

## ДИФЕРЕНЦИРАНЕ И АНТИБИОТИЧНА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ НА *PANTOEA AGGLOMERANS* ИЗОЛИРАНА ОТ ЦВЕТЕН ПЧЕЛЕН ПРАШЕЦ

Динко Хр. Динков

Тракийски университет, Стара Загора

---

**РЕЗЮМЕ** — От проби неизсушен и изсушен цветен пчелен прашец от РБългария са изолирани *P.agglomerans* и *P.agglomerans* bgr 6. Предлага се схема за принципно първично диференциране на *Pantoea* spp. от други видове микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* (род *Salmonella*, *E.coli*, *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*). Изследвана е антибиотичната чувствителност на 5 бр. щамове *P.agglomerans* и *P.agglomerans* bgr 6. Установена е тяхната чувствителност спрямо представители на основните групи антибиотици, прилагани за терапия на бактериални заболявания в хуманната медицина:  $\beta$ -лактамни антибиотици (амоксцилин + клавул. киселина: 20/10  $\mu$ g), аминогликозиди (гентamicin), амфениколи (chlорамфеникол), тетрациклини (doxicyclin), хинолони (enrofloxacin) и цефалоспорици (cephalotin). Прави се заключението за несъществен риск от трансфер на антибиотична бактериална резистентност чрез установените в цветния пчелен прашец *P.agglomerans*.

**Ключови думи:** антибиотици, pantoea, чувствителност, цветен пчелен прашец

---

## DIFFERENTIATION AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF *PANTOEA AGGLOMERANS* ISOLATED FROM FLOWER BEE POLLEN

Dinko Hr. Dinkov

Trakia University, Stara Zagora

---

**ABSTRACT**— In samples from Bulgarian wet and dry flower bee pollen were identified *P.agglomerans* and *P.agglomerans* bgr 6. It was proposed the scheme for principal primary differentiation between *Pantoea* spp. and other microorganisms from the family *Enterobacteriaceae* (genus *Salmonella*, *E.coli*, *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis*). This study investigated also the antibiotic susceptibility for 5 strains *P.agglomerans* and *P.agglomerans* bgr 6. It was found their sensitivity towards members of the main classes of antibiotics used therapeutically to treat bacterial infections in human medicine:  $\beta$ -Lactam antibiotics (amoxicillin + clavulonic acid: 20/10  $\mu$ g), aminoglycosides (gentamycin), amphenicols (chloramphenicol), tetracyclines (doxycyclin), fluoroquinolones (enrofloxacin) and cephalosporins (cephalotin). We conclude that the risk of transfer of bacterial antibiotic resistance with found in flower bee pollen *P.agglomerans* is remote.

**Keywords:** antibiotics, pantoea, susceptibility, flower bee pollen

---

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

Цветният пчелен прашец би могъл да се причисли към храните с комбиниран растителен и животински произход. Той се събира от пчелите от растенията, обработва се от тях механично и чрез добавяне на специфични субстанции (ензими и др.), при което се оформят големи конгломерати от поленови зърна. Този продукт впоследствие при навлизане на пчелите в кошерите се отделя чрез прашецоуловителите и допълнително се обработва от човека чрез пресяване и изсушаване [6]. В нашата страна, съгласно наредба №9 от 2005 г. медоносните пчели събират от цветовете на растенията цветния прашец, който посредством прашецоуловители се отнема от кошничките на крачетата им и впоследствие, след съответна обработка от човека би могъл да служи за храна [1].

Изобретяването на прашецоуловителите в годините след втората световна война съвпада с натрупването на повече сведения относно възможностите за използване на преработения от пчелите цветен прашец като храна за човека [6].

У нас от 1991 г. датира отраслова нормала чрез която се регламентират методите за анализ и нормативните изисквания към предназначения за консумация от човека цветен пчелен прашец [3]. Съгласно утвърдената през 2005 г. наредба №9 цветният пчелен прашец следва да се изсушава в автоматизирани сушилни при температура до 45°C за постигане на от 8 до 12% остатъчна влажност [1].

Съдържанието на редица ценни хранителни съставки в събирания от пчелите и впоследствие преработван за консумация от човека цветен пчелен прашец в наши дни го превръща във все по-често предпочитана храна [6]. Някои изследователи посочват, че биологичните и химични компоненти на този продукт се запазват по-добре при неговото замразяване и изсушаване, в сравнение със самостоятелното използване на изсушаването при първичната му обработка [10].

