

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**ПОСТОЄНКО ГАННА ВОЛОДИМИРІВНА**

УДК 638.1:638.15:614.91(4)

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИКОРИСТАННЯ  
ПРОБІОТИКІВ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ  
ЄВРОПЕЙСЬКОГО ГНИЛЬЦЮ БДЖІЛ**

Спеціальність: 211 – «Ветеринарна медицина»

Галузь знань: 21 – «Ветеринарна медицина»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень.  
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на  
відповідне джерело Г.В. Постоєнко

Науковий керівник  
**НЕДОССКОВ Віталій Володимирович**  
доктор ветеринарних наук,  
професор

**КИЇВ - 2024**

## АНОТАЦІЯ

**Постоєнко Г.В. Експериментальне обґрунтування використання пробіотиків для профілактики та лікування європейського гнильцю бджіл.** Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» (21 – Ветеринарна медицина). Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2024.

Дисертація присвячена обґрунтуванню доцільності використання пробіотичних препаратів для профілактики бактеріальних захворювань бджіл та за європейського гнильцю. Дослідження виконані на базі лабораторії технологічних та спеціальних заходів профілактики хвороб бджіл та дослідних пасік Національного наукового центру «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича», а також на базі лабораторії кафедри ветеринарної епідеміології ат охорони здоров'я тварни факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України.

В ході дослідження було відпрацьовано та удосконалено методику виділення пробіотичних мікроорганізмів. Протягом 2021 – 2023 років у сезон медозбору (з травня до вересня) з меду, що надходив на дослідження, відібрано 120 зразків різного ботанічного складу та територіального розміщення пасік. З дослідних проб виготовлено зразки різного терміну зберігання (перша, друга, третя та четверта доба після відкачування), з яких шляхом мікробіологічних досліджень виділено бактерії видів *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum* та *Enterococcus faecium*, характерних для мікробіому кишківника бджіл. Встановлено, що для виділення вказаних пробіотичних мікроорганізмів доцільно використовувати свіжовідкачаний мед доставлений до лабораторії не пізніше ніж через 3 дні після відкачування.

В результаті дослідження культурально-морфологічних та біохімічних властивостей встановлено приналежність виділених мікроорганізмів до трьох

видів, а саме *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum* та *Enterococcus faecium*. Доведено можливість використання свіжовідкачаного меду як джерела пробіотичних мікроорганізмів, обґрунтовано оптимальні терміни виділення бактерій з меду після його відкачування, а також доведено відсутність впливу ботанічного походження меду на можливість виділення бактерій нормофлори, видовий склад асоціації та можливість використання для профілактики та за європейського гнильцю бджіл.

З метою встановлення безпечності проб меду відібраних для експерименту проведено ряд дослідів з визначення присутності бактерій групи кишкової палички або родини *Enterobacteriaceae*, дріжджових та плісневих грибів, а також бактерій роду *Salmonella spp.* та мезофільних аеробних та факультативно анаеробних мікроорганізмів в досліджуваних зразках. Підсумком проведених експериментів є встановлення факту відсутності в дослідних зразках патогенних мікроорганізмів виду *Salmonella*. Кількість пліснявих грибів та дріжджів відповідала нормам чинного законодавства для продуктів харчування, в тому числі меду. Отже, відібрані зразки меду можуть бути використані для подальших досліджень.

Дослідження антагоністичних властивостей мікроорганізмів нормофлори полягало в культивування суміші кожного представника нормофлори кишківника бджіл з представниками патогенної та умовно-патогенної нормофлори бджіл. Експериментально доведено відсутність росту *Streptococcus pluton* в присутності бактерій родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та *Enterococcus*. На ряду з цим, виявлено ознаки затримки росту *Bacillus subtilis* та *Escherichia coli* за умови культивування в присутності бактерій виду *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum* та *Enterococcus faecium*. Результати досліджень доводять антагоністичні властивості виділених мікроорганізмів по відношенню до представників умовно-патогенної мікрофлори кишківника бджіл, а також збудника європейського гнильцю.

На підставі видового складу виділеної зі свіжовідкачаного меду асоціації нормофлори кишківника бджіл та аналізу ринку пробіотичних препаратів для

ветеринарного застосування, в якості модельного зразка для подальших досліджень обрано зареєстрований в Україні специфічний пробіотик для бджіл «Апінормін».

Використання пробіотику «Апінормін» для обробки тіла комах в обраних дозуваннях (0,4 г/сім'ю; 0,8 г/сім'ю, 4 г/сім'ю та 8 г/сім'ю) було не токсичним для бджіл. В контрольній групі, де комах обробляли чистим цукровим сиропом, кількість бджіл, що вийшла з досліду в середньому становила 1 комаху. В дослідній групі, що оброблена дозами 0,4 та 0,8 г/сім'ю кількість комах, що вийшла з досліду становила в середньому 2 комахи. Найвищий показник виживання в досліді продемонструвала група комах, оброблених пробіотиком «Апінормін» в дозі 4 г/сім'ю, в середньому 4 комахи. Порівняльний аналіз кількості комах, що вийшли з досліду, показує відсутність негативного впливу усіх досліджених дозувань на відсоток виживання бджіл і демонструє позитивний ефект використання пробіотику «Апінормін» в дозі 4 г/сім'ю.

Використання пробіотику «Апінормін» в якості підгодівлі було не тільки не токсичним для бджіл, а й сповільнювало динаміку їх природного відмирання. Найбільше комах вийшло з досліду в групі, що отримувала «Апінормін» в дозі 8 г/сім'ю, а саме в середньому 9 комах. Найменше бджіл вижило в контрольній групі, а саме 2 особини. Показник виживання комах в дослідних групах, що отримували «Апінормін» в дозуванні 0,4 г/сім'ю становив в середньому 3 особини, 0,8 г/сім'ю – 3 особини, 4 г/сім'ю – 6 особин. Порівняння середньої кількості особин, що вийшли з експерименту, в дослідних та контрольній групі дає можливість зробити висновок про нешкідливість використання «Апінорміну» в усіх дослідних дозуваннях для підгодівлі бджіл. На підставі аналізу отриманих результатів для подальших досліджень обрано оптимальні дозу та спосіб застосування пробіотику «Апінормін» для бджіл, а саме 4г/сім'ю в якості підгодівлі.

З метою підвищення ефективності застосування модельного зразка досліджено нешкідливість та біостимулювальний вплив комбінованого застосування специфічного пробіотику для бджіл та препарату «Аноліт». Згідно інструкції, пробіотик «Апінормін» перед застосуванням необхідно активувати

питною нехлорованою водою. В ході експерименту сформовано контрольну групу, що отримувала чистий цукровий сироп та 3 дослідні групи, які отримували в якості підгодівлі пробіотик «Апінормін» в дозі 4 г/сім'ю (група 1), препарат «Аноліт» (група 2) та пробіотик «Апінормін», активований препаратом «Аноліт» (група 3). Використання в якості підгодівлі для бджіл препарату «Аноліт» викликало прискорення динаміки природного відмирання комах в середньому на 5%, порівняно з аналогічним показником в контрольній групі. Разом з тим, динаміка природного відмирання бджіл в дослідній групі 3, яка отримувала комбінацію пробіотику «Апінормін» та препарату «Аноліт» сповільнювалась в середньому на 27% порівняно з контролем та на 11% порівняно з групою 1, яка отримувала пробіотик «Апінормін» в дозі 4 г/сім'ю. Отримані результати свідчать про доцільність використання препарату «Аноліт» для активації пробіотику «Апінормін» в якості підгодівлі для бджіл.

З метою експериментального обґрунтування доцільності використання специфічного пробіотику для корисних комах проведено дослідження з визначення впливу пробіотиків різного призначення на динаміку природного відмирання бджіл. З даною метою відібрано ряд пробіотичних препаратів, зокрема пробіотик для бджіл «Апінормін», пробіотичний препарат «Бажана», пробіотик «Purina ProPlan FortiFlora» та ферментно-пробоіотичний препарат «Імунобактерин Д». Показники динаміки природного відмирання бджіл за використання в якості підгодівлі перелічених пробіотичних препаратів у дозі 4 г/сім'ю демонстрували прискорення гибелі комах у групах, де використовували препарат «Purina ProPlan FortiFlora» на 2%. У групі, де для підгодівлі використовували «Імунобактерин Д» на різних етапах дослідження відбувалось прискорення і сповільнення динаміки відмирання бджіл в середньому на 3%, тобто ефективність і доцільність застосування препарату не простежується. Необхідно зазначити, що використання препаратів «Бажана» та «Апінормін» достовірно сповільнювали динаміку відмирання комах, порівняно з контролем, проте у випадку використання препарату «Бажана» загибель бджіл сповільнювалась в середньому на 4%, а у

випадку використання пробіотику «Апінормін» показник сповільнення динаміки відмирання бджіл досягав 11%. Отримані результати доводять доцільність використання саме специфічних пробіотичних препаратів для бджіл як препаратів першого вибору для профілактики та за європейського гнильцю бджіл.

На підставі проведених досліджень та аналізу отриманих даних науково-виробничих випробувань в умовах лабораторного експерименту та дослідної пасіки розроблено та відпрацьовано технологічні схеми застосування комбінації препаратів «Апінормін» 4г/сім'ю та «Аноліт» за європейського гнильцю бджіл та для профілактики хвороб у весняно-літній період та при підготовці бджолиних сімей до зимівлі на різних етапах їх господарського використання. Результати проведених досліджень наочно демонстрували подовжуваність життя робочих бджіл, збільшення медової продуктивності, зростання інтенсивності відкладання яєць маткою та стійкість організму комах до збудників захворювань за комбінованого впливу пробіотику «Апінормін» та препарату «Аноліт» у дослідних групах при застосуванні обох профілактичних схем. Під час огляду сімей навесні у дослідних групах, які отримували препарати в рамках профілактичної схеми застосування для підготовки комах до зимівлі, встановлено виживання всіх сімей в дослідних групах, порівняно з контролем, де загинула одна бджолина сім'я. Отримані результати науково-виробничих випробувань комбінованого застосування пробіотику «Апінормін» 4 г/сім'ю та препарату «Аноліт» продемонстрували позитивний вплив на стан хворих на європейський гнилець сімей за запропонованої схеми, біостимулювальну дію комбінації препаратів, доцільність застосування в практиці бджільництва.

**Ключові слова:** бджола медоносна, пробіотики, профілактика бактеріозів, європейський гнилець бджіл, мікробіота кишківника, життєздатність, яйцекладка, медопродуктивність, , Аноліт, специфічність, нешкідливість.

## ANNOTATION

**Postoienko H.V. Experimental substantiation of the probiotics usage for the prevention and treatment of European bee rot** – Qualification scientific work on the rights of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the speciality 211 "Veterinary Medicine" (21 - Veterinary Medicine). - National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2024.

The dissertation is devoted to justifying the feasibility of using probiotic preparations to prevent bacterial diseases and, in the case of European bee rot. The research was carried out in the basis of the laboratory of technological and special measures for the prevention of bee diseases and research apiaries of the National Scientific Center "Institute of Beekeeping named after P.I. Prokopovych", as well as in the basis of the laboratory of the veterinary epidemiology and animal health department of the faculty of veterinary medicine of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine.

In the course of the research, the method of isolation of probiotic microorganisms was worked out and improved. During 2021 - 2023 honey collection season (from May to September), 120 samples of different botanical composition and territorial placement of apiaries were selected from the honey received for research. Samples of different storage periods (the first, second, third and fourth day after pumping) were prepared from the experimental samples, from which bacteria of the species *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum* and *Enterococcus faecium*, characteristic of the gut microbiome of bees, were isolated by means of microbiological studies. It was established that for the isolation of the specified probiotic microorganisms it is advisable to use freshly pumped honey delivered to the laboratory no later than 3 days after pumping.

As a result of the study of cultural, morphological and biochemical properties, it was established that the isolated microorganisms belong to three species, namely

*Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum* and *Enterococcus faecium*. The possibility of using freshly pumped honey as a source of probiotic microorganisms has been proven, the optimal terms for the release of bacteria from honey after it has been pumped are substantiated, and the lack of influence of the botanical origin of honey on the possibility of the release of normoflora bacteria, the species composition of the association, and the possibility of use for the prevention and in case of european bee rot has been proven.

In order to establish the safety of the honey samples selected for the research, a number of experiments were conducted to determine the presence of bacteria of the *Escherichia coli* group or the *Enterobacteriaceae* family, yeast and mold fungi, as well as bacteria of the genus *Salmonella spp.* and mesophilic aerobic and facultatively anaerobic microorganisms in the studied samples. The result of the conducted experiments is the establishment of the fact of the absence of pathogenic microorganisms of the *Salmonella* species in the test samples. The number of molds and yeasts met the norms of the current legislation for food products, including honey. Therefore, the selected honey samples can be used for further research.

The study of the antagonistic properties of microorganisms of the normal flora consisted in the cultivation of a mixture of each representative of the normal flora of the bees gut with representatives of the pathogenic and conditionally pathogenic normal flora of bees. The lack of growth of *Streptococcus pluton* in the presence of bacteria of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Enterococcus* has been experimentally proven. Along with this, signs of growth retardation of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* were found under the condition of cultivation in the presence of bacteria of the species *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum* and *Enterococcus faecium*. The results of the research prove the antagonistic properties of the selected microorganisms



in relation to representatives of the conditionally pathogenic microflora of the gut of bees, as well as the causative agent of European rot.

On the basis of the species composition of the association of normal bee gut flora isolated from freshly pumped honey and analysis of the market of probiotic preparations for veterinary use, the specific probiotic for bees "Apinormin" registered in Ukraine was chosen as a model sample for further research.

The use of the probiotic "Apinormin" for the treatment of bees bodies in selected dosages (0.4 g/family; 0.8 g/family, 4 g/family and 8 g/family) was not toxic to bees. In the control group, where insects were treated with pure sugar syrup, the average number of bees that came out of the experiment was one insect. In the experimental group treated with doses of 0.4 and 0.8 g/family, the number of insects that came out of the experiment was, on average, 2 insects. The highest survival rate in the experiment was demonstrated by a group of insects treated with the probiotic "Apinormin" at a dose of 4 g/family, an average of 4 insects. A comparative analysis of the number of insects that came out of the experiment shows the absence of an adverse effect of all tested dosages on the percentage of bee survival and demonstrates the positive effect of using the probiotic "Apinormin" at a dose of 4 g/family.

Using the probiotic "Apinormin" as a supplement was not only non-toxic for bees, but also slowed down the dynamics of their natural death. The largest number of insects came out of the experiment in the group receiving "Apinormin" at a dose of 8 g/family, namely, an average of 9 insects. The fewest bees survived in the control group, namely 2 insects. The survival rate of insects in experimental groups treated with "Apinormin" at a dosage of 0.4 g/family averaged 3 insects, 0.8 g/family - 3 insects, 4 g/family - 6 insects. A comparison of the average number of insects that left the experiment in the research and control groups makes it possible to conclude that the use of "Apinormin" in all experimental dosages as a supplement is harmless. Based on the analysis of the obtained

results, the optimal dose and method of application of the probiotic "Apinormin" for bees were chosen for further research, namely 4 g/family as supplement.

In order to increase the efficiency of the use of the model sample, the harmlessness and biostimulating effect of the combined use of a specific probiotic for bees and the drug "Anolite" were investigated. According to the instructions, the probiotic "Apinormin" must be activated with non-chlorinated drinking water before use. In the course of the experiment, a control group was formed that received pure sugar syrup and 3 experimental groups that received the probiotic "Apinormin" in a dose of 4 g/family (group 1), the drug " Anolite " (group 2) and the probiotic " Apinormin", activated by the drug " Anolite " (group 3). The use of the drug " Anolite " as a supplement for bees caused an acceleration of the dynamics of the natural death of insects by an average of 5%, compared to a similar indicator in the control group. At the same time, the dynamics of natural death of bees in experimental group 3, which received a combination of the probiotic "Apinormin" and the drug " Anolite " slowed down on average by 27% compared to the control and by 11% compared to group 1, which received the probiotic "Apinormin" in a dose of 4 g/family. The obtained results indicate the expediency of using the drug " Anolite " to activate the probiotic "Apinormin" as a supplement for bees.

In order to experimentally substantiate the expediency of using a specific probiotic for beneficial insects, a study was conducted to determine the effect of probiotics of various purposes on the dynamics of the natural death of bees. For this purpose, a number of probiotic preparations were selected, in particular the probiotic for bees "Apinormin", the probiotic preparation "Bazhana", the probiotic "Purina ProPlan FortiFlora" and the enzyme-probiotic preparation "Immunobacterin D". Indicators of the dynamics of the natural death of bees when using the listed probiotic preparations as a supplement at a dose of 4 g/family showed an acceleration of the death of insects in groups where the drug "Purina ProPlan FortiFlora" was used by 2%. In the group where "Immunobacterin D"

was used for feeding at various stages of the study, the dynamics of the death of bees accelerated and slowed down by an average of 3%, that is, the effectiveness and expediency of the use of the drug cannot be traced. It should be noted that the use of the drugs "Bazhana" and "Apinormin" reliably slowed down the dynamics of the death of insects, compared to the control, however, in the case of the use of the drug "Bazhana" the death of bees slowed down by an average of 4%, and in the case of the use of the probiotic "Apinormin" the rate of slowdown the dynamics of the death of bees reached 11%. The obtained results prove the feasibility of using specific probiotic preparations for bees as first-choice preparations for the prevention and treatment of european bee rot.

On the basis of the conducted research and analysis of the data obtained from scientific and industrial tests in the conditions of a laboratory experiment and an experimental apiary, technological schemes for the use of a combination of the drugs "Apinormin" 4g/family and "Anolite" for the european bee rot and for the prevention of diseases in the spring summer period and during the preparation of bee colonies for wintering at various stages of their economic use. The results of the research clearly demonstrated the extension of the life of worker bees, an increase in honey productivity and in the intensity of laying eggs by the queen, and the resistance of the insect organism to pathogens under the combined effect of the probiotic "Apinormin" and the drug "Anolite" in the experimental groups when using both preventive schemes. During the examination of families in the spring in experimental groups that received drugs as part of a preventive application scheme to prepare insects for wintering, the survival of all families in the experimental groups was established, compared to the control, where one bee family died. The obtained results of scientific and production tests of the combined use of the probiotic "Apinormin" 4 g/family and the drug "Anolite" demonstrated a positive effect on the condition of families suffering from european rot under the proposed

scheme, the biostimulating effect of the combination of drugs, the feasibility of use in beekeeping practice.

**Keywords:** honey bee, probiotics, prevention of bacterial diseases, European bee rot, gut microbiota, viability, egg laying, honey productivity, "Apinormin", "Anolite", specificity, harmlessness.

## СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Статті у наукових фахових виданнях України,  
включених до міжнародних наукометричних баз даних*

1. **Постоєнко Г. В.**, Постоєнко В. О., Єфіменко Т. М., Односум Г. В., Балян А. В. (2022) Нешкідливість, біостимулювальна та антивірусна дія пробіотика “Апінормін” для медоносних бджіл. НВ ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: Ветеринарні науки, 24(107), с. 64-70. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10711> (Постоєнко Г.В. проведено літературний науковий пошук даних щодо застосування пробіотичних препаратів для бджіл, визначення їх нешкідливості та ефективності їх застосування для корисних комах, проведено збір та статистичну обробку дослідних даних, узагальнення результатів та формулювання основних висновків. Постоєнко В. О. визначено актуальність та сформульовано наукову новизну, здійснено загальне управління в ході проведення дослідження. Єфіменко Т.М. визначено практичне значення та мету проведених досліджень, сформовано план та схему проведення досліджень, а також сформульовано висновки. Односум Г.В. проведено літературний науковий пошук, збір, аналіз та статистичну обробку дослідних даних. Балян А.В. проведено літературний науковий пошук, аналіз дослідних даних та формулювання первинних висновків).

2. **Постоєнко Г. В.** (2023) Нормофлора кишківника бджіл та перспективи її практичного застосування. Науково-виробничий журнал «Бджільництво України», Том 1, (9), с. 99 – 108. <https://doi.org/10.46913/beekeepingjournal.2022.9.14> (Постоєнко Г.В. проведено літературний науковий пошук стосовно пробіотичних мікроорганізмів, що є характерними представниками нормофлори кишківника бджіл, їх культурально-морфологічних, біохімічних, структурних властивостей, генетичних особливостей та способів їх застосування в якості компонентів препаратів комплексної дії, визначено актуальність, наукову новизну та практичне значення, сформульовано мету та завдання дослідження, проведено

*систематизацію отриманих даних, сформульовано та викладено висновки, підготовлено публікацію до друку відповідно до вимог видання).*

**3. Постоєнко Г. В.,** Постоєнко В. О., Єфіменко Т. М., Односум Г. В., Недосєков В. В. (2023) Видоспецифічність пробіотичних засобів для бджіл. Науково-виробничий журнал «Бджільництво України», 1, (10), 40-45. <https://doi.org/10.46913/beekeepingjournal.2022.10.06> *(Постоєнко Г.В. проведено літературний науковий пошук, порівняльний аналіз наявних досліджень, які наближені до опублікованих авторами, проаналізовано ринок пробіотичних препаратів підібрано матеріали та методи досліджень, проведено статистичну обробку дослідних даних. Постоєнко В.О. визначено актуальність та сформульовано наукову новизну, здійснено загальне управління в ході проведення дослідження. Єфіменко Т.М. визначено практичне значення та мету проведених досліджень, сформовано план та схему проведення досліджень, сформульовано попередні висновки. Односум Г.В. проведено літературний науковий пошук, збір та статистичну обробку дослідних даних. Недосєковим В.В. проведено літературний науковий пошук наявних зарубіжних досліджень наближених до опублікованих авторами, збір та аналіз дослідних даних, сформульовано висновки).*

**4. Постоєнко Г. В.,** Постоєнко В. О., Гордієнко О. І., Напненко О. О., Недосєков В. В. (2023) Удосконалення методики виділення пробіотичних культур зі свіжовідкачаного меду. Науковий вісник ветеринарної медицини, № 2. С. 101–110. Doi: 10.33245/2310-4902-2023-184-2-101-110 *(Постоєнко Г.В. проведено літературний науковий пошук вітчизняних літературних даних стосовно методів, що застосовуються для виділення пробіотичних мікроорганізмів нормофлори кишківника бджіл, проаналізовано їх кількість та частоту застосування, проведено відбір та підготовку матеріалів для дослідження, проаналізовано отримані результати, оформлено первинну документацію, підготовлено статтю до публікації. Постоєнко В.О. визначено практичне значення та мету досліджень, сформовано план та схему проведення досліджень, здійснено загальне управління в ході проведення дослідження, сформульовано висновки. Гордієнко О.І. проведено відбір та підготовку дослідних матеріалів, проаналізовано отримані результати,*

сформульовано попередні висновки. Напненко О.О. здійснено управління в ході відбору та підготовки дослідних матеріалів та визначення оптимальних методів досліджень. Недосєковим В.В. проведено літературний науковий пошук зарубіжних літературних даних, аналіз та узагальнення дослідних даних).

**Статті у науковому фаховому виданні, включеному до наукометричної бази даних Scopus**

5. Sidashova S., Adamchuk L., Yasko V., Kirovich N., Lisohurska D., **Postoienko H.**, Lisohurska O., Furman S., Bezditko L. (2022) The inhibitory effect of Ukrainian honey on probiotic bacteria. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 16, 149-160. <https://doi.org/10.5219/1721> (*Postoienko H. проведено літературний науковий пошук, порівняльний аналіз наявних досліджень, які наближені до опублікованих авторами та визначено відповідні узгодження і відмінності, статистичний аналіз дослідних даних, проведено мелісопалінологічний аналіз проб меду для дослідження. Sidashova S. визначено актуальність та практичне значення досліджень, сформульовано наукову новизну, сформовано загальні висновки досліджень. Adamchuk L. визначено актуальність, сформульовано наукову новизну, практичне значення та мету проведених досліджень, проведено літературний науковий пошук, збір дослідних даних, підготовлено первинний варіант тексту, знаходження джерел фінансування. Yasko V. проведено літературний науковий пошук, статистичну обробку дослідних даних та аналіз отриманих результатів. Kirovich N. проведено літературний науковий пошук та збір дослідних даних. Lisohurska D. проведено літературний науковий пошук, підготовлено публікацію до друку відповідно до вимог видання. Lisohurska O. проведено збір та аналіз дослідних даних, сформульовано висновки та узагальнення результатів досліджень. Furman S. проведено проведено збір дослідних даних, їх статистичну обробку та аналіз отриманих результатів. Bezditko L.- проведено збір дослідних даних).*

### **Статті в інших виданнях**

6. Postoienko Volodymyr, Bezpaluyi Ivan, **Postoienko Hanna** (2022). Biotechnological Evaluation of Bee Ethology During Honey Collection and Probiotic Properties of Honey. American Journal of Agriculture and Forestry. Vol. 10, No. 3, pp. 94-99. doi:10.11648/j.ajaf.20221003.12. *(Postoienko H. проведено літературний науковий пошук, порівняльний аналіз наявних досліджень, які наближені до опублікованих авторами, відбір дослідних матеріалів, проведено дослідження з виділення пробіотичних мікроорганізмів нормофлори кишківника бджіл, проаналізовано та статистично оброблено дослідні дані, . Postoienko V. визначено актуальність та практичне значення досліджень, сформульовано наукову новизну, здійснено загальне управління в ході проведення дослідження, сформовано загальні висновки досліджень. Bezpaluyi I. сформульовано наукову новизну, практичне значення та мету проведених досліджень, проведено літературний науковий пошук, збір дослідних даних, знаходження джерел фінансування, підготовлено публікацію до друку відповідно до вимог видання).*

7. Гордієнко О. І., **Постоєнко Г. В.**, Постоєнко В. О., Напненко О. О., Артеменко В. Ю., Тиндик В.С. (2022) Виділення, ідентифікація та характеристика пробіотичних культур з меду бджолиного. Науково-виробничий журнал "Бджільництво України", 1(6), с. 7-11. <https://doi.org/10.46913/beekeepingjournal.2021.6.01>. *(Постоєнко Г.В. проведено літературний науковий пошук, порівняльний аналіз наявних досліджень, які наближені до опублікованих авторами, проведено дослідження з визначення антагоністичних властивостей пробіотичних мікроорганізмів , збір та статистичну обробку дослідних даних. Гордієнко О.І. проведено літературний науковий пошук, відбір дослідних матеріалів, які наближені до опублікованих авторами, здійснено контроль проведення досліджень мікробіологічних досліджень, проаналізовано та статистично оброблено дослідні дані. Постоєнко В.О. визначено актуальність та практичне значення досліджень, сформульовано наукову новизну, здійснено загальне управління в ході проведення дослідження,*



*сформовано загальні висновки досліджень. Напненко О.О, проведено збір та аналіз дослідних даних, сформовано попередні висновки досліджень підготовлено первинний варіант тексту, знаходження джерел фінансування. Артеменко В.Ю. проведено збір, статистичну обробку та аналіз дослідних даних. Тиндиком В.С. проведено літературний науковий пошук, збір та статистичну обробку дослідних даних).*

### ***Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації***

#### ***Тези наукових доповідей***

**8. Г. Постоєнко** Вплив згодовування препарату «Апінормін» на динаміку природного відмирання бджіл. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасне бджільництво: проблеми-досвід-нові технології». – Київ, Україна (20.08.2021). *(Постоєнко Г.В. проведено літературний науковий пошук та порівняльний аналіз наявних досліджень, які наближені до опублікованих даних, сформульовано актуальність, новизну та практичне значення проведених досліджень, зібрано, проаналізовано та узагальнено дослідні дані, сформовано висновки, підготовлено публікацію до друку).*

**9. Postoienco H. V., Postoienco V. O., Efimenko T. M., Odnosum H. V.** Dynamics of natural extinction of bees (*Apis mellifera* L.) by conditions of feeding and body spraying by probiotic drug «Apinormin». Materials of the 4th International Scientific and Practical Conference “Experimental and theoretical research in modern science”. - Kishinev, Moldova (4-5.11.2021). *(Postoienco H.V. проведено літературний науковий пошук, порівняльний аналіз наявних досліджень, які наближені до опублікованих авторами, проаналізовано ринок пробіотичних препаратів підібрано матеріали та методи досліджень, проведено статистичну обробку дослідних даних, підготовлено публікацію до друку. Postoienco V.O. визначено актуальність та сформульовано наукову новизну, здійснено загальне управління в ході проведення дослідження. Efimenko T.M. визначено практичне значення та мету проведених досліджень, сформовано план та схему проведення досліджень, проведено збір та*

*аналіз дослідних даних, сформульовано попередні висновки. Odnosum Н.У. проведено літературний науковий пошук, збір та статистичну обробку дослідних даних.).*

10. О. Гордієнко, О. Напненко, **Г. Постоєнко**. Оптимізація сублімаційного методу зберігання лактобактерій. Міжнародна науково-практична конференція науково-педагогічних працівників та молодих науковців «Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах Євроінтеграції» присвяченої 85-річчю заснування факультету ветеринарної медицини ОДАУ. 14-15.09.2023, Одеса, Україна. (Постоєнко Г.В. проведено літературний науковий пошук, визначено практичне значення та мету проведених досліджень, проведено дослідження з виділення пробіотичних мікроорганізмів роду *Lactobacillus plantarum* та *Bifidobacterium bifidum* для дослідження різних способів зберігання штамів за використання різних поживних середовищ, проведено статистичну обробку дослідних даних, сформовано попередні висновки. Гордієнко О.І. визначено актуальність та сформульовано наукову новизну, здійснено загальне управління в ході проведення дослідження, підготовлено публікацію до друку. Напненко О.О. проведено літературний науковий пошук, сформовано план та схему проведення досліджень, проведено збір, аналіз та узагальнення дослідних даних, сформовано остаточні висновки).

**ЗМІСТ**

<b>АНОТАЦІЯ.....</b>	<b>2</b>
<b>СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.....</b>	<b>13</b>
<b>ЗМІСТ.....</b>	<b>19</b>
<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І ТЕРМІНІВ.....</b>	<b>21</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>23</b>
<b>РОЗДІЛ 1.ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....</b>	<b>30</b>
1.1.Бактеріальні хвороби бджіл .....	30
1.2.Профілактика та лікування бактеріальних хвороб бджіл (екологічно- безпечні заходи і засоби за бактеріозів бджіл) .....	46
1.3.Пробіотики та перспективи їх застосування у практичному бджільництві.	49
<b>РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....</b>	<b>59</b>
2.1.Матеріали, об'єкти, схема та умови проведення досліджень .....	59
2.2.Методи досліджень .....	65
2.2.1.Дослідження нормофлори .....	65
2.2.2.Визначення властивостей пробіотичних засобів .....	67
2.2.3.Оцінка якості меду бджолиного .....	70
2.3 Статистична обробка даних .....	77
<b>РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ .....</b>	<b>80</b>
3.1.Удосконалення методики виділення пробіотичних культур зі свіжовідкачаного меду .....	80
3.2.Нормофлора кишківника бджіл та меду бджолиного .....	87
3.3.Антагоністичні властивості пробіотичних культур in vitro по відношенню до збудників бактеріозів бджіл .....	91
3.4.Обґрунтування оптимальних доз та способів застосування пробіотику ....	93
3.5.Нешкідливість та біостимулювальна дія пробіотику для бджіл .....	95

3.6.Результати перорального застосування пробіотичних препаратів на <i>Apis mellifera</i> .....	101
3.7.Розроблення практичних схем застосування пробіотичних засобів для застосування за європейського гнильцю та профілактики в природних умовах .....	107
<b>РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ ...</b>	<b>117</b>
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>128</b>
<b>ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ.....</b>	<b>130</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>131</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>153</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І ТЕРМІНІВ

**AFB (АГ)** – American fullbrood, американський гнилець

**EFB (ЄГ)** – European fullbrood, європейський гнилець

**FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)** – спеціалізована установа ООН з питань сільського господарства (включаючи тваринництво, лісове господарство, рибництво та аквакультуру) та продовольства.

**GAP (Good Agricultural Practice)** – належна сільськогосподарська практика

**GHP (Good Hygiene Practice)** – належна гігієнічна практика

**HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point)** – система аналізу ризиків, небезпечних чинників і контролю критичних точок

**In situ** – вивчення процесу на місці де він відбувається

**LAB (lactic acid bacteria)** – молочнокислі бактерії

**MRC** - селективне поживне середовище для культивування лактобацил, інша назва середовище Блікфельда

**MRSa** – MPC агар

**MRSb** – MPC бульйон

**PFGE (pulsed-field gel electrophoresis)** – гель-електрофорез в імпульсному полі

**PRR (pattern recognition receptor)** – рецептори розпізнавання паттернів

**QPS (Qualified presumption of safety)** – показник загальної безпечності пробіотичного мікроорганізму

**WOAH (OIE) (World Organisation of Animal Health)** – Всесвітня організація здоров'я тварин, назва при заснуванні Office International des Epizooties.

**АС** – антимікробні сполуки

**Бактеріюцини** – специфічні білки, що продукуються деякими бактеріями і пригнічують життєдіяльність клітин інших штамів того ж виду або споріднених видів бактерій.

