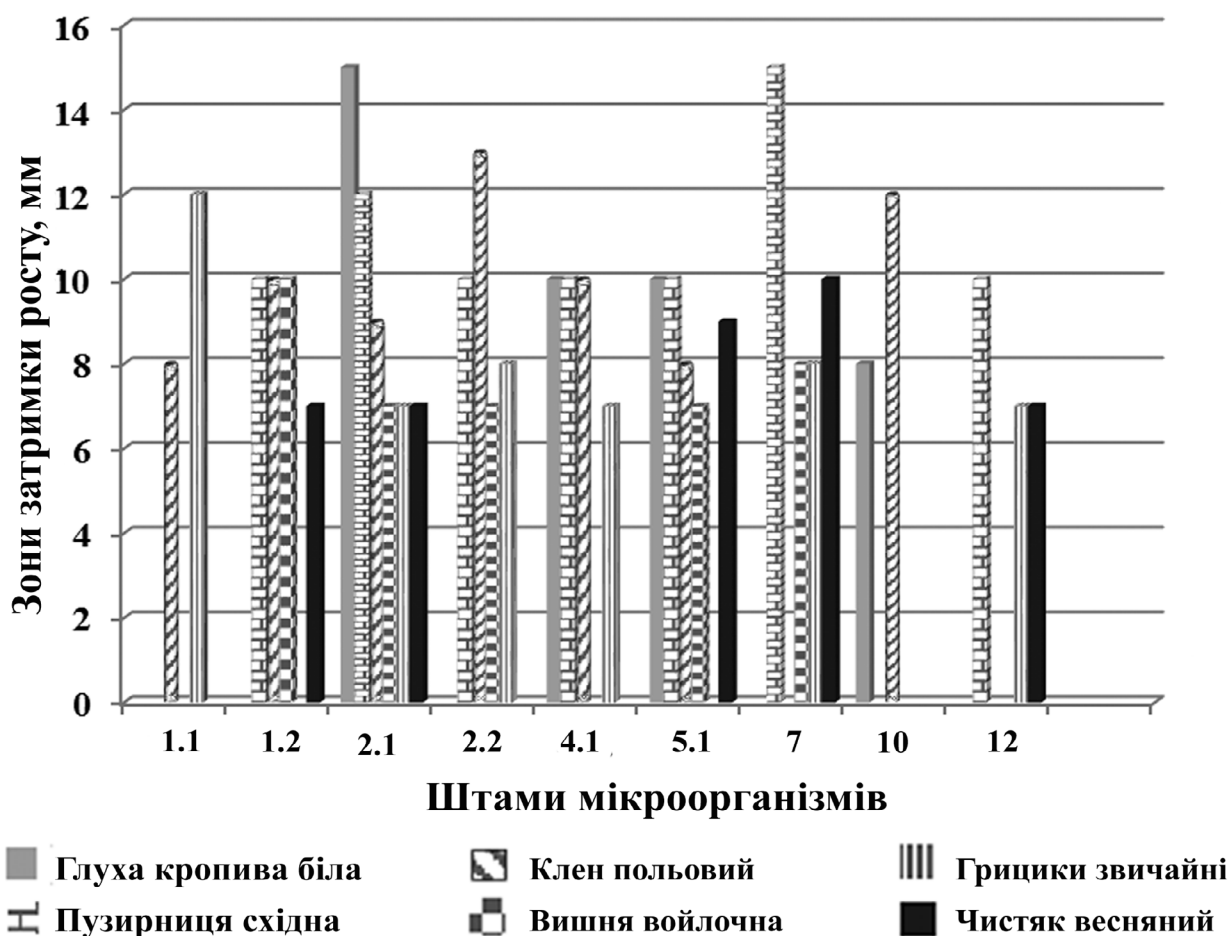


Рис. 2. Антибактеріальна активність спиртових екстрактів квітів клена польового, вишні войлочної, глухої кропиви білої, пузирниці східної, грициків звичайних, чистяка весняного, фіалки триколірної щодо мікроорганізмів, виділених з личинок медоносних бджіл, уражених гнильцями.

Fig. 2. Antibacterial activity of ethanol extracts of flowers of *Acer campestre*, *Prunus tomentosa*, *Lamium album*, *Physoclaina orientalis*, *Capsella bursa-pastoris*, *Ficaria verna*, *Viola tricolor* on microorganisms isolated from the larvae of honey bees affected by foulbrood.