За да се гарантират желаните от потребителите безопасност и качество на предлагания на пазара, произведен при изискванията за биопроизводство цветен пчелен прашец през 2014 г. в нашата страна бяха предложени редица допълнителни изисквания към неговото производство като бе акцентирано върху основните микробиологични опасности на този хранителен продукт [20]. Впоследствие бяха представени и изисквания при производството на цветен пчелен прашец от несертифицирани по изискванията за биопроизводство пчелини [17].

В наши дни с все по-широкото навлизане на цветния пчелен прашец на пазара като хранителен продукт добиват особена актуалност въпросите, свързани с необходимостта от регламентиране на специфични микробиологични критерии, гарантиращи неговата безопасност за консуматорите. С особена важност стои въпросът и за микроорганизмите, пренасяни чрез този пчелен продукт, консумиран все по-често от човека..

В нормативните документи, регламентиращи изискванията към цветния пчелен прашец у нас [1, 3], не се посочват специфични микробиологични критерии към цветния пчелен прашец. Въпреки изтъкването на важността на микробиологичните изследвания на пчелния прашец като основни гаранции на неговата безопасност за консуматорите [8], в световен мащаб все още липсват утвърдени специфични критерии и стандарти за микробиологични изследвания на продукта. Не се установяват и специфични лабораторни препоръки, с оглед диференциране на изолираните микроорганизми при неговото микробиологично изследване. Всичко това създава съществени затруднения пред контролните органи в областта на храните при интерпретацията на микробиологичните анализи на предназначения за консумация от човека цветен пчелен прашец.

В световен мащаб са извършвани оскъден брой проучвания за констатиране на микроорганизми в цветния пчелен прашец, предназначен за консумация от човека. Според

някои автори в него могат да се установят микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae*, които се счита, че попадат в продукта от външната среда (вода, почва и др.). Поради факта, че част от тези микроорганизми се съдържат в чревния тракт на животните и човека се счита, че те могат да попаднат в непреработените термично храни, какъвто е и пчелния прашец, поради което микроорганизмите от сем. *Enterobacteriaceae* се определят като важен индикатор за вторично замърсяване на храните с фекални микроорганизми [7]. Следва принципно да се отбележи, че от микроорганизмите от сем. *Enterobacteriaceae* особено опасни за човешкото здраве са тези от род *Salmonella*, редица представители на род *Esherichia* и по-специално *E.coli* и др., критериите и методите за анализ на които вече са регламентирани за повечето храни, консумирани от човека [2]. При това следва да се отбележи, че в съвременната нормативна база до момента не са регламентирани специфични микробиологични критерии за все по-консумирания от човека цветен пчелен прашец.

Селектирането на все по резистентни видове ентеробактерии, предаващи се чрез храните на хората, постави с особена актуалност въпроса за необходимостта от високостепенна специфичност на терапевтичните средства, използвани като пръв избор за терапия на заболяванията при човека, предизвикани от микроорганизми, предавани чрез храните. Известно е, че необработените термично растителни храни биха могли да крият риск за човешкото здраве в случай, че съдържат патогенни или опортюнистични микроорганизми. Напоследък някои автори препоръчват завишаване на вниманието към определени обичайни за растенията микроорганизми, с оглед оценка на потенциалния риск за консуматорите [14].

Известно е, че *Pantoea agglomerans* (преди – *Enterobacter agglomerans*), който е от сем. *Enterobacteriaceae*, е използван в селското стопанство като биологичен антагонист на гъбичните заболявания при растенията [16]. Има сведения, че този микроорганизъм е бил изолиран от повърхността на листата и плодовете на различни растения, които са чести съставки на много традиционни храни особено в страните от региона на Черно море [14].

Напоследък някои автори причисляват *P. agglomerans* към опортюнистичните патогени криещи опасност главно за имуносупресирани организми. Постепенно нараства броят на научните съобщения за констатиране на асоциирани с *P.agglomerans* опортюнистични заболявания при хората. Микроорганизмът е доказан в абсцеси [19], артрити [12], и като причинител на отделни септицемични случаи при новородени [5]. Според някои автори въбдеще се очаква нарастване на случаите на свързаните с този микроорганизъм инфекции при хората [21].

