



MIKROORGANIZMI DIGESTIVNOG TRAKTA PČELE *APIS MELIFERA* KAO BIODEGRADERI NEONIKOTINOIDNIH PESTICIDA – ANALITIČKI ASPEKTI



MICROORGANISMS FROM THE DIGESTIVE TRACT OF HONEY BEE *APIS MELLIFERA* AS BIODEGRADERS OF NEONICOTINOID PESTICIDES – ANALYTICAL ASPECTS

Djurić Aleksandra^{1,2a}, Joksimović Kristina², Jocić Sandra², Nedić Nebojša³, Gojgić-Cvijović Gordana¹, Jakovljević Dragica¹, Beškoski Vladimir P.², Vrvic Miroslav M.²

¹Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu; ²Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu; ³Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

^adjuric@chem.bg.ac.rs



Ciljevi

Izolovanje mikroorganizama iz mednog i pravog želuca pčele; biohemijska i fiziološka karakterizacija mikroorganizama pomoću API Biomérieux testova; molekulska karakterizacija izolovanih sojeva sekvenciranjem gena 16S rRNA; karakterizacija neonikotinoidnih pesticida instrumentalnom metodom HPLC-MS/MS.

Uvod

Značaj pčela za očuvanje ravnoteže ekosistema je ogroman, zbog čega je u interesu ljudi da se unapredi njihov kvalitet života. Pored primarnih proizvoda medonosne pčele (med, matični mleč, vosak, pčelinji otrov, polen i perga), značajna je i indirektna korist u oprašivanju biljnih kultura. Sindrom nestajanja pčela (Colony collapse disorder) pojavio se pre deset godina u SAD, a potom u Evropi i Aziji i prouzrokovao pad broja pčela u svetu. Hipoteze koje pokušavaju da objasne ovu pojavu fokusiraju se na neželjene efekte koje sa sobom nose pesticidi i druge antropogene hemikalije. S druge strane, veliki broj bakterijskih sojeva uspešno vrši degradaciju pesticida.

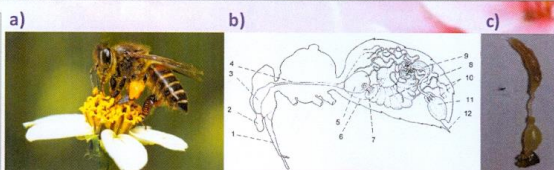
Hipoteza ovog rada: Mikroorganizmi digestivnog trakta medonosne pčele mogu da izvrše biotransformaciju neonikotinoidnog pesticida i samim tim zaštite pčele od njihovog štetnog dejstva.

Metode

U radu su korišćeni mikroorganizmi koji su izolovani iz gastrointestinalnog trakta (GIT) medonosnih pčela sa tri lokalizacije, sa pčelinjaka na Poljoprivrednom fakultetu (Beograd); sa pčelinjaka u blizini polja zasejanih uljanom repicom; sa pčelinjaka u okolini Arandjelovca. Kao podloge za izolovanje i gajenje mikroorganizama korišćeni su De Man, Rogosa, Sharpe podloga sa i bez cisteina (za izolovanje Gram-pozitivnih anaeroba i samog roda *Lactobacillus*). Vršeno je bojenje po Gramu, oksidaza i katalaza test. Korišćeni su API 20A, *BACILLUS* 50 CHB/E testovi. Genomska DNK je ekstrahovana upotrebom DNeasy Blood & Tissue Kit (Nemačka). Za HPLC-MS/MS analizu neonikotinoidnih pesticida korišćen je instrument ACQUITY H class UPLC povezan sa trostrukim kvadrupol detektorom (Waters, SAD).

Zaključci

Mikroorganizmi su uspešno izolovani i na osnovu molekulske identifikacije sve izolovane kulture pripadaju rodu *Lactobacillus*. Instrumentalna metoda HPLC-MS/MS za kvalitativno i kvantitativno određivanje neonikotinoidnih pesticida je razvijena i optimizovana za dalju upotrebu. Izolovani mikroorganizmi iz digestivnog trakta pčela, roda *Lactobacillus* su uspešno okarakterisani i mogu se koristiti u narednim eksperimentima biodegradacije pesticida.



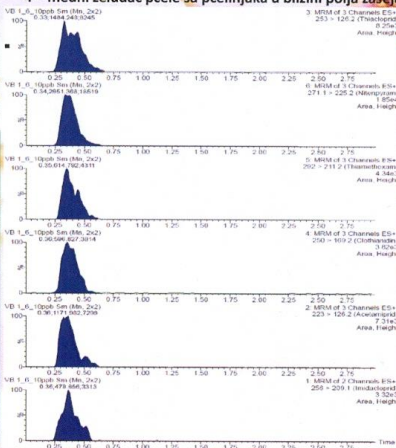
Slika 1a. Medonosna pčela;
Slika 1b. Sistem organa za varenje kod medonosne pčele: 1-jezik; 2-gornja vilica; 3-ždrelo; 4-jednjak; 5-medni želudac, prazan; 6-medni želudac, pun; 7-ventil; 8-pravi želudac (srednje crevo); 9-tanko crevo; 10-Malpigijske cevi; 11-debela crevo; 12-anus;
Slika 1c. Izolovan GIT medonosne pčele.

Rezultati

Tabela 1. Rezultati

Obležje kolonije	Vrsta podloge	Poreklo	Bojenje po Gramu	Oksidaza/Katalaza test	Identifikacija
2+	MRS+C ¹	MŽ ZEMUN ³	G +	-/-	<i>Lactobacillus paracasei</i>
2-	MRS ²	MŽ ZEMUN ³	G +	-/-	<i>Lactobacillus paracasei</i>
3-	MRS ²	MŽ ZEMUN ³	G +	-/-	<i>Lactobacillus paracasei</i>
4-	MRS ²	MŽ ZEMUN ³	G +	-/-	<i>Lactobacillus paracasei</i>
6-	MRS ²	MŽ-UR ⁴	G +	-/-	<i>Lactobacillus kunkeei</i>

1 – MRS+C (De Man, Rogosa, Sharpe podloga sa cisteinom); 2 – MRS (bez cisteina); 3 – medni želudac pčele sa pčelinjaka na Poljoprivrednom fakultetu (Beograd); 4 – medni želudac pčele sa pčelinjaka u blizini polja zasejanih uljanom repicom.



Slika 2. HPLC-MS/MS analiza neonikotinoidnih pesticida