**Біфідум-агар** – селективне поживне середовище для культивування біфідобактерій, інша назва – середовище Блоурока

**ГМФ** – гідроксиметилфурфурол

**ІФА** – імуноферментний аналіз

**КУО** – колонієутворююча одиниця, кількість життєздатних мікроорганізмів

**МПА** – м'ясо-пептонний агар;

**ПЛР** – полімеразна ланцюгова реакція

**Пребіотики** – неперетравлювані компоненти їжі, які вибірково стимулюють ріст і/або активність захисної мікрофлори кишечника людини і поліпшують тим самим її здоров'я

**Пробіотики** – живі мікроорганізми, які можуть позитивно впливати на здоров'я людини/тварин нормалізувати склад і функції мікрофлори шлунково-кишкового тракту

**Постбіотики** – побічні продукти пробіотиків, які харчуються пребіотиками

**РП** - реєстраційне посвідчення;

**ТСА** – триптон-соєвий агар

**ШКТ (шлунково-кишковий тракт)** – система органів хребетних тварин, що забезпечують процеси травлення

## ВСТУП

**Актуальність роботи.** Медоносні бджолі роду *Apis mellifera L.* відіграють суттєву роль в забезпеченні ефективного функціонування агропромислового сектору економіки України [1]. Їх використання не лише забезпечує низку галузей народного господарства різноманітною сировиною для переробки і продукцією, що споживається населенням та широко експортується [1, 2, 3], а також відіграє ключову роль в досягненні високих показників врожайності, адже бджолі є запилювачами багатьох ентомофільних рослин [3, 4, 5].

На світовій арені Україні стабільно посідає місце в першій п'ятірці найбільших експортерів меду, конкуруючи з такими гігантами як США, Німеччина, Китай та Франція. Протягом останніх десяти років рівень експорту меду з України хоч і повільно, але стабільно набирає обертів. У 2022 р. вартість експортованого меду становила більше 2,6 млрд доларів. За час повномасштабної війни в Україні обсяги експорту меду знизились, але не зникли повністю, що викликає повагу з огляду на всі труднощі провадження бджільничої діяльності в умовах війни [1].

Останнім часом в результаті дії несприятливих чинників навколишнього середовища популяція бджолі медоносної на території України зазнає значного негативного впливу [6]. Серед них можна виділити зміни погодно-кліматичних умов, використання хімічних засобів для обробки сільськогосподарських культур, забрудненість ґрунтів, зловживання генетично модифікованими рослинами, порушення умов утримання бджіл, наявність збудників інфекційних захворювань та використання антибактеріальних і хіміотерапевтичних препаратів для лікування бджіл. Перераховані стресові чинники зазвичай діють комплексно і впливають на здоров'я комах, їх адаптаційно-захисні механізми, поведінку, продуктивність і, як наслідок, на якість і безпеку отриманої продукції [7; 8, 9, 10].

Згідно рекомендацій FAO схеми боротьби з інфекційними захворюваннями бджіл, зокрема бактеріальної етіології, передбачають знищення уражених сімей

шляхом спалювання у випадку запущеної стадії захворювання [11] або використання відповідних антибіотиків, ефект від яких не завжди є достатнім, більше того знижує резистентність організму, репродукційну здатність матки та продуктивності робочих бджіл і, як наслідок, ослаблення сили бджолиної сім'ї в цілому. Даний факт свідчить про порушення норм благополуччя тварин, що використовуються в сільському господарстві [12]. Крім того, це негативно впливає на якість і безпечність продуктів бджільництва, що є актуальним питанням, адже наша держава є однією з найбільших у світі споживачів та експортерів меду бджолиного [13]. Продаж та споживання населенням такого меду може становити значну небезпеку для здоров'я людей, що потребує детальних досліджень з оцінки ризиків та біобезпеки в галузі бджільництва та тваринництва в цілому [14].

За цих умов актуальним напрямом досліджень є пошук і розроблення органічних засобів комплексної дії. До них, зокрема, відносять і пробіотики - бактеріальні препарати, які сконструйовані на основі нормофлори шлунково-кишкового тракту (ШКТ) людини і тварин [15, 16]. Ці мікроорганізми можуть приносити користь своїм господарям при перетравленні їжі, забезпеченні необхідними поживними речовинами, детоксикації шкідливих молекул, розробленні схем із заміни антибіотикотерапії у захисті від патогенів, біостимуляції життєздатності, імуномодуляції тощо. Дослідженнями мікробіологічного складу кишківника бджіл займаються шведські, китайські та американські вчені [15, 16, 17, 18]. Шведськими вченими на чолі з Олофсоном, зокрема, було виділено та охарактеризовано ряд пробіотичних мікроорганізмів роду *Lactobacillus* [15].

В Україні використання пробіотиків у практичному бджільництві знаходиться на початковій стадії розвитку. На разі зареєстровано лише один специфічний для бджіл засіб «Апінормін» (Додаток А, РП № ВВ-00861-02-18). Проте, практично не з'ясованими залишаються питання, пов'язані з впровадженням їх у практику бджільництва [19, 20, 21]. Вирішення цієї проблеми полягає в проведенні комплексних досліджень з виділення, встановлення видового



складу та з'ясування властивостей асоціації мікроорганізмів нормофлори кишківника бджіл, визначенні характеристик пробіотичного засобу в лабораторних умовах, проведенні науково-виробничих випробувань дослідного препарату, що слугуватимуть теоретичним і експериментальним обґрунтуванням доцільності застосування пробіотиків у практиці.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дослідження, що увійшли до дисертаційної роботи, є частиною науково-дослідної роботи лабораторії технологічних та спеціальних заходів профілактики хвороб бджіл і лабораторії методів оцінки якості і безпечності продукції бджільництва Національного наукового центру «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича» за завданнями: № ДР 0121U108490 «Розроблення нових і удосконалення існуючих екологічно безпечних способів і засобів оздоровлення бджіл за найбільш поширених захворювань для органічного виробництва продукції бджільництва» та № ДР 0121U108509 «Розроблення критеріїв оцінки якості та безпечності продукції бджільництва».

**Мета і задачі дослідження.** Мета роботи – експериментальне обґрунтування доцільності використання пробіотиків для профілактики і лікування європейського гнильцю бджіл та розробка комплексного підходу до впровадження пробіотиків у практику бджільництва.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- удосконалити методику виділення пробіотичних культур зі свіжовідкачаного меду бджолиного;
- встановити видовий склад, культурально-морфологічні й біохімічні характеристики виділеної асоціації мікроорганізмів нормофлори кишківника бджіл;
- дослідити антагоністичні властивості пробіотичних культур *in vitro*;
- обґрунтувати в лабораторних умовах оптимальні дози та способи застосування пробіотику «Апінормін»;

- встановити нешкідливість та специфічність дії пробіотичного засобу;
- розробити та запропонувати практичні схеми застосування пробіотичних засобів для профілактики та за європейського гнильцю бджіл.

*Об'єкт дослідження*- профілактика і лікування за європейського гнильцю бджіл.

*Предмет дослідження* – розроблення комплексного підходу до експериментального обґрунтування використання пробіотиків для профілактики та лікування європейського гнильцю бджіл.

*Методи дослідження* — мікробіологічні; біохімічні; технологічні; аналітичні, статистичні, а також монографічний, порівняльний, ретроспективний аналіз, абстрактно-логічний.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше науково аргументовано комплексний підхід до експериментального обґрунтування використання пробіотиків для профілактики бактеріальних хвороб бджіл та лікування європейського гнильцю, який ґрунтується на проведенні досліджень з виділення, визначення видового складу та властивостей асоціації мікроорганізмів нормофлори кишківника бджіл, з'ясуванні характеристик пробіотичного засобу в лабораторних умовах, проведенні науково-виробничих випробувань дослідного препарату та розробленні практичних схем його застосування.

Удосконалено методику виділення пробіотичних культур зі свіжовідкачаного меду і доведено, що придатною для отримання бактерій нормофлори є сировина терміном перших три дні після відкачування.

Підтверджено відповідність асоціації мікроорганізмів нормофлори, виділеної зі свіжовідкачаного меду, яка складається з трьох культур - *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum* та *Enterococcus faecium* бактеріальній складовій препарату «Апінормін», що слугувало обґрунтуванням його використання у наступних дослідженнях в якості модельного зразка.

Показано значні антагоністичні властивості мікроорганізмів нормофлори по відношенню до збудника європейського гнильцю бджіл, нешкідливість та

специфічність дії пробіотичного засобу, що є підставою для його використання з профілактичною метою та для лікування європейського гнильцю. Визначено оптимальні схему і дозу застосування «Апінорміну», а саме шляхом згодовування препарату з цукровим сиропом у дозі 4 г на сім'ю медоносним бджолам. Вперше аргументовано доцільність використання «Аноліту» замість питної води для активації «Апінорміну» перед його використанням.

Розроблено одну практичну схему застосування пробіотичних препаратів для лікування європейського гнильцю бджіл та дві профілактичні схеми застосування, а також доведено стимулювальний вплив комплексу «Апінорміну» і «Аноліту» на інтенсивність відкладання яєць бджолиними матками та медопродуктивність.

### **Практичне значення отриманих результатів.**

Запропоновано і доведено лабораторними і практичними дослідженнями доцільність та ефективність використання пробіотичного препарату «Апінормін», зокрема в комбінації з «Анолітом», з профілактичною метою та для лікування європейського гнильцю бджіл.

Рекомендовано для лабораторій відповідного профілю та наукових досліджень методику виділення пробіотичних культур зі свіжовідкачаного меду з метою конструювання нових пробіотичних засобів, дослідження властивостей та різноманіття асоціації мікроорганізмів нормофлори та для практичного застосування в якості діючих речовин як у пробіотичних препаратах, так і в засобах комплексної дії.

Запропоновано схеми для практичного застосування пробіотику «Апінормін» в комбінації з «Анолітом» для профілактики та для лікування європейського гнильцю бджіл, а саме:

- у весняно-літній період шляхом згодовування з цукровим сиропом двічі на місяць три місяці підряд (квітень, червень та липень) з інтервалом 7 днів;
- при підготовці до зимівлі шляхом згодовування з цукровим сиропом двічі з інтервалом 7 днів за декілька тижнів перед консервацією на зимівлю;

- для лікування європейського гнильцю бджіл шляхом згодовування з цукровим сиропом 3 рази з інтервалом 7 днів.

Розроблено науково-методичні рекомендації «Удосконалення методики виділення пробіотичних культур зі свіжовідкачаного меду бджолиного».

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем особисто проводився пошук та аналіз літературних даних, що стосуються теми дисертаційного дослідження, планування деяких аспектів експериментальних досліджень, облік та статистична обробка одержаних результатів, формулювання висновків, підготовка матеріалів для публікації статей в наукових виданнях та підготовка до захисту тексту дисертаційного дослідження.

Автор висловлює особливу подяку науковому керівнику, доктору ветеринарних наук, професору Недосєкову Віталію Володимировичу за участь у формулюванні теми, мети і завдань дисертаційного дослідження, розробці загальної схеми проведення дослідів, формуванні розділу аналіз і узагальнення одержаних результатів, а також здійсненні загального контролю за ходом виконання всіх етапів дисертаційного дослідження.

За допомогу у проведенні мікробіологічних досліджень автор висловлює подяку колективу кафедри ветеринарної епідеміології та охорони здоров'я тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України, зокрема завідувачу кафедри, кандидату ветеринарних наук, доценту Мельнику Володимирі Васильовичу, доктору ветеринарних наук, професору Ушкалову Валерію Олександровичу, доктору ветеринарних наук, професору Виговській Лілії Миколаївні, доктору ветеринарних наук, доценту Галат Марині Владиславівні, кандидату ветеринарних наук, доценту Козловській Ганні Володимирівні та кандидату ветеринарних наук, доценту Мартинюку Олександрі Григоровичу.

За надання дозволу для проведення експериментів на бджолах та здійснення загального керівництва над виконанням дослідів автор висловлює подяку директору ННЦ «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича», доктору сільськогосподарських наук, професору Постоєнку Володимирі Олексійовичу, а також завідувачці лабораторії технологічних та спеціальних заходів профілактики

хвороб бджіл, кандидату біологічних наук Єфіменко Тетяні Михайлівні, кандидату ветеринарних наук, старшому науковому співробітнику Односум Ганні Володимирівні та завідувачці лабораторії методів оцінки якості та безпечності продукції бджільництва Лазаревій Людмилі Миколаївні.

За надання консультаційних послуг, допомогу в плануванні та проведенні деяких мікробіологічних експериментів автор висловлює подяку кандидату сільськогосподарських наук Гордієнко Ользі Іванівні.

В ході виконання роботи, спільно з колегами, здобувачем отримано навички планування експериментів, опановано ряд експериментальних методів дослідження, підходи до статистичної обробки результатів.

#### **Апробація результатів дисертації.**

Результати дисертаційного дослідження були представлені на міжнародних та всеукраїнських конференціях: Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасне бджільництво: проблеми-досвід-нові технології» (м. Київ, 20 серпня 2021 р.); Міжнародній науковій конференції присвяченій 100-річчю кафедр факультету ветеринарної медицини «Єдине здоров'я – 2022» (м. Київ, 22–24 вересня 2022р.); 4th International Scientific and Practical Conference “Experimental and theoretical research in modern science” (Kishinev, Moldova, 4-5.11.2021); Міжнародній науково-практичній конференції науково-педагогічних працівників та молодих науковців «Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах євроінтеграції» (м. Одеса, 14–15 вересня 2023 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційного дослідження опубліковано 10 наукових праць, у тому числі 4 статті у наукових фахових виданнях України, 1 стаття в міжнародній наукометричній базі даних Scopus, 1 стаття в інших міжнародних виданнях, 1 стаття в інших виданнях, 3 тез.

**Структура і обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 170 сторінках комп'ютерного тексту і складається з: анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел і додатків. Дисертаційна робота

проілюстрована 20 рисунками та 26 таблицями. Список використаних джерел містить 198 джерел, з яких 166 латиницею.

## РОЗДІЛ 1.

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1 Бактеріальні хвороби бджіл

Останнім часом галузь бджільництва набуває значної цінності як в Україні, так і у світі.

Бджільництво є дуже профіцитним напрямком економіки України, як з точки зору біобезпеки, так і з точки зору харчової безпеки. Бджоли відіграють вирішальну роль у запиленні, збільшенні біорізноманіття та підвищенні врожайності, що безпосередньо підтримує продовольчу безпеку, забезпечуючи стабільне постачання фруктів, овочів та інших культур [1, 3, 4, 5]. З точки зору біобезпеки, бджільництвом можна керувати стабільно з мінімальним впливом на навколишнє середовище за умови, що застосовуються такі практики, як утримання місцевих видів бджіл [2] і контроль хвороб, таких як кліщі варроа [7]. Крім того, виробництво меду є натуральним джерелом їжі з низьким рівнем ризику та значною харчовою цінністю, що сприяє здоровішому харчуванню [13, 14]. При належному управлінні бджільництво може підвищити як екологічну стійкість, так і доступність їжі.

Утримання бджолиних сімей, продаж меду та продуктів бджільництва та значне споживання їх населенням викликають значний інтерес науковців до вивчення біології окремої комахи та бджолиної сім'ї в цілому, моніторингу різноманіття та поширеності захворювань бджіл різної етіології, а також потенційного шкідливого впливу даних захворювань на якість продукції та, як наслідок, на стан здоров'я населення.

Серед списку хвороб бджіл, оприлюдненого Всесвітньою організацією здоров'я тварин присутні бактеріальні, грибкові, вірусні та паразитарні захворювання корисних комах [22]. Бактеріальні хвороби бджіл є на даний момент досить поширеними у світі та завдають значної шкоди галузі бджільництва [9, 14].

Серед них виділяють Американський та Європейський гнилець [22], парагнилець, септицемія, гафніоз, сальмонельоз, колибактеріоз [23]. Згідно Коду здоров'я наземних тварин виділено два захворювання бактеріальної етіології, а саме Американський та Європейський гнилець бджіл. Нижче наведено характеристики даних захворювань [23].

### **1.1. Бактеріальні хвороби бджіл**

Американський гнилець (American fullbrood, AFB) – контагіозне бактеріальне захворювання бджіл, яке зустрічається всюди, де утримують бджіл виду *Apis mellifera* spp. і є частою проблемою промислових та локальних пасік [24-28, 29]. Після виявлення захворювання проводиться ряд заходів для локалізації та попередження поширення збудника [25, 30-32]. Всесвітня організація здоров'я тварин (WOAH) класифікує AFB як надзвичайно небезпечне інфекційне захворювання тварин, яке має суттєвий вплив на екологічну та економічну складову галузі бджільництва [32].

#### *Епізоотологічні дані*

Американський гнилець (AFB) — це інфекційне захворювання личинкової стадії медоносної бджоли *Apis mellifera* та інших *Apis* spp., що спричиняє значні втрати бджолиних колоній у помірних і субтропічних регіонах по всьому світу, де утримуються такі бджоли [32]. АГ вбиває лише інфіковані личинки медоносних бджіл, однак без лікування дане захворювання призводить колапсу та вимирання всієї колонії. Враховуючи тяжкість інфекції, її часте виникнення швидко і легке поширення для неї характерне поширення типу епізоотії та ензоотії [34]. Через швидке поширення в межах континенту хвороба також може мати панзоотичний характер [35, 36]. Оскільки АГ завдає значної прямої та непрямої шкоди для профілактики, придушення та викорінення зазвичай застосовуються радикальні заходи. Для цього необхідно сповістити відповідні органи [33] та знищити заражену сім'ю [25, 27, 30-32]. Цей збудник впливає на розмноження на стадії личинок або лялечок, його спори є інфекційною формою. Личинки медоносних бджіл більш сприйнятливі до інфекції протягом перших 36 годин після вилуплення



яєць, справді, потрібно лише десять спор, щоб захворіти личинка віком менше 24 годин [33, 37].

Спори личинок *Paenibacillus larvae* проростають і розмножуються в середній кишці, проникаючи в тканини личинок, де вони продовжують розмножуватися та виробляти мільярди спор [32, 33, 34, 38, 39]. Інфікована личинка врешті-решт гине та розкладається личинками до коричневого напіврідкого клеєподібного колоїду, зазвичай відомого як «м'яка маса» — основний клінічний симптом для діагностики АГ [32, 33, 38]. Природне поширення спор *P. larvae* між колоніями відбувається шляхом горизонтальної передачі, коли окремі медоносні бджоли, що несуть спори бактерій, переміщуються між колоніями або під час грабування бджіл, крадіжки ресурсів у слабших хворих сімей, підбирають спори та транспортують їх назад у власну колонію [38, 39]. Передача цієї хвороби, таким чином, залежить від щільності і спалахи АГ виникають частіше в районах з високою щільністю колоній, характерною для бджільництва. Крім того, згодовування або викрадення меду або бджолиного хліба, наповненого спорами, пакетних бджіл і впровадження маток із заражених колоній також може поширювати хворобу. Віск, забруднений спорами *P. larvae*, який використовується у виробництві, може також поширюють хворобу, якщо її не лікувати належним чином. Раннє виявлення АГ допомагає запобігти подальшому поширенню інфекції [32, 39].

Виявлення невеликої кількості послідовностей личинок, заражених *P. larvae* за межами зони спалаху АГ показує просторову ензоотичну поширеність патогену [32, 39], що свідчить про інші шляхи передачі. Звичайні практики бджільництва, такі як транспортування та повторне використання матеріалу вулика та переміщення бджіл між колоніями, прискорюють поширення АГ і насправді є набагато важливішими шляхами передачі, ніж природний дрейф чи пограбування [32, 34, 39]. Крім того, глобальна торгівля медоносними бджолами та продуктами

бджільництва сприяє переміщенню інфікованого матеріалу на великі відстані [32, 33].

Інфекція може передаватися личинкам бджолами-годувальницями або спорами, що залишаються на дні комірки розплоду. Хоча личинкові стадії робочих бджіл, трутнів і маток сприйнятливі до інфекції, заражені матки та личинки трутнів рідко зустрічаються в природних умовах. Сприйнятливість личинок до АГ зменшується зі збільшенням віку [32,34]; личинки не можуть бути заражені пізніше ніж через 53 години після вилуплення яйця. Середня інфекційна доза (LD50 = доза спор, при якій гине 50% личинок), необхідна для ініціації інфекції, хоча й дуже різна, становить  $8,49 \pm 1,49$  спор у 24–28-годинних личинках бджіл. Заміна стільників із залишками хворого розплоду є найпоширенішим способом поширення хвороби від колонії до колонії [32,33, 39].

#### *Збудник*

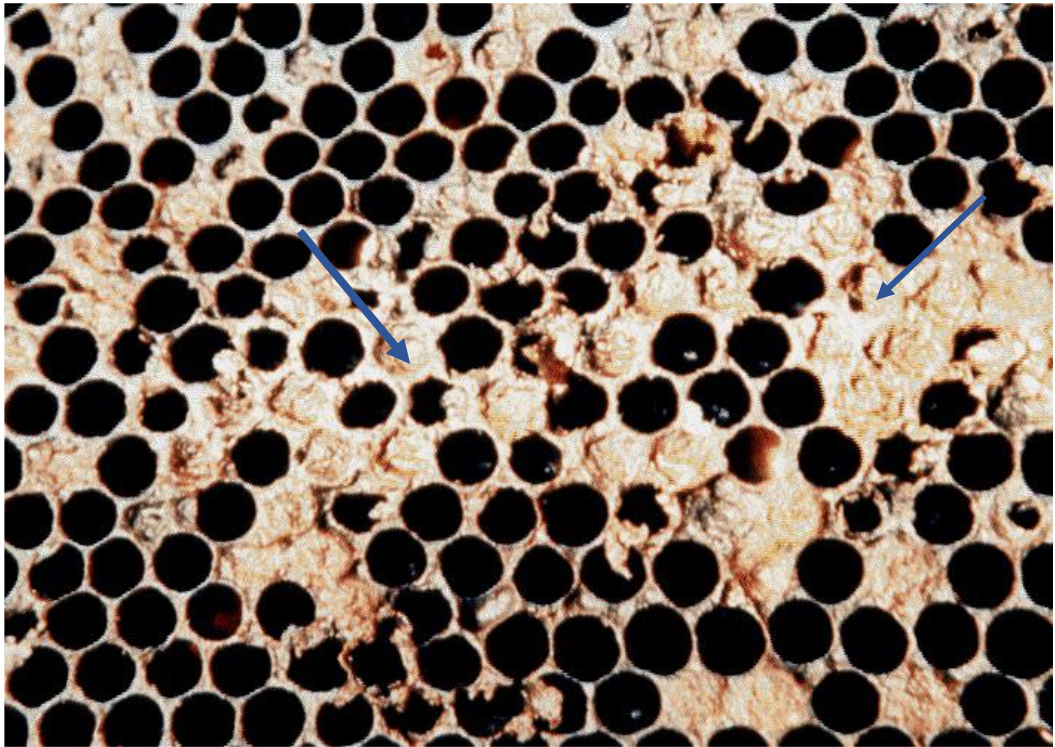
*Raenibacillus larvae* є грампозитивною бактерією, яка може продукувати понад один мільярд спор у кожній інфікованій личинці [32, 33, 34, 38, 39]. Бактерія являє собою заокруглену, пряму або іноді вигнуту паличку, яка сильно варіює за розміром (0,5-0,8 мкм в ширину і 1,5-6 мкм в довжину), зустрічається окремо або в ланцюжках і нитках; більшість штамів рухливі [32]. *P. larvae* продукує надзвичайно живучі спори, які є єдиною патогенною формою цієї бактерії [39]. Спори надзвичайно термостабільні та стійкі до хімічних агентів. Тільки спори здатні викликати інфекцію [32]. Спори личинок *P. larvae* можуть зберігатися в продуктах бджільництва (мед, віск, мертві личинки) і в навколишньому середовищі від 3 до 10 років, і 35 років у сухих личинкових лусках. [32]. Молоді личинки медоносних бджіл поглинають спори *P. larvae* разом з їжею, яку їм забезпечують дорослі бджоли-годувальниці в колонії [31-34].

### *Клінічні ознаки*

Клінічні ознаки захворювання можуть варіювати в залежності від генотипу збудника, який уражає бджіл, резистентності сім'ї та стійкості по відношенню до збудника АГ [32, 34]. Стільники з розплодом заражених колоній мають нерівний малюнок, а кришки комірок, що містять хворі личинки медоносних бджіл, виглядають затемненими та заглибленими, мають жирний вигляд і нехарактерні перфорації. Напіврідкий колоїд, схожий на клей, зрештою, висихає до твердої луски, яка щільно прилягає до дна комірки [32,33, 34, 38].

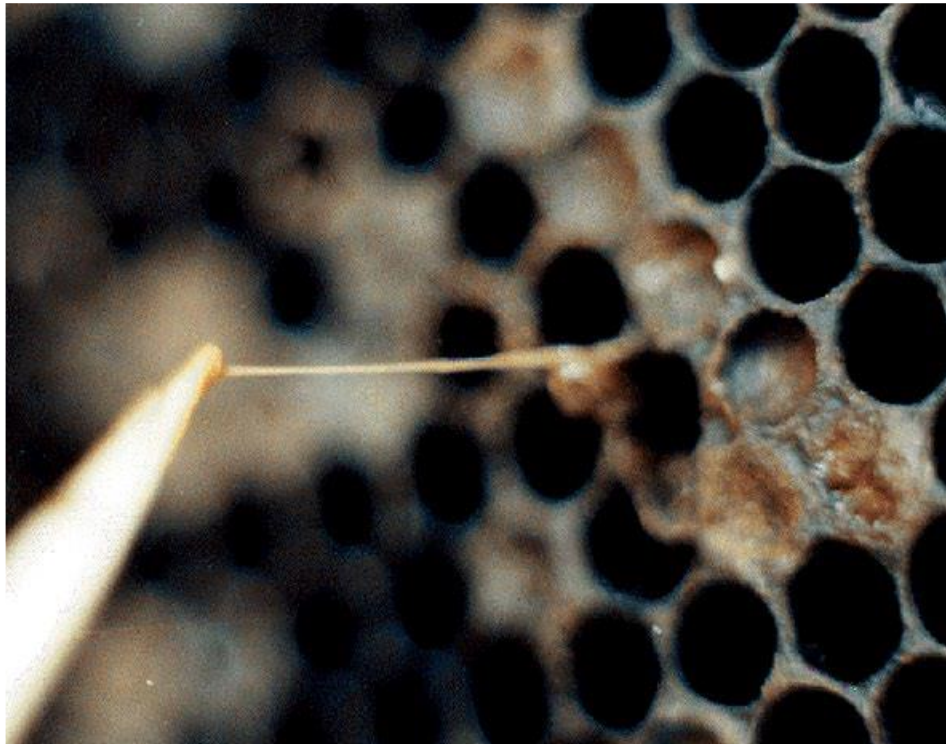
Личинки можуть швидко загинути у ранньому віці, коли вони скручуються біля основи незакритих комірок стільників. Дорослі робочі бджоли видаляють ці мертві личинки, залишаючи лише порожню комірку [32, 34]. Інші личинки гинуть на більш пізніх стадіях розвитку, коли вони перебувають у вертикальному положенні, заповнюючи більшу частину комірки розплоду. Личинки, заражені різними за генотипом підвидами збудника, як правило, гинуть або до закриття комірки розплоду, або після [38].

У сильно заражених колоніях стільники мають плямистий вигляд, спричинений малюнком здорового закритого розплоду, незакритих комірок, що містять залишки хворих личинок, і порожніх комірок [34]. Кришечка комірки, яка містить хвору личинку, виглядає вологою і темна, стає увігнутою і перфорованою в міру прогресування інфекції (рис. 1.1) [32].



**Рисунок 1.1 Рамка, з ураженими стільниками; кришечки уражених комірок ввігнуті всередину [32].**

Крім того, личинка або лялечка змінює колір, спочатку на бежевий, а потім на темно-коричневий [34]. Личинки можуть набувати клейкої консистенції, їх можна витягувати у вигляді ниток, коли зонд вставляється в залишки личинок і виймається з клітини (тест сірником) [32].



**Рисунок 1.2 Метод з сірником [32].**

Це, ймовірно, найвідоміший метод польової діагностики захворювання, але в деяких випадках залишки личинок досить водянисті, що призводить до негативного результату тесту з сірником. Нарешті, через 1 місяць або більше після того, як личинка стає мотузкою, залишки хворого розплоду висихають, утворюючи типові тверді темні лусочки, які є крихкими та міцно прилягають до дна комірки (рис. 1.3) [32].

Якщо смерть настає на стадії лялечки, язичок лялечки висувається з голови, простягаючись до верхньої частини виводкової комірки або може повертатися назад до дна комірки.



**Рисунок 1.3** Дно комірки із засушеними рештками ураженої личинки

Симптом так званого «висунутого язика» є однією із найхарактерніших ознак захворювання, хоча спостерігається рідко (Малюнок 1.4) [32]. «Язик» може також зберігатися на засохлій лусочці.



**Рисунок 1.3** Дно комірки з засушеними рештками ураженої личинки [32]

Існує закономірність між швидкістю загибелі личинки та її видаленням і очищенням комірки. Це може бути пов'язано з тим, що бджоли-годувальниці менше розпізнають мертвих личинок після закриття комірки [40]. Але зазвичай бджоли-годувальниці очищають всі комірки з ураженим розплодом [34]. Цілком імовірним є той факт, що інтенсивність очищення уражених комірок бджолами-годувальницями напряду залежить від сили та чисельності сім'ї.

### *Діагностика*

Діагностика АГ ґрунтується на ідентифікації збудника та наявності клінічних ознак [32, 33, 34, 38]. Для достовірного аналізу необхідно брати декілька зразків для дослідження. Однак на практиці методика відбору зразків буде залежати від того, чи проби відібрані в підозрілої щодо наявності захворювання бджолиної сім'ї/пасіки або для аналізу в межах моніторингу/профілактики АГ [32]. В першу чергу проводиться аналіз клінічних ознак, які було наведено вище. Для ідентифікації збудника використовується ряд досліджень, зокрема мікробіологічна характеристика, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)[32, 38], біохімічне профілювання, метод імуноферментного аналізу (ІФА) для виявлення специфічних антитіл та мікроскопія. Дослідник повинен знати про різницю в чутливості між перерахованими методами і повинен вибрати найбільш відповідні для конкретної ситуації [32, 34].

Європейський гнилець (European fullbrood, EFB) – контагіозне бактеріальне захворювання бджіл, що зустрічається всюди у світі, де утримують бджіл роду *Apis mellifera* spp. [48]. Існують відомості також про ураження розплоду бджіл роду *Apis cerana* [49], зокрема в Індії [50], та можливості ураження бджіл виду *A. cerana* збудниками, характерними для виду *A. mellifera* [50]. Масштаби шкоди від даного захворювання варіюють, але класифікують ЄГ як менш небезпечне захворювання

порівняно з АГ. Дана хвороба не належить до руйнівних, хоча призводить до серйозних втрат розплоду, і, як наслідок, до ослаблення та втрати бджолиних сімей.

#### *Епізоотологічні дані*

Найчастіше ця хвороба є ендемічною, для неї характерні випадкові, сезонні спалахи та спонтанне одужання [39]. Згідно даних літератури у Великій Британії та Швейцарії спостерігалось різке зростання захворюваності на ЄГ, а значні спалахи захворювання були зареєстровані в країнах, які вважаються вільними від захворювання (наприклад, Норвегія) [41–43]. Велика кількість клінічних випадків захворювання нещодавно також була зареєстрована у Фінляндії, Франції, Греції, Голландії, Італії та Чехії [44–45]. Захворюваність пов'язана зі щільним розміщенням бджолиних сімей на обмеженій території [46].

Хвороба може виникати протягом року, але більш поширена навесні, коли є більше розплоду. Ознаки захворювання можуть спонтанно зникати в інфікованих колоніях до кінця активного сезону, але, ймовірно, повернуться в наступні роки [52]. Бактерія може поширюватися через мед із зараженими стільниками, через пилок, мед, розплід тощо. Розвитку ЄГ може сприяти дисбаланс між кількістю личинок і бджіл-годувальниць. Крім того, ЄГ більш поширений у холодну та дощову весну, де може бути дефіцит корму, особливо протеїну для розплоду (брак пилку). Було також помічено, що якість і кількість джерел нектару і пилку можуть впливати на перебіг хвороби. Стан здоров'я сім'ї дуже важливий для розвитку захворювання всередині колонії. Особливо схильні до цього захворювання сім'ї, які зазнали стресу з будь-якої причини (дефіцит їжі, перелітне бджільництво, пестициди тощо), а також генетично більш чутливі сім'ї. Здорові та міцні колонії зможуть самотійно одужати від хвороби, якщо сезон гарантує адекватні джерела корму та його кількість (пилок, нектари та квіти) [53].



Географічно хвороба змінюється за ступенем тяжкості: від відносно незначної в одних регіонах до дедалі більш тяжкої в інших [52].

Сильно уражений розплід може мати затхлий або кислий запах, але також запах може бути відсутнім, в залежності від наявності сапрофітів. Пізнє зараження кліщами роду *Varroa*, перед розпадом колонії, може бути причиною схожого зовнішнього вигляду розплоду і є важливою ознакою для диференційної діагностики [53].

### Збудник

ЄГ викликається грампозитивною ланцетною стрептококовою бактерією *Melissococcus plutonis* (*M. pluton*) [54], яка часто пов'язана з іншими бактеріальними збудниками, зокрема: *Bacillus alvei*, *Streptococcus faecalis*, *Achromobacter eurydice*, *Paenibacillus alvei* та *Bacillus laterosporus* [53]. Бактерія виділена не лише з європейської медоносної бджоли *Apis mellifera*, а й з комах виду *Apis cerana* та *Apis laboriosa* [55]. Залежно від виду бактерії, пов'язаної з бактерією *M. plutonius*, ЄГ може протікати з різними симптомами (наприклад, наявність/відсутність неприємного кислого запаху) [53]. *M. pluton* — бактерія, спори якої досить стійкі до несприятливих умов навколишнього середовища (наприклад, спори здатні зберігати життєздатність протягом кількох місяців у пилку) [47].