При изследване на проби от растителни храни от България, Турция, Гърция, Румъния, Украйна и Русия около 60-70% от установените микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* са доказани като *P. agglomerans*. Провеждани са и експериментални третираня на 3 опитни групи мишки с бактериални суспензии на *P. agglomerans* с предварително доказана високостепенна резистентност към антибиотици с гъстоти съответно от  $1,4 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^6$  и  $4,5 \times 10^8$  CFU, прилагани през устата в количество от 200  $\mu$ l. Като обща констатация авторите посочват, че не са установени статистически достоверни намаления на основните микроорганизми от чревната микрофлора при проведените изследвания след 24, 48 и 72 часа от експеримента. Не са констатирани и съществени намаления на микроорганизмите от сем. *Lactobacteriaceae* в чревната микрофлора на опитните животни [14].

Въпреки данните за широкото разпространение по растенията на *P.agglomerans* и свързаното с това наличие на този микроорганизъм в пчелите и пчелните продукти в кошерите [13], до момента в достъпните ни литературни източници не бяха констатирани данни за изолиране на *P.agglomerans* и *P.agglomerans* *bgp* 6 от цветен пчелен прашец, предназначен за консумация от човека.

Поради факта, че този микроорганизъм е от сем. *Enterobacteriaceae*, в което се включват и редица други микроорганизми, при неговото първично изолиране в лабораторни условия се срещат редица затруднения особено по отношение на диференцирането му от опасните за човешкото здраве микроорганизми от род *Salmonella*, *E.coli*, както и тези от род *Proteus* (*P.vulgaris* и *P.mirabilis*). Всичко това наложи извършването на допълнителни биохимични и серологични тестове, с оглед разработване и предлагане на схема за принципно първично лабораторно диференциране на изолираните от цветен пчелен прашец на *Pantoea* spp. от някои други важни за безопасността на храните видове микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* (род *Salmonella*, *E.coli*, *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*).

В достъпните ни литературни източници не бяха установени сведения за антибиотичната устойчивост на щамове *Pantoea* spp., изолирани от цветния пчелен прашец, предназначен за консумация от човека. Поради това съществува сериозна неяснотата по отношение на евентуалния риск от възникване на заболявания, свързани с консумацията на този пчелен продукт от човека. Не е изяснен и важният въпрос за риска от пренасяне на антибиотична резистентност чрез *P.agglomerans* при хората, консумиращи цветен пчелен прашец. Всичко това наложи извършването на допълнителни проучвания за определяне на антибиотичната устойчивост на изолирани от цветния пчелен прашец щамове *Pantoea* spp.

## 2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

През м. юни 2014 г. бяха получени проби неизсушен и изсушен пчелен прашец, предназначен за търговска реализация и консумация от човека, от рег. Странджа (n=4), рег. Шумен (n=6), рег.Карлово (n=2) и рег.Сливен (n=2). Пробите произхождаха от пчелини, разположени в индустриално незамърсени местности отстоящи на 3 km от площи с интензивно земеделие, пътища и промишлени предприятия [6]. Незабавно след получаването им те бяха вакуумирани, посредством вакуумираща машина miniVac (Vac-Star AG, Switzerland, <http://www.vac-star.com/en/p1-miniVAC.html>). С оглед извършване на последващи комплексни микробиологични изследвания (*under press*), пробите изсушен пчелен прашец бяха съхранявани при хладилни условия (0-4°C) [1], а тези от неизсушения продукт - в замразено състояние при -18°C [10], за период от една година.

В следващия текст се разглежда подробно изолирането на *Pantoea* spp. първоначално като част от сем. *Enterobacteriaceae*, след което се посочва последователността на тяхното допълнително изследване, с оглед сигурното им доказване в предназначения за търговска реализация цветен пчелен прашец.

### 2.1. Изолиране на *Pantoea* spp. от цветен пчелен прашец

Подготвят се основно разреждане (1:10) на цветния пчелния прашец в буферизирана пептонова вода (Merck, Darmshtadt, Germany), сред което се правят и степенни разреждания в стерилен физиологичен разтвор. Извършва се посевка на по 0,1 mL от основното и степенните разреждания върху повърхността на MacConkey агар и XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) агар (Merck, Darmstadt, Germany), последвано от инкубация при 37°C за 24 h. Остатъкът от основното разреждане (1:10) на пчелния прашец се оставя за обогатяване при 37°C за 18 часа. Следва вторично обогатяване чрез прехвърляне на 1 mL от основното разреждане в два обогатителни бульона: селенитов бульон (37°C за 24 h), и среда на Rappaport-Vassiliadis (41°C за 24 h) (Merck, Darmshtadt, Germany). На 42-ия час от обогатителните бульони се извършва посевка върху MacConkey агар и XLD агар (Merck, Darmstadt, Germany), последвано от нова инкубация при 37°C за 24 h.