Також виявлено, що антибактеріальну активність проявляли екстракти квітів усіх досліджених декоративних культур, кущів та дерев – 95% від усіх досліджених дикорослих культур. Середнє значення зони затримки росту для дикорослих культур становило 9,2 мм, декоративних – 8 мм, дерев та кущів – 8,5 мм.

Цікавим є той факт, що екстракти квітів деяких рослин: глуха кропива біла (*Lamium album* Linnaeus, 1753), клен польовий (*Acer campestre* Linnaeus, 1735), вишня войлочна (*Prunus tomentosa* Thunberg, 1784), вереск звичайний (*Calluna vulgaris* Hull, 1808), медунка лікарська (*Pulmonaria officinalis* Linnaeus, 1753), проліска дволиста (*Scilla bifolia* Linnaeus, 1753), чистець лісовий (*Stachys sylvatica* Linnaeus, 1753), вероніка весняна (*Veronica verna* Linnaeus, 1753), які проявили антибактеріальні властивості щодо тест-культур, є і рослинами-нектароносами.

Найбільш чутливим виявився штамп №2.1, вплив на який мали 50% усіх досліджених екстрактів квітів (рис. 3). Чутливими виявилися також штамп № 7 (зони пригнічення росту виявлені за впливу 43% досліджених екстрактів квітів), №1.2 і 4.1 (39%), №2.2 і 5.1 (36%).

Таким чином антибактеріальний ефект до штаму *Melissococcus pluton* 8.1 проявили екстракти квітів 14 видів рослин, до бактерій роду *Bacillus*, виділених з патологічного

матеріалу, — екстракти квітів 27 видів ранньоквітучих рослин, з яких 10 видів відносяться до декоративних рослин, дерев та кущів, а 17 — до дикорослих рослин. Можна припустити, що нектар весняних квітів, особливо дерев і кущів, є найбільш цілющим для бджіл.

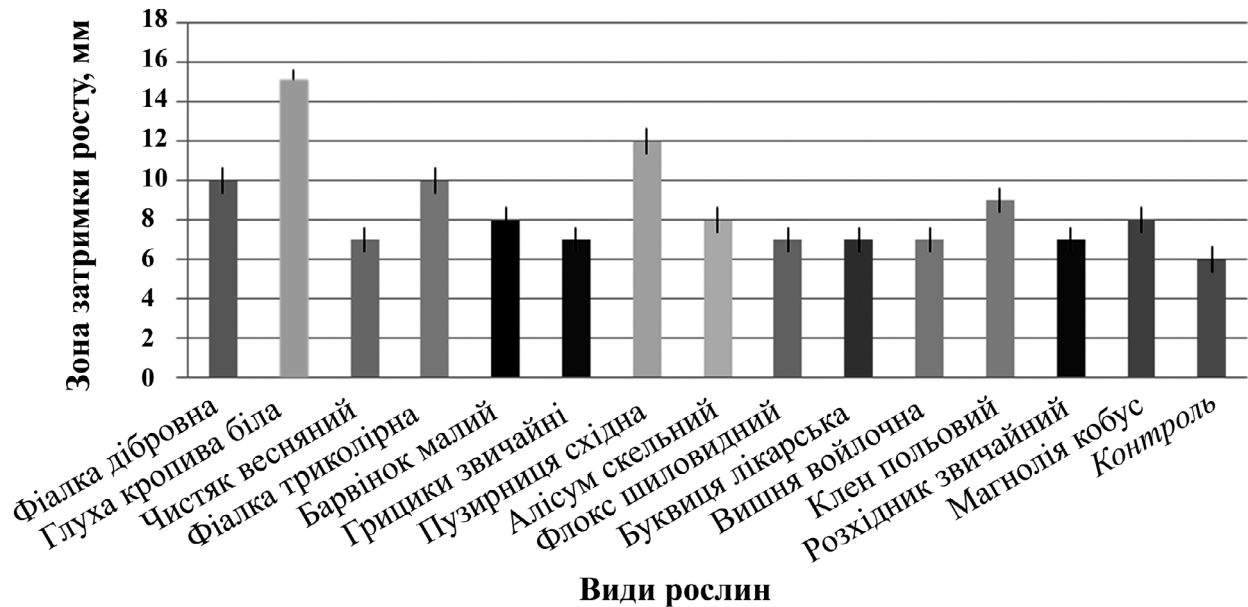


Рис. 3. Антибактеріальна активність спиртових екстрактів весняних квітів щодо штаму № 2.1.