Ранні дослідження показують, що *M. plutonius* розмножується в харчовій масі та на межі перитрофічної мембрани, і вважається, що він вбиває хазяїна до того, як він або будь-яка інша бактерія, пов'язана з ЄГ, проникне в тканину личинки [56]. Нещодавнє дослідження підтверджує, що інфекція, по суті, обмежена травним трактом, але спостерігалася дифузія речовин, отриманих з *M. plutonius*, у тканини личинок [57]. Фактори, що призводять до другого етапу інфікування, пошкодження тканин і стадії явних клінічних ознак, залишаються загадковими. Ранні звіти свідчать про те, що *M. plutonius* демонструє надзвичайно низький рівень

генетичного різноманіття, хоча спостерігаються деякі відмінності в біохімічних і фізичних характеристиках бактеріальних ізолятів [57]. Зовсім недавно виявлено «атиповий» підтип *M. plutonis* з Японії, який демонструє фенотипові та генетичні відмінності від раніше описаних «типових» бактеріальних ізолятів, що свідчить про більшу генетичну варіацію. За допомогою гелі-електрофорезу в імпульсному полі (PFGE) типові та атипові ізоляти згрупували в два генетично відмінних кластери [58].

#### *Клінічні ознаки*

Хвороба з'являється і протікає переважно в період швидкого росту колоній. Загальними ознаками, що спостерігаються в сім'ї, є нерівномірне ураження розплоду та закриття комірок, що розподілені по рамці з розплодом [53](рис. 1).



**Рисунок 1.4 Нерівномірне ураження розплоду бджіл [53].**

Личинки гинуть у віці від 4 до 5 днів, іноді в закритих комірках. ЄГ зазвичай вражає молодих личинок, які гинуть за 1-2 дні до запечаткування у своїх комірках,

а іноді незабаром після і завжди перед перетворенням на лялечку. Молоді уражені личинки покривають дно комірки і стають майже прозорими, з видимими трахеями. Колір личинок змінюється від перлинно-білого до жовтого, а потім коричневого [53] (рис. 1.2).



**Рисунок 1.5** Зміна кольору личинок, уражених *M. plutonius* [53].

Заражені личинки займають неприродне положення в комірках, скручуються біля стінки. Личинки згодом розпадаються до такого стану, коли вони утворюють сухі гумові лусочки, які можна легко видалити з комірки [47].

Більшість хворих личинок швидко виявляються та видаляються бджолами-годувальницями, залишаючи після себе порожні комірки, випадково розкидані серед решти розплоду. Деякі заражені личинки успішно виживають, заляльковуються і з'являються дорослими. Такі вцілілі личинки здатні випорожнюватися, а їх інфіковані фекалії сприяють поширенню хвороби [47, 53].

Заражені личинки, які не були виявлені дорослими бджолами, спочатку стають м'якими і набувають світло-жовтого кольору, який поступово змінюється на коричневий, гинуть і перетворюються в напіврідку масу. Потім вони висихають і перетворюються на темно-коричневу луску, яку можна легко видалити з комірок. Сильно уражений розплід може мати дуже несвіжий або кислуватий запах, іноді різко кислий, як оцет, але часто запах відсутній [38, 47, 53] (рис. 1.3) [53].



**Рисунок 1.6 Комірки із темно-коричневою масою – залишками мертвих личинок [53]**

### *Діагностика*

Для польової діагностики достатньо оглянути розплід і виявити описані вище симптоми (розсіяний розплід, пожовклі мертві личинки у відкритих комірках, кислий запах тощо), які можна поєднати з використанням набору для швидкої діагностики [47, 53].

Загальні симптоми, які бджоляр може спостерігати в сім'ї, це неоднорідний і непостійний розплід, який іноді супроводжується неприємним запахом. Окремі личинки гинуть, переміщуючись у своїх комірках, колір личинок змінюється від перлинно-білого до жовтого, коричневого та сірувато-чорного. Однак, визначальною характеристикою ЄГ є загибель розплоду на стадії годівлі в незакритих комірках [38,53].

Після зараження личинки гинуть через кілька днів незалежно від того, робочі бджоли, трутні чи матки. Бджільництво може локально агломерувати надзвичайно високу щільність популяцій медоносних бджіл, таким чином сприяючи поширенню збудника [46]. ЄГ — це кишкова інфекція личинок медоносних бджіл, що виникає внаслідок споживання зараженого корму, який дають бджоли-годувальниці [57]. Бактерія розвивається всередині вулика на рівні розплоду. Ця

хвороба поширюється орально в межах вулика через бджіл-годувальниць, які, намагаючись очистити комірки від мертвих личинок, заражаються спорами і передають їх розплоду під час годівлі [52,53]. Хвороба може передаватись від вулика до вулика або від пасіки до пасіки. Це можуть зробити бджоли, особливо під час грабунку зараженого вулика [54, 57, 58]. Збудник також може поширювати бджоляр, використовуючи заражений мед для підгодівлі здорових сімей, переміщуючи хворі сім'ї під час кочового бджільництва, торгівлі зараженими інструментами, використовуючи заражене обладнання та переміщуючи стільники з одного вулика в інший [53].

З описаного вище, зрозуміло, що між ЄГ і АГ є дуже багато спільного, але існують і суттєві відмінності. Коротко такі відмінності наведено в таблиці 1. Наведене порівняння представлено FAO і рекомендується в якості самостійної попередньої оцінки стану розплоду як в умовах наукової чи виробничої пасіки, так і у випадку маленької домашньої пасіки.

*Таблиця 1.1*

**Порівняльна характеристика відмінностей клінічних ознак  
європейського та американського гнильцю [53]**

<i>Європейський гнилець (ЄГ)</i>	<i>Американський гнилець (АГ)</i>
Мертва личинка в незакритій комірці	Мертва личинка в закритій комірці
Кислий запах	Запах рибного желе
Відсутність почорніння стільників	Темні стільники, ввігнуті всередину та перфоровані кришечки стільників
Не скручена личинка	Скручена личинка
Луски легко видаляються зі стільника	Луски важко видалити зі стільника

Загалом ЄГ завжди вважався менш серйозним, ніж АГ тому, що показники відновлення від ЄГ вищі, ніж від АГ, і часто європейський гнилець може пройти без втручання або з невеликим втручанням. Проте, він залишається хворобою національного та глобального значення. Дійсно, більш агресивні форми бактерії

були описані в різних країнах [59, 60, 70]. Крім того, часто повідомляють про випадки так званого типового ЄГ [71, 72]. Повідомляється, що атиповий ЄГ є причиною більш серйозних повторних спалахів, які важче вилікувати [53].

На відміну від личинок бджіл, які гинуть від АГ, що містить виключно збудник *P. larvae*, личинки бджіл, які гинуть від ЄГ зазвичай містять вторинні бактерії [53]. Такі бактерії можуть мати додатковий патогенний вплив на розвиток *M. plutonius* у хворих личинках, але їх роль у розвитку захворювання неясна та обговорюється. Такі бактерії, як *Enterococcus faecalis*, *Brevibacillus laterosporus*, *Bacillus pumilis*, *Paenibacillus alvei* та *Paenibacillus dendritiformis* були виділені з симптоматичних личинок разом із *M. plutonius* [53, 73, 74], а деякі навіть розглядаються як докази наявності ЄГ [47].

Для підтвердження захворювання надсилають зразок мертвих личинок до спеціалізованих лабораторій, де є можливість виділити збудник, на яке виникла підозра (Рисунок 1.5) [53].



**Рисунок 1.8 Відбір патологічного матеріалу (мертвої личинки) для лабораторного дослідження [53]**

Рекомендовані заходи і засоби лікування бактеріальних хвороб бджіл в більшості визначаються масовим знищенням уражених бджолиних сімей або застосуванням антибактеріальних препаратів. З огляду на сучасні підходи до використання екологічно-безпечних способів лікування актуальним є питання пошуку та розробки натуральних засобів комплексної для боротьби з бактеріальними захворюваннями бджіл.

## **1.2. Профілактика та лікування бактеріальних хвороб бджіл (Екологічно-безпечні заходи і засоби за бактеріозів бджіл).**

Методи контролю АГ відрізняються у всьому світі. У той час як спалювання хворих сімей вважається найефективнішим методом боротьби [75], інфіковані сім'ї також можна лікувати широко поширеним методом «струшування рою», коли практично весь розплід видаляють, а дорослим бджолам дають новий матеріал і нову воскову основу [76]. Надмірне використання антибіотиків широкого спектру дії призвело до резистентності бактерій, виявлення залишків таких препаратів у продуктах бджільництва, і, як наслідок, заборонаю їх використання на законодавчому рівні у кількох країнах.

Підвищений попит на альтернативні, природні стратегії для профілактики та контролю АГ призвів до масштабних досліджень із застосування ефірних олій, рослинних екстрактів, прополісу, маточного молочка, нетрадиційних природних молекул, пробіотиків, пребіотиків, жирних кислот, бактерій та бактеріоцинів з цією метою. Однак, надзвичайно стійка природа спор личинок *P. larvae* може знизити ефективність цих підходів. Детальний опис різних альтернативних натуральних продуктів і стратегій для контролю АГ можна знайти впрацях Alonso-Salces et al. [33], а також Кузишинова та ін. [77]. Іншою нещодавно оціненою стратегією є терапія бактеріофагами, яка, як повідомляється, є ефективним засобом лікування або профілактики АГ при використанні як коктейлю з кількох фагів у раціоні личинок [77–79]. Проте, діапазон хазяїв використовуваних фагів має бути досліджений, щоб переконатися, що всі відповідні штами личинок *P. larvae*

служать ціллю, а також для зменшення дисбактеріозу мікробіоти середньої кишки, для уникнення будь-яких екологічних ризиків [80].

Для контролю захворювання Сомервіль та ін. [81] рекомендують належну сільськогосподарську практику (GAP) і належну гігієнічну практику (GHP) у бджільництві. Це заходи профілактики, які включають всі загальні та профілактичні процедури, щоб не допустити потрапляння хвороби на незаражені пасіки. У разі клінічних ознак або підозри на АГ обов'язком, в тому числі юридичним, кожного в ланцюгу біологічного та харчового виробництва, від пасічників до ветеринарів на полі, ветеринарів у лабораторії та ветеринарних інспекторів, є вжиття відповідних заходів та процедур. Належні практики включають: гігієну пасіки; регулярні перевірки колоній; поточна дезінфекція при роботі на пасіках; огляд куплених бджолиних сімей і спійманих сімей; використання стерилізованих гребінчастих основ, виготовлених відповідно до систем аналізу небезпек і критичних контрольних точок (НАССР); лабораторне обстеження прикорму; особливу увагу приділяють при прийнятті здичавілих роїв [31,36,82-84].

Для успішної боротьби із захворюванням та запобіганню його поширення необхідно якомога швидше вжити всіх необхідних заходів. Серед пунктів, що зазначені в керівництві FAO можна виділити основні, серед яких [53]:

- знищення шляхом спалювання заражених сімей (стільников і медоносних бджіл; вулики, якщо вони в хорошому стані, можна продезінфікувати). Цей захід рекомендований у разі запущеної стадії захворювання, слабких сімей або низької поширеності захворювання на пасіці.

- ретельна дезінфекція всіх об'єктів, які використовуються для маніпуляцій з інфікованими вуликами, включаючи обладнання, яке використовується пасічником для роботи (наприклад, вуличний інструмент, рукавички, костюм, медогонка тощо).



- метод шокового струшування, що полягає у струшуванні бджіл із заражених стільників у чистий вулик з новим фундаментом.

Серед загальних профілактичних заходів рекомендовано:

- слідкувати за тим, щоб сім'ї завжди мали запаси їжі (пилкок і мед);
- не використовувати підозрілий не перевірений мед для підгодівлі бджіл;
- не переміщувати рамки з одного вулика в інший, не переконавшись у відсутності ознак захворювання;
- оновлювати рамки зі стільниками кожні два-три роки (приблизно 30 відсотків рамок кожного року).
- вилучити матку із заражених колоній на термін виведення нової матки [53].

Щоб підтвердити підозру на захворювання або відстежити поширеність заражених личинок, різні продукти з вулика медоносної бджоли (наприклад, мед, бджоли, віск, пилкок, сміття) можуть бути відібрані для лабораторного аналізу [39]. Діагностика захворювання за зразками меду та дорослих бджіл має вищу прогностичну цінність порівняно з виявленням бактерій у зразках воску, пилку та залишків [85, 86]. Регулярний моніторинг захворювання важливий, тому що якщо АГ не виявити та не лікувати, це призведе до втрати інфікованої сім'ї [87] та стане основним джерелом інфекції для сусідніх колоній [39].

### *Лікування*

Стратегії лікування ЄГ подібні до підходів до АГ. Застосування антибіотиків обмежено в багатьох країнах, а для контролю ЄГ рекомендовано використовувати метод «струшеного рою». Однак, спалювання колоній з важкими симптомами захворювання широко використовується [46].

У разі спалаху АГ мають бути дотримані всі положення, що стосуються заходів і процедур раннього виявлення, моніторингу, профілактики, контролю, локалізації та ліквідації захворювання [27,31,32,83,32,88]. Бджільництво повинно бути організовано в асоціації, адже це найкращий спосіб боротьби з недбалістю

окремих бджолярів. Всі учасники процесу бджільництва (пасічники, ветеринари, садівники, агрономи, екологи) повинні пройти навчання через зустрічі з обміном досвідом, експертні лекції. Індивідуальні бджолярі, бджільничі організації, клінічні ветеринарні служби, лабораторії та ветеринарні інспектори повинні працювати разом для досягнення цієї мети [88]. Одним зі способів боротьби із захворюваннями бактеріальної етіології є знищення заражених бджолиних сімей шляхом їх спалювання та захоронення для переробки з метою реалізації частини заходів, спрямованих на ліквідацію хвороб. Ще одним заходом у ланцюжку ліквідації хвороби виявилася дезінфекція пасік [34].

Ознайомлення ветеринарних служб, бджолярів і бджільничих організацій з відповідними законодавчими нормами, хворобами бджіл і розплоду, GAP і GHP [30,32], належним управлінням бджільництвом і системами НАССР є основою успішного бджільництва.

Дікель та ін. провели перші експериментальні випробування пероральної вакцинації проти хвороби АГ, що є новою віхою в лікуванні хвороб бджіл та інших комах [89].

Сучасним перспективним напрямом профілактики і лікування бактеріозів бджіл є використання пробіотичних препаратів, які розроблені на основі асоціації мікроорганізмів нормофлори, виділених із кишківника бджіл та їх продуктів. Ці засоби розглядаються як альтернатива застосуванню антибіотиків, є екологічно безпечними та характеризуються комплексністю позитивної дії [90, 91].

### **1.3. Пробіотики та перспективи їх застосування у практичному бджільництві**

Пробіотичні культури— це штами мікроорганізмів, що є представниками нормальної мікрофлори кишківника макроорганізму (людини, тварин, комах, птиці, тощо) [91], препаратами пробіотичної дії або пробіотиками називають лікувально-профілактичні засоби, що сконструйовані на основі специфічних мікроорганізмів людини чи тварин [15, 16].

Сучасне бджільництво зазнає значних збитків під впливом низки негативних чинників, до яких належать і бактеріальні хвороби. Вони є причиною смертності бджіл, а також знижують резистентність організму до збудників хвороб, несприятливих чинників довкілля, знижують силу сімей і, як наслідок, зменшують їх продуктивність [92 – 100].

Дослідження збалансованої кишкової мікробіоти часто пов'язують з превентивними підходами до контролю та попередження зараження макроорганізму, зокрема бджіл, різними патогенами та/або паразитами [101, 102].

Присутність молочнокислих бактерій в кишківнику бджіл доведена низкою досліджень [16, 103]. Показано, що саме задня кишка медоносних бджіл (*Apis mellifera L.*) колонізована великою спільнотою в межах роду *Lactobacillus* [15, 104].

На сьогоднішній день близько 36 видів *Lactobacillus* були прийняті як харчові та внесені до списку QPS [105], тому вони настільки широко використовуються в харчовій промисловості для виробництва ферментованих харчових продуктів і як захисні культури [106, 107]. На додаток до властивостей підкислення, *Lactobacillus spp.* може синтезувати широкий спектр антимікробних сполук (АС), що протидіють патогенним мікроорганізмам, таким як *Staphylococcus aureus* [108].

Складні мікробні спільноти трапляються практично в кожному місці на тілі людини, а ті, що пов'язані зі шлунково-кишковим трактом, є домівкою для величезної кількості бактерій, які викликають особливу зацікавленість через їх різноманітний вплив на здоров'я господаря [18]. За останнє десятиліття численними дослідженнями доведено характерне й відносно стабільне співтовариство, присутнє в кишківнику всіх здорових робочих бджіл [18, 19, 109-111]. На сьогодні дослідження мікробіоти кишківника медоносної бджоли показують, що вона впливає на харчування господаря, збільшення ваги, ендокринну передачу сигналів, імунну функцію та стійкість до патогенів [18, 112]. Тому визначення видового складу нормофлори кишківника є актуальним напрямом досліджень і слугує теоретичним та експериментальним обґрунтуванням сучасних підходів до корекції обмінних процесів у бджіл, біостимулювання їх захисних сил

і продуктивності, практичних схем профілактики й лікування інфекційних хвороб, отримання органічної продукції [20, 90, 113].

Одним із напрямів практичного застосування знань про мікробіоту кишківника медоносної бджоли є конструювання на її основі специфічних пробіотичних засобів [19]. Їх використання у ветеринарній медицині зарекомендувало себе як безпечний та ефективний спосіб нормалізації нормофлори шлунково-кишкового тракту тварин [114 - 117]. Мікробіомний склад нормофлори кишківника бджіл містить велику кількість молочнокислих бактерій, що володіють пробіотичними властивостями [19, 118]. Дослідження мікробіоти кишківника бджіл відбувається за такою схемою: виділення бактерій нормофлори, їх ідентифікація, виявлення складу стабільного співтовариства, специфічного для бджіл роду *Apis mellifera* та вивчення його впливу на життєдіяльність бджоли, що має вагомим практичне значення для конструювання нових екологічно безпечних препаратів [18, 118, 119]. Специфічні пробіотики для бджіл, виготовлені на основі бактерій нормофлори їх кишківника, можуть бути ключем до вирішення багатьох проблем галузі, а також забезпечення людства екологічно безпечними продуктами бджільництва [120].

Робоча бджола проходить чотири чіткі фази розвитку: яйце, личинка, лялечка, доросла комаха [121]. Абсолютна чисельність кишкових бактерій різко змінюється на цих стадіях [119]. Кожен вулик містить одну матку, здатну відкласти 1000–2000 яєць на день за сприятливих умов [122]. Запліднене яйце відкладається в окрему робочу комірку, де з нього вилуплюється личинка, яку годують дорослі робочі особини, що мають назву бджіл-годувальниць [123]. Кишківник личинок містить мало бактеріальних клітин, часто занадто мало, щоб їх можна було виявити за допомогою стандартних протоколів ПЛР або мікроскопії з використанням флуоресцентної гібридизації *in situ* [119]. Декілька видів бактерій, характерних для дорослих особин, були виявлені в кишківнику личинок [112, 124], проте личинкові кишкові бактерії, здається, здебільшого потрапляють з їжею, яку дають дорослі бджоли-годувальниці [17], та, імовірно, є тимчасовими, а не стабільними колонізаторами. Наприкінці личинкової стадії бджоли-годувальниці будують

восковий ковпачок, який закриває комірку перед початком стадії лялечки. Також на цьому етапі ліквідується перегородка, яка розділяє середню й задню кишки під час личинкової стадії [112, 124, 125]. Також перед початком і перед завершенням періоду лялечки зовнішній скелет, включно зі слизовою оболонкою кишечника, скидається (цей процес називається екдизисом), усуваючи будь-які бактерії, які могли бути присутніми в середній кишці личинки до початку розвитку лялечки. Після завершення метаморфозу доросла бджола прогризає восковий ковпачок.

Новонароджені робочі бджоли майже вільні від бактерій [119, 126, 127], хоча деякі бактерії можуть бути отримані під час прогризання [110]. Кишкові бактерії, отримані медоносними бджолами на стадії личинки, очищаються під час переходу у стадію лялечки, а нові спільноти утворюються після появи дорослої особини через контакт із сусідами та/або поверхнею гнізда [119, 128, 129]. Збільшується кількість бактерій у кишечнику логарифмічно, поки спільнота не стабілізується на рівні  $10^8$ – $10^9$  бактеріальних клітин приблизно через 4 дні після народження [18, 129].

Незважаючи на те, що мікробіота шлунково-кишкового тракту людини складніша, спільнота кишківника бджіл дає можливість зрозуміти процеси, які керують формуванням спеціалізованих асоціацій, а також шляхи, якими вони впливають на біологію господаря [110].

За останнє десятиліття в результаті застосування різноманітних підходів до вивчення нормофлори кишківника бджіл було виявлено характерне й відносно стабільне бактеріальне співтовариство, присутнє в кишківнику всіх здорових дорослих робочих бджіл. Ця спільнота робить суттєвий внесок у травлення, розвиток кишківника, збільшення ваги та стійкість до патогенів, у ній домінує обмежена кількість бактеріальних ліній, які живуть лише в кишківнику бджіл. Ці види можна виділяти, ідентифікувати та культивувати, здійснювати подальше вивчення співвідношення штамів окремих бактерій у співтоваристві корисної мікробіоти кишківника та розробляти підходи до створення комплексних препаратів на їх основі [18]. Шведські дослідники менше 10 років тому виявили

велику невивчену бактеріальну мікробіоту в симбіозі з медоносними бджолами, розташовану в медовому шлунку [118].

Основною перевагою для дослідження нормофлори є те, що здорові особини мають просту й специфічну кишкову мікробіоту, яка присутня в медоносних бджіл, зібраних у всьому світі [130, 131]. Кишківник дорослих робочих бджіл містить особливу спеціалізовану мікробіоту, у якій домінують лише дев'ять кластерів видів бактерій, що становлять від 95% до 99,9% бактерій майже всіх особин, кожен із яких представляє комплекс споріднених штамів [132, 16]. Вісім бактеріальних симбіонтів є типовими для мікробіоти кишківника дорослої медоносної бджоли, включно з двома численними групами типу *Proteobacteria*, а саме *Snodgrassella alvi* (*Betaproteobacteria*) та *Gilliamella apicola* (*Gammaproteobacteria*), а також двома кластерами *Firmicutes* у межах роду *Lactobacillus* [16, 110, 133, 134, 135]. Серед грампозитивних бактерій кластери двох видів у межах типу *Firmicutes* також повсюдно поширені; їх називають групами *Lactobacillus Firm-4* і *Lactobacillus Firm-5*. Також у більшості дорослих особин трапляються скупчення видів *Bifidobacterium asteroides*, що належить до типу *Actinobacteria*, хоча й у меншій чисельності [16]. Менш численними й поширеними є також види *Proteobacteria Frischella perrara*, *Bartonella apis*, *Parasaccharibacter apium* та група видів, пов'язаних із *Glucobacter*, позначена *Alpha2*. Ці види мають обмежені ніші в кишківнику бджоли (*F. perrara*) або є загальними і трапляються також у середовищі вулика (*P. apium*, *Alpha2.1*), що може пояснити їх порівняно меншу частоту в дослідженнях кишківника медоносних бджіл [16]. Разом п'ять основних бактерій і чотири більш рідкісні бактерії становлять домінуючий набір того, що можна знайти в кишківнику медоносної бджоли. Тоді як інші бактерії іноді можуть бути присутніми, ці дев'ять представляють бактеріальні лінії, особливо пристосовані до життя поряд зі своїми бджолами-господарями. Відмінності між цими видами в чисельності й поширеності пов'язані, імовірно, з вузькоспеціалізованими локалізаціями або метаболічними нішами в кишківнику, як це зазвичай буває в інших тварин [136].

Ефективність використання пробіотичних препаратів давно відома та широко використовується для корекції різних патологічних станів у гуманній та ветеринарній медицині [136-138]. Препарати, що містять нормальну мікрофлору, з лікувальною метою використовувалися з найдавніших часів. І.І. Мечников уперше описав позитивний ефект, що спричиняється молочнокислими бактеріями на організм людини. Незважаючи на різноманітні формулювання поняття «пробіотики», більшість дослідників називає ними лікарські засоби, які містять як діючу речовину певні штами мікрофлори здорового організму людини. Відомо, що бактерії, які в нормі заселяють слизові, чинять антагоністичну дію щодо патогенної та умовно-патогенної мікрофлори, забезпечують вітаміно-синтезуючу й ферментативну функції [139]. Позитивний вплив пробіотиків, зокрема шляхом пересадки фекальної мікробіоти [137], використовується в комплексних схемах лікування ожиріння та метаболічних розладів [138], зокрема для стабілізації стану за нових випадків цукрового діабету [140]. Також дослідження мікробіомного складу шлунково-кишкового тракту може слугувати маркером запального процесу в організмі, зокрема за коронавірусної інфекції COVID-19 [141].

Корекція мікробіомного складу нормофлори шлунково кишкового тракту позитивно впливає на патогенез хронічного обструктивного захворювання легень, що, своєю чергою, полегшує клінічний стан пацієнта, знижує ризики розвитку ускладнень і рецидивів та пришвидшує одужання [142].

Найвідоміші мікроорганізми, що використовуються як основа біопрепаратів – лактобацили. Відомо про використання *Lactobacillus plantarum*, *L. fennentum*, *L. casei*, *L. amylovorus*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. reuleri*, *L. lactis* для виробництва пробіотиків [143]. Біфідобактерії – інша група мікроорганізмів, на основі яких базуються багато пробіотиків. Застосовують *Bifidobacterium animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. thermophilus* [144].

Основою ефективності пробіотичних препаратів є специфічність, саме тому для розроблення пробіотичного препарату для бджіл необхідно вивчити мікробіомний склад нормофлори кишківника саме цих корисних комах. Мікробіота кишківника бджіл складається приблизно із 40 штамів молочнокислих бактерій, з

них 13 штамів таксономічно належать до роду *Lactobacillus* (9 видів) [15] та *Bifidobacterium* (4 види).

Молочнокислі бактерії (Lactic acid bacteria, LAB) – це група бактерій, функціонально пов'язана з їх здатністю виробляти молочну кислоту під час гомочи гетероферментативного метаболізму. Загалом, деякі види LAB можуть виробляти біологічно активні сполуки, наприклад органічні кислоти, вільні жирні кислоти, етанол, бензоат, ферменти, перекис водню, антимікробні пептиди та антибіотики [145, 146]. Ці властивості разом створюють широкий спектр інгібуючих властивостей по відношенню до патогенів. Наскільки нам відомо, ця нова мікробіота LAB медоносних бджіл є однією з найбільших симбіотичних флор, які коли-небудь траплялися в одному організмі [147-149].

Встановлено, що ці симбіонти LAB однаково присутні та активні серед усіх медоносних бджіл (*Apis spp.*) і відібраних бджіл без жала, а також, відповідно, у їх щойно зібраному меді на всіх континентах світу [147-150]. Окрім їх ключової ролі у виробництві меду, наше дослідження показує, що симбіонти були еволюційно сформовані для синергічної роботи, щоб захищати бджіл від вхідних мікробних загроз, внесених з нектаром, зокрема декількома бактеріальними родами та дріжджовими грибами, виробляючи різні метаболіти, пептиди й білки [147, 151]. LAB-симбіонти створені для захисту своїх ніш, якими є медовий шлунок і продукти бджільництва (мед і бджолиний хліб) [46, 147, 149, 150]. Цими мікробними загрозами є бактерії, дріжджі та цвіль, що містяться у квітах і навколишньому середовищі.

Мікробні роди та родини, які зазвичай трапляються, – це *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus* та *Candida* [149]. Раніше ми помітили, що LAB-симбіонти реагують у синергічній речовині та захищаються, виділяючи різні активні сполуки, які пригнічують ріст інших мікроорганізмів. Такі цікаві чисельні варіації та виробництво різних активних сполук, здається, є добре налагодженим взаємним існуванням бджіл, симбіонтів LAB, квіткових нектарів та мікробних загроз, яке змінюється залежно від сезону й стану здоров'я бджіл [149].



Масова присутність життєздатних LAB ( $10^8$  LAB/г свіжого меду) [147, 149] актуалізувала гіпотезу про те, що ці нові LAB з їх активними біопродуктами можуть бути причиною того, що мед упродовж історії людства вважався антимікробним засобом [118]. Одним із найпоширеніших способів використання меду в історії людства є лікування ран. Можливе пояснення полягає в тому, що мед, який використовується в народній медицині, був свіжозібраним, містив велику кількість життєздатних та активних LAB під час нанесення на рани. Результати останніх досліджень показують, що LAB виробляє велику кількість передбачуваних протимікробних білків і пептидів [151]. LAB відчуває присутність інших небезпечних бактерій та починає виробляти речовини для свого захисту [118]. Зрештою, LAB гинуть через пару тижнів у зібраному зрілому меді через низький вміст води [118].

Після встановлення в кишечнику дорослої особини стабільного складу мікробіоти він змінюється незначно, незважаючи на сезонні зміни та зміни в раціоні, поведінці й експресії генів, які відбуваються, коли робочі бджоли перетворюються з бджіл-годувальниць на фуражирів [119, 152]. Різноманітність LAB можна пояснити різницею в поживному вмісті різних нектарів і пилку, а також різноманітністю мікроорганізмів, з якими вони зустрічаються, наприклад, у квітах. Перехідні квіткові мікроорганізмів викликають ріст резидентної мікробіоти LAB у медоносних бджіл та вироблення ними передбачуваних протимікробних білків [151], механізм, відомий для штамів LAB в інших нішах (наприклад, *Lactobacillus reuteri*) під час виробництва реутерину [153]. Результати дослідження обміну речовин демонструють, що метаболіти LAB у поєднанні діють синергічно та утворюють безліч біоактивних речовин. Коли вся мікробіота працює синергетично, створюється безліч антимікробних сполук, які залишаються в медовому шлунку та потрапляють у продукти бджільництва. Це може пояснити те, чому досі невідомі фактори, що впливають на антимікробні властивості меду, відрізняються залежно від типу меду [118]. На окрему увагу заслуговує розвиток напряму досліджень пробіотичних культур, пов'язаних із вивченням впливу постбіотиків на організм хазяїна. Постбіотиками (від лат. *post* – після, грец. *βίος* – життя) називають

продукти життєдіяльності пробіотичних бактерій або їх нежиттєздатні форми, які володіють біологічною активністю в організмі-хазяїні [154]. Постбіотики включають бактеріальні метаболічні побічні продукти, наприклад ферменти, пептиди, тейхоєві кислоти, бактеріоцини, органічні кислоти, етанол, діацетил, ацетальдегіди та пероксид водню.

Також встановлено, що деякі термічно інактивовані мікроорганізми можуть зберігати й деякі бактеріальні структури, які володіють біологічною активністю в господаря. Ці продукти обміну речовин мають властивості інгібіторів по відношенню до патогенних мікроорганізмів, а отже, можуть бути використані як альтернатива антибіотикам. Постбіотики є нетоксичними, непатогенними та стійкими до гідролізу сполуками, оскільки вони є нежиттєздатними бактеріальними продуктами або метаболічними побічними продуктами з пробіотиків [155, 156]. У деяких випадках постбіотики також можуть посилювати бар'єрну функцію проти певних видів мікроорганізмів, наприклад *Saccharomyces boulardii*, і покращувати ангиогенез *in vitro* й *in vivo* в епітеліальних клітинах шляхом активації рецепторів  $\alpha 2\beta 1$  інтеграну колагену. Подібні властивості були виявлені також у низки інших пробіотичних видів, а саме *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bacteroides fragilis*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli* та *Faecalibacterium prausnitzii*.

Постбіотики здійснюють також цитопротекторну функцію на клітини кишечника. Основний механізм, який лежить в основі цього явища, – сигналізація за допомогою рецепторів розпізнавання патернів (pattern recognition receptor (PRR) [157].

Медоносні бджоли також піддаються експериментам щодо впливу збурень на сформовану кишкову мікробіоту. Утримання колоній медоносних бджіл є недорогим, маючи 30–80 тисяч дорослих робочих особин на колонію [122], можна легко забезпечувати велику кількість особин для експериментів із великими розмірами вибірки. У дослідженнях порушень мікробіома дорослих робочих особин збирають і позначають, обробляють у лабораторії антибіотиками або хімікатами, а потім повертають у вулик, з якого вони були вилучені [158]. Цей

підхід можна використати для вивчення стійкості мікробіоти кишківника бджіл до збурень і для розуміння впливу ксенобіотиків, зокрема хімічних речовин, що застосовуються для сільськогосподарських культурах, які бджоли-фуражники можуть транспортувати назад у вулик [159, 160], на поведінку та здоров'я бджіл. Крім того, ізоляти бактеріальних патогенів, що походять від хворих медоносних бджіл, можна використовувати для оцінювання ролі мікробіоти кишківника бджіл у стійкості до колонізації патогенними мікроорганізмами [157].

Таким чином, наведені дані літератури показують, що актуальним напрямом досліджень є розроблення і впровадження в практику бджільництва екологічно безпечних заходів і препаратів комплексної дії для профілактики і лікування інфекційних хвороб бджіл. Такий підхід може реалізовуватися як спільним застосуванням низки відповідних заходів і засобів, так і одним препаратом комплексної дії [113, 161, 162]. До таких засобів належать пробіотики.

В Україні на цей час розроблено та зареєстровано лише один специфічний пробіотик для бджіл - «Апінормін», що містить у своєму складі асоціацію мікроорганізмів нормофлори кишківника, виділених з українських порід бджіл роду *Apis mellifera*, а саме *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum* та *Enterococcus faecium* [19, 111]. Впровадження в практику подібного препарату вимагає виконання низки наукових досліджень:

- виділення бактерій нормофлори кишківника бджіл та дослідження їх культурально-морфологічних характеристик та біохімічних властивостей;
- визначення впливу пробіотичних бактерій на штами збудників бактеріальних хвороб бджіл *in vitro* та на рівні макроорганізму;
- доведення специфічності дії та нешкідливості пробіотичного препарату на основі бактерій нормофлори в природніх умовах та обґрунтування можливості їх використання за європейського гнильцю бджіл.

Вирішенню поставлених завдань присвячена дана робота.