При констатиране на лактозонегативни или лактозопозитивни колонии на изолати на микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* на 24-ия при първичната посевка или на 66-ия час при препосевката от обогатителните бульони върху MacConkey агара и XLD агара се

извършва последващ анализ чрез подготовка и оцветяване на микроскопски препарати по метода на Gram, след което се следва схемата за принципно първично лабораторно диференциране на *Pantoea* spp. от някои други важни за безопасността на храните видове микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* (род *Salmonella*, *E.coli*, *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*). Използвани бяха среда на KLIGLER и среда за доказване на подвижност, индол и H<sub>2</sub>S (Merck, Darmshtadt, Germany), както и салмонелни серуми (Sifin Service GmbH, Berliner Allee 317-321, Berlin, Germany, <http://sifin.de/>).

## 2.2. Идентификация на изолатите *Pantoea* spp. чрез система BioLog (Biolog, Hayward, USA).

За последващо доказване на видовете *Pantoea* spp. бяха събрани изолати с идентични колониална морфология и микроскопска картина, характерни за микроорганизмите от сем. *Enterobacteriaceae* и първично определени като *Pantoea* spp., съгласно схемата за принципно лабораторно диференциране (виж резултати), които се култивираха върху кръвен агар, с оглед растеж на единични колонии от чисти култури, последвано от инкубация за 24 часа при 37°C. Впоследствие на така подготвените чисти култури от изолати се извършиха анализи чрез комбинираната с компютърен софтуер съвременна идентификационна система BioLog Gen III microplates (BioLog, Hayward, USA).

Накратко изследването включваше вземане на отделни колонии с помощта на специален тампон със заострен връх, които се поставяха и хомогенизираха в епруветки със специална среда IF-A за суспендиране на микроорганизми за плаки GEN III. Във всяка от ямките на плаките GEN III към системата бяха поставяни по 100 µL от суспензията на микроорганизма. Впоследствие плаките се инкубираха при 33 °C за 24 часа. Отчитането на резултатите се извършваше визуално по промяната на цвета в ямките, сравнено с положителната (10 ямка) и отрицателните (1-ва ямка) контроли. Данните бяха интерпретирани с помощта на софтуера OmniLog на системата BioLog Gen III microplates (Biolog, Hayward, USA). При отчитане на резултатите цветът на разтвора от ямката A1 представлява негативна контрола, а този от A10 – позитивна контрола. При идентичен цвят на съответната ямка с позитивната контрола се записва: + (при принтиране 250), при среден по интензивност цвят: ± (при принтиране 75), а при идентичен с негативната контрола цвят: - (при принтиране 0).

Получените потвърдителни резултати за определяне на изолатите от *Pantoea* spp. като щамове *P.agglomerans* и *P.agglomerans bgr 6*, посредством системата BioLog аргументираха разработването на предлаганата схема за принципно първично диференциране на *Pantoea* spp. от някои други, често изолирани от храните видове микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* (род *Salmonella*, *E.coli*, *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*), (виж резултати).

## 2.3. Определяне на антибиотичната чувствителност на *P. agglomerans* и *P.agglomerans bgr 6*, изолирани от цветен пчелен прашец

При провеждане на анализите по предлаганата схема за принципно първично биохимично диференциране (виж т.2.1. и т.2.2), във всички проби бе установена контаминираност с *Pantoea* spp. В експериментите за установяване на антибиотичната чувствителност бяха използвани 5 броя щамове *P. agglomerans* и *P.agglomerans bgr 6*, както следва: 2 бр. *P.agglomerans bgr 6*, изолирани от изсушен пчелен прашец от рег. Шумен и неизсушен пчелен прашец от рег. Странджа; 3 бр. *P.agglomerans*, изолирани от неизсушен и изсушен пчелен прашец от рег. Сливен и изсушен пчелен прашец от рег. Карлово (табл.2).