Fig. 3. Antibacterial activity of ethanol extracts of spring flowers on the strain № 2.1

Висновки

Результати експериментів на культурі мікроорганізмів, виділених з личинок медоносних бджіл, уражених гнильцями, свідчать про те, що такі рослини-нектароноси, як: глуха кропива біла, клен польовий, вишня войлочна, цибуля ріпчаста, чорнобривець розлогий, спірея японська, деревій звичайний, вереск звичайний, м'ята перцева, липа дрібнолиста, волошка лучна, вербозілля лучне, можуть бути ефективними для профілактики та лікування бактеріальних хвороб бджіл. Отримані дані дозволяють рекомендувати для дослідження на бджолиних сім'ях, уражених гнильцем, протигнильцеві властивості зазначених вище рослин.

Література

- Алексєєв І.С. Повний атлас лікарських рослин. Донецьк: Глорія Трейд, 2013. 400 с.
- Алексєєнко Ф.М., Ревенко В.А., Чепурко М.А. Справочник по болезням и вредителям пчел. Киев: Урожай, 1988. 174 с.
- Боднарчук Л. І., Ефіменко Т. М., Дахновський В. І., Дульнєв П. Г. Спосіб лікування бджіл від аскоферозу А01К47/00 А01N65/00. Приоритет матеріалів заявки №2000021086 від 24.02.2000 р. Опубл. Бюл. №12 від 15.12.2003 р. Патент України на винахід №61965.
- Грбов О.Ф., Лихотин А.К. Болезни и вредители пчел. Москва: Агропромиздат, 1989. 235 с.
- Дульнєв П.Г., Ефіменко Т.М., Серєда О.В. Засіб для стимуляції та оздоровлення бджолиних сімей А01К53/00; А61К35/78. Приоритет матеріалів заявки №2000031834 від 31.03. 2000 р. Бюл. №9 від 16.09.2002 р. Патент України на винахід №49085.
- Шабарішов І.А. Ученые пчеловоды России. Москва: Колос, 1986. 175 с.
- Ярошко О., Степура Л., Сківка Л., Шепелевич В., Гриценко Л., Яворська Н., Святецька В. Антибактеріальна активність спиртових екстрактів квітів щодо тест-культури *Vacillus subtilis* УКМ В-90: Збірник наукових праць XV Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Проблеми та перспективи розвитку науки на початку третього тисячоліття у країнах СНД» (Переяслав-Хмельницький, 29-30 вересня 2013 р.). Переяслав-Хмельницький, 2013. С. 11–13.

- Flesar J., Havlik J., Kloucek P., Rada V., Titera D., Bednar M., Stropnický 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.145(1-2):129-33. doi: 10.1016/j.vetmic.
- González M.J., Marioli J.M. Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American Foulbrood // *Journ. Invertebr. Pathol.* 2010. 104 (3). P. 209-13. doi: 10.1016/j.jip.2010.04.005.
- Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Definitive document // *Clin. Microbiol. Infect.* 1998. 4. P. 291–296.
- Reybroeck W., Daeseleire E., De Brabander H.F., Herman L. Antimicrobials in beekeeping // *Vet. Microbiol.* 2012. 6. 158 (1-2). P. 1-11. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.01.012.
- Yaroshko O.M., Halata M.S., Shepelevych V.V., Stepura L.G., Grytsenko L.M., Yavorska N.V., Svyatetska V.M., Yefimenko T.M. Antibacterial effect of flower extracts on microorganisms isolated from honeycombs with affected bee brood. *Microbiology and Immunology - the Development Outlook in the 21st century. Abstracts book of the II International Scientific Conference, April 14-15, 2016, Kyiv.* Kyiv, 2016. P. 15.
- Yaroshko O.M., Halata M.S., Shepelevych V.V., Stepura L.G., Grytsenko L.M., Yavorska N.V., Svyatetska V.M., Voychuk S.I., Yefimenko T.M. The features of microbiota isolated from the honeycombs with affected bee brood // *Agric. sci. pract.* 2015. 2(3). P. 9–14.