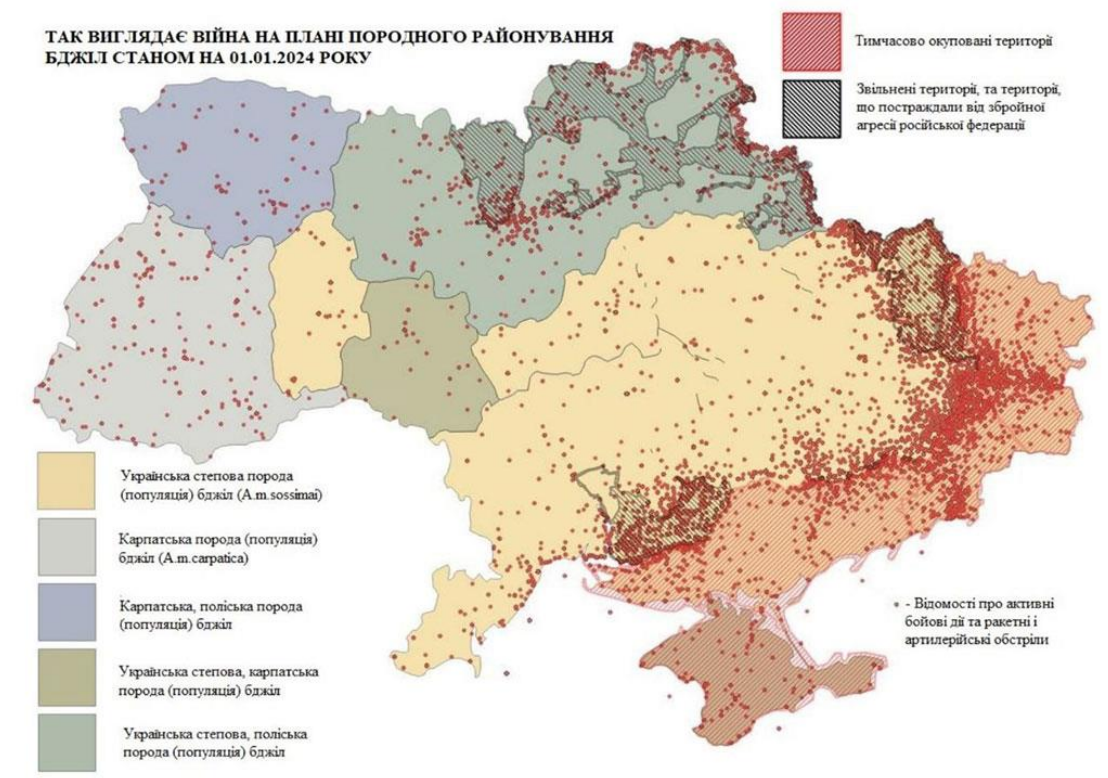
## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Матеріали, об'єкти, схема та умови проведення досліджень

Матеріалами дисертаційної роботи є результати власних досліджень, виконаних у продовж 2020-2023 рр. на кафедрі епізоотології, мікробіології та вірусології Національного університету біоресурсів і природокористування України та на базі лабораторії технологічних та спеціальних заходів профілактики хвороб бджіл Національного наукового центру «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича». Дослідження проводили згідно загальної схеми (рис. 2.1).

У процесі виконання дисертаційної роботи реалізовано 3 етапи досліджень. Перший етап полягав у виділенні нормофлори кишківника бджіл, другий - у визначенні характеристик пробіотичного засобу в лабораторних умовах та проведенні науково-виробничих випробувань дослідного препарату. На третьому етапі досліджень, на підставі отриманих результатів, розроблено рекомендовані схеми застосування пробіотику «Апінормін» у практичному бджільництві.

В роботі використано бджіл виду *Apis mellifera*, підвиду *Apis mellifera sossimai* (українська степова порода), що знаходилися на дослідних пасіках Національного наукового центру «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича». Вибір даної породи обґрунтовано аналізом пориреності різних порід бджіл на території України. Результати даного дослідження показали, що більше 80% бджіл, що використовуються в сільському господарстві України відносяться до виду *Apis mellifera*, підвиду *Apis mellifera sossimai* (українська степова порода) (рис. 2.1).



**Рис. 2.1 Карта поширеності порід бджіл на території України станом на 1.01.2024 р. [163]**

Для проведення досліджень в лабораторних умовах льотних бджіл літньої генерації було відібрано в садки в період активного медозбору. Для створення ряду аналогів садки з бджолами зважувались до відбору бджіл (пусті) та з бджолами. Садки з комахами, відібраними в дослід розміщувались і утримувались в термостаті при температурі 30°C, за відсутності інсоляції.

### 2.1.1 Мед

Для дослідження відібрано та використано 120 зразків свіжовідкачаного меду бджолиного, що надходив до лабораторії якості та безпечності продукції бджільництва ННЦ «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича» протягом 2020- 2023 років. Проби меду, що використовувались у досліді, відібрано на приватних пасіках Київської області та надіслано до лабораторії не пізніше ніж через 12 годин після відкачування. При відборі зразків враховували ботанічне походження меду, територіальне розміщення пасіки, сезон та кліматичні умови в період заготівлі продукту комахами та викачування меду. В дослідну групу ввійшли зразки меду з акації та соняшника, а також різнотрав'я (Таблиця 2.1).

Таблиця 2.1

**Кількість відібраних проб меду згідно ботанічного походження**

Рік відбору зразка	Ботанічне походження та кількість відібраних проб, шт		
	Акацієвий травень-червень	Різнотрав'я червень-липень	Соняшниковий серпень
2021	10	15	15
2022	10	15	15
2023	10	15	15

Згідно періоду цвітіння медоносних рослин і терміну, необхідного на заготівлю меду комахами, відбір проб здійснювали в різні сезони. Мед з акації відбирали навесні, а саме в період з травня до червня, відбір меду з різнотрав'я - в період з червня по липень, а меду з соняшника - з липня по серпень.

**2.1.2 Штами мікроорганізмів**

Основними видами для дослідження було обрано *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum* та *Enterococcus faecium*.

Вибір даних мікроорганізмів обумовлено даними літератури, що підтверджують присутність значної кількості даних бактерій у кишківнику бджіл та доведеними їх пробіотичними властивостями [15-20, 90, 103, 108-113]. Умови виділення культур дослідних бактерій варіювали в залежності від виду бактерій і будуть наведені в наступних розділах.

В дослідних зразках було виявлено ріст наведених вище видів мікроорганізмів у різних кількостях (Таблиця 2.2).

Таблиця 2.2

**Види мікроорганізмів, виділені із досліджуваних зразків**

Вид бактерії	Кількість зразків	
	шт	%
<i>Lactobacillus plantarum</i>	117	97,5

<i>Bifidobacterium bifidum</i>	98	81,7
<i>Enterococcus faecium.</i>	101	84,2

### 2.1.2 Специфічний пробіотик для бджіл «Апінормін»

В якості модельного зразку для дослідження впливу пробіотиків на організм бджіл та для експериментального обґрунтування перспектив використання пробіотиків для профілактики бактеріальних хвороб бджіл, а також ефективність за європейського гнильцю було обрано препарат «Апінормін». Даний засіб є ветеринарним препаратом, що зареєстрований в Україні у 2018 році (реєстраційне посвідчення № ВВ-00861-02-18). і призначений для використання у бджільництві. В своєму складі містить бактерії-представники нормальної мікрофлори кишківника бджіл, а також захисне та поживне середовища і цукор.

Згідно РП препарат містить бактерії виду *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* та *Enterococcus spp.*, поживне та захисне середовища і цукор (Таблиця 2.3). Загальне мікробне число молочно-кислих мікроорганізмів становить  $1-5 \times 10^9$  КУО/г.

Таблиця 2.3

#### Склад препарату «Апінормін» (згідно РП)

Назва складника	Кількість
<i>Lactobacillus spp.</i>	$1-5 \times 10^9$ КУО/г
<i>Bifidobacterium spp.</i>	$1-5 \times 10^8$ КУО/г
<i>Enterococcus spp.</i>	$1-5 \times 10^8$ КУО/г
Сахарозо-желатинове захисне середовище	18%
Казеїново-дріжджове поживне середовище	5%
Цукор мелений	77%

Згідно додатку до РП препарат призначений для профілактики та лікування ряду захворювань бджіл різної етіології, зокрема європейського гнильцю (Додаток

А). Склад даного продукту обумовлює ефективність його використання для підвищення продуктивності та резистентності бджолиних сімей, а отже здатності боротися зі збудниками інфекції [19].

Аноліт – це екологічно чистий електрохімічно активований розчин універсального призначення: для дезінфекції, передстерилізаційного очищення, стерилізації та антисептичної обробки. Дана речовина отримана в результаті дії електричного струму на звичайну воду, яка, в результаті, стає не лише стерильною, але й набуває дезінфікуючих властивостей широкого спектру дії [166]. На відміну від поширених дезінфектантів, Аноліт не має негативного впливу на організм людини і тварин, а також не шкодить екосистемі [167]. Окремими дослідженнями було доведено, що Аноліт також є нешкідливим для бджіл [168].





Рис. 2.1 Загальна схема досліджень

## 2.2. Методи досліджень

### 2.2.1. Дослідження нормофлори

#### 2.1 Виділення пробіотичних мікроорганізмів з меду бджолиного

На першому етапі досліджень виготовляли селективні поживні середовища: MRS-бульйон по 5 мл у пробірках, MRS-агар, агар Ендо із сухих комерційних концентратів фірми Himedia (Індія), біфідобактеріум – агар Him Labs Inc (Індія). Середовища виготовляли за наведеним на упаковці прописом. Агаризовані поживні середовища розливали в чашки Петрі. Підготовку проб меду здійснювали згідно з ДСТУ 8684:2016. На чашки Петрі з агаризованими середовищами наносили MRS-агар, агар Ендо із сухих комерційних концентратів фірми Himedia, біфідобактеріум агар Him Labs Inc, висівали «штрихом» суспензію свіжовідкачаного меду, прокультивованого на MRS-бульйоні [113]. Усього по три пробірки та по три чашки кожного зразка меду на кожне окреме агаризоване середовище. Експозиція пробірок та чашок тривала 24–48 год. у термостаті при температурі 30°C [111]. Ідентифікували пробіотичні бактерії та досліджували їх біохімічні властивості за відомими методиками [164, 165].

Підготовку проб проводили згідно з ДСТУ ISO 6887-1:2003 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Готування досліджуваних проб, вихідної суспензії та десятикратних розведень для мікробіологічного досліджування. Частина 1. Загальні правила готування вихідної суспензії та десятикратних розведень (ISO 6887-1:1999, IDT) [174].

Виявлення бактерій родини *Enterobacteriaceae* згідно ISO 21528-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae — Part 1: Detection of Enterobacteriaceae. Виявлення ентерококів проводили згідно ДСТУ 8534:2015 Продукти харчові. Метод виявлення та визначання кількості ентерококів.

Виявлення патогенних мікроорганізмів *Salmonella* проводили згідно ДСТУ EN 12824:2004 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення *Salmonella* (EN 12824:1997, IDT).

Культивування мікроорганізмів проводили згідно ДСТУ 8535:2015 Продукти харчові. Методи культивування мікроорганізмів.

Полюві ізоляти бактеріальних штамів отримували шляхом культивування проб свіжовідкачаного меду на специфічних поживних середовищах, після чого визначали їх культурально-морфологічні та біохімічні властивості [111, 113].

Світлове мікроскопіювання використовували для дослідження 12-годинних культур бактерій, вирощених на напіврідкому середовищі MRS, з яких виготовляли мазки на предметному склі, фіксували та фарбували за Грамом. Мікроскопіювали при збільшенні 100\*10 з імерсією. Спостерігали палички та коки різної товщини, розташовані поодинокі, в ланцюжках різної довжини [91, 111, 113].

#### *Визначення культурально-морфологічних та біохімічних властивостей*

Для дослідження культурально-морфологічних ознак бактеріальних клітин з середовищ із МРС агаром, де спостерігався ріст колоній, відбиралися проби і виготовлялися мазки, які, в подальшому, фарбувалися за Грамом та досліджувалися з використанням імерсійного об'єктива світлового мікроскопа [169]. Для ідентифікації бактерій, наявних в мазках оцінювали забарвлення за Грамом, наявність спор, форму і розмір клітин. Для виявлення біохімічних властивостей отриманих бактерій проводили дослідження з визначення здатності культур до розщеплення ряду цукрів Гіса, газоутворення та зміни рН середовища [91, 111, 113].

#### *Визначення антагоністичних властивостей*

Для того щоб визначити антагоністичний вплив на збудника захворювань бджіл, а саме *Str. pluton*, а також *Bac. subtilis* та *E. coli* у пробірки з MRS-бульйоном висівали зразки меду – по 0,5 г кожного. Їх культивували 24 год. при

37 °С. Після ідентифікації культур за культурально-морфологічними властивостями накопичували біомасу кожної окремо до концентрації клітин за стандартом каламуті  $1,0 \times 10^6$  клітин/1,0 мл. На стерильні диски з фільтрувального паперу діаметром 1,0 см наносили суспензію добової культури *L. Plantarum*, *E. faecium*, *Bif. bifidum* з концентрацією 1 млрд клітин/см<sup>3</sup> кожної відповідно. Паралельно готували суспензії *Str. pluton*, *Bac. subtilis*, *E. coli* та в стерильних умовах наносили на паперові диски з попередньо нанесеними культурами *L. plantarum*, *E. faecium*, *Bif. bifidum*, окремо один від одного, по одній краплі, з концентрацією  $1,0 \times 10^6$  клітин/1,0 мл. Антагоністичні властивості *L. plantarum*, *E. faecium*, *Bif. Bifidum* до штамів *Str. pluton*, *Bac. subtilis*, *E. Coli* визначали культивуванням на триптон-соєвому агарі (ТСА) паперових дисків із різними варіантами нашарованих одна на одну добових культур: *L. plantarum* + *Str. pluton*; *L. plantarum* + *Bac. subtilis*; *L. plantarum* + *E. coli*; *E. faecium* + *Str. pluton*; *E. faecium* + *Bac. subtilis*; *E. faecium* + *E. coli*; *Bif. bifidum* + *Str. pluton*; *Bif. bifidum* + *Bac. subtilis*; *Bif. Bifidum* + *E. coli* у термостаті при температурі (37±0,5) °С протягом 48 год. Контролем слугували одночасно висіяні культури *L. plantarum*, *E. faecium*, *Bif. bifidum*, *Str. pluton*, *Bac. subtilis*, *E. coli* на середовищі культивування ТСА (триптон соєвий агар) з концентрацією клітин не менше ніж  $1,0 \times 10^6$ /1,0 мл, які окремо одну від одної наносили на стерильні паперові диски. Статистичне оброблення отриманих результатів проводили методом варіаційної статистики в програмі Excel [111, 113].

### 2.2.2. Визначення властивостей пробіотичних засобів

#### *Дослідження нешкідливості*

Для визначення нешкідливості пробіотичного засобу «Апінормін» перед застосуванням його активують у воді без хлору (1:3–7) і згодовують бджолам у кількості 4 г на бджолину сім'ю; у літній період – можливе також застосування шляхом обприскування рамок з бджолами та стінок вуликів 4 г на 400 мл питної води [20].

Досліди за лабораторних умов проведені на льотних бджолах літньої генерації, відібраних у садки безпосередньо перед дослідом. Пероральну дію пробіотичного препарату “Апінормін” визначали шляхом згодовування дослідним бджолам цукрового сиропу з препаратом в дозі 8, 4, 0,8 і 0,4 г на сім’ю. А контактну дію – шляхом обприскування тіла бджіл водним розчином препарату в цих же концентраціях. Препарат згодовували бджолам двічі з інтервалом 7 днів протягом 24 годин з 50 % цукровим сиропом. Перше згодовування препарату проводили в день відбору бджіл для дослідю. Обробляли тіло бджіл водним розчином препарату з дрібнодисперсного обприскувача також двічі в дати згодовування препаратів. Піддослідних комах утримували в термостаті за температури 34–35 °С та відносної вологості 60–70 % без інсоляції. Один варіант – одна концентрація. На варіант 3 повторності по 50 бджіл. Облік смертності бджіл проводили кожні 48 годин протягом 2-х тижнів від початку дослідю [20].

Досліди за природних умов проведено на пасіці ННЦ “Інститут бджільництва імені П. І. Прокоповича” на бджолах *Apis mellifera* української степової породи. Було досліджено ефективність препарату “Апінормін” в дозі 4 г на сім’ю. Сім’ї на момент дослідження в основному мали по 6–7 рамок, обсиджених бджолами. Ефективність застосування препарату “Апінормін” порівнювалась з контролем – сім’ями, які отримували тільки воду в дні обробок дослідних сімей препаратом. На варіант брали по 3 сім’ї. Оброблювали бджолині сім’ї 4 рази. Для цього згодовували препарат із 50 % цукровим сиропом (у дозі 1 л на сім’ю) в дозі 4 г на сім’ю з одночасним обприскуванням тіла бджіл та розплоду водним розчином дослідного препарату в аналогічній дозі з інтервалом 7 діб із розрахунку 10 мл на вуличку. Спостереження за дослідними сім’ями тривали до припинення матками яйцекладки, пов’язаного з настанням осінньо-зимового періоду. Дані оброблені статистично з використанням програми MS Excel [20].

### Дослідження специфічності дії

Дослідження специфічності проводили шляхом порівняння ефективності препарату для бджіл «Апінормін» та препаратів для інших видів тварин та людини. В дослідженні використовували наступні пробіотичні засоби: «Апінормін» – пробіотик для бджіл, до складу якого входять штами мікроорганізмів, виділених з кишківника здорових бджіл: *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* [19]; «Бажана» – пробіотик для людей, діючою речовиною якого є: комбінація ліофілізованих дріжджів (*Saccharomyces boulardii*), 2-х пробіотичних штамів (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*) та пребіотик інουλін [170]; «Імунобактерин Д» – ферментно-пробіотична кормова добавка для свійських тварин, птиці, котів і собак, що містить: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, ксиланазу, протеазу, амілазу [171]; «Purina ProPlan FortiFlora» – кормова добавка з пробіотиком для собак та цуценят, що містить *Enterococcus faecium*, вітаміни, а також комплекс макро- і мікроелементів [172] (табл. 2.4.) [120].

Таблиця 2.4.

### Склад пробіотичних штамів у препаратах для різних видів тварин [120]

№ п/п	Назва препарату	Вид мікроорганізму	Кількість штамів
1	«Апінормін»	<i>Lactobacillus plantarum</i> УКМ В-2693, <i>Bifidobacterium bifidum</i> ІМВ В-7,68, <i>Enterococcus faecium</i> LK-50	1–5×10 <sup>9</sup> *КУО/Г 1–5×10 <sup>8</sup> *КУО/Г 1–5×10 <sup>8</sup> *КУО/Г
2	«Бажана»	<i>Saccharomyces boulardii</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Інулін	2,5×10 <sup>9</sup> *КУО 2,5×10 <sup>9</sup> *КУО 1×10 <sup>9</sup> *КУО 3500 мг (mg)
3	«Імунобактерин Д»	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	6×10 <sup>9</sup> *КУО/Г 6×10 <sup>9</sup> *КУО/Г
4	«Purina ProPlan FortiFlora»	<i>Enterococcus faecium</i> SF68 NCIMB 10415 (4b1705)	1×10 <sup>12</sup> *КУО/кг (kg)

Досліди за лабораторних умов проведені на льотних бджолах літньої генерації, відібраних у садки безпосередньо перед дослідом в червні місяці 2022 року. Вплив згодовування пробіотичних препаратів («Апінорміну» для бджіл, «Бажани» для людей, «Імунобактерину Д» для свійських тварин і «Purina ProPlan FortiFlora» для собак) на природне відмирання бджіл визначали шляхом згодовування дослідним бджолам цукрового сиропу з препаратом в дозі 4 г на сім'ю. Препарати згодовували бджолам двічі з інтервалом 7 днів протягом 24 годин з 50% цукровим сиропом. Перше згодовування препарату проводили в день відбору бджіл в дослід. Між згодовуванням дослідних препаратів комах годували чистим 50% цукровим сиропом. Піддослідних комах утримували в термостаті за температури 37 °С та відносної вологості 60–70%. Доступ до води був обмежений. Комах утримували в термостаті без освітлення. Одночасно в досліді були задіяні 5 варіантів по 4 повторності в кожному. Кожна повторність містила 50 бджіл. Облік смертності бджіл проводили кожні 48 годин протягом двох тижнів від початку досліду. Дані оброблені статистично за допомогою MS Excel [120].

### 2.2.3. Оцінка якості меду бджолиного

Для дослідження використовували свіжовідкачаний мед бджолиний, що надходив до лабораторії з метою оцінки його якості. Дослідження проводились на базі лабораторії оцінки якості та безпечності продукції бджільництва ННЦ «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича» в межах робочої програми № ДР 0121U108509 «Розроблення критеріїв оцінки якості та безпечності продукції бджільництва». Проби меду досліджували відповідно до ДСТУ 4497:2005 «Мед натуральний. Технічні умови».

Дослідження якості меду полягали в оцінці органолептичних та фізико-хімічних властивостей меду, а також мікробіологічної безпечності. Серед органолептичних показників визначали колір, смак, аромат, консистенцію, ступінь кристалізації, наявність ознак бродіння та механічних домішок в меді.

Дані показники досліджують за допомогою органів чуття дослідника (зір, нюх, смак) без використання додаткового обладнання [173].

Серед фізико-хімічних показників визначали масову частку води, діастазне число, вміст гідроксиметилфурфуролу (ГМФ), а також проводили пилковий аналіз меду. Для визначення масової частки води підготовлену пробу меду поміщають на призму рефрактометра і вимірюють коефіцієнт заломлення. Отримані данні згідно таблиці перераховують на масову частку води (табл. 2.5.) [173].

*Таблиця 2.5.*

**Визначення масової частки води [173]**

Коефіцієнт заломлення	Масова частка води, %	Коефіцієнт заломлення	Масова частка води, %	Коефіцієнт заломлення	Масова частка води, %
1,5044	13,0	1,4935	17,2	1,4830	21,4
1,5038	13,2	1,4930	17,4	1,4825	21,6
1,5033	13,4	1,4925	17,6	1,4820	21,8
1,5028	13,6	1,4920	17,8	1,4815	22,0
1,5023	13,8	1,4915	18,0	1,4810	22,2
1,5018	14,0	1,4910	18,2	1,4805	22,4
1,5012	14,2	1,4905	18,4	1,4800	22,6
1,5007	14,4	1,4900	18,6	1,4795	22,8
1,5002	14,6	1,4895	18,8	1,4790	23,0
1,4997	14,8	1,4890	19,0	1,4785	23,2
1,4992	15,0	1,4885	19,2	1,4780	23,4
1,4987	15,2	1,4880	19,4	1,4775	23,6
1,4982	15,4	1,4875	19,6	1,4770	23,8
1,4976	15,6	1,4870	19,8	1,4765	24,0
1,4971	15,8	1,4865	20,0	1,4760	24,2
1,4966	16,0	1,4860	20,2	1,4755	24,4



1,4961	16,2	1,4855	20,4	1,4750	24,6
1,4956	16,4	1,4850	20,6	1,4745	24,8
1,4950	16,6	1,4845	20,8	1,4740	25,0
1,4946	16,8	1,4840	21,0		
1,4940	17,0	1,4835	21,2		

Допустима розбіжність між двома випробуваннями не повинна перевищувати 0,1% [173].

Для визначення діастазного числа використовується 0,2М ацетатний буферний розчин з рН 5,0, розчин крохмалю, комбінований реактив та розчин меду (проба). Дослідження ґрунтується на вимірюванні оптичної густини зразків за допомогою фотоелектроколориметра проти води. Діастазне число меду ( $X_3$ ), од. Готе, в перерахунку на 1 г безводної речовини вираховують за формулою [173]:

$$X_3 = \frac{(D_K - D_D) \cdot 100 \cdot 80}{D_K (100 - W)},$$

де  $D_K$  – оптична густина зразка з дистильованою водою;

$D_D$  – оптична густина зразка з розчином меду, що його випробовують;

80 – коефіцієнт перерахунку;

$W$  – масова частка води в меду, %.

За кінцевий результат беруть середнє арифметичне результатів двох випробувань. Допустима розбіжність між двома випробуваннями не повинна перевищувати 0,5 од. Готе [173].

Для визначення ГМФ використовують розчин барбітурової кислоти, розчин партолуїдину, реактив Керреса та розчин меду (проба). Суть дослідження полягає у вимірюванні оптичної густини досліджуваного розчину проти контрольного щохвилини протягом 6 хвилин [173].

Вміст ГМФ, мг у 1 кг меду визначають за формулою:

$$\text{ГМФ} = E \times 192,$$

Де  $E$  – максимальне значення вимірної оптичної густини;

192 – постійний коефіцієнт.

За кінцевий результат беруть середнє арифметичне результатів двох випробувань. Допустима розбіжність між двома випробуваннями не повинна перевищувати 0,5 мг/кг [173].

Для проведення пилкового аналізу меду готують розчин досліджуваного зразка, центрифугують при 2500-3000 об./хв. і зливають надосадову рідину. З осаду відбирають 1 краплю, переносять на предметне скло, підсушують, додають 1 краплю спиртового розчину фуксину для фіксації та накривають покривним скельцем. Зразок досліджують під мікроскопом при збільшенні 1000 x [173].

Для визначення видового складу пилкових зерен беруть краплю підготовленої проби вміщують в камеру Горяєва для підрахунку пилкових зерен та оцінки їх видового різноманіття. Під мікроскопом нараховують не менше 200 пилкових зерен, реєструють їх видовий склад відповідно до додатка, що містить зображення та характеристику пилкових зерен різних видів рослин. Кількість пилкових зерен кожного виду розраховують за формулою [173]:

$$X = 100a/b,$$

де  $X$  – кількість пилкових зерен кожного виду, %;

$a$  – підраховане число пилкових зерен кожного виду, шт.;

$b$  – загальне число підрахованих пилкових зерен

Мед, що використовувався для виділення пробіотичних бактерій, було надано в лабораторію методів оцінки якості та безпечності продукції бджільництва Національного наукового центру «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича». Оцінка якості меду проводилась згідно ряду показників. Результати проведених досліджень представлені в таблицях нижче.

Перший зразок меду надійшов до лабораторії на початку червня 2022 року (табл. 2.6).

Таблиця 2.6.

## Оцінка якості меду бджолиного (зразок 1) (Додаток Б)

Назва показника	Вимоги ДСТУ (вищий/перший гатунок)	Результат	Похибка
1	2	3	4
Колір	Безкольоровий, білий, світло-жовтий, жовтий, темно-жовтий, темний з різними відтінками	Світло-жовтий	
Смак	Солодкий, ніжний приємний, терпкий, подразнює слизову оболонку ротової порожнини, без сторонніх присмаків	Солодкий, подразнює слизову оболонку ротової порожнини, без сторонніх присмаків	
Аромат	Специфічний, приємний, від слабкого до сильного, ніжний, без сторонніх запахів	Приємний, без сторонніх запахів	
Консистенція	Рідка, в'язка, дуже в'язка, щільна	Рідка	-
Кристалізація	Від дрібно до крупнозернистої	Відсутня	-
Ознаки бродіння	Не дозволені	Не виявлені	-
Механічні домішки	Не дозволені	Не виявлені	-
Масова частка води, %, не більше	18,5/21,0	16,2	0,1
Діастазне число (до безводної речовини), од. Готе, не менше	15,0/10,0	19,7	0,5
Вміст гідроксиметилфурфуролу (ГМФ), мг на 1 кг, не більше	10,0/25,0	1,54	0,1
Пилковий аналіз (спектр пилкових зерен)		Плодові дерева - 25, верба – 11, медунка – 8, бузина – 7, хрестоцвіті – 14, лох – 3, кропива дводомна – 6, суниця - 5	

Другий зразок меду надійшов до лабораторії в кінці червня 2022 року (табл. 2.7).

Таблиця 2.7.

## Оцінка якості меду бджолиного (зразок 2) (Додаток В)

Назва показника	Вимоги ДСТУ (вищий/перший гатунок)	Результат	Похибка
1	2	3	4
Колір	Безкольоровий, білий, світло-жовтий, жовтий, темно-жовтий, темний з різними відтінками	Світло-жовтий	
Смак	Солодкий, ніжний приємний, терпкий, подразнює слизову оболонку ротової порожнини, без сторонніх присмаків	Солодкий, подразнює слизову оболонку ротової порожнини, без сторонніх присмаків	
Аромат	Специфічний, приємний, від слабкого до сильного, ніжний, без сторонніх запахів	Приємний, без сторонніх запахів	
Консистенція	Рідка, в'язка, дуже в'язка, щільна	Рідка	-
Кристалізація	Від дрібно до крупнозернистої	Відсутня	-
Ознаки бродіння	Не дозволені	Не виявлені	-
Механічні домішки	Не дозволені	Не виявлені	-
Масова частка води, %, не більше	18,5/21,0	16,8	0,1
Діастазне число (до безводної речовини), од. Готе, не менше	15,0/10,0	10,22	0,5
Вміст гідроксиметилфурфуролу (ГМФ), мг на 1 кг, не більше	10,0/25,0	0,76	0,1
Пилковий аналіз (спектр пилкових зерен)		Акація -25, карагана – 5, плодове дерева – 9, чорнокорінь – 13, лядвенець – 7, жимолость - 3, аморфа – 8, малина – 6, конюшина – 8	

Третій зразок меду надійшов до лабораторії в на початку серпня 2022 року (табл. 2.8).

Таблиця 2.8.

## Оцінка якості меду бджолиного (зразок 3) (Додаток Г)

Назва показника	Вимоги ДСТУ (вищий/перший гатунок)	Результат	Похибка
1	2	3	4
Колір	Безкольоровий, білий, світло-жовтий, жовтий, темно-жовтий, темний з різними відтінками	Жовтий	
Смак	Солодкий, ніжний приємний, терпкий, подразнює слизову оболонку ротової порожнини, без сторонніх присмаків	Солодкий, подразнює слизову оболонку ротової порожнини, без сторонніх присмаків	
Аромат	Специфічний, приємний, від слабкого до сильного, ніжний, без сторонніх запахів	Приємний, без сторонніх запахів	
Консистенція	Рідка, в'язка, дуже в'язка, щільна	Рідка	-
Кристалізація	Від дрібно до крупнозернистої	Відсутня	-
Ознаки бродіння	Не дозволені	Не виявлені	-
Механічні домішки	Не дозволені	Не виявлені	-
Масова частка води, %, не більше	18,5/21,0	17,6	0,1
Діастазне число (до безводної речовини), од. Готе, не менше	15,0/10,0	18,9	0,5
Вміст гідроксиметилфурфуролу (ГМФ), мг на 1 кг, не більше	10,0/25,0	2,3	0,1
Пилковий аналіз (спектр пилкових зерен)		Соняшник – 36, гречані – 6, гвоздичні – 4, лядвенець – 12, материнка – 5, осот – 3, хрестоцвіті – 8, конюшина – 6, фацелія – 5, злаки – 4, малина, акація, сади ≤ 3	

Всі зразки меду були визнані такими, що відповідають вимогам ДСТ України та показникам меду вищого гатунку (Додаток Б, В, Г).

Для дослідження мікробіологічних параметрів безпечності меду досліджували кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів та бактерій групи кишкових паличок.

Підготовка проб проводилась згідно ДСТУ ISO 6887-1:2003 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Готування досліджуваних проб, вихідної суспензії та десятикратних розведень для мікробіологічного досліджування проводилась згідно загальних правил готування вихідної суспензії та десятикратних розведень [174, 175].

Визначення кількості мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів проводилось згідно ДСТУ ISO 4833:2006 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин з використанням горизонтального методу підрахунку мікроорганізмів. Техніка підрахування колоній за температури 30°C [176, 177].

Також проводили досліди з виділення коагулазо-позитивних *Staphylococcus aureus* згідно ГОСТ 10444.2-94 «Продукти харчові. Методи виявлення та визначення кількості *Staphylococcus aureus*» [178].

Визначення кількості *Bacillus cereus* проводили згідно ДСТУ ISO 7932:2007 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Для підрахунку кількості бактерій використовували горизонтальний метод визначення кількості ймовірно *Bacillus cereus*. Техніка підрахунку за температури 30°C [179, 180].

Виділення бактерій роду *Salmonella* проводили згідно ДСТУ EN 12824:2004 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин з використанням горизонтального методу виявлення *Salmonella* [181].

### 2.3 Статистична обробка даних

Статистичну обробку даних виконували за допомогою програми Microsoft Excel 2011. Використовували обчислення відсотку від цілого для встановлення відсотку виживання бджіл після обробок чи згодовування дослідного препарату.

$$M = \frac{N * 100}{n}$$

де  $M$  – кількість бджіл, %;

$N$  – кількість бджіл на момент дослідження, шт;

$n$  – кількість бджіл на початку дослідження, шт;

100 – коефіцієнт перерахунку.

Також вираховували середнє арифметичне за формулою:

$$N_{\text{сер}} = \frac{a+b+c}{n}$$

де  $N_{\text{сер}}$  – середнє арифметичне ряду показників;

$a+b+c$  – сума показників;

$n$  – кількість вимірювань.

Точність підрахунків визначали за допомогою вирахування коефіцієнту достовірності. На базі відсотку смертності розраховувано середню гармонічну тривалості життя ( $\tau$ ) за формулою

$$1/\tau = (1/t_1 + 1/t_2 + \dots + 1/t_N) / N,$$

де  $t_1, t_2 \dots t_N$  – час життя кожної комахи в групі з  $N$  комах, оброблених відповідною дозою.

Для відпрацювання методики застосування пробіотичного засобу в природних умовах на підставі отриманих результатів було обрано дозу 4 г на сім'ю пробіотика «Апінормін» та розроблено 3 схеми його застосування – для застосування при європейському гнильці бджіл, для профілактики у весняно-літній період та при підготовці до зимівлі. Ефективність самостійного застосування пробіотика «Апінормін» порівнювали з його комбінацією з препаратом «Аноліт».