Антибиотичната чувствителност на щамовете бе тествана по метода на Bauer-Kirby, често използван за установяване на този показател при патогенни микроорганизми [4].

### 3. РЕЗУЛТАТИ

3.1. Схема за принципно първично лабораторно диференциране на *Pantoea* spp. от микроорганизми от род *Salmonella*, *E.coli*, *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*.

Схемата за принципно първично лабораторно диференциране на *Pantoea* spp. от микроорганизмите от род *Salmonella*, *E.coli*, *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis* включва три етапа.

1-ви етап. Използване на две среди за принципно първично диференциране - среда на KLIGLER и среда за доказване на подвижност, индол и H<sub>2</sub>S (Merck, Darmshtadt, Germany).

В следващата таблица са посочени критериите за принципно първично диференциране, както и резултатите по отношение на съответните биохимични отнасяния на *Pantoea* spp. и микроорганизмите от род *Salmonella*, *E.coli*, *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis* като с (+) са означени позитивните, а с (-) негативните биохимични отнасяния и характеристики като в някои случаи са добавени и важни допълнителни пояснения (табл. 1).

**Табл. 1. Принципно първично биохимично диференциране на *Pantoea* spp. от род *Salmonella*, *E.coli*, *P.vulgaris* и *P.mirabilis* (Principal primery biochemical differentiation of *Pantoea* spp. with genus *Salmonella*, *E.coli*, *P.vulgaris* и *P.mirabilis*).**

Микроорганизми (Microorganisms)	<i>Pantoea</i> spp.	<i>Salmonella</i>	<i>E.coli</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Биохимични отнасяния и характеристики (Biochemical parameters and characteristics)					
<b>Среда на KLIGLER (KLIGLER medium), (Merck, Darmshtadt, Germany)</b>					
Лактоза (Lactose)	Розов наклонен слой (-) или жълт наклонен слой (+) (-) or (+)	Розов наклонен слой (-)	Жълт наклонен слой (+)	Розов наклонен слой (-)	Розов наклонен слой (-)
D-глюкоза (D-glucose)	+	+	+	+	+
Отделяне на газ от D-глюкоза (Gas from D-glucose)	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	+	-	+	+
<b>Среда за доказване на подвижност, индол и H<sub>2</sub>S (SIM medium), (Merck, Darmshtadt, Germany)</b>					
Подвижност (Mobility)	+	+	+	+	+
Индол (Indol)	-	-	+	+	-
H <sub>2</sub> S	-	+	-	+	+
		(слабо, low <i>S.gallinarum</i> )			

2-ри етап. Серологично изследване.

За изключване на съмнение за микроорганизми от род *Salmonella* при установяване на лактозонегативни и индол негативни колонии, отчетено на средата за доказване на подвижност, индол и H<sub>2</sub>S (SIM medium), (Merck, Darmshtadt, Germany) на изолати,

съмнителни за *Pantoea* spp. (виж табл.1), се препоръчва да се извърши аглутинация чрез наситени аглутиниращи салмонелни серуми (Sifin Service GmbH, Berliner Allee 317-321, Berlin, Germany, <http://sifin.de/>). Реакцията е позитивна само при род *Salmonella*, а негативна при *Pantoea* spp., както и при останалите сравнявани микроорганизми (*E.coli*, *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*).

3-ти етап. Комплексно биохимично обследване.

При позитивни предварителни биохимични тестове (виж 1-ви и 2-ри етап), съмнителните за *Pantoea* spp. изолати се определят прецизно до вид, посредством съвременни системи, базиращи се на комплексно биохимично обследване (Biolog, Hayward, USA), API-tests (bioMérieux, France и др.). За целта те се препосвяват до получаване на чисти култури, след което при невъзможност за незабавно изследване на изолатите, същите могат да се запазят при  $-18^{\circ}\text{C}$  за последващ комплексен анализ в епруветки тип епендорф с TSB (Tryptone Soy Broth), (Merck, Darmshtadt, Germany) и добавен 20% глицерол.

3.2. Антибиотична чувствителност на щамове *P.agglomerans* и *P.agglomerans* bgp 6, изолирани от цветен пчелен прашец от различни региони на България

Получените резултати по отношение на антибиотичната чувствителност на обследваните 5 броя щамове *P.agglomerans* и *P.agglomerans* bgp 6 са представени на таблица 2. Зоните при определянето на антибиотичната чувствителност по метода на Bauer-Kirby [4] бяха интерпретирани въз основа на CLSI [9].