Схема застосування за європейського гнильцю бджіл полягала у згодовуванні 4г пробіотику «Апінормін» на 1 бджолосім'ю 3 рази з інтервалом 7 днів. Профілактична схема обробки бджіл у весняно-літній період передбачала згодовування пробіотику «Апінормін» у дозі 4г на сім'ю 2 рази на місяць ( у квітні, червні та липні) з інтервалом 7 днів. Схема застосування при підготовці комах до зимівлі полягала в двократному згодовуванні пробіотику з інтервалом

в 7 днів. Дану схему профілактики рекомендовано починати за місяць до консервування бджіл на зимівлю.

Пробіотик попередньо активували питною водою або препаратом «Аноліт» за 12-16 годин до застосування і згодовувати з 50% цукровим сиропом. Облік результатів проводили через 7 днів після останнього згодовування.



## РОЗДІЛ 3.

### РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1. Удосконалення методики виділення пробіотичних культур зі свіжовідкачаного меду

На першому етапі дослідження було проведено аналіз методів відбору проб нормофлори кишківника бджіл. Спосіб отримання проб шляхом виділення мікроорганізм безпосередньо з кишківника аутопсованих комах ми не застосовували [182], оскільки даний спосіб потребує знищення значної кількості бджіл, а використання даного способу серед науковців, що вивчають медоносних бджіл стимулювало нас до пошуку альтернатив.

В зв'язку з цим, нами проаналізовано відомості щодо використання меду як джерела пробіотичних мікроорганізмів кишківника бджіл [104, 182 - 184]. Даний спосіб широко використовується, доцільність його застосування доведена рядом публікацій щодо ефективності виділення пробіотичних культур з меду бджолиного [113, 184-188]. Нами раніше проведено дослід з виділення бактерій зі свіжовідкачаного меду, виділено, ідентифіковано та охарактеризовано бактерії родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та *Enterococcus* [113].

З огляду на відсутність літературних даних та сформульованої методики виділення бактеріальної нормофлори зі свіжовідкачаного меду, не обґрунтовано етапи досліджень, параметри оцінювання якості виділених культур, а також тривалість зберігання корисних культур в запечатаних стільниках з медом та перспективи використання такого меду для дослідів з виділення пробіотичних мікроорганізмів - вирішення даних питань лягло в основу удосконалення методики виділення пробіотичних культур зі свіжовідкачаного меду.

Дослідження меду проводились протягом сезону поступово, по мірі надходження їх до лабораторії. Для дослідження відбиралися зразки меду, що були відкачані не пізніше ніж за 3 доби до оформлення проб у лабораторії. Таким чином було відібрано три види меду за ботанічним складом – мед з акації, липи та соняшника. Обґрунтуванням для вибору саме цих видів меду служило

кількісне переважання даних видів меду серед проб наданих для дослідження, а також поопулярність таких сортів меду серед населення.

З метою встановлення безпечності меду бджолиного, як продукту харчування, у дослідних пробах визначали присутність бактерій групи кишкової палички (БГКП) або родини *Enterobacteriaceae*, дріжджових та плісневих грибів, а також бактерій роду *Salmonella spp.* (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Присутність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, роду *Salmonella spp.*,  
плісневих та дріжджових грибів**

<i>Найменування показників, одиниці вимірювань</i>	<i>Результати випробувань</i>	<i>Невизначеність випробувань</i>	<i>Норми за НД</i>
Наявність бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> , НІЧ в 1,0 г	<3	Дійсне число мікроорганізмів в 1 г на 95 % рівні вірогідності в межах 0,0-9,4	не встановлені
Визначення чисельності дріжджів, КУО/г	<10	-	-
Визначення чисельності плісневих грибів, КУО/г	<10	-	-
Патогенні мікроорганізми, в т.ч. бактерії роду <i>Salmonella spp.</i> в 25 г	не виявлено	не визначається	Не допускаються в 25 г

КУО – колонієутворююча одиниця

НД – нормативна документація

НІЧ – найбільш імовірне число

Результати проведених досліджень, що в числовому варіанті представлені в таблиці вище, демонструють відповідність показників мікробіологічної безпечності досліджуваних зразків меду державним стандартам якості та безпечності продуктів харчування. В жодній дослідній пробі не було виявлено патогенних мікроорганізмів роду *Salmonella*, присутність яких не допускається. Кількість виявлених бактерій родини *Enterobacteriaceae*, а також плісневих та

дріжджових грибків знаходилась в межах допустимих показників. Отримані результати свідчать про якість та безпечність досліджених проб меду та можливість їх використання в подальших дослідах.

Наступний етап дослідження передбачав визначення в дослідних пробах присутності та визначення мікробного числа бактерій роду *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, а також кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів. Результати дослідження проб, маркованих як мед з акації білої, представлено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

**Присутність бактерій роду *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*,  
*Enterococcus spp.* та мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних  
мікроорганізмів**

<i>Найменування показників, одиниці вимірювань</i>	<i>Результати випробувань</i>	<i>Невизначеність випробувань</i>	<i>Норми за НД</i>
Наявність ентерококів ( <i>Enterococcus spp.</i> ), НІЧ в 1,0 г	3	Дійсне число мікроорганізмів в 1 г на 95 % рівні вірогідності в межах 0,1-9,5	не встановлені
<i>Lactobacillus spp.</i> , КУО/г	$1,0 \times 10^1$	-	-
<i>Bifidobacterium spp.</i> , КУО/г	$1,0 \times 10^1$	-	-
Кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів (КМАФАМ), КУО/г	$5,0 \times 10^1$	-	-

КУО – колонієутворююча одиниця

НД – нормативна документація

НІЧ – найбільш імовірне число

Отримані результати свідчать про присутність родів пробіотичних мікроорганізмів у досліджених пробах меду. Інтенсивність росту мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів (МАФАМ), порівняно з

іншими досліджуваними родами мікроорганізмів може бути зумовлена значним видовим різноманіттям даної групи мікроорганізмів, а отже, сумарно більшою кількістю окремих колоній в 1 г.

З метою встановлення тривалості зберігання бактерій в меді після відкачування проведено дослідження з виділення пробіотичних мікроорганізмів на першу, другу, третю та четверту добу після відкачування.

Досліджувані проби меду поділили на 3 групи за ботанічним походженням, а саме мед з акації (група 1), мед з різнотрав'я (група 2) та мед з соняшника (група 3).

Результати досліджень представлені в таблицях 3.3, 3.4 та 3.5 [91].

Таблиця 3.3

**Присутність бактерій роду *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*,  
*Enterococcus spp.* (група 1)**

<b>Найменування показників, одиниці вимірювань</b>	<b>Термін зберігання зразків меду, діб</b>	<b>Результати випробувань</b>	<b>Невизначеність випробувань</b>	<b>Норми за НД</b>
Наявність ентерококів ( <i>Enterococcus spp.</i> ), НІЧ в 1,0 г	1й день	1	Дійсне число мікроорганізмів в 1 г на 95 % рівні вірогідності в межах 0,1-9,5	не встановлені
	2й день	2		
	3й день	3		
	4й день	1		
<i>Lactobacillus spp.</i> , КУО/г	1й день	Ріст відсутній	-	-
	2й день	Ріст відсутній		
	3й день	$1,0 \times 10^1$		
	4й день	Ріст відсутній		
<i>Bifidobacterium spp.</i> , КУО/г	1й день	Ріст відсутній	-	-
	2й день	Ріст відсутній		
	3й день	$1,0 \times 10^1$		
	4й день	Ріст відсутній		

Отримані результати демонструють закономірність у виділенні пробіотичних мікроорганізмів на 3й день після відкачування. У зразках групи 1 ріст ентерококів спостерігався протягом 4х діб дослідження, але свого піку кількість колонієутворюючих одиниць досягла на 3й день, натомість на 4й день дослідження кількість виділених колоній різко зменшувалась. (Таблиця 3.3).

Ріст колоній бактерій родів *Lactobacillus spp* та *Bifidobacterium spp.* в зразках групи 1 спостерігався виключно на 3й день зберігання.

Таблиця 3.4

**Присутність бактерій роду *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp.*,  
*Enterococcus spp.* (група 2)**

<b>Найменування показників, одиниці вимірювань</b>	<b>Термін зберігання зразків меду, діб</b>	<b>Результати випробувань</b>	<b>Невизначеність випробувань</b>	<b>Норми за НД</b>
Наявність ентерококів ( <i>Enterococcus spp.</i> ), НІЧ в 1,0 г	1й день	1	Дійсне число мікроорганізмів в 1 г на 95 % рівні вірогідності в межах 0,1-9,5	не встановлені
	2й день	1		
	3й день	3		
	4й день	Ріст відсутній		
<i>Lactobacillus spp</i> , КУО/г	1й день	Ріст відсутній	-	-
	2й день	$1,0 \times 10^1$		
	3й день	$1,0 \times 10^1$		
	4й день	Ріст відсутній		
<i>Bifidobacterium spp.</i> , КУО/г	1й день	Ріст відсутній	-	-
	2й день	$1,0 \times 10^1$		
	3й день	$1,0 \times 10^1$		
	4й день	Ріст відсутній		

У зразках групи 2 ріст ентерококів спостерігався протягом 3х діб дослідження і досягнув свого піку саме на 3й день, натомість на 4й день дослідження ріст колоній не спостерігався.

Ріст колоній бактерій родів *Lactobacillus spp* та *Bifidobacterium spp.* у зразках групи 2 натомість спостерігався починаючи з 2го дня зберігання (Таблиця 3.4).

Таблиця 3.5

**Присутність бактерій роду *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp.*,  
*Enterococcus spp.* (група 3)**

<b>Найменування показників, одиниці вимірювань</b>	<b>Термін зберігання зразків меду, діб</b>	<b>Результати випробувань</b>	<b>Невизначеність випробувань</b>	<b>Норми за НД</b>
Наявність ентерококів ( <i>Enterococcus spp.</i> ), НІЧ в 1,0 г	1й день	1	Дійсне число мікроорганізмів в 1 г на 95 % рівні вірогідності в межах 0,1-9,5	не встановлені
	2й день	2		
	3й день	3		
	4й день	Ріст відсутній		
<i>Lactobacillus spp</i> , КУО/г	1й день	Ріст відсутній	-	-
	2й день	Ріст відсутній		
	3й день	$1,0 \times 10^1$		
	4й день	Ріст відсутній		
<i>Bifidobacterium spp.</i> , КУО/г	1й день	Ріст відсутній	-	-
	2й день	Ріст відсутній		
	3й день	$1,0 \times 10^1$		
	4й день	Ріст відсутній		

Результати досліджень зразків групи 3 показали ріст колоній ентерококів протягом перших трьох діб зберігання з найбільшим показником КУО на 3й день зберігання та відсутність росту бактерій на 4й день досліду.

Натомість ріст бактерій родів *Lactobacillus spp* та *Bifidobacterium spp.* у зразках гурпи спостерігався виключно на 3й день зберігання меду, аналогічно з показниками групи 1 (табл.3.5).

Отримані результати свідчать про ефективність використання свіжовідкачаного меду як джерела пробіотичних мікроорганізмів та доцільність використання даного методу для відбору проб, а також дані мікробіологічного дослідження меду на наявність патогенних мікроорганізмів та пліснявих грибів свідчить про безпечність використання даного меду як для досліджень, так і в якості харчового продукту [91].

Описана вище методика виділення пробіотичних мікроорганізмів також доводить доцільність використання меду будь-якого ботанічного походження та територіального розміщення пасіки, а отже впливу кліматичних факторів, для виділення пробіотичних мікроорганізмів. Також рядом лабораторних досліджень доведено, що оптимальним для проведення досліджень з виділення пробіотичних мікроорганізмів є термін зберігання меду після відкачування не більше 3х діб.

Ідентифікація культурально-морфологічних та біохімічних властивостей дослідних культур показала присутність бактерій 3х різних видів. Бактерії першого виду відносилися до *Bifidobacterium bifidum*, на твердому поживному середовищі утворювали бежево-білі колонії з нерівними краями або щільні білого кольору. На рідкому поживному середовищі утворювали каламуть та леткі кислоти, тому рН середовища культивування змінювався в бік підвищення кислотності. Біохімічні властивості характеризувалися здатністю ферментувати глюкозу, мальтозу, сахарозу, інулін, декстрин та крохмаль. Мікроскопічно дані бактерії відносилися до Грам позитивних, були середнього розміру, округлої форми та розміщені поодинокі або у вигляді коротких ланцюжків різної форми [91,188].

Бактерії другого виду відносяться до виду *Lactobacillus plantarum*, на твердому поживному середовищі утворювали гладкі колонії білого кольору з рівними краями. На рідкому поживному середовищі також утворювали каламуть та леткі кислоти, тому рН середовища культивування змінювався в бік підвищення кислотності. Серед біохімічних властивостей даного виду бактерій спостерігалась здатність ферментувати глюкозу, сахарозу та слабше мальтозу. Мікроскопічно дані бактерії відносилися до Грам позитивних довгих паличок середнього розміру або дрібних дуже коротких паличок із заокругленими краями, розміщених поодинокі або у вигляді ланцюжків [91, 190].

Бактерії третього виду відносяться до виду *Enterococcus faecium*, на твердому поживному середовищі утворювали дрібні прозорі колонії з рівними краями. На рідкому поживному середовищі утворювали каламуть з подальшою появою ослизлого осаду. Серед біохімічних властивостей спостерігалась здатність ферментувати глюкозу без утворення газу. Мікроскопічно дані бактерії відносилися до Грам позитивних коків, розміщених попарно або коротким ланцюжками [91, 111, 113, 191].

### **3.2 Нормофлора кишківника бджіл та меду бджолиного**

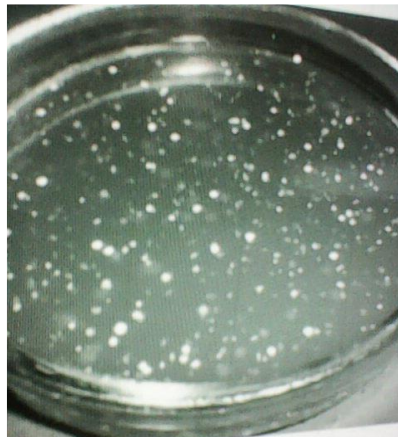
Дослідження нормофлори кишківника бджіл, описані в огляді літератури, передбачають виділення бактерій безпосередньо з кишківника аутопсованих комах. Даний підхід несе за собою значні втрати корисних комах, що не влаштовуватиме пересічного пасічника. Саме тому, для досліджень нами обрано шлях виділення бактерій нормофлори кишківника бджіл зі свіжовідкачаного меду бджолиного.

Спеціалізоване кишкове співтовариство медоносних бджіл схоже на мікробіоту ссавців, проте воно набагато простіше [18]. В ньому домінують лише дев'ять кластерів бактеріальних видів, які пов'язані лише з бджолами [15, 150]. На відміну від мікробіомів ссавців, усі види нормофлори кишківника бджіл можна культивувати в лабораторії та виробництві, що дозволяє проводити



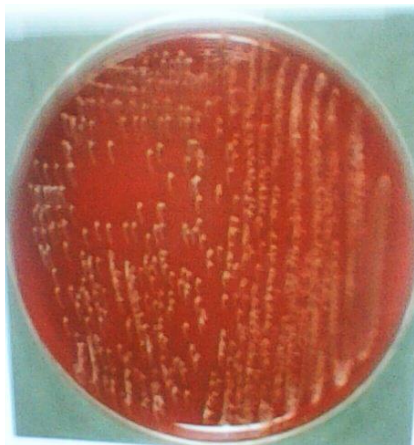
потужні експериментальні роботи з конструювання пробіотичних препаратів [148].

Аналіз літературних даних показав, що більшість бактерій нормофлори бджіл відноситься до трьох родин, а саме – лактобактерій, біфідобактерій та ентерококів. Тому для культивування було підбрано селективні середовища саме для даних бактерій. Для першого пасажу було обрано MRS-бульйон. Далі проводилось пересівання вторинної культури на різні поживні середовища, які буде описано нижче.



**Рисунок 3.1** Ріст колоній *L. plantarum* на MRS агарі

При культивуванні на MRS бульйоні отримано інокулят клітин у вигляді помутніння. Через добу після висівання спостерігали характерний ріст колоній на диференційних середовищах: на MRS агарі – лактобактерії (рис. 3.1), на агарі Ендо – ентерококи (рис. 3.2), на біфідобактеріум агарі – біфідобактерії (рис.3.3).



### Рисунок 3.2 Ріст колоній *E. faecium* на агарі Ендо



### Рисунок 3.3 Ріст колоній *Bif. bifidum* на біфідобактеріум агарі Him Labs Inc

При мікроскопіюванні мазків під імерсією із субстрату культивування наявних лактобактерій, ентеробактерій та біфідобактерій, що були зафарбовані за методом Грама, спостерігали, що на всіх диференційних середовищах клітини були зафарбовані як грампозитивні. Лактобактерії – паличкоподібної форми прямі, але деякі клітини були трішки загнуті, факультативний анаероб. У процесі старіння культури форма клітин змінювалась на кокоподібну; також спостерігали утворення і ниткоподібних форм, збільшення діаметра колоній до 7 мм. Біфідобактерії – суворий анаероб, маленькі палички 2–5 мкм, які з часом утворюють розгалужені форми, спор не утворюють. При культивуванні на печінковому середовищі Блоурока утворюються колонії у вигляді «комет» білого кольору. Ентеробактерії – факультативний анаероб, овальні дрібні клітини 0,6–2,0 мкм (стрептококи). При культивуванні не спостерігали утворення спор та капсул, метаболізм бродильного типу, при якому ферментуються вуглеводи з утворенням молочної кислоти, знижуючи кислотність до  $4,2 \pm 0,1$ , але без появи газу. При культивуванні на хромогенному бульйоні було підтверджено приналежність клітин культури до *Enterococcus faecium*.

Проведені біохімічні дослідження (табл. 3.3) виділених зі свіжовідкачаного меду культур показали характерну асиміляцію цукрів Гіса, яка притаманна для лактобактерій, а саме: ферментують добре глюкозу, лактозу та сахарозу; слабкіше – мальтозу з утворенням кислот, переважно молочної (Таблиця 3.6).

Таблиця 3.6

**Ферментоліз цукрів Гіса пробіотичними культурами, виділеними зі свіжовідкачаного меду**

Показник / Назва штаму	Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Мальтоза	Індол	Молочна кислота	Утворення газу
<i>Lactobacillus plantarum</i>	++++	++++	++++	++	Так	Так	Ні
<i>Enterococcus faecium</i>	++++	++++	++++	++++	Так	Ні	Ні
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	++++	++++	++++	++++	Ні	Ч/п	Ні

Примітки: +++++ – ферментує цукор добре;

++ – ферментує цукор слабше;

Так – позитивна реакція на індол, наявність молочної кислоти, утворення газу;

Ч/п – частково-позитивна реакція на індол, наявність молочної кислоти, утворення газу;

Ні – негативна реакція.

Така культура дає також позитивну реакцію на індол. Біфідобактерії ферментували глюкозу, сахарозу, лактозу й манозу. Не утворювали індолу, слабо утворювали молочну кислоту та газ. Ентеробактерії ферментували сахарозу, лактозу, глюкозу, манозу та утворювали індол, не утворювали молочної кислоти та газу. Саме через характерну асиміляцію цукрів Гіса було встановлено, що це притаманно для лактобактерій, ентеробактерій, біфідобактерій. За сукупністю визначених культурально-морфологічних та біохімічних ознак встановлено, що виділені культури зі зразків свіжовідкачаного меду належать до *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* і *Bifidobacterium bifidum*.

Нами виділено зі свіжовідкачаного меду українських порід бджіл ізоляти нормофлори їх кишківника – *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum* та

*Enterococcus faecium*. Доклінічні випробування нових засобів передбачають дослідження їх нешкідливості, безпечності, ефективності дії, обґрунтування оптимальних схем і доз введення [19, 144]. Однією з таких характеристик є визначення антагоністичних властивостей пробіотичних культур *in vitro* по відношенню до збудників бактеріозів бджіл.

### 3.3. Антагоністичні властивості пробіотичних культур *in vitro* по відношенню до збудників бактеріозів бджіл

Зазначені властивості виділених зі свіжовідкачаного меду пробіотичних культур визначали за проявом антагоністичного впливу на збудника захворювань бджіл, а саме *Streptococcus (Melisococcus) pluton (Str. pluton)*, а також *Bacillus subtilis (Bac. subtilis)* та *Escherichia coli (E. coli)* (табл. 3.7). При культивуванні на ТСА кожного окремого штаму спостерігали характерний ріст *Lactobacillus plantarum (L. plantarum)*, *Enterococcus faecium (E. faecium)*, *Bifidobacterium bifidum (Bif. Bifidum)*, *Streptococcus pluton*, *Bacillus subtilis* та *Escherichia coli*. На чашках Петрі, де культивували суміші культур *Lactobacillus plantarum* із *Streptococcus pluton*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* відповідно, спостерігали відсутність росту *Streptococcus pluton*, а також затримку росту із нанесеною культурою *Bacillus subtilis* та *Escherichia coli*, при цьому спостерігали ріст *Lactobacillus plantarum*.

Таблиця 3. 7

#### Антагоністичні властивості *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum* зі свіжовідкачаного меду по відношенню до *Streptococcus pluton*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*

Назва штаму	Назва середовища культивування	Показник росту культури
<i>L. plantarum</i>	ТСА	$1,0 \times 10^5$
<i>E. faecium</i>		$1,0 \times 10^5$
<i>B. bifidum</i>		$1,0 \times 10^5$
<i>Str. pluton</i>		$1,0 \times 10^3$
<i>Bac. subtilis</i>		$1,0 \times 10^3$
<i>E. coli</i>		$1,0 \times 10^3$

<i>L. plantarum</i> + <i>Str. pluton</i>	TCA	Наявний ріст <i>L. plantarum</i> , відсутній ріст <i>Str. pluton</i>
<i>L. plantarum</i> + <i>Bac. subtilis</i>		Наявний ріст <i>L. plantarum</i> , окремі колонії <i>Bac. subtilis</i>
<i>L. plantarum</i> + <i>E. coli</i>		Наявний ріст <i>L. plantarum</i> , окремі колонії <i>E. coli</i>
<i>E. faecium</i> + <i>Str. pluton</i>	TCA	Наявний ріст <i>E. faecium</i> , окремі колонії <i>Str. pluton</i>
<i>E. faecium</i> + <i>Bac. subtilis</i>		Наявний ріст <i>E. faecium</i> , окремі колонії <i>Bac. Subtilis</i>
<i>E. faecium</i> + <i>E. coli</i>		Наявний ріст <i>E. faecium</i> , відсутній ріст <i>E. coli</i>
<i>B. bifidum</i> + <i>Str. pluton</i>	TCA	Наявний ріст <i>Bif. bifidum</i> , окремі колонії <i>Str. pluton</i>
<i>B. bifidum</i> + <i>Bac. subtilis</i>		Наявний ріст <i>Bif. bifidum</i> , відсутній ріст <i>Bac. subtilis</i>
<i>B. bifidum</i> + <i>E. coli</i>		Наявний ріст <i>Bif. bifidum</i> , окремі колонії <i>E. coli</i>

Нами встановлено характерні антагоністичні властивості *L. plantarum*, *E. faecium*, *Bif. bifidum* по відношенню до збудника європейського гнильцю бджіл, а саме *Str. pluton*, а також *Bac. subtilis* та *E. coli*, що обґрунтовує можливість їх використання у наступних дослідженнях для відпрацювання схем профілактики і лікування бактеріозів бджіл. Виділена нами зі свіжовідкачаного меду асоціація пробіотичних культур та встановлення її антагоністичних властивостей по відношенню до збудника європейського гнильцю бджіл підтверджує важливість застосування на бджолах української степової породи бджіл пробіотику “Апінормін”. Даний препарат розроблено раніше на основі такої ж асоціації пробіотичних культур та зареєстровано в Україні в установленому порядку (РП № ВВ-00861-02-18). Наступні дослідження виконувалися нами з використанням саме цього засобу.

### 3.4. Обґрунтування оптимальних доз та способів застосування пробіотику

В лабораторних умовах визначено пероральну та контактну дію пробіотичного препарату “Апінормін” на бджолах, ізольованих в садки. Для дослідження було обрано 4 дози пробіотику для бджіл «Апінормін», а саме 0,8 г/сім’ю, 0,4 г/сім’ю, 4 г/сім’ю та 8 г/сім’ю. Експериментальні дозування перед застосуванням було підготовлено згідно методики, вказаної в підрозділі 2.2.2. Контрольна група отримувала чистий цукровий сироп. Комахи отримували пробіотик 2 рази з інтервалом 7 днів шляхом згодовування та обробки тіла (табл 3.8).

Таблиця 3.8

#### Смертність бджіл за умови згодовування цукрового сиропу з різними концентраціями препарату “Апінормін” ( $M \pm m, n = 3$ )

Варіант досліджу	Смертність на день досліджу, %									
	16.06	17.06	18.06	22.06	23.06	24.06	25.06	29.06	30.06	1.07
Варіант 1. Згодовування 4 % “Апінорміну”	0	0	3,25± 1,63*	19,96 ±0,51 *	25,99 ±1,63 *	35,28 ±1,21 *	46,27 ±5,46 *	77,46 ±5,64 *	81,63 ±2,06 *	87,74± 1,24*
Варіант 2. Згодовування 8 % “Апінорміну”	0	0	3,35± 1,75*	10,62 ±3,59 *	17,32 ±6,8*	24,59 ±5,43 *	31,86 ±7,61 *	75,41 ±8,7* *	79,33 ±5,1* **	82,68± 3,41** *
Варіант 3. Згодовування 0,8 % “Апінорміну”	0	1,52± 1,52*	1,52± 1,52*	19,24 ±2,26 **	25,61 ±3,43 **	31,82 ±7,41 *	43,44 ±10,8 1*	83,23 ±5,06 ***	86,26 ±6,66 ***	93,89± 3,89** *
Варіант 4. Згодовування 0,4 % “Апінорміну”	1,23± 1,23*	2,47± 2,47*	2,47± 2,47*	19,78 ±4,3*	36,29 ±4,34 **	48,23 ±6,62 **	60,39 ±8,98 **	88,67 ±4,09 ***	93,83 ±3,27 ***	96,92± 1,63** **
Варіант 5. Контроль (згодовування сиропу без препарату)	0	10,59 ±5,8*	10,59 ±5,8*	22,81 ±8,71 *	36,54 ±10,6 1*	37,92 ±9,33 *	59,61 ±15,4 *	85,54 ±11,6 4**	89,71 ±7,55 **	93,87± 3,61** *

Примітка: \* $P \leq 0,9$ ; \*\* $P \leq 0,95$ ; \*\*\* $P \leq 0,98$ ; \*\*\*\* $P \leq 0,99$

Встановлено, що згодовування бджолам цукрового сиропу разом з “Апінорміном” в усіх досліджених дозах було не тільки нетоксичним для бджіл, а й таким, що уповільнило їх природне відмирання.

При цьому кращий результат показало найбільше із досліджених дозувань – 8 г на сім’ю. Її згодовування уповільнило природне відмирання бджіл на різних етапах спостережень від 7,24 ( $P \leq 0,90$ ) до 27,75 % ( $P \leq 0,90$ ). Тобто смертність бджіл у варіантах зі згодовуванням “Апінорміну” в дозі 8 г на сім’ю з 3-го по 10-й день досліду становила: 3,35– 31,86 %, а без згодовування (контроль) – 10,59 – 59,61 % .

Для порівняння та відпрацювання різних технологічних схем застосування пробіотичних препаратів для бджіл досліджено також вплив аналогічних доз пробіотику «Апінормін» за обробки дослідними розчинами тіла комах (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

**Смертність бджіл за умови обробки їх тіла різними дозами водного розчину препарату “Апінормін” ( $M \pm m, n = 3$ )**

Варіант досліду/Доза, г/сім’ю	Смертність на день досліду, %									
	16.06	17.06	18.06	22.06	23.06	24.06	25.06	29.06	30.06	1.07
Варіант 1. 4 г на сім’ю	0	2,6± 1,33 *	2,6± 1,33 *	23,7± 9,69*	31,37± 13,66*	41,25± 12,26*	50,52± 14,48*	84,63 ±5,36 ***	92,65 ±0,69 ****	92,65 ±0,69 ****
Варіант 2. 8 г на сім’ю	0	3,51 ±3,5 1*	10,3 5±6, 08*	31,67 ±10,7 1*	45,8±5, 56*	52,47± 10,17*	63,23± 3,89** *	92,02 ±1,41 *****	92,02 ±1,41 *****	93,77 ±3,14 ***
Варіант 3. 0,8 г на сім’ю ”	1,3 3±1 ,33 *	2,67 ±2,6 7*	5,75 ±3,4 7*	19,98 ±14,0 2*	21,73± 13,18*	27,51± 12,55*	60,19± 8,54**	92,47 ±2,92 ***	92,47 ±2,92 ***	95,56 ±4,44 ***
Варіант 4. 0,4 г на сім’ю	0	8,47 ±3,0 4*	8,47 ±3,0 4*	24,67 ±2,09 **	33,43± 2,43** *	40,57± 4,71**	52±4,5 8**	93,62 ±3,48 ***	97,62 ±2,38 ****	97,62 ±2,38 ****

Варіант 5. Контроль	0	0	3,03 ±3,0 3*	29,01 ±11,3 3*	36,65± 14,01*	40,01± 14,24*	51,04± 13,12*	83,95 ±8,09 **	83,95 ±8,09 **	91,36 ±6,87 ***
---------------------------	---	---	--------------------	----------------------	------------------	------------------	------------------	----------------------	----------------------	-----------------------

Примітка: \*P≤0,9; \*\*P≤0,95; \*\*\*P≤0,98; \*\*\*\*P≤0,99; \*\*\*\*\*P≤0,999

При обробці тіла бджіл водним розчином препарату найбільша із досліджених доз (8 г на сім'ю) прискорила відмирання бджіл до 12,46 %, а 0,8 г на сім'ю – уповільнила до 14,22 % на ранніх етапах, але прискорила до 9,15 % на пізніх (табл. 3.9).

Порівняльний аналіз отриманих даних, наведених у таблицях 3.8 та 3.9 показує, що оптимальною дозою “Апінорміну” для подовження життя бджіл при пероральному і контактному застосуванні є 4 г/сім'ю. Факт уповільнення відмирання бджіл за згодовування препарату і вірогідність наведених даних підтверджено статистичною обробкою.

Отримані нами результати про підвищення терміну життя бджіл за впливу “Апінорміну” підтверджують його біостимулювальні властивості.

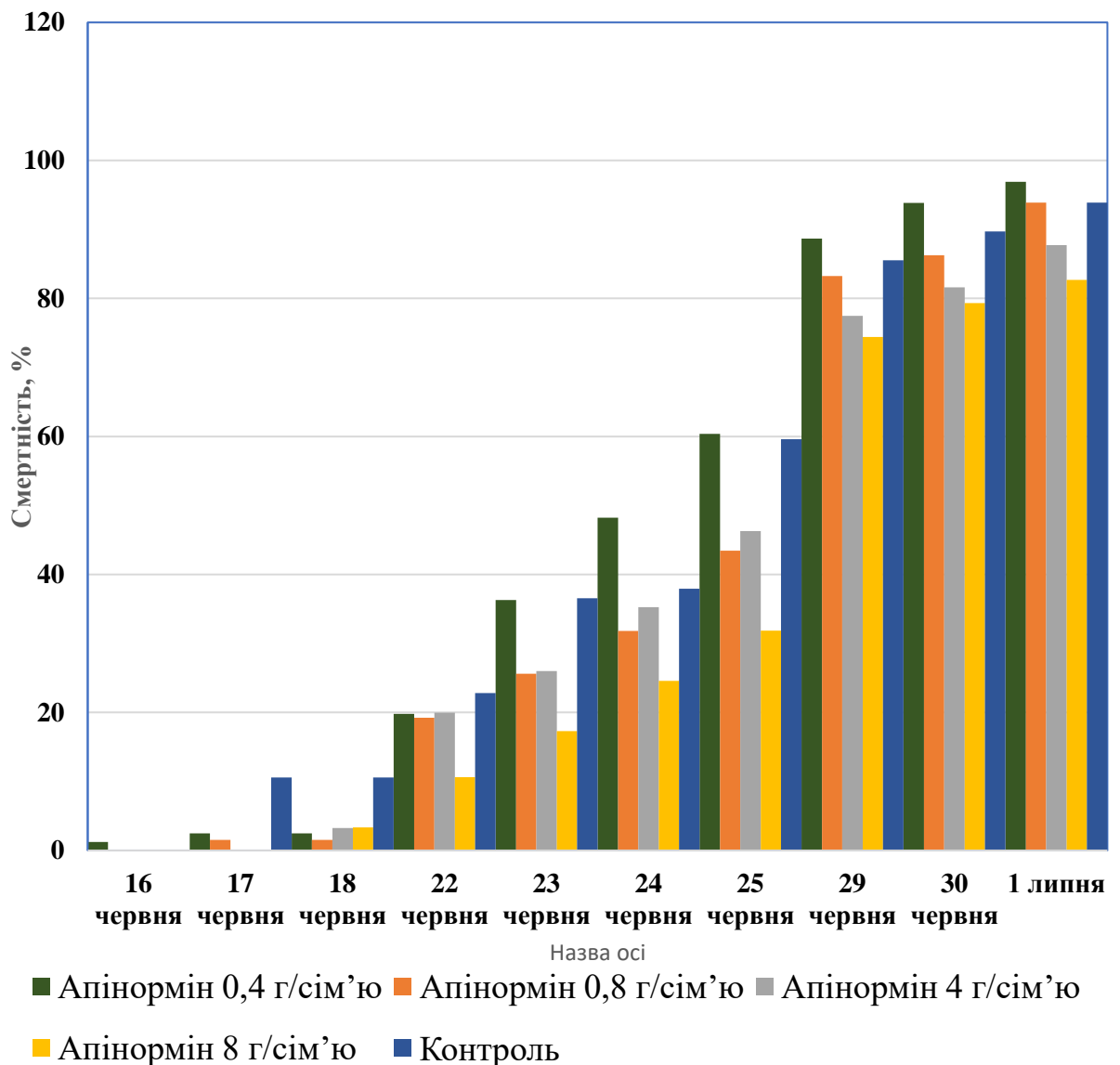
### **3.5. Нешкідливість та біостимулювальна дія комбінованого застосування пробіотику для бджіл «Апінормін» та препарату «Аноліт»**

Дослідження нешкідливості пробіотичного засобу «Апінормін» полягало в оцінці його токсичного впливу на корисних комах. В межах даного експерименту оцінювали вплив препарату «Аноліт», зокрема в комбінації з пробіотиком «Апінормін» на загальний стан корисних комах. Згідно даних літератури, «Аноліт» демонструє позитивний ефект за аскоферозу та європейського гнильцю бджіл [167].

Суть даного ряду експериментів полягала у порівнянні способів застосування різних доз препарату «Апінормін» (в якості підгодівлі та для обробки тіла комах), а також у дослідженні впливу комбінації пробіотику «Апінормін» з препаратом «Аноліт» з метою встановлення можливості їх сумісного застосування, у випадку отримання позитивних результатів. По



завершенні кожного експерименту токсичний вплив препарату оцінювали шляхом підрахунку кількості комах, що загинули (облік смертності або показник динаміки природного відмирання бджіл).



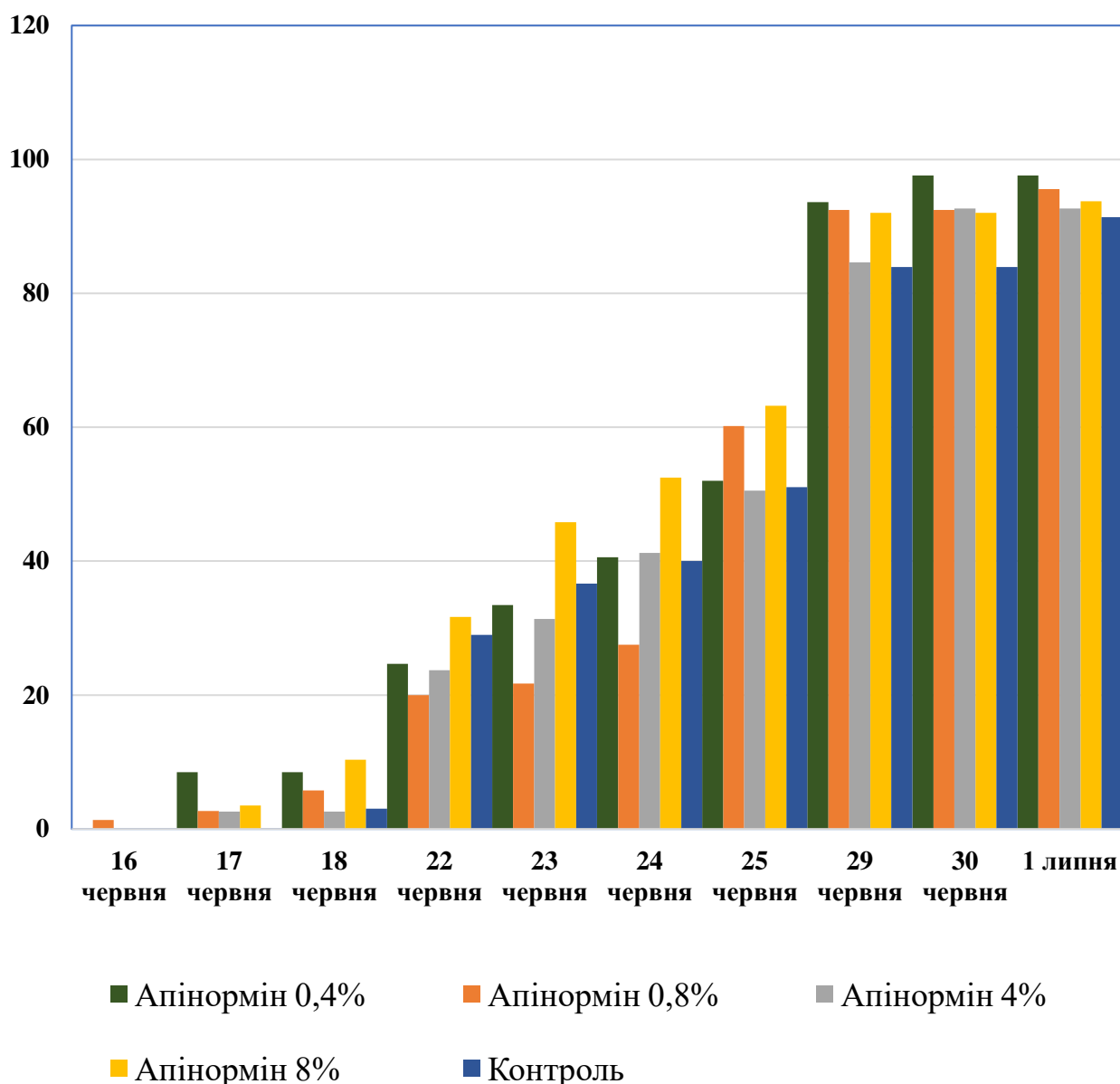
**Рис. 3.4 Смертність бджіл за умови згодовування різних доз пробіотику "Апінормін"**

Підготовка до експерименту проводилась аналогічним шляхом, як і при обґрунтуванні оптимальних доз та способів застосування пробіотику, описаному вище. Кожен варіант містив по 3 повторності, на рисунку наведено середню арифметичну кількість комах, що загинули в кожному варіанті в день обліку результатів (рис. 3.4).

Отримані результати свідчать про достовірне сповільнення динаміки природного відмирання бджіл у варіанті за згодовуванням дослідного препарату в дозі 4 і 8 г/сім'ю. Смертність в даних варіантах була відсутня протягом перших двох днів дослідження, проявилася лише на 3й день і мала показник значно нижче рівня контролю. Показник динаміки природного відмирання бджіл в даних варіантах знаходився нижче рівня контролю протягом всього дослідження. У варіанті, де дослідний препарат згодовувався в дозі 0,8 г/сім'ю смертність проявилася на другий день дослідження і була значно нижче рівня контролю. Протягом всього досліду показник смертності в даному варіанті був нижче рівня контролю, але наприкінці експерименту за значеннями смертності в даному варіанті досягла показників контрольної групи. У варіанті зі згодовуванням пробіотику в дозі 0,4 г/сім'ю смертність проявилася з першого дня дослідження. Показники смертності були рівними контрольній групі і з другої половини експерименту були вищими за контроль.

Також досліджено вплив різних концентрацій пробіотику «Апінормін» у випадку обробки тіла комах. За принципом аналогів сформовано 5 груп – 4 дослідні та контрольна по 3 повторності в кожній. Завчасно підготовленими розведеннями дослідного препарату тіло комах обробляли з дрібнодисперсного оприскувача двічі з інтервалом 7 днів. В якості показника, що відображає токсичність використовували показник динаміки природного відмирання бджіл.

Згідно отриманих результатів динаміка природного відмирання бджіл після першої обробки комах сповільнилась, порівняно з контролем (рис. 3.5). У варіантах зі згодовуванням трьох експериментальних доз показник смертності знаходився нижче або на рівні контролю. У випадку експериментального розчину дози 8 г/сім'ю показник смертності був незначно вище рівня контролю на 4й день дослідження. Після повторної обробки комах показники смертності у варіантах зі всіма експериментальними дозами почали зростати і знаходились вище рівня контролю. У варіанті з дозою 4 г/сім'ю показник смертності був найближче до рівня контролю.



**Рисунок 3.5 Смертність бджіл за умови обробки тіла комах різними концентраціями пробіотику "Апінормін"**

Описані вище результати показують, що всі експериментальні дозування пробіотику «Апінормін» не мають вираженого токсичного впливу на бджіл. Необхідно взяти до уваги, що бджоли відносяться до комах, тобто їх життєдіяльність і загибель нерозривно пов'язана з умовами існування в межах сім'ї, де у кожної особини є своя роль. В умовах експерименту комахи знаходились в ізолюваному просторі, були позбавлені можливості долати в польоті значну відстань і виконувати свої функції як члени бджолоїної сім'ї. Крім

того, корм, який надавався комахам в межах експерименту був лише вуглеводним, а комахи не мали можливості забезпечити себе білковим кормом, який є не менш важливим для нормального існування. Сукупність цих факторів негативним чином вплинула на тривалість життя дослідних комах і очевидно прискорила їх природню загибель. В умовах проведення експерименту було передбачено підтримання температури утримання комах, максимально наближеної до природніх (садки з бджолами перебували в термостаті), а також відсутність постійної інсоляції.

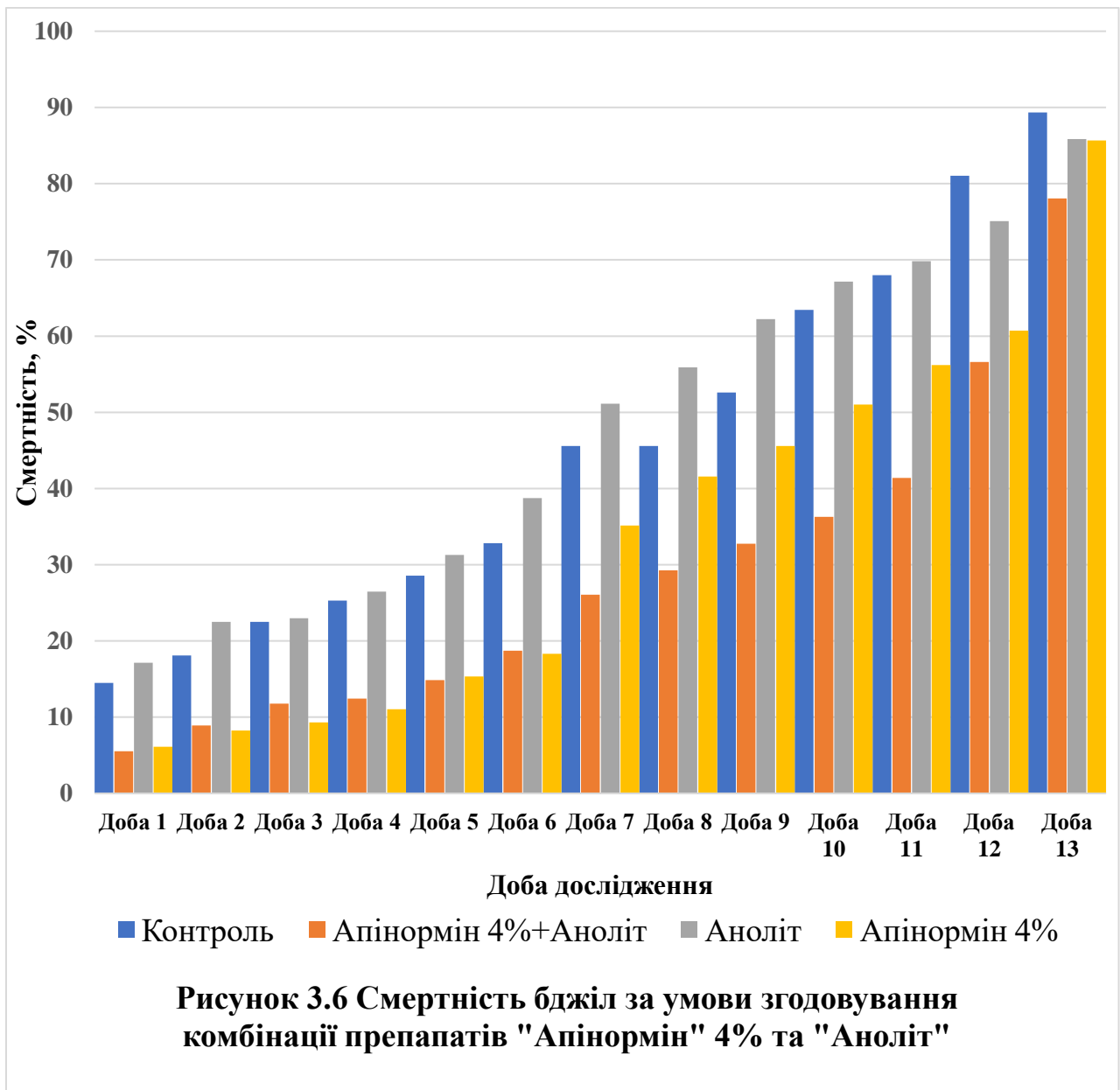
Беручи до уваги отримані результати, а також з огляду на вказані вище фактори суспільного існування дослідних комах можна зробити висновок, що доза пробіотичного препарату «Апінормін» 4 г/сім'ю є оптимальною для проведення подальших досліджень.

Експеримент з вивчення комбінованого застосування пробіотику «Апінормін» в оптимальній дозі (4 г/сім'ю) та препарату «Аноліт» полягав у визначенні впливу даного поєднання на динаміку природного відмирання бджіл. Для проведення експерименту за принципом аналогів з дослідних комах було сформовано чотири групи– три дослідні та контрольну, по три повторності в кожній. Безпосередньо перед проведенням експерименту було підготовлено дослідні зразки, а саме: «Апінормін» в дозі 4 г/сім'ю, активований водою, препарат «Аноліт» та «Апінормін» в дозі 4 г/сім'ю, активований препаратом «Аноліт». Перша дослідна група отримувала пробіотик «Апінормін» в дозі 4 г/сім'ю, активований препаратом «Аноліт», друга група отримувала препарат «Аноліт», а третя - пробіотик «Апінормін» в дозі 4 г/сім'ю, активований водою. Дослідні препарати комахи отримували в суміші з 50% цукровим сиропом двічі з інтервалом 7 днів. Контрольна група отримувала чистий цукровий сироп.

Отримані результати свідчать про позитивний вплив комбінації пробіотику «Апінормін» в дозі 4 г/сім'ю та препарату «Аноліт» (Рис. 3.6).

З першого дня дослідження показники смертності бджіл у варіантах зі згодовуванням «Апінорміну» та комбінації пробіотика з «Анолітом»

знаходились суттєво нижче рівня контролю і зберегли дану тенденцію до завершення експерименту.



Зокрема, необхідно відмітити, що показники динаміки природного відмирання бджіл у варіанті зі згодовуванням пробіотику «Апінормін» в дозі 4 г/сім'ю після повторного згодовування дослідних зразків були вищими за показники у варіанті зі згодовуванням комбінації препаратів. Стосовно варіанту зі згодовуванням препарату «Аноліт» слід зазначити, що показники смертності після першого згодовування дослідних зразків знаходились на рівні контролю або незначно перевищували їх, але після повторного згодовування стабільно знаходились нижче рівня контролю.

Узагальнення результатів, отриманих в ході описаних вище експериментальних досліджень показує, що пробіотичний препарат «Апінормін» є нетоксичним для бджіл в усіх експериментальних дозуваннях і може застосовуватись у бджільництві шляхом згодовування та обробки рамок з комахами. Незначне прискорення динаміки природного відмирання бджіл, яке спостерігалось протягом експерименту може бути наслідком неможливості забезпечити всі необхідні комфортні умови існування комах в умовах лабораторії з метою унеможливлення впливу даних факторів на тривалість життя корисних комах.

Оптимальною дозою пробіотику «Апінормін» обрано 4 г/сім'ю, спираючись на її прослідкований позитивний вплив за умови обох досліджених способів застосування на загальний стан та динаміку підвищення показника тривалості життя комах.

Отримані результати стосовно застосування пробіотику «Апінормін» в дозі 4 г/сім'ю разом з препаратом «Аноліт» в якості активатора підтверджують припущення стосовно можливого потенціювання позитивного ефекту кожного з препаратів за умови їх комбінованого застосування шляхом згодовування на динаміку природного відмирання бджіл. Експериментально доведено, що тривалість життя бджіл подовжується як за самостійного застосування пробіотику, так і у поєднання з «Анолітом». Висновком даного дослідження може слугувати теза про нешкідливість та біостимулювальний вплив досліджуваного пробіотику, зокрема в комбінації з «Анолітом» на здоров'я бджіл.

### **3.6. Результати переорального застосування пробіотичних препаратів на *Apis mellifera***

З метою обґрунтування переваг та доцільності використання саме специфічного пробіотику для бджіл проведено експеримент, що покликаний порівняти вплив низки пробіотичних засобів, призначених для різних видів тварин, зокрема для бджіл, на динаміку природного відмирання комах.

В результаті проведених досліджень встановлено, що згодовування всіх пробіотичних препаратів в дозі 4 г/сім'ю: «Апінорміну» для бджіл, «Бажана» для людей, «Імунобактерину Д» для свійських тварин і «Purina ProPlan FortiFlora» для собак було безпечним для бджіл. В жодному з варіантів не спостерігалось масового падежу комах. У варіантах зі згодовуванням пробіотиків, неспецифічних для досліджуваних комах, відмирання бджіл знаходилося практично на рівні контролю, де згодовувався чистий цукровий сироп. У варіанті зі згодовуванням «Апінорміну» відмирання бджіл уповільнювалось порівняно з контролем від 3,7 до 20,31% ( $89,35 \pm 6,01$  у контролі і  $85,65 \pm 4,37$  в досліді та  $81,04 \pm 8,28$  у контролі і  $60,73 \pm 4,24$  в досліді), що свідчить про позитивний вплив «Апінорміну» на здоров'я бджіл (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

**Смертність бджіл за умов згодовування цукрового сиропу з пробіотичними препаратами в дозі 4 г на сім'ю ( $M \pm m$ ,  $n=4$ )**

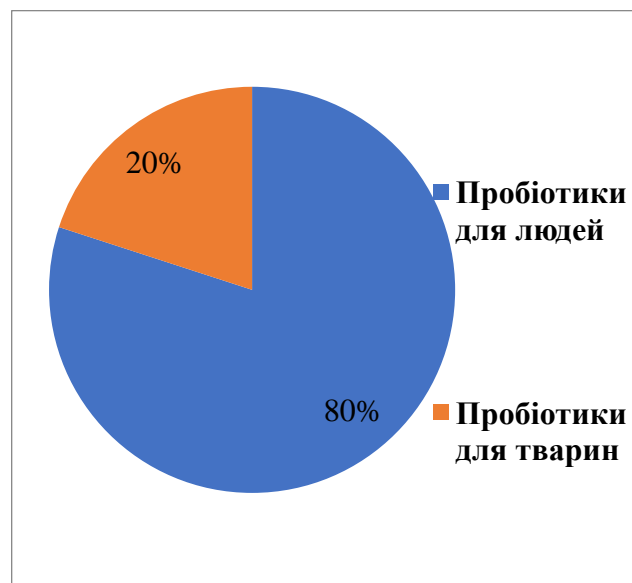
додати колонки з кількістю бджіол на початку та в кінці дослідження

Варіант досліду	Смертність на день досліду, %												
	12/06	13/06	14.06	15.06	16.06	17.06	19.06	20.06	21.06	22.06	23.06	24.06	27.06
Варіант 1. Контроль	14,5 ± 4,72 **	18,09 ± 3,7 ***	22,51 ± 4,2 ***	25,29 ± 4,13 ***	28,57 ±3,58 ****	32,83 ± 4,34 ***	45,57 ± 5,09 ****	45,57 ± 5,09 ****	52,6 ± 4,86 **** *	63,45 ± 4,81 **** *	68 ± 6,81 **** *	81,04 ± 8,28 ****	89,35 ± 6,01 **** *

<b>Варіант 2.</b> «Ругіна Про План Fortiflora» для собак, 4 г/сім'ю	<b>8,63</b> ±1,69 ***	<b>18,49</b> ±5,25 **	<b>27,36</b> ±5,77 ***	<b>27,93</b> ±5,65 ***	<b>31,01</b> ±6,04 ***	<b>35,5</b> ±7,10 ***	<b>44,04</b> ±5,88 ****	<b>48,01</b> ±5,89 ****	<b>53,32</b> ±6,26 ****	<b>60,02</b> ±6,92 ****	<b>63,83</b> ±7,08 ****	<b>80,26</b> ±4,04 **** *	<b>89,95</b> ±2,67 **** *
<b>Варіант 3.</b> «Капсули Бажана» для людей, 4 г/сім'ю	<b>8,49</b> ±4,96 *	<b>14,11</b> ±5,46 *	<b>16,35</b> ±5,78 *	<b>20,68</b> ±6,94 **	<b>23,85</b> ±7,79 **	<b>32,13</b> ±7,33 ***	<b>38,35</b> ±6,41 ****	<b>42,78</b> ±6,05 ****	<b>50,37</b> ±7,18 ****	<b>56,53</b> ±9,34 ***	<b>64,12</b> ±11,11 ***	<b>80,36</b> ±9,56 ****	<b>86,24</b> ±8,81 ****
<b>Варіант 4.</b> «Імунобакте-рин Д» для свійських тварин, 4 г/сім'ю	<b>11,44</b> ±5,57 *	<b>16,45</b> ±6,24 *	<b>18,48</b> ±6,45 *	<b>25,35</b> ±3,96 ***	<b>32,57</b> ±2,67 **** *	<b>36,2</b> ±3,52 **** *	<b>48,02</b> ±4,9 ****	<b>51,96</b> ±5,01 **** *	<b>54,11</b> ±5,77 ****	<b>59,7</b> ±9,21 ***	<b>64,6</b> ±9,44 ***	<b>74,44</b> ±7,41 **** *	<b>88,71</b> ±5,47 **** *
<b>Варіант 5.</b> «Алінормін» для бджіл, 4 г/сім'ю	<b>6,13</b> ±2,49 *	<b>8,24</b> ±3,66 *	<b>9,33</b> ±2,94 **	<b>11,05</b> ±4,09 *	<b>15,34</b> ±4,37 **	<b>18,33</b> ±3,97 ***	<b>35,15</b> ±4,54 ****	<b>41,57</b> ±2,39 **** *	<b>45,59</b> ±3,81 **** *	<b>51,03</b> ±5,56 ****	<b>56,2</b> ±2,81 **** *	<b>60,73</b> ±4,24 **** *	<b>85,65</b> ±4,37 **** *



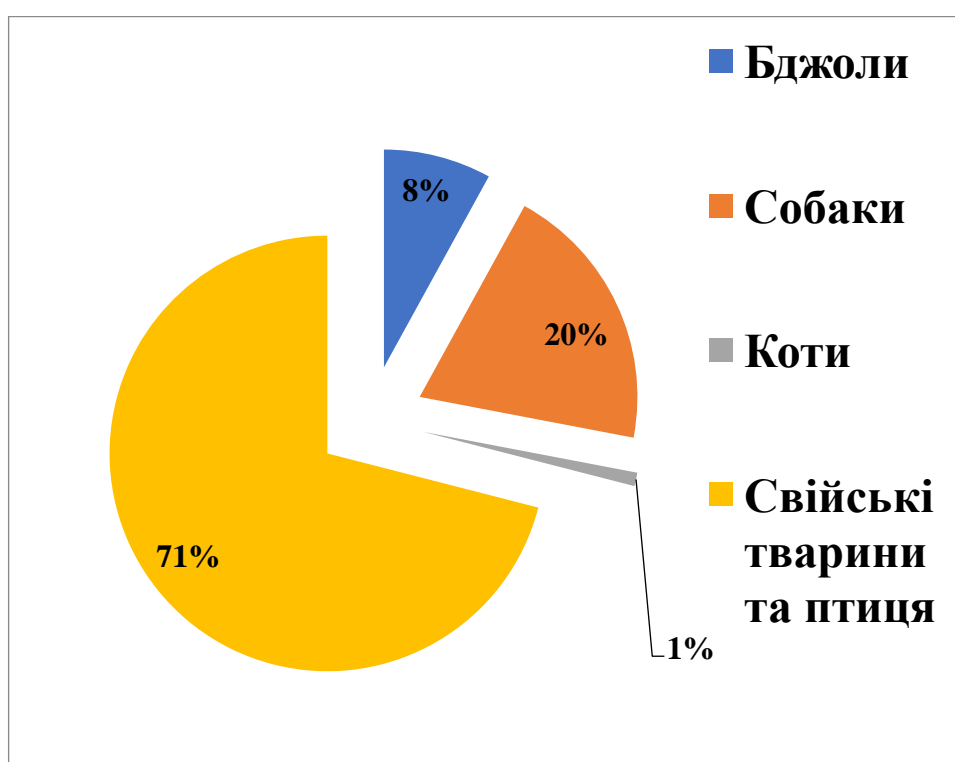
Якщо порівнювати показники динаміки природного відмирання бджіл за впливу пробіотиків, то найближчі до контрольних значення були у варіанті зі згодовуванням пробіотику для людей (Бажана). Даний експеримент доводить тезу, про необхідність врахування фактору специфічності при підборі пробіотичних засобів для бджіл зокрема тому, що в якості діючих речовин дані препарати містять саме штами бактерій-представників мікробіому здорових бджіл, організм комах адаптований до продуктів їх життєдіяльності та стійкий до можливих токсичних впливів. Застосування пробіотичних препаратів, що здатні витіснити з кишківника бджіл патогенну мікрофлору, що втягується в патологічний процес за інфекційних захворювань, повинно відобразитись на тривалості життя бджіл та прояв у них інфекційних захворювань, зокрема бактеріальної етіології [7]. Використання пробіотиків у комплексній терапії та профілактиці низки захворювань, зокрема гастроентерологічних, корекція стану ШКТ людини і тварин після використання антибіотиків давно відоме і широко поширене в Україні та світі [137, 140]. Пробіотичні препарати для людей є специфічними за видом і виготовлені на основі бактерій нормофлори, які виділені з шлунково-кишкового тракту людини [136]. Деякі пробіотики містять також дріжджові гриби та поживне середовище для бактерій.



**Рисунок 3.7** Співвідношення кількості пробіотичних препаратів для людей і тварин, зареєстрованих на ринку України

Ринок гуманних пробіотиків складається з надзвичайно великої кількості препаратів. На ринку України у вільному доступі можна придбати більше ніж 60 найменувань пробіотичних препаратів українського, європейського та американського виробництва [170]. В той же час, ринок пробіотичних препаратів для тварин представлений близько 20 найменуваннями. Якщо у відсотковому співвідношенні порівняти кількість, зареєстрованих в Україні пробіотиків для людей і кількість, аналогічних препаратів для тварин отримаємо картину, зображену на рисунку 3.7.

Ринок пробіотиків для тварин складається з невеликої кількості специфічних препаратів, наприклад для собак, але в більшості представлений препаратами широкого спектру дії і призначеними для декількох видів тварин (рис. 3.8).



**Рисунок 3.8 Порівняльна характеристика кількості пробіотиків за видом тварин**

Більшість пробіотиків для тварин містять одні й ті самі пробіотичні бактерії незалежно від виду тварин, для якого призначений препарат, а також додаткові

компоненти, серед яких поживні речовини рослинного і тваринного походження, ферменти та дріжджові гриби, макро- та мікроелементи [171]. На сьогодні в Україні доступні декілька пробіотичних препаратів, інструкція яких свідчить про можливість їх використання для бджіл. Всі вони містять загальновідомі штами пробіотичних бактерій, але лише пробіотик «Апінормін» містить штами бактерій, виділені безпосередньо з кишківника бджіл і тому може вважатися специфічним для даного виду комах [7, 113]. Порівняльна характеристика кількості доступних пробіотиків для людей і тварин свідчить про зацікавленість у використанні даних препаратів для різних видів тварин, в тому числі і бджіл, а також про їх поширеність в протоколах лікування та корекції станів у людей. Широкий спектр доступних пробіотиків, специфічних для людей, може бути свідченням їх ефективності в запропонованих схемах використання. Саме тому для порівняльного аналізу ефективності пробіотичних препаратів для бджіл було обрано специфічний пробіотик для бджіл «Апінормін», специфічний пробіотик для людей «Бажана» та 2 препарати з пробіотичною дією для тварин «Імунобактерин Д» та «Purina ProPlan FortiFlora». Дані препарати, згідно з інструкцією, є пробіотиками, мають у своєму складі корисні мікроорганізми різних видів (табл. 2.1), а також допоміжні речовини.

Всі досліджувані нами препарати містили у своєму складі штами мікроорганізмів з пробіотичною дією. Згідно даних літератури вони є представниками нормальної мікрофлори кишківника тварин чи людини, для яких призначені. Згідно отриманих нами в результаті дослідження даних можна зробити висновок, що для максимальної ефективності пробіотичного препарату при його конструюванні необхідно враховувати не лише походження окремих мікроорганізмів, але і вплив специфічної асоціації мікроорганізмів нормофлори на діяльність кишківника людини і тварин, зокрема бджіл.

Таким чином, отримані нами дані в лабораторних умовах доводять перспективність застосування пробіотичних засобів для профілактики та за європейського гнильцю бджіл, отримання органічної продукції бджільництва. При цьому обґрунтовані в лабораторних умовах оптимальні дози, способи

задавання «Апінорміну» комахам використані нами у наступних дослідженнях з відпрацювання схем його застосування у виробничих умовах.

### **3.7. Розроблення практичних схем застосування пробіотичних засобів для застосування за європейського гнильцю та профілактики в природних умовах.**

Для встановлення ефективності застосування пробіотичного препарату «Апінормін» для профілактики та лікування європейського гнильцю бджіл було розроблено і апробовано в умовах дослідної пасіки лікувальну схему застосування за європейського гнильцю та 2 профілактичні.

Схема застосування для лікування європейського гнильцю бджіл полягала у використанні специфічного пробіотику на бджолиних сім'ях, що мали клінічні ознаки та лабораторно підтверджений діагноз на європейський гнилець. Дослідження проводились на пасіці, де було виявлено сім'ї з клінічними ознаками європейського гнильцю бджіл. Всі сім'ї були обстежені на предмет виявлення характерних клінічних ознак. Комахи були малоактивними, при огляді було виявлено значну кількість підмору, а при огляді рамок було помічено знижену щільність обсидаженості рамок бджолами. Розплід характеризується як нерівномірний, виявлено значну кількість пустих комірок, розміщених хаотично по рамці з розплідом. При обстеженні незакритих виявлено значну кількість пустих комірок, а також таких, які містили рідкий клеєподібний вміст невизначеної форми. Необхідно зазначити, що після відкриття вулика було відчутно стійкий запах столярного клею. Для проведення експерименту з хворих сімей було відібрано ті, що мали аналогічні симптоми та однакову ступінь ураження і за принципом аналогів було сформовано 2 групи – дослідну і контрольну – по 7 бджолосімей в кожній.

Попередньо, пробіотичний препарат «Апінормін», згідно інструкції, було активовано питною нехлорованою водою (дослідний зразок 1) та препаратом «Аноліт» (дослідний зразок 2). Дослідні розчини було приготовано в дозі 4г

пробіотику на сім'ю, відповідно до висновків, отриманих в результаті лабораторних досліджень. Активацію препарату проводили згідно інструкції за 16-18 годин перед застосуванням. Дослідні групи отримували підготовлені раніше робочі розчини препаратів: перша група отримувала пробіотик «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю, активований водою (дослідний зразок 1), друга група отримувала пробіотик «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю, активований «Анолітом» (дослідний зразок 2). Контрольна група отримувала антибактеріальні засоби тетрациклінового ряду згідно інструкції. Комахи отримували препарат шляхом згодовування з 50% цукровим сиропом тричі з інтервалом 7 днів.

Облік результатів проводили через 7 днів після останнього згодовування препаратів. Оцінку ефективності препаратів проводили згідно інтенсивності прояву клінічних ознак, зазначених при первинному обстеженні сімей. Отримані результати представлені в таблиці 3.11.

Таблиця 3.11

**Інтенсивність прояву клінічних ознак Європейського гнильцю в дослідних сім'ях**

Показник	Група					
	Контрольна		Дослідна 1		Дослідна 2	
	До	Після	До	Після	До	Після
Запах	Специфічний (столярного клею)		Меду та воску		Меду та воску	
Характеристика розплоду	Рівномірний з вираженою строкатістю		Рівномірний, незначна строкатість		Рівномірний мінімальна строкатість	
Активність бджіл у вулику (обсидженість рамок у вулику бджолами)	Малоактивні, менше третини рамок обсиджені бджолами		Активні, більшість рамок обсиджені бджолами		Активні, всі рамки обсиджені бджолами	
Кількість підмору, шт	50	56	45	20	48	15

Отримані результати свідчать про ефективність застосування всіх схем боротьби із європейським гнильцем. Треба зазначити, що контрольна група

показала незначну позитивну динаміку – розплід став більш рівномірним, але ознаки строкатості спостерігались (Рис. 3.9). Рамки були незначно обсиджені бджолами, значна кількість комах знаходилась на стінках вулика чи на дні. Комахи малоактивні, кволі, кількість підмору після застосування антибактеріальних препаратів незначно збільшилась, на 12%, а саме на 6 одиниць. Специфічний запах столярного клею став менш інтенсивним, але точно визначався.



**Рисунок 3.9 Рамка з розплідом контрольної групи**

Обидві дослідні групи показали значну позитивну динаміку після курсу лікування. Після відкриття вулику було чутно насичений запах меду та воску. Комахи дуже активні, швидко переміщались по рамкам, створювали гул робочого процесу. Рамки з бджолами обсиджені повністю, на стінках та дні вулика помічено 1-2 бджоли. Характеристика розплоду значно покращилась –

розплід рівномірний, містив незначні ознаки строкатості (Рис. 3.10). В деяких комірках було візуалізовано здорові личинки. Необхідно зазначити що у дослідній групі, що отримувала препарат «Апінормін» активований препаратом «Аноліт» комахи були активніші. Кількість підмору в даній дослідній групі зменшилась на 31,25%, а саме на 33 одиниці.