**Table 2. Антибиотична чувствителност на щамове *P.agglomerans* и *P.agglomerans* bgp 6 изолирани от неизсушен и изсушен цветен пчелен прашец от четири различни региона на България. (Antibiotic susceptibility for strains of *P.agglomerans* and *P.agglomerans* bgp 6 isolated from wet and dry flower bee pollen samples harvested from the four different regions of Bulgaria)**

Антибиотици (Antibiotics)	Чувствителност (Sensitivity) (S)	<i>P.agglomerans</i> bgp 6 (dry bee pollen, Shoumen)	<i>P.agglomerans</i> bgp 6 (wet bee pollen, Strandzha)	<i>P. agglomerans</i> (wet bee pollen, Sliven)	<i>P. agglomerans</i> (dry bee pollen, Sliven)	<i>P. agglomerans</i> (dry bee pollen, Karlovo)
Ampicillin (10 µg)	>14 mm	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)
Amoxicillin + clavul. Acid (20/10 µg)	>21 mm	8 (R)	6 (R)	23 (S)	21 (S)	23 (S)
Gentamycin (10 µg)	>15 mm	20 (S)	21 (S)	18 (S)	23 (S)	22 (S)
Chloramphenicol (30 µg)	>18 mm	20 (S)	23 (S)	30 (S)	30 (S)	28 (S)
Doxicyclin (30 µg)	>16 mm	17 (S)	19 (S)	20 (S)	22 (S)	22 (S)
Enrofloxacin (5 µg)	>22 mm	18 (I)	23 (S)	23 (S)	23 (S)	22 (S)
Cephalotin (30 µg)	>18 mm	6 (R)	6 (R)	20 (S)	15 (I)	25 (S)

S – чувствителен към антибиотика; I – интермедиерен към антибиотика; R – резистентен към антибиотика; S – sensitive to antibiotic; I – intermediate to antibiotic; R – resistant to antibiotic

Установено бе, че всички щамове *P.agglomerans* и *P.agglomerans* bgp, изолирани от изсушен и неизсушен пчелен прашец показват различностепенна чувствителност спрямо представители на групите често прилагани антибиотици за терапия на бактериални заболявания при хората, както следва: β-лактамни антибиотици (amoxicillin + clavul. acid:

20/10 µg), аминогликозиди (gentamycin), амфениколи (chloramphenicol), тетрациклини (doxycyclin), флуорохинолони (enrofloxacin) и цефалоспорини (cephalotin), (табл.2).

Тези данни в голямата си част се различават от резултатите на други автори, според които *P.agglomerans*, които са били изолирани от други растителни източници като моркови, зелен грах и магданоз са показали устойчивост спрямо някои антибиотици (ampicillin, amoxicillin и cephalosporines) [14]. Нашите резултати по отношение на тези три антибиотика показват известни различия на антибиотичната чувствителност, които са обясними с индивидуалната специфичност на изследваните щамове *P. agglomerans* и *P.agglomerans bgr 6* (табл.2). Можем да посочим, че освен към антибиотика ampicillin, при останалите два сравнявани с данните на автора [14] антибиотици (amoxicillin и cephalosporines), резултатите за изследваните щамове *P. agglomerans*, изолирани от цветен пчелен прашец от различни региони на България показват в почти всички случаи чувствителност. Интермедиерност е установена единствено при тестване спрямо cephalotin на щам *P. agglomerans*, изолиран от изсушен пчелен прашец от рег. Сливен (табл.2).

При интерпретацията на тези резултати трябва да се има пред вид и факта, че обичайно пеницилиновите антибиотици и в частност ампицилина са нискоефективни при терапията на предизвиканите от грам отрицателни микроорганизми заболявания при хората [11].

При перорално третиране на мишки с щам *P.agglomerans*, изолиран от морков с произход България при използване на доза за перорално заразяване от  $1.4 \times 10^5$  CFU са установени  $2,1 \times 10^3$  CFU от микроорганизмите в червата на третирани мишки. При това не са доказани съществени промени при патологоанатомичната преценка на органите в сравнение с контролната група от нетретирани мишки [14].

Въпреки, че според проведени генетични проучвания до момента не са констатирани специфични маркери за идентифициране на щамове *P.agglomerans* с потенциал да предизвикат заболявания при хора [18], в други изследвания се посочва, че в някои от тези микроорганизми могат да се установят специфични hgr гени, които някои автори свързват с техния евентуален патогенен потенциал [15] и вирулентност [21].