**Рисунок 3.10 Рамка з розлодом після згодовування препарату «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю**

Отримані результати свідчать про біостимулювальний вплив дослідних препаратів на комах. Згідно отриманих результатів, пробіотик «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю стимулює природну опірність комах до патогенів, сприяючи швидшому очищенню уражених комірок і видаленню відмерлих решток личинок. Зокрема, виявлено позитивний вплив на яйценоскість маток. Доказом цього може слугувати рівномірний запечатаний розплід, а також значна кількість комірок, що містять здоровий розплід (рис. 3.11). Доказом позитивного впливу на силу сім'ї може слугувати значна кількість рамок із запечатаним медом та

значна обсиженість рамок бджолами. Позитивний вплив на динаміку природного відмирання бджіл та подовжуваність життя комах підтверджує показник кількості підмору. В дослідній групі 1 даний показник після завершення експерименту зменшився на 25 одиниць, що становить 62,5% від кількості підмору на початку дослідю.



**Рисунок 3.11 Рамка з розплодом після згодовування комбінації препаратів «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю та «Аноліт»**

З викладеного вище можна зробити висновок про позитивний вплив пробіотичного препарату «Апінормін», зокрема в комбінації з препаратом «Аноліт» на загальний стан бджолиних сімей, що мали ознаки ураження європейським гнильцем. Отримані результати можуть слугувати підставою і обґрунтуванням доцільності перспектив дослідження заміни антибактеріальних препаратів специфічними пробіотиками за європейського гнильцю. Окремою перевагою застосування пробіотичних засобів є відсутність їх негативного впливу на якість отримуваної продукції бджільництва, а також повна відповідність всесвітній концепції боротьби з антибіотикорезистентністю в



галузі сільського господарства, гуманної та ветеринарної медицини, а також контролю якості та безпечності продукції агропромислового комплексу.

З профілактичною метою пробіотичні препарати доцільно застосовувати на початку весни, після першого обльоту та в період інтенсивного медозбору, а також при підготовці комах до зимівлі.

Схема профілактичної обробки комах у весняно-літній період або в період активного медозбору передбачає застосування пробіотику саме з метою зміцнення організму комах в умовах значного навантаження, позитивного впливу на сповільнення динаміки природнього відмирання бджіл, а також стимулювання плідності та яйценоскості маток.

Для проведення досліджень за принципом аналогів було створено 3 групи - контрольну та 2 дослідні по 7 бджолосімей в кожній. Для експерименту було відібрано тільки ті сім'ї, що були клінічно здоровими і не мали ознак захворювань будь-якої етіології. Дослідні препарати в необхідних концентраціях готувались безпосередньо перед згодовуванням за схемою, описаною раніше. Комахи отримували препарат шляхом згодовування з 50% цукровим сиропом 2 рази на місяць (в квітні, червні та липні) з інтервалом 7 днів. Контрольна група отримувала чистий цукровий сироп. Ефективність препарату оцінювали за рядом показників, зокрема загальний стан сімей, якість розплоду, стійкість до збудників захворювань, інтенсивність медозбору та яйценоскість маток. Облік результатів проводили в кінці сезону активного медозбору, а саме в кінці липня. Отримані результати наведено в табл. 3.12.

*Таблиця 3.12.*

**Вплив профілактичного застосування комбінації препаратів «Апінормін» та «Аноліт» у весняно-літній період на стан і продуктивність бджолиних сімей**

№ п/п	Показники	Контрольна група		Дослідна група 1		Дослідна група 2	
		до	після	до	після	до	після
1	Стан сімей	Добрий		Добрий		Добрий	
2	Якість розплоду	Не щільний, 1 сім'я із 7 з пропусками		Щільний, практично без пропусків		Щільний, практично без пропусків	

3	Активність бджіл	Бджоли активні		Бджоли більш активні, рамки обсижені бджолами		Бджоли більш активні, рамки обсижені бджолами	
4	Стійкість до збудників інфекційних хвороб	Виявлено 1 із 7 бджолосімей з ознаками європейського гнильцю		Стійкі		Стійкі	
5	Медозбір за сезон, %	100		135 - 161		158 - 178	
6	Яйценокість маток за сезон, %	100		140 - 153		156 - 174	
7	Кількість підмору, шт	18	17	18	12	19	7

Згідно результатів, вказаних в таблиці 3.9., можна зробити висновок про очевидний позитивний вплив досліджуваних препаратів на більшість досліджуваних показників. Зокрема, біостимулювальний вплив препаратів підтверджується активністю комах у вулику, збільшенням відсотку медозбору за сезон – на 35-61% та на 58-78% у варіанті зі згодовуванням комбінації пробіотику «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю та препарату «Аноліт». Зменшилась кількість підмору на 33,3%, а саме на 11 одиниць у варіанті зі згодовуванням пробіотику «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю та на 63,1 %, а саме на 10 одиниць у варіанті зі згодовуванням комбінації пробіотику «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю та препарату «Аноліт». Ознакою підвищення загальної опірності організму комах до збудників захворювань бджіл може слугувати відсутність ознак захворювань бактеріальної етіології у дослідних групах, порівняно з контролем, де виявлено 1 сім'ю з клінічними ознаками європейського гнильцю. На підтвердження стимуляційного впливу препаратів на яйценокість маток свідчить рівномірний щільний розплід в усіх сім'ях дослідних груп, а також підвищення відносної яйценокості маток на 40-53 % у варіанті зі згодовуванням пробіотику «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю та на 56-74% у варіанті зі згодовуванням комбінації пробіотику «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю препарату «Аноліт».



1	Стан сімей навесні	Задовільний, загинула 1 із 7 бджолосімей		Добрий, зменшилася кількість помору		Добрий, зменшилася кількість помору	
2	Якість розплоду	Не щільний, з пропусками		Щільний, практично без пропусків		Щільний, без пропусків	
3	Активність бджіл	Бджоли менш активні, менше третини рамок обсиджені бджолами		Бджоли активні, ранній обліт, більшість рамок обсиджена бджолами		Бджоли активні, ранній та інтенсивний обліт бджіл, всі рамки обсиджені бджолами	
4	Стан гнізда	Чистий, без плям		Чистий, без плям		Чистий, без плям	
5	Кількість підмору, шт	18	60	12	20	13	18

Згідно отриманих результатів можна зробити висновок про позитивний вплив дослідних препаратів на якість зимівлі комах. Зокрема, в порівнянні з контролем, у дослідних групах всі сім'ї вийшли із зимівлі з незначними втратами. Кількість підмору була незначною. В дослідній групі 1 кількість підмору збільшилась на 8 одиниць, а в дослідній групі 2 – на 5 одиниці. В контрольній групі загальна кількість підмору збільшилась на 42 одиниці. До того ж в контрольній групі протягом зимівлі загинула 1 сім'я. Розплід в дослідних сім'ях був щільним, не мав пропусків та ознак ураження збудниками бактеріальних захворювань. Рамки з розплодом в контрольній групі мали незначну кількість пропусків, проте інших ознак захворювань виявлено не було.

Необхідно зазначити, що активність комах значно відрізнялась в усіх трьох групах. Комахи контрольної групи були малоактивні, значна їх кількість знаходилась на дні та стінах вулика. Менше третини рамок були обсиджені бджолами. У варіанті зі згодовуванням пробіотику «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю бджоли були досить активними, перший обліт стався досить рано без попередньої підгодовлі комах після відкриття вуликів, майже всі рамки були щільно обсиджені бджолами. У варіанті зі згодовуванням комбінації препаратів «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю та «Аноліт» бджоли були дуже активними, в сім'ях даної групи теж спостерігався ранній, але більш інтенсивний обліт без

попередньої підгодівлі, крім того в більшості сімей всі рамки були обсижені бджолами.

Оцінка стану гнізда показала позитивні результати – всі вулики дослідних та контрольної групи були чистими, плям чи бруду не було виявлено. Даний факт свідчить в першу чергу про якість залишеного на зиму корму.

Аналіз отриманих результатів показує очевидний позитивний вплив як самостійного застосування пробіотику, так і в комбінації з «Анолітом» на стан зимівлі бджолиних сімей. При обстеженні сімей навесні дослідні групи показали набагато кращі показники по всім досліджуваним параметрам. Окремо треба зазначити, що дослідні сім'ї не мали жодної ознаки бактеріальних захворювань, що свідчить не лише про клінічне здоров'я комах, які входили в зимівлю, а й про значну опірність їх організму у випадку, якщо збудники бактеріозів залишались в незначній кількості у вулику і не набули поширеності протягом періоду зимівлі.

Таким чином можна зробити висновок про доцільність використання пробіотичного препарату «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю в тому числі в комбінації з препаратом «Аноліт» в запропонованій схемі для профілактики європейського гнильцю бджіл восени при підготовці бджолиних сімей до зимівлі.

## РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

В ході еволюції відбувалася адаптація бджоли медоносної до умов існування на певній території, в результаті чого виникли так звані аборигенні породи бджіл, що володіють цінними господарсько-корисними ознаками і розводяться для отримання необхідної продукції та запилення ентомофільних видів рослин. Корисні комахи становлять значну цінність не лише як об'єкти тваринного світу, видове різноманіття яких необхідно підтримувати і зберігати, а й як важливу галузь сільського господарства, що має не лише самостійну цінність, як джерело продуктів харчування, а й відіграє вирішальну роль в збереженні рідкісних і корисних рослин, забезпечуючи запилення.

Питання екологічної безпечності продуктів харчування на сьогодні стоїть дуже гостро в усіх галузях тваринництва, зокрема у бджільництві. З огляду на значний експорт меду з України за кордон питання оцінки його якості стоїть дуже гостро. Масова фальсифікація меду в масштабах світового експорту вже не становить значної проблеми саме через простоту перевірки якості натурального солодкого продукту, а також через зростаючий попит на мед, що пройшов термічну обробку. Тим не менш, виявлення залишкових кількостей антибіотиків у пробах українського меду суттєво знижує його вартість на міжнародному ринку і знижує кількість експорту меду з України. Продуктивність бджолої сім'ї безпосередньо залежить від її сили, а також від впливу ряду екологічних чинників, серед яких забруднення навколишнього середовища, наявність збудників інфекційних та інвазійних захворювань, застосування антибіотиків тощо [20].

Проблематика антибіотикорезистентності становить значну загрозу для гуманної та ветеринарної медицини, адже такі стійкі до антибіотиків мікроорганізми викликають важкі захворювання у людини і тварин. Лікування захворювань, спричинених резистентними збудниками не завжди є ефективним на ряду з більш негативним впливом на детоксикаційну та видільну системи

організму людини і тварин. Необхідно також звернути увагу на те, що споживання продуктів харчування, зокрема меду, збагачених залишками антибіотиків також може бути причиною розвитку толерантності до антибактеріальних засобів у людини і тварин.

Для отримання екологічно безпечної продукції бджільництва (наприклад, меду без антибіотиків), стимуляції розмноження та підвищення резистентності бджіл до збудників інфекційних захворювань і несприятливих чинників довкілля назріла доцільність застосовувати комплексні натуральні препарати, зокрема пробіотики [113, 118, 174].

На тлі зростаючої занепокоєності проблемою стійкості до антибіотиків та пошуку способів її вирішення в галузі бджільництва, використання пробіотиків для стимуляції розвитку та продуктивності бджолиних сімей, розроблення і впровадження у практику схем їх застосування для профілактики та лікування інфекційних захворювань бджіл, зокрема бактеріальних, могли б замінити масове використання антибактеріальних препаратів та стати зброєю в боротьбі з антибіотикорезистентністю. Пошук засобів та способів їх використання є викликом і пріоритетом для сучасного бджільництва.

Пробіотики та пробіотичні мікроорганізми є предметом значних дискусій в усіх сферах діяльності людини, пов'язаних з питанням охорони здоров'я, профілактики та лікування різноманітних патологій людини і тварин, шлунково-кишкового тракту зокрема, а також в питаннях, що стосуються контролю якості продукції тваринного походження.

В зазначеному аспекті важливого значення набули бактеріальні препарати на основі нормофлори шлунково-кишкового тракту (ШКТ) людини і тварин – пробіотику [15, 18, 119, 148]. Це живі мікробіологічні препарати для людей і тварин, які за рахунок антагоністичних властивостей витісняють патогенну мікрофлору та відновлюють мікробний баланс кишечника. Вважається, що пробіотичні культури та їх метаболіти позитивно впливають на організм,

проявляють антимікробні та широкий спектр біостимулювальних властивостей [184 - 187]. Ці мікроорганізми можуть приносити користь своїм господарям при перетравленні їжі, забезпеченні необхідними поживними речовинами, детоксикації шкідливих молекул, захисті від патогенів і паразитів, біостимуляції життєздатності, імуномодуляції тощо [16, 17, 46]. Дослідження мікробіому кишківника бджіл, сформованого в процесі еволюції та адаптованого до конкретних умов існування на основі взаємодії макроорганізму з мікрофлорою, слугують теоретичним і експериментальним обґрунтуванням розроблення і застосування пробіотиків у практиці [16, 110, 128, 149].

В Україні та світі створено багато препаратів на основі пробіотиків для гуманної та ветеринарної медицини. Вони досить широко використовуються як допоміжні засоби в протоколах лікування за великої кількості захворювань, що супроводжуються порушенням нормальної мікрофлори в організмі людей і тварин [161, 185, 188]. Останнім часом починає розвиватися напрям з використанням пробіотиків у бджільництві. Захворювання бджіл, зокрема бактеріальної етіології, становлять значну небезпеку для бджолиних сімей та галузі бджільництва, адже збудники таких захворювань уражають саме розплід, поширюючись і розвиваючись призводять до загибелі бджолиної сім'ї в результаті природнього відмирання робочих комах.

З літературних даних відомо, що в ході еволюції медоносними бджолами вироблені захисні механізми від інфікування під час медозбору. Саме в цей період більшість комах-представників сім'ї контактує з навколишнім середовищем, яке може бути джерелом бактеріальної небезпеки. Одним з таких механізмів є наявність в організмах бджіл асоціації пробіотичних культур, формування якої залежить від видового складу медоносів, породності сімей, технологічних чинників їх утримання, стану навколишнього середовища та ін. [189 - 190].

Препарати на основі пробіотичних мікроорганізмів мають відповідати загальним вимогам до препаратів, призначених для застосування тваринами, а



саме: нешкідливість, специфічність дії та ефективність. Доведення відповідності препарату даним критеріям обґрунтовує можливість застосування такого препарату на практиці.

Деякі практики застосовують пробіотики на бджолах, у котрих діючою речовиною слугують штами мікроорганізмів, що виділені з інших видів тварин. Такі препарати, не адаптовані до бджіл, змінюють склад мікробіому цих комах, що негативно відображається на їх здоров'ї [18, 131, 191]. Необхідно зазначити, що клінічне здоров'я окремої комахи та бджолиної сім'ї в цілому залежить не тільки від наявності конкретних штамів мікроорганізмів в асоціації пробіотичного препарату, а й співвідношення тих чи інших бактерій. Тобто для максимальної ефективності та безпечного застосування пробіотику для бджіл необхідно дотримуватись при конструюванні саме оптимального співвідношення видів пробіотичних бактерій та їх кількості в асоціації нормофлори. Це питання на даний момент недостатньо вивчене і на нашу думку становить значний інтерес з точки зору вдосконалення підходів до конструювання та розробки нових пробіотичних засобів для бджіл.

На даний момент ринок пробіотичних препаратів для бджіл в Україні обмежений. Серед них є лише один специфічний пробіотик, що сконструйований саме на основі бактерій нормофлори кишківника, притаманних саме бджолам. Також представлено декілька препаратів, які рекомендовані до застосування в бджільництві, але містять в своєму складі бактерії, виділені з інших видів тварин. Брак специфічних пробіотиків для бджіл пояснюється відсутністю комплексних підходів до розробки і впровадження в практику подібних препаратів саме для бджіл.

Першим етапом у плануванні підходів до конструювання пробіотичних препаратів є виділення та вивчення властивостей бактерій, що характерні для нормофлори кишківника бджіл. Першою ланкою досліджень зі створення пробіотиків для бджіл є виділення, ідентифікація та характеристика пробіотичних культур з їх кишківника або свіжовідкачаного меду. Виділення

бактерій нормофлори з кишківника бджіл шляхом аутопсії комах є беззаперечно вірним способом з точки зору аналогічних досліджень, проведених в гуманній та ветеринарній медицині. У зв'язку з тим, що бджоли – комахи соціальні і мешкають численними сім'ями для отримання достовірних результатів розтин необхідно проводити не однієї, а багатьох комах з однієї сім'ї. Такий підхід потребує знищення значної кількості бджіл, що може призвести до ослаблення сім'ї. Альтернативою може слугувати дослідження свіжовідкачаного меду. Шведськими дослідниками показано, що у меді, переданому на дослідження не пізніше ніж через 12 годин після відкачування, присутні 13 видів молочнокислих бактерій, 9 з яких лактобацили та 4 – біфідобактерії [118]. Незважаючи на масштабні та різноманітні дослідження видового різноманіття бактерійного складу, виділеного з меду, літературні дані не містять інформації, що стосується методики проведення подібних досліджень.

Нами було детально досліджено та запропоновано удосконалену методику виділення пробіотичних мікроорганізмів зі свіжовідкачаного меду. Для дослідження було обрано та використано тільки проби меду, що були проаналізовані в лабораторії на відповідність критеріям оцінки якості меду згідно ДСТУ. Отримані результати дали можливість прослідкувати та чітко визначити оптимальний час для виділення пробіотичних організмів з меду з метою отримання життєздатних бактерій. Встановлено, що оптимальним є період з першого по третій день після відкачування. Виділені в даний проміжок часу пробіотичні бактерії є максимально життєздатними і володіють всіма корисними ознаками, що необхідні для отримання ефективного пробіотичного засобу. Порівняльний аналіз проб меду різного ботанічного складу та періоду відкачування довів відсутність залежності видового складу асоціації мікроорганізмів та простоти їх виділення в лабораторних умовах від видового складу пилкових зерен в меді (сорт меду) та від сезону медозбору (рання весна, початок та кінець літа). Виділені з усіх трьох зразків мікроорганізми володіли всім набором необхідних корисних ознак, видовий склад асоціації також не відрізнявся.

Отримані нами дані свідчать про доцільність та необхідність використання саме свіжовідкачаного меду як джерела пробіотичних мікроорганізмів. Такий спосіб дасть можливість зберегти чисельність корисних комах і отримати якісний матеріал для подальшого вивчення властивостей як окремих бактерійних штамів, так і особливостей асоціації пробіотичних організмів нормофлори кишківника бджіл. Штами пробіотичних бактерій, виділені таким чином підходять для наступного масового культивування, ліофілізації та використання в якості компонентів не лише специфічних пробіотиків для бджіл, а й препаратів комплексної дії для тварин та людини.

На основі даних літератури та результатів наших попередніх досліджень встановлено, що бактерії виду *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum* та *Enterococcus faecium* є найбільш поширеними і характерними для нормофлори бджіл української степової породи, що є домінуючою породою медоносних бджіл виду *Apis mellifera* на території України.

Особливу цікавість для нас становило вивчення антагоністичних властивостей пробіотичних культур по відношенню до збудників бактеріозів бджіл, зокрема європейського гнильцю. Ефективність пробіотичних засобів для бджіл ґрунтується на створення конкурентних умов існування бактерій – корисних, патогенних та умовно-патогенних- в кишківнику бджіл. Особливу цікавість для сучасних науковців становить саме здатність пробіотичних культур нормофлори кишківника комах проявляти антагоністичні властивості по відношенню до представників патогенної та умовно патогенної мікрофлори [19, 192 - 193]. Ця властивість пробіотичних мікроорганізмів проявляється найкраще при контакті пробіотику, на основі асоціації бактерій нормофлори, з організмом хазяїна, для якого вони характерні [19, 194]. Отримані результати демонструють явно виражене домінування та пригнічення пробіотичними бактеріями не лише збудника європейського гнильцю бактерії *Melisococcus plutonius*, а й представників умовно-патогенної мікрофлори – наприклад *Echerichia coli*.

Шляхом порівняльного аналізу ринку представлених в Україні пробіотичних засобів для бджіл ми дійшли висновку, що специфічний пробіотик

для бджіл «Апінормін» (Додаток 1) відповідає всім параметрам, які нами було закладено для модельного зразку, необхідного для розробки методів та підходів до обґрунтування використання пробіотичних препаратів у бджільництві та розробки схем, способів та доз їх застосування на практиці.

Ветеринарні засоби, що пропонуються для використання повинні відповідати низці вимог, які гуртуються на оцінці нешкідливості та специфічності дії препарату, а також його ефективності. Оцінку нешкідливості у випадку з пробіотичними мікроорганізмами, згідно наведених вище даних, доцільно проводити тільки для препаратів, що сконструйовані на основі бактерій нормофлори. Дослідження даного питання ґрунтувалися на визначенні впливу різних доз та способів застосування специфічного пробіотику для бджіл «Апінормін». Згідно даних літератури було обрано 4 дози застосування модельного препарату, а саме 0,8; 0,4; 4 та 8 г на сім'ю та 2 способи застосування – згодовування з цукровим сиропом та обприскування тіла комах для проведення досліджень в лабораторних умовах. Ми не виключаємо, що ізольовані в садки бджоли, які є соціальними комахами, тобто такими, що можуть жити повноцінно тільки в сім'ї, зазнають білкового голодування і страждають від продуктів перекисного окислення, які утворюються в результаті такого стресу. Згодовування препарату, що утримує казеїново-дріжджове поживно-захисне середовище, у високих концентраціях може усувати цей факт, а отже такий прийом може застосовуватись при стресових ситуаціях в бджолиних сім'ях, зокрема за порушення технології утримання комах. Окрім того, препарат можна застосовувати в комплексному лікуванні та оздоровленні бджіл за інфекційних та інвазійних захворювань, зокрема за європейського гнильцю. Однак таке припущення потребує експериментальної перевірки на бджолиних сім'ях в кожній конкретній ситуації.

Незважаючи на умови утримання комах, які були далекими від природніх, модельний препарат продемонстрував відсутність токсичного впливу на організм комах в усіх дозуваннях та за обох способів застосування, а також

сприяв сповільненню динаміки природного відмирання комах в умовах лабораторного експерименту.

Важливою характеристикою пробіотичних засобів є специфічність дії щодо виду тварин [113, 174, 195]. Проведені нами дослідження з практичної точки зору продемонстрували значну різницю в ефективності між низкою неспецифічних пробіотиків та «Апінорміном». Необхідно зазначити, що у складі пробіотичних засобів, які були обрані для порівняльного аналізу, були присутні аналогічні види бактерій, що і в специфічному пробіотику для бджіл. Суттєва різниця полягала в тому, що кожен з неспецифічних пробіотиків містив у собі лише один чи іноді два види бактерій з асоціації мікроорганізмів, наприклад *Lactobacillus plantarum* та *Bifidobacterium bifidum* у складі пробіотику для людей, і дуже багато додаткових речовин. Крім того, виділені бактерії хоч і належали до роду *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*, але, очевидно, не були адаптованими для умов існування саме в кишківнику бджіл, що зумовило відсутність позитивного ефекту [196]. Пробиотики для продуктивних тварин містили в складі велику кількість ферментних речовин, що могли негативним чином вплинути на динаміку природного відмирання бджіл. Пробиотик для собак мав у своєму складі лише бактерії виду *Enterococcus faecium*. З огляду на літературні дані, що свідчать про наявність антагоністичних властивостей пробіотичних мікроорганізмів в цілому та у бактерій виду *Enterococcus faecium* зокрема [197, 198] отримані нами результати свідчать про необхідність забезпечити функціонування асоціації мікроорганізмів у кишківнику бджіл для отримання максимального ефекту. Загалом, показано, що неспецифічні пробиотики певною мірою прискорюють динаміку природного відмирання бджіл, порушуючи стабільність кишкового співтовариства, що призводить до ослаблення імунітету комах, зниження їх опірної здатності та виснаження резервних сил організму комах. В масштабах сім'ї це може призводити до зниження продуктивності, загальному ослабленню сім'ї та появи захворювань різної етіології.

Комплексний підхід до застосування пробіотиків для бджіл забезпечувався також дослідженням ефективності та нешкідливості комбінованого використання пробіотику «Апінормін» та препарату «Аноліт». Було проведено дослідження з визначення впливу згодовування та обробки тіла комах препаратом «Аноліт». Отримані результати свідчать про відсутність токсичного впливу даного препарату на корисних комах, а також демонструють значний позитивний вплив даної комбінації на загальний стан комах та тривалість їх життя в умовах лабораторного дослідження.

Оцінка ефективності дослідного препарату підтверджується шляхом порівняльної оцінки застосування оптимальних доз, схем і способів застосування, відпрацьованих в лабораторії, в умовах дослідної пасіки. Згідно проведеного порівняльного аналізу нами було обрано оптимальну дозу – 4 г на сім'ю та найбільш природній спосіб застосування, а саме згодовування з цукровим сиропом для проведення подальших досліджень з відпрацювання схем застосування пробіотиків для бджіл в умовах пасіки.

Аналіз життєвого циклу бджіл, сезонності використання комах у промисловому бджільництві та проблем, з якими стикаються бджолярі на різних етапах своєї діяльності спонукали нас до розробки та апробації в умовах пасіки трьох способів застосування пробіотиків у бджільництві.

В ході роботи було розроблено та відпрацьовано схему застосування пробіотичного препарату «Апінормін» за європейського гнильцю та 2 схеми профілактичного застосування на практиці. Порівняльну оцінку ефективності пробіотику «Апінормін», зокрема в комбінації з «Анолітом» проводили шляхом оцінки ряду показників

Схема використання пробіотиків для лікування бактеріальних хвороб бджіл включала в себе згодовування дослідного пробіотику «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю з цукровим сиропом та комбінації «Апінорміну» в дозі 4 г на сім'ю та «Аноліту» двократно з інтервалом 7 днів. Отримані результати показали

значне покращення стану бджолиних сімей, зокрема підвищення продуктивності та опірної здатності комах, а також зниження інтенсивності прояву клінічних ознак захворювання. Порівняльний аналіз самотійного використання пробіотику та комбінації з «Анолітом» показав вищу ефективність використання комплексної схеми застосування пробіотику за європейського гнильцю бджіл.

Схема використання пробіотику «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю, зокрема в комбінації з «Анолітом» для профілактики бактеріальних хвороб бджіл у весняно-літній період полягала у порівняльному дослідженні ефективності самотійного згодовування пробіотику «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю та у комбінації з «Анолітом» у період підготовки до сезону медозбору, навесні, та в період активного медозбору (літо). Для проведення даного дослідження пробіотик «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю, зокрема у комбінації з «Анолітом», згодовували бджолам 2 рази на місяць (у квітні, червні та липні) з інтервалом 7 днів. Отримані дані показали значний приріст показників медозбору за сезон та яйценоскості матки, порівняно з контрольною групою, яка отримувала чистий цукровий сироп. Крім того, показники природньої смертності, а як наслідок сила сімей у дослідних варіантах була значно вище.

Схема використання пробіотику «Апінормін» в дозі 4 г на сім'ю, зокрема в комбінації з «Анолітом» для підготовки бджолиних сімей до зимівлі передбачала двократне згодовування дослідних препаратів бджолам безпосередньо перед консервуванням на зиму. Оскільки період зимівлі є несприятливим для комах, що використовуються в промисловому бджільництві, метою застосування пробіотиків є посилення резистентності комах до збудників захворювань, а також загальнозміцнюючий вплив на їх організм перед початком сезону медозбору, а саме перед першим вильотом навесні. Отримані дані показали, що застосування пробіотичного препарату «Апінормін», зокрема в комбінації з «Анолітом», позитивним чином вплинуло на стан сімей в період зимівлі. Жодна з дослідних сімей не загинула, сім'ї були активними, жодна сім'я

не мала клінічних ознак захворювань бактеріальної етіології, кількість підмору була мінімальною.

Таким чином, на прикладі модельного препарату «Апінормін» теоретично обґрунтовано та експериментально доведено ефективність використання специфічних пробіотичних засобів для бджіл для профілактики та лікування європейського гнильцю бджіл. Розроблено та відпрацьовано в лабораторних та природних умовах практичні схеми комбінованого застосування пробіотику «Апінормін» та препарату «Аноліт» з метою профілактики європейського гнильцю бджіл у весняно-літній період та при підготовці комах до зимівлі, а також лікувальну схему застосування за європейського гнильцю бджіл, рекомендовані нами для застосування на пасіці.

Отримані нами результати та сформульовані висновки формують підґрунтя для подальших досліджень різноманіття асоціації нормофлори кишківника бджіл української степової породи бджіл, встановлення видового різноманіття в межах визначених родів бактерій, що були виявлені в кишківнику бджіл. Позитивний ефект комбінованого застосування пробіотиків з іншими препаратами, на прикладі синергії між «Апінорміном» та «Анолітом» формує перспективи для розробки подібних комбінацій для застосування за хвороб бджіл різної етіології, схеми лікування яких на даний момент не розроблені або ґрунтуються на використанні виключно хіміотерапевтичних препаратів.



## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі отримано нові дані та експериментально обґрунтовано комплексний підхід до розроблення і впровадження в практику бджільництва пробіотиків для профілактики та лікування європейського гнильцю бджіл, який ґрунтується на проведенні досліджень з виділення, визначенні видового складу та властивостей асоціації мікроорганізмів нормофлори кишківника бджіл, з'ясуванні характеристик пробіотичного засобу в лабораторних умовах, проведенні науково-виробничих випробувань дослідного препарату та розробленні практичних схем його застосування.

1. Удосконалено методику виділення пробіотичних культур зі свіжовідкачаного меду бджолиного, яка доводить можливості їх виділення незалежно від ботанічного походження сировини та наочно показує оптимальні терміни для отримання мікроорганізмів на протязі перших трьох діб після відкачування меду.

2. За культурально-морфологічними й біохімічними характеристиками визначено видовий склад виділеної асоціації мікроорганізмів нормофлори бджіл української степової породи, яка отримана зі зразків свіжовідкачаного меду та складається з *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* і *Bifidobacterium bifidum*.

3. Встановлено антагоністичні властивості асоціації *L. plantarum*, *E. faecium*, *Bif. Bifidum* по відношенню до збудника європейського гнильцю бджіл, а саме *Str. pluton*. Підтверджено відповідність асоціації мікроорганізмів нормофлори зі свіжовідкачаного меду бактеріальній складовій препарату «Апінормін», що слугувало обґрунтуванням його використання у наступних дослідженнях в якості модельного зразка.

4. В лабораторних умовах досліджено пероральну (згодовуванням з цукровим сиропом) та контактну (шляхом обприскування тіла бджіл) дії препарату «Апінормін» на бджолах, ізольованих в садки ряду дозувань пробіотику, а саме 0,8, 0,4, 4 та 8 г на сім'ю. Доведено переваги перорального

способу застосування над контактним, оптимальною дозою застосування препарату є 4 г на сім'ю.

5. Доведено нешкідливість дії «Апінорміну» в діапазоні досліджуваних дозувань 0,8 – 8 г на сім'ю та достовірне сповільнення динаміки природного відмирання бджіл у варіанті за згодовуванням дослідного препарату в дозі 4 і 8 г на сім'ю, що доводить його біостимулювальні властивості.

6. Показано переваги комбінованого застосування «Апінорміну» в оптимальній дозі (4 г на сім'ю) та препарату «Аноліт» при заміні води на стадії активації препарату перед його застосуванням, а саме сповільнення динаміки природного відмирання бджіл в умовах ізольованого утримання.

7. З'ясовано, що при згодовуванні бджолам з цукровим сиропом пробіотиків (рекомендованих для людей, свійських тварин, собак), неспецифічних для досліджуваних комах, відмирання бджіл знаходилось практично на рівні контролю. У варіанті зі згодовуванням «Апінорміну» відмирання бджіл уповільнювалось порівняно з контролем від 3,7 до 20,31% ( $89,35 \pm 6,01$  у контролі і  $85,65 \pm 4,37$  в досліді та  $81,04 \pm 8,28$  у контролі і  $60,73 \pm 4,24$  в досліді), що свідчить про необхідність застосування принципу специфічності по виду тварин при виборі пробіотичних засобів.

8. Розроблено одну практичну схему застосування для лікування європейського гнильцю бджіл та дві профілактичні схеми застосування, а також доведено стимулювальний вплив комплексу «Апінорміну» і «Аноліту» на інтенсивність відкладання яєць бджолиними матками та медопродуктивність бджіл.

## ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Запропоновано і доведено лабораторними і практичними дослідженнями доцільність та ефективність використання пробіотичного препарату «Апінормін», зокрема в комбінації з «Анолітом», для бджіл для профілактики та лікування європейського гнильцю бджіл.

Рекомендовано для лабораторій відповідного профілю та наукових досліджень методику виділення пробіотичних культур зі свіжовідкачаного меду з метою конструювання нових пробіотичних засобів, вивчення властивостей та різноманіття асоціації мікроорганізмів нормофлори та для практичного застосування як діючих речовин пробіотичних препаратах або засобах комплексної дії.

Запропоновано схеми практичного застосування пробіотику «Апінормін» в комбінації з «Анолітом» для профілактики та лікування європейського гнильцю бджіл, а саме:

- у весняно-літній період шляхом згодовування з цукровим сиропом двічі на місяць три місяці підряд (квітень, червень та липень) з інтервалом 7 днів;
- при підготовці до зимівлі шляхом згодовування з цукровим сиропом двічі з інтервалом 7 днів за декілька тижнів перед консервацією на зимівлю;
- для лікування європейського гнильцю бджіл шляхом згодовування з цукровим сиропом 3 рази з інтервалом 7 днів.