В други проучвания се посочва, че до момента не са установени достоверни генетични различия между клиничните и неклиничните изолати на *P.agglomerans*, установени при хората [22].

Според украински автор при третиране на мишки с високи концентрации на суспензии от *P.agglomerans*, след това се е наблюдавало средностепенно намаление на лактозопозитивните *E.coli*, а при използвани по-високи дози от бактериалната суспензия не са установени микроорганизми от *Enterococcus* spp. в чревния тракт на опитните животни [14].

Известно е, че *Enterococcus* spp. и лактозопозитивните *E.coli* играят съществена роля при чревните инфекции при хората. Някои автори посочват зависимост между приетите количества *P.agglomerans* и последващата липса на микроорганизми от *Enterococcus* spp., както и намаление на броя на лактозопозитивните *E.coli* в чревния тракт на мишки [14]. Тези данни, както и резултатите от нашето проучване за установена липса на резистентност на изолираните от пчелния прашец щамове *P.agglomerans* (табл.2) към представители на шест групи широко използвани в хуманната медицина антибиотици, можем да изкажем хипотезата за възможна антагонистична роля на този микроорганизъм при евентуален повисокостепенен прием чрез пчелния прашец по отношение на намаляване на някои от чревните микроорганизми. За нейното потвърждение би следвало да се извършат допълнителни проучвания на чревно съдържимо от хора, след прием на цветен пчелен прашец, съдържащ завишени количества от микроорганизма *P. agglomerans*. С оглед гаранциите за сигурна превенция от евентуални заболявания при имunosупресирани хора и малки деца, възникващи след консумация на пчелен прашец, контаминиран с *P.agglomerans* [13, 14], в бъдеще би следвало да се извършат допълнителни генетични проучвания на



изолирани от този продукт *P.agglomerans* и *P.agglomerans bgr 6*, с оглед пълно изключване наличието на маркери за патогенност и вирулентност, констатирани при този вид микроорганизъм, но от други растителни източници [15, 21].

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на извършените в статията проучвания могат да се направят следните изводи:

1. В предложенията за европейски микробиологични критерии към цветния пчелен прашец не фигурира *P.agglomerans* [8]. Въз основа на нашите резултати препоръчваме извършването и на допълнителни проучвания в различни географски региони, с оглед определяне на нива на контаминираност с *P.agglomerans* на цветния пчелен прашец, предназначен за директна консумация от човека. Това би спомогнало за обосноваване на включването на *P.agglomerans* в международните микробиологични критерии, с оглед гарантиране безопасността на цветния пчелен прашец за консумация от човека.

2. Предлага се схема за принципно първично лабораторно диференциране на *Pantoea* spp., изолирани от цветен пчелен прашец от микроорганизмите от род *Salmonella*, *E.coli*, *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*.

3. Получените резултати за антибиотичната чувствителност на анализираниите щамове *P.agglomerans* показват, че те са чувствителни спрямо често прилаганите антибиотици за терапия на бактериални заболявания при хората. Поради това може да се направи заключението, че цветния пчелен прашец не представлява опасност по отношение на трансфериране на резистентни *P.agglomerans* към  $\beta$ -лактамни антибиотици (amoxicillin + clavul. acid: 20/10  $\mu$ g), аминогликозиди (gentamycin), амфениколи (chloramphenicol), тетрациклини (doxycyclin), флуорохинолони (enrofloxacin) и цефалоспорици (cephalotin), (табл. 2).

#### 6. ЛИТЕРАТУРА

- [1] Наредба №9 от 22 юни 2005 г. за условията и реда за одобряване и регистрация на предприятията за преработка на восък и производство на восъчни основи, както и на предприятията за производство и търговия с пчелен мед и пчелни продукти, Издадена от министерство на земеделието и горите (Обн., ДВ, бр. 54 от 01.07.2005 г.).
- [2] Регламент (ЕО) №1441/2007 на комисията от 5 декември 2007 година за изменение на Регламент (ЕО) № 2073/2005 относно микробиологичните критерии за храните.
- [3] Централен кооперативен съюз (1991) Отраслова нормала (ОН) 2567111-91, Прашец цветен пчелен, 1-7.
- [4] Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C. & M. Turck (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 36, 493-496.
- [5] Bergman K.A., Arends J.P. & E.H. Schölvinck (2007). *Pantoea agglomerans* septicemia in three newborn infants, Pediatric Infectious Disease Journal, 26, Iss. 5, 453-454.
- [6] Bogdanov, S. (2014) Pollen: Production, Nutrition and Health: A Review: www.bee-hexagon.net.
- [7] Bouriche H., Karnouf N., Belhadj H., Dahamna S., Harzalah D. & A. Senator (2011). Free Radical, Metal-chelating and Antibacterial Activities of Methanolic Extract of *Capparis Spinosa* buds. Adv. Environ. Biol., 5(2), 281-287.
- [8] Campos, M.G.R., S. Bogdanov, L.B. Almeida-Muradian, T. Szczesna, Y. Mancebo, C. Frigerio & F. Ferreira (2008). Pollen composition and standardization of analytical methods. Journal of Apicultural Research and Bee World, 47(2), 156-163.
- [9] CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2008). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals.

- [10] Dominguez-Valhondo, D., D. B. GIL, M. T. Hernandez & D. Gonzalez-Gomez (2011). Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybee-collected pollen. *International Journal of Food Science and Technology*, 46 (10). 2204-2211.
- [11] Ibrahim M.K., Abdel-Moneim M. Galal, Idriss M. Al-Turk & Khalid D. Al-Zhrany (2010). Antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria in hospitals' drain in Al-Madina Al-Munnawara, *JTUSCI*, 3, 14-22.
- [12] Kratz A., Greenberg D., Barki Y., Cohen E., & M. Lifshitz (2003). *Pantoea agglomerans* as a cause of septic arthritis after palm tree thorn injury; case report and literature review, *Archives of Disease in Childhood*, 88, 542-541.
- [13] Loncaric, I., Heigl, H., Licek, E., Moosbeckhofer, R., Busse, H.J., & R. Rosengarten (2009). Typing of *Pantoea agglomerans* isolated from colonies of honey bees (*Apis mellifera*) and culturability of selected strains from honey. *Apidologie* 40, 40-54.
- [14] Mudryk, M. (2012). Plant-isolated *Pantoea agglomerans*-new look into potential pathogenicity, *Мікробіол. журн*, ISSN 0201-8462, T.74, №6, 53-57.
- [15] Naha K., Ramamoorthi, Prabhu M. (2012). Spontaneous septicaemia with multiorgan dysfunction – a new face for *Pantoea agglomerans*, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5, Iss. 1, 83-84.
- [16] Nunes C., Usall J., Teixidó N. & Viñas I. (2001). Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium *Pantoea agglomerans* (CPA-2), *Int. J. Food Microbiology*, 70, Iss. 1-2, 53-61.
- [17] Parvanov, P., Stratev D., Balkanska R. & D. Dinkov (2014). Specific requirements for processing, storage and marketing of flower bee pollen, pp.52-53, Abstracts and Program, International Scientific Conference "20 years Faculty of Veterinary Medicine at the University of Forestry, 28-30.11.2014, Yundola, Bulgaria.
- [18] Rezzonico F., Smits T., Montesinos E., Frey J.E. & B. Duffy (2009). Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC Microbiology*, 9:204. doi:10.1186/1471-2180-9-204.
- [19] Rodrigues A.L., Lima I.K., Koury A.-Jr, de Sousa R.M. & L.C. Meguins (2009). *Pantoea agglomerans* liver abscess in a resident of Brazilian Amazonia, *Tropical Gastroenterology*, 30 (3), 154-155.
- [20] Stratev, D., R. Balkanska, St. Mateev & D. Dinkov (2014). Processing, storage, labeling and microbiological hazards of organic bee pollen production, "24-th International Scientific Conference, Dedicated to the 70-Anniversary of the Foundation of the Union of Scientists in Bulgaria", Science & Technologies, Volume IV, Number 5, 21-27. Animal studies & Veterinary medicine. Available: <http://journal.sustz.com/VolumeIV/Number5/Papers/DeyanStratev1.pdf>.
- [21] Völksch B., Thon S., Jacobsen I.D. & M. Gube (2009). Polyphasic study of plant- and clinic-associated *Pantoea agglomerans* strains reveals indistinguishable virulence potential, *Original Research Article Infection, Genetics and Evolution*. 9, Iss. 6, 1381-1391.