Розроблено науково-методичні рекомендації «Удосконалення методики виділення пробіотичних культур зі свіжовідкачаного меду бджолиного».

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- 1) Дребот О.І., Височанська М.Я. (2023) особливості розвитку галузі бджільництва в контексті світового досвіду. Збалансоване природокористування, випуск №, с. 52-58. <https://doi.org/10.33730/2310-4678.3.2023.287821>
- 2) Гречка, Г. М., Кулинич, І. М., & Ємець, Я. М. (2024). Етологічні аспекти медоносних бджіл Гадяцького екотипу за різних умов утримання. Науково-виробничий журнал "Бджільництво України", (11), 17-22. <https://doi.org/10.46913/beekeepingjournal.2023.11.03>
- 3) Hristov P., Neov B., Shumkova R., Palova N. Significance of apoidea as main pollinators. *Ecological and economic impact and implications for human nutrition. Diversity*. 2020;12:280. doi: 10.3390/d12070280
- 4) Patil P.N., Pastagia J.J. Effect of bee pollination on yield of coriander. *Coriandrum sativum* Linnaeus. *Int. J. Plant Prot.* 2016;9:79–83.
- 5) Khalifa, S. A. M., Elshafiey, E. H., Shetaia, A. A., El-Wahed, A. A. A., Algethami, A. F., Musharraf, S. G., AlAjmi, M. F., Zhao, C., Masry, S. H. D., Abdel-Daim, M. M., Halabi, M. F., Kai, G., Al Naggar, Y., Bishr, M., Diab, M. A. M., & El-Seedi, H. R. (2021). Overview of Bee Pollination and Its Economic Value for Crop Production. *Insects*, 12(8), 688. <https://doi.org/10.3390/insects12080688>
- 6) Жукорський, О. М., & Атарщикова, А. М. (2023). Апімоніторинг стану навколишнього середовища. Науково-Виробничий Журнал "Бджільництво України", 1(9), 40-45. <https://doi.org/10.46913/beekeepingjournal.2022.9.05>
- 7) Постоєнко В.О., Боднарчук Г.Л., Бугера С.І. та ін. Б349 Бджільництво України : монографія / За заг. ред. Д.с.-г.н., проф. В.О. Постоєнка. Київ : Видавництво Ліра-К, 2021. 464 с. ISBN 978-617-520-168-8.
- 8) Лазарева Л.М., Постоєнко В.О., Штагрет Л.І. та ін. Фізико-хімічні показники крем-меду. Тваринництво України. 2020. № 3. С. 3–9.

9) Varol, E; Yücel, B (2019), The Effects of Environmental Problems on Honey Bees in view of Sustainable Life, *Mellifera*, 19(2):23-32.

10) Seraglio, S.K.T., Silva, B., Bergamo, G., Brugnerotto, P., Gonzaga, L.V., Fett, R., & Costa, A.C.O. (2019). An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. *Food Research International*, 119, 44-66. doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.028.

11) <https://teca.apps.fao.org/en/technologies/8418/>

12) Основи біобезпеки та благополуччя тварин / Недосєков В.В., О 75 Блаха Т., Ситюк М.П., Мартинюк О.Г., Мельник В.В., Юстинюк В.Є. – Ніжин, 2021. – 252 с.

13) Berhilevych, O., Kasianchuk, V., Kukhtyn, M., Dimitrijevich, L., & Marenkova, T. (2019). The study correlation between physicochemical properties, botanical origin and microbial contamination of honey from the south of Ukraine. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 13(1), 863–869. <https://doi.org/10.5219/1179>

14) Liudmyla Lazarieva, Larysa Akymenko, Hanna Postoienko, Volodymyr Postoienko, Lesia Nikitina, Dmytro Zasiëkin, Serhii Razanov, Vitalii Nedosekov, Sergey Amons, Alla Razanova, Lyudmyla Symochko (2023) Specific quality indicators of monofloral linden honey. *International Journal of Ecosystems and Ecology Science (IJEES)* Volume 13, issue 1. DOI: <https://doi.org/10.31407/ijeess13.120>

15) Olofsson, T. C., Alsterfjord, M., Nilson, B., Butler, È., & Vásquez, A. (2014). *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64 (Pt9), 3109–3119. DOI: [10.1099/ijs.0.059600-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.059600-0)

- 16) Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature reviews. Microbiology*, 14(6), 374–384. [DOI:10.1038/nrmicro.2016.43](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.43)
- 17) Raymann, K., & Moran, N. A. (2018). The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current opinion in insect science*, 26, 97–104. [DOI:10.1016/j.cois.2018.02.012](https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.012)
- 18) Zheng H. et al. Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab Anim (NY)*. 2018. 47(11). P. 317-325. doi:10.1038/s41684-018-0173-x
- 19) Спосіб профілактики та лікування інфекційних хвороб і стимуляції життєдіяльності та імунної системи бджіл із застосуванням препаратів пробіотичної дії «Ентеронормін» або «Апінормін»: пат. 115447 Україна: 217.01 / В. О. Постоєнко. № у 2016 13515; заявл. 28.12.2016; опубл. 10.04.2017, Бюл. № 7. 4 с.
- 20) Postoienko, H., Postoienko, V., Yefimenko, T., Odnosum, H., & Balian, A. (2022). Harmlessness, biostimulating and antiviral action of probiotic “Apinormin” for honey bees. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 24(107), 64-70. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10711>
- 21) : Khyzhnyak, S.V., Midyk, S.V., Sysoliatin, S.V., Kovalenko, V. L., Ishchenko, L. M., Voitsitskiy, V. M., Yakubchak. O. M. (2018). The content of fatty acids in the tissues of honey bees after feeding with herbicide. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(3), 51-54.
- 22) <https://www.woah.org/en/disease/diseases-of-bees/>
- 23) Галатюк О.Є. Хвороби бджіл та основи бджільництва: навчальний посібник для студентів факультетів ветеринарної медицини, технології виробництва та переробки тваринницької продукції, ветеринарних лікарів, пасічників. Видання друге, виправлене і доповнене. - Житомир: “Полісся”, 2010. - 344 с. + вкл. ISBN 978-966-655-530-7
- 24) Bertolotti, A.C.; Forsgren, E.; Schäfer, M.O.; Sircoulomb, F.; Gaïani, N. Development and evaluation of a core genome multilocus sequence typing scheme for *Paenibacillus larvae*, the deadly American foulbrood pathogen of honeybees. *Environ.*

- Microbiol. 2021, 23, 5042–5051. Available online: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03191806/document> (accessed on 3 January 2023). [CrossRef]
- 25). Genersch, E. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 2010, 103, S10–S19.[CrossRef] [PubMed]
- 26) Poppinga, L.; Genersch, E. Molecular pathogenesis of American Foulbrood: How *Paenibacillus larvae* kills honey bee larvae. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2015, 10, 29–36. [CrossRef] [PubMed]
- 27) Ebeling, J.; Knispel, H.; Hertlein, G.; Fünfhaus, A.; Genersch, E. Biology of *Paenibacillus larvae*, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 7387–7395. [CrossRef] [PubMed]
- 28) Al-Ghamdi, A.A.; Al-Ghamdi, M.S.; Ahmed, A.M.; Mohamed, A.S.A.; Shaker, G.H.; Ansari, M.J.; Dorrah, M.A.; Khan, K.A.; Ayaad, T.H. Immune investigation of the honeybee *Apis mellifera jemenitica* broods: A step toward production of a bee-derived antibiotic against the American foulbrood. *Saudi J. Biol. Sci.* 2021, 28, 1528–1538. [CrossRef]
- 29) Matheson A. World bee health report. *BeeWorld.* 1993;74(4):176–212. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1993.11099183>
- 30) Council Directive, 92/65/EEC, Annex A. *Off. J. Eur. Union* 1992, 268, 58–63.
- 31). Locke, B.; Low, M.; Forsgren, E. An integrated management strategy to prevent outbreaks and eliminate infection pressure of American foulbrood disease in a commercial beekeeping operation. *Prev. Vet. Med.* 2019, 167, 48–52. [CrossRef] [PubMed]
- 32). OIE. Chapter 3.2.2: American Foulbrood of Honey Bees (Infection of Honey Bees with *Paenibacillus larvae*). In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 8th ed.; OIE: Paris, France, 2018. <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>
- 33) Alonso-Salces, Rosa & Cugnata, Noelia & Guaspari, Elisa & Pellegrini, María & Aubone, Inés & Piano, Fiorella & Antúnez, Karina & Fuselli, Sandra. (2017). Natural strategies for the control of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in honey bees: a review. *Apidologie.* 48. 10.1007/s13592-016-0483-1.

- 34) Matovi'c, K.; Žarkovi'c, A.; Debeljak, Z.; Vidanovi'c, D.; Vaskovi'c, N.; Tešovic', B.; C' iric', J. American Foulbrood—Old and Always New Challenge. *Vet. Sci.* 2023, 10, 180. <https://doi.org/10.3390/vetsci10030180>
- 35) White, G.F. *The Bacteria of the Apiary: With Special Reference to Bee Diseases; Technical Series; USDA, Bureau of Entomology: Washington, DC, USA, 1906; Volume 14, pp. 1–50.*
- 36) Lindström, A.; Korpela, S.; Fries, I. The distribution of *Paenibacillus* larvae spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J. Invertebr. Pathol.* 2008, 99, 82–86. [CrossRef].
- 37) <https://www.izsvenezie.com/documents/reference-laboratories/beekeeping/diseases/american-foulbrood.pdf>
- 38) <https://www.fao.org/documents/card/ru/c/3c652500-3a8e-5d19-bfb4-9bc165c36271>
- 39) Forsgren, E., Locke, B., Sircoulomb, F. et al. Bacterial Diseases in Honeybees. *Curr Clin Micro Rpt* 5, 18–25 (2018). <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0083-0>
- 40) Rauch S., Ashiralieva A., Hedtke K. & Genersch E. (2009). Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus* larvae, the etiological agent of American Foulbrood of honey bees. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 3344–3347.
- 41) Wilkins S, Brown M, Andrew A, Cuthbertson GS. The incidence of honey bee pests and diseases in England and Wales. *Pest Manag Sci.* 2007;63(11):1062–8. <https://doi.org/10.1002/ps.1461>.
- 42) Roetschi A, Berthoud H, Kuhn R, Imdorf A. Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie.* 2008;39(3):362–71. <https://doi.org/10.1051/apido:200819>.
- 43) Dahle B. Åpen yngelröta. *Birokteren.* 2010;12:342–4.



- 44) Hendrikx P, Saussac M, Meziani F, Wendling S, Franco S, Chauzat M-P. Résabeilles: résultats de deux campagnes de surveillance programmée de la mortalité des abeilles en France. Bull épidémiologique, santé Anim Aliment. 2015;19–23. по EFB 28
- 45) Erban T, Ledvinka O, Kamler M, Hortova B, Nesvorna M, Tyl J, et al. Bacterial community associated with worker honeybees (*Apis mellifera*) affected by European foulbrood. PeerJ. 2017;5:e3816. <https://doi.org/10.7717/peerj.3816>. по EFB 29
- 46) Forsgren E. (2010). European foulbrood in honey bees. Journal of invertebrate pathology, 103 Suppl 1, S5–S9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.016> по EFB 30
- 47) OIE. Chapter 3.2.3. – European foulbrood of honey bees (infection of honey bees with *Melissococcus plutonius*)3.2.2:  
[https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.02.03\\_EUROPEAN\\_FOULBROOD.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.03_EUROPEAN_FOULBROOD.pdf)
- 48) Takamatsu, D., Morinishi, K., Arai, R., Sakamoto, A., Okura, M., Osaki, M. (2014) Typing of *Melissococcus plutonius* isolated from European and Japanese honey bees suggests spread of sequence types across borders and between different *Apis* species. Vet. Microbiol. 171, 221–226
- 49) Hepburn, R., Radloff, S.E. (2011) Honeybees of Asia, p. 669. Springer, Berlin
- 50) Dalip Chand, Meera Srivastava. European foulbrood disease in *A. mellifera* as documented in some districts of Haryana, India. J Entomol Zool Stud 2019;7(6):868-872.
- 51) Forsgren, E., Wei, S., Guiling, D., Zhiguang, L., Tran, T.V., Tang, P.T., Truong, T.A., Dinh, T.Q., Fries, I. (2015) Preliminary observations on possible pathogen spill-over from *Apis mellifera* to *Apis cerana*. Apidologie 46, 265–275
- 52) Forsgren E., Budge G.E., Charriere J.-D. & Hornitzky M.A.Z. (2013). Standard methods for European foulbrood research. J. Apic. Res., 52, 1–14. doi 10.3896/IBRA.1.52.1.12.
- 53) <https://www.fao.org/3/ca4051en/ca4051en.pdf>

- 54) McKee, Ben & Djordjevic, Steven & Goodman, Russell & Hornitzky, Alan. (2003). The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. *Apidologie*. 34. 19-27. [10.1051/apido:2002047](https://doi.org/10.1051/apido:2002047).
- 55) Mohan Rao K, Katna S, Rana BS, Rana R. Thai sacbrood and sacbrood viruses versus European foulbrood of hive bees in India—a review. *J Apic Res*. 2015;54(3):192–9. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1145417>.
- 56) Okumura K, Arai R, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D, Osaki M, Miyoshi Akiyama T 2011. Complete Genome Sequence of *Melissococcus plutonius* ATCC 35311. *J Bacteriol* 193: <https://doi.org/10.1128/jb.05151-11>
- 57) Okamoto, M., Furuya, H., Sugimoto, I., Kusumoto, M., & Takamatsu, D. (2022). A novel multiplex PCR assay to detect and distinguish between different types of *Paenibacillus* larvae and *Melissococcus plutonius*, and a survey of foulbrood pathogen contamination in Japanese honey. *The Journal of veterinary medical science*, 84(3), 390–399. <https://doi.org/10.1292/jvms.21-0629>
- 58) Arai R, Tominaga K, Wu M, Okura M, Ito K, Okamura N, et al. Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. *PLoS One*. 2012;7:e33708.
- 59) Arai R., Tominaga K., Wu M., Okura M., Ito K., Okamura N., Onishi H., Osaki M., Sugimura Y., Yoshiyama M. & Takamatsu D. (2012). Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. *PLoS One*, 7, 1–10.
- 60) De Leon-Door A.P., Romo-Chacón A., Rios-Velasco C., Zamudio-Flores P.B., Ornelas-Paz J.J. & Acosta-Muñiz & C.H. (2018). Prevalence, typing and phylogenetic analysis of *Melissococcus plutonius* strains from bee colonies of the state of Chihuahua, Mexico. *J. Invertebr. Pathol.*, 159, 71–77.
- 70) Nakamura K., Okumura K., Harada M., Okamoto M., Okura M. & Takamatsu D. (2020). Different impacts of pMP19 on the virulence of *Melissococcus plutonius* strains with different genetic backgrounds. *Environ. Microbiol.* 22, 2756–2770.

- 71) Gaggia F., Baffoni L., Stenico V., Alberoni D., Buglione E., Lilli A., Di Gioia D. & Porrini C. (2015). Microbial investigation on honey bee larvae showing atypical symptoms of European foulbrood. *Bull. Insectol.*, 68, 321–327.
- 72) Roy C. & Franco S. (2021). Investigation of an atypical case of European foulbrood in France. *Vet. Rec. Case Rep.*, 9:E45. <https://doi.org/10.1002/vrc2.45>.
- 73) Erler S, Lewkowski O, Poehlein A, Forsgren E. The curious case of *Achromobacter eurydice*, a gram-variable pleomorphic bacterium associated with European foulbrood disease in honeybees. *Microb Ecol.* 2017; <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1007-x>. A revised systematic classification of *A. eurydice*, a secondary bacteria in EFB.
- 74) Gaggia F, Baffoni L, Stenico V, Alberoni D, Buglione E, Lilli A, et al. Microbial investigation on honey bee larvae showing atypical symptoms of European foulbrood. *Bull Insectology.* 2015;68:321–7.
- 75) Genersch E. American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol.* 2010;103:S10–9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.015>.
- 76) Del Hoyo ML, Basualdo M, Lorenzo A, Palacio MA, Rodriguez EM, Bedascarrasbure E. Effect of shaking honey bee colonies affected by American foulbrood on *Paenibacillus larvae* spore loads. *J Apic Res.* 2001;40(2):65–9. <https://doi.org/10.1080/00218839.2001.11101053>.
- 77) Ghorbani-Nezami S, LeBlanc L, Yost DG, Amy PS, Jeanne R. Phage therapy is effective in protecting honeybee larvae from American foulbrood disease. *J Insect Sci.* 2015;15(1):84. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iev051>.
- 78) Yost DG, Tsourkas P, Amy PS. Experimental bacteriophage treatment of honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. *Bacteriophage.* 2016;6(1):e1122698. <https://doi.org/10.1080/21597081.2015.1122698>.
- 79) Brady TS, Merrill BD, Hilton JA, Payne AM, Stephenson MB, Hope S. Bacteriophages as an alternative to conventional antibiotic use for the prevention or treatment of *Paenibacillus larvae* in honeybee hives. *J Invertebr Pathol.* 2017;150:94–100. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.09.010>.

- 80) Beims H, Wittmann J, Bunk B, Spröer C, Rohde C, Günther G, et al. *Paenibacillus* larvae-directed bacteriophage HB10c2 and its application in American foulbrood-affected honey bee larvae. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(16):5411–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.00804-15>.
- 81) Somerville, D.; Annand, N.; New South, W. *Healthy Bees: Managing Pests, Diseases and Other Disorders of the Honey Bee.* (Sydney, NSW?): Tocal College, NSW DPI (AgGuide: A Practical Handbook). 2016. Available online: <http://ezproxy.nb.rs:2059/login.aspx?direct=true&db=e000xww&AN=1580990&site=eds-live> (accessed on 3 January 2023).
- 82) Formato, G.; Smulders, F.J. Risk management in primary apicultural production. Part 1: Bee health and disease prevention and associated best practices. *Veter-Q.* 2011, 31, 29–47. [CrossRef] [PubMed]
- 83) Rivera Gomis, J.; Bubnic, J.; Ribarits, A.; Moosbeckhofer, R.; Alber, O.; Kozmus, P.; Formato, G.; Muz, M.N. Good farming practices in apiculture. *Rev. Sci. Tech. L'oise* 2019, 38, 879–890. [CrossRef]
- 84) Matović, K.; Žarković, A.; Vidanović, D.; Debeljak, Z.; Vasković, N.; Šekler, M. American foulbrood disease in the southwestern part of Serbia. In *Improving Beekeeping in Serbia*; Serbian Academy of Sciences and Arts: Belgrade, Serbia, 2016; pp. 105–119. (In Serbian)
- 85) Forsgren E, Laugen AT. Prognostic value of using bee and hive debris samples for the detection of American foulbrood disease in honey bee colonies. *Apidologie.* 2014;45(1):10–20. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0225-6>.
- 86) Adjlane N, Haddad N, Kechih S. Comparative study between techniques for the diagnosis of American foulbrood (*Paenibacillus* larvae) in honeybee colony. *J Anim Vet Adv.* 2014;13:970–3.
- 87) Hansen H, Brodsgaard C. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World.* 1999;80(1):5–23. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1999.11099415>.

- 88) Mezher, Z.; Bubnic, J.; Condoleo, R.; Jannoni-Sebastianini, F.; Leto, A.; Proscia, F.; Formato, G. Conducting an international, exploratory survey to collect data on honey bee disease management and control. *Appl. Sci.* 2021, 11, 7311. [CrossRef]
- 89) Dickel, F.; Bos, N.M.P.; Hughes, H.; Martín-Hernández, R.; Higes, M.; Kleiser, A.; Freitak, D. The oral vaccination with *Paenibacillus larvae* bacterin can decrease susceptibility to American Foulbrood infection in honey bees—A safety and efficacy study. *Front. Veter-Sci.* 2022, 9, 946237. [CrossRef] [PubMed]
- 90) Постоєнко, Г. В. (2023). Нормофлора кишківника бджіл та перспективи її практичного застосування. Науково-виробничий журнал "Бджільництво України", 1(9), 99-108. <https://doi.org/10.46913/beekeepingjournal.2022.9.14>
- 91) Постоєнко Г.В., Постоєнко В.О., Гордієнко О.І., Напненко О.О., Недосєков В.В. Удосконалення методики виділення пробіотичних культур зі свіжовідкачаного меду. *Науковий вісник ветеринарної медицини*, 2023. № 2. С. 101–110.
- 92) Brosi, B. J., Delaplane, K. S., Boots, M., & De Roode, J. C. (2017). Ecological and evolutionary approaches to managing honeybee disease. *Nat Ecol Evol*, 1, 1250–1262. DOI:10.1038/s41559-017-0246-z.
- 93) Dynes, T. L., Berry, J. A., Delaplane, K. S., Brosi, B. J., & De Roode, J. C. (2019). Reduced density and visually complex apiaries reduce parasite load and promote honey production and overwintering survival in honey bees. *PLoS ONE*, 14(5), e0216286. DOI: 10.1371/journal.pone.0216286.
- 94) Bartlett, L. J., Rozins, C., Brosi, B. J. et al. (2019). Industrial bees: The impact of apicultural intensification on local disease prevalence. *J Appl Ecol.*, 56, 2195–2205. DOI: 10.1111/1365-2664.13461.
- 95) Hristov, P., Shumkova, R., Palova, N., & Neov, B. (2020). Factors Associated with Honey Bee Colony Losses: A Mini-Review. *Vet Sci.*, 7(4), 166. DOI: 10.3390/vetsci7040166.
- 96) Luis, A. R., Yadró, C. A., Invernizzi, C., Branchiccela, B., Piñeiro, A., Morfi, A. P. et al (2020). *Nosema ceranae* and RNA viruses in homey bee populations of Cuba.

Journal of Apicultural Research, 59, 468–471.  
DOI: 10.1080/00218839.2020.1749451.

97) Bartlett, L. J., Boots, M., Brosi, B. J., De Roode, J. C., Delaplane, K. S., Hernandez, C. A. et al. (2021). Persistent effects of management history on honeybeecolony virus abundances. *J Invertebr Pathol*, 179, 107520.  
DOI: 10.1016/j.jip.2020.107520.

98) Saranchuk, I. I., Vishchur, V. Ya., Gutyj, B. V., & Klim, O. Ya. (2021). Effect of various amounts of sunflower oil in feed additives on breast tissues' functional condition, reproductivity, and productivity of honey bees. *Ukrainian Journal of Ecology*, 11(1), 344–349. DOI: 10.15421/2021\_51.

99) Kovalskyi, Yu., Gutyj, B., Fedak, V., Kovalska, L., & Druzhibiak, A. (2021). The influence of feed quality on the development and productivity of bee queens. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Agricultural sciences*, 23(95), 71–75.  
DOI: 10.32718/nvlvet-a9510.

100) McMenamin, A. J., Parekh, F., Lawrence, V., & Flenniken, M. L. (2021). Investigating Virus-Host Interactions in Cultured Primary Honey Bee Cells. *Insects.*, 12(7), 653. DOI: 10.3390/insects12070653.

101) 1. Wu M., Sugimura Yu., Taylor D. M., Yoshiyama M. Honeybee Gastrointestinal Bacteria for Novel and Sustainable Disease Control Strategies. *Journal of Developments in Sustainable Agriculture*. 2013. Vol. 8. Issue 2. P. 85–90.  
DOI:10.11178/jdsa.8.85

102) Fowler A. E., Irwin R.E., Adler L.S. Parasite defense mechanisms in bees: behavior, immunity, antimicrobials, and symbionts. *Emerging Topics in Life Sciences*. 2020. Vol. 4. Issue 1. P. 59–76. DOI:10.1042/ETLS20190069

103) Endo A., Salminen S. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Systematic and applied microbiology*. 2013. Vol. 36. Issue 6. P. 444–448. DOI:10.1016/j.syapm.2013.06.002

104) Ellegaard J., Dubná S., Sedláček I., Švec P. *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the

causative agents of American and European foulbrood. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2014. Vol. 64. Issue 1. P. 152– 157. DOI:10.1099/ijss.0.053033-0

105) Updated list of QPS-recommended microorganisms for safety risk assessments carried out by Efsa / E. B. Panel et al. Zenodo, 2023. DOI:10.5281/zeno.do.7554079

106) Adedokun S. A., Jaynes P., Payne R. L., Todd J. Applegate. Standardized Ileal Amino Acid Digestibility of Corn, Corn Distillers' Dried Grains with Solubles, Wheat Middlings, and Bakery By-Products in Broilers and Laying Hens. *Poultry science*. 2014. Vol. 94. Issue 10. P. 2480–2487. DOI:10.3382/ps/pev22

107) Strategies to increase the hygienic and economic value of fresh fish: Biopreservation using lactic acid bacteria of marine origin / B. Gómez-Sala et al. *International journal of food microbiology*. 2016. Vol. 223. P. 41–49. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.005

108) Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention / S. A. Ibrahim et al. *Foods*. Vol. 10. Issue 12. 3131 p. DOI:10.3390/foods10123131

109) Vsquez A., Forsgren E. et al. Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. *PLoS ONE*. 2012. 7(3): e33188. doi: 10.1371/journal.pone.003318

110) Schwarz R. et al. Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016. 113(33). P. 9345-9350. doi:10.1073/pnas.1606631113

111) Гордієнко О. І., Постоєнко Г. В., Постоєнко В. О., Напненко О. О., Артеменко В. Ю., Тиндик В. С. Виділення, ідентифікація та характеристика пробіотичних культур з меду бджолиного. *Бджільництво України*. 2021. № 6. С. 7-11. doi: 10.46913/Beekeepingjournal.6.01.

112) Vojvodic S. et al. Microbial gut diversity of Africanized and European honey bee larval instars. *PLoS One*. 2013. 8(8):e72106. doi:10.1371/journal.pone.0072106

113) Гордієнко, О. І., Постоєнко, Г. В., Постоєнко, В. О., Напненко, О. О., Артеменко, В. Ю., & Тиндик, В. С. (2022). Виділення, ідентифікація та

характеристика пробіотичних культур з меду бджолиного. Науково-виробничий журнал "Бджільництво України", 1(6).

<https://doi.org/10.46913/beekeepingjournal.2021.6.01>

114) Yang, Q., & Wu, Z. (2023). Gut Probiotics and Health of Dogs and Cats: Benefits, Applications, and Underlying Mechanisms. *Microorganisms*, 11(10), 2452. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102452>

115) Grześkowiak, Ł., Endo, A., Beasley, S., & Salminen, S. (2015). Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe*, 34, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.002>

116) Lee, D., Goh, T. W., Kang, M. G., Choi, H. J., Yeo, S. Y., Yang, J., Huh, C. S., Kim, Y. Y., & Kim, Y. (2022). Perspectives and advances in probiotics and the gut microbiome in companion animals. *Journal of animal science and technology*, 64(2), 197–217. <https://doi.org/10.5187/jast.2022.e8>

117) Xu, H., Zhao, F., Hou, Q., Huang, W., Liu, Y., Zhang, H., & Sun, Z. (2019). Metagenomic analysis revealed beneficial effects of probiotics in improving the composition and function of the gut microbiota in dogs with diarrhoea. *Food & function*, 10(5), 2618–2629. <https://doi.org/10.1039/c9fo00087a>

118) Olofsson T., Butler E. et al. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees – an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *Int Wound J.* 2016. doi:10.1111/iwj.12345

119) Martinson V. Moy J. et al. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl Environ Microbiol.* 2012. 78(8). P. 2830-2840. doi:10.1128/AEM.07810-11

120) Постоєнко, Г. В., Постоєнко, В. О., Єфіменко, Т. М., Односум, Г. В. & Недосєков, В. В. (2023). Видоспецифічність пробіотичних засобів для бджіл. *Науково-виробничий журнал "Бджільництво України"*, (10), 40-45. <https://doi.org/10.46913/beekeepingjournal.2022.10.06>

121) Oertel E. Metamorphosis in the honeybee. *Journal of Morphology.* 2005. 50. P. 295-339. doi:10.1002/jmor.1050500202



- 122) European Food Safety Authority et al. (2021). Analysis of background variability of honey bee colony size. *EFSA Supporting Publications*. Retrieved from: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/sp.efsa.2021.EN-6518> [in English]
- 123) Kešnerová, L. et al. (2020). Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer. *The ISME Journal*, vol. 14, 3, pp. 801–814. DOI: 10.1038/s41396-019-0568-8 [in English].
- 124) Hroncova Z, Havlik J, Killer J, Dosekocil I, Tyl J, et al. (2015) Variation in Honey Bee Gut Microbial Diversity Affected by Ontogenetic Stage, Age and Geographic Location. *PLOS ONE* 10(3):e0118707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118707> [in English].
- 125) Vázquez, D.E., Farina, W.M. (2020). Differences in preimaginal development of the honey bee *Apis mellifera* between in vitro and in-hive contexts. *Apidologie*, vol. 51, pp. 861–875. DOI: 10.1007/s13592-020-00767-0 [in English].
- 126) White, P.B. (2005). The normal bacterial flora of the bee. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, vol. 24, pp. 64–78. DOI: 10.1002/path.1700240106 [in English].
- 127) Cilia, G. et al. (2021). Changes of Western honey bee *Apis mellifera ligustica* (Spinola, 1806) ventriculus microbial profile related to their in-hive tasks. *Journal of Apicultural Research*, vol. 60, 1, pp. 198–202. DOI:10.1080/00218839.2020.1830259 [in English].
- 128) Engel, P., Moran, N.A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 37, 5, pp. 699–735. DOI: 10.1111/1574-6976.12025 [in English].
- 129) Powell, J.E. et al. (2014). Routes of Acquisition of the Gut Microbiota of the Honey Bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 80, 23, pp. 7378–7387. DOI: 10.1128/AEM.01861-14 [in English].
- 130) Cox-Foster D. L. et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*. 2007. 318(5848). P. 283-287. doi:10.1126/ science.1146498

- 131) Kwong W.K., Medina L. A. et al. Dynamic microbiome evolution in social bees. *Sci Adv.* 2017. 3(3):e1600513. doi:10.1126/sciadv.1600513
- 132) Moran N. A. et al. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS One.* 2012. 7(4):e36393. doi:10.1371/journal.pone.0036393
- 133) Jeyaprakash, A. et al. (2003). Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 84, 2, pp. 96–103. DOI: 10.1016/j.jip.2003.08.007 [in English].
- 134) Mohr, K.I., Tebbe, C.C. (2006). Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environmental Microbiology*, vol. 8, 2, pp. 258–272. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00893.x [in English].
- 135) Martinson, V. G., Danforth, B. N., Minckley, R. L., Rueppell, O., Tingek, S., & Moran, N. A. (2011). A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular ecology*, 20(3), 619–628. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04959.x>
- 136) Donaldson, G.P. et al. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 14, 1, pp. 20–32. DOI: 10.1038/nrmicro3552 [in English].
- 137) El-Salhy, M. et al. (2020). Efficacy of faecal microbiota transplantation for patients with irritable bowel syndrome in a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Gut*, vol. 69, 5, pp. 859–867. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-319630 [in English].
- 138) Fernandes Rodrigues, V. et al. (2022). *Akkermansia muciniphila* and Gut Immune System: A Good Friendship That Attenuates Inflammatory Bowel Disease, Obesity, and Diabetes. *Frontiers in Immunology*, vol. 13, art. 934695. DOI:10.3389/fimmu.2022.934695 [in English].
- 139) Крисенко О. В., Скляр Т. В., Вінніков А. І., Сліпецька А. В., Куденко С. С. Мікробіологічні аспекти пробіотичних препаратів. *Вісник Дніпропетровського*

університету. *Біологія. Екологія.* 2 0 1 0 . В. 18, Т. 2.  
doi:10.15421/011021.

140) De Groot P. et al. Faecal microbiota transplantation halts progression of human new-onset type 1 diabetes in a randomised controlled trial. *Gut.* 2021. 70(1). P. 92-105.

doi:10.1136/gutjnl-2020-322630

141) Yeoh Y. K. et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut.* 2021. 70(4). P. 698-706.

doi:10.1136/gutjnl-2020-323020

142) Lai H. C. et al. Gut microbiota modulates COPD pathogenesis: role of anti-inflammatory *Parabacteroides goldsteinii* lipopolysaccharide. *Gut.* 2022. 71(2). P. 309-321.

doi:10.1136/gutjnl-2020-322599

143) Matsumoto K. et al. Effects of a probiotic fermented milk beverage containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on defecation frequency, intestinal microbiota,

and the intestinal environment of healthy individuals with soft stools. *J Biosci Bioeng.*

2010 110(5). P. 547-552. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.05.016

144) Petrof E. O. Probiotics and Gastrointestinal Disease: Clinical Evidence and Basic Science. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 2009. 8(3). P. 260-269.

doi:10.2174/187152309789151977

145) Klaenhammer, T. et al. (2002). Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 82, 1–4, pp. 29–58. DOI: 10.1007/978-94-017-2029-8\_3 [in English].

146) De Vuyst, L., Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, vol. 13, 4, pp. 194–199. DOI: 10.1159/000104752 [in English].

147) Olofsson, T.C., Vásquez, A. (2008). Detection and Identification of a Novel Lactic Acid Bacterial Flora Within the Honey Stomach of the Honeybee *Apis mellifera*.

*Current Microbiology*, vol. 57, 4, pp. 356–363.

DOI: 10.1007/s00284-008-9202-0 [in English].

148) Olofsson, T.C. et al. (2011). A scientific note on the lactic acid bacterial flora within the honeybee subspecies *Apis mellifera* (Buckfast), *A. m. scutellata*, *A. m.*

*mellifera*, and *A. m. monticola*. *Apidologie*, vol. 42, 6, pp. 696–699. DOI: 10.1007/s13592-011-0064-2 [in English].

149) Vásquez, A. et al. (2012). Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. *PLoS ONE*, vol. 7, 3, art. e33188. DOI: 10.1371/journal.pone.003318 [in English].

150) Vásquez, A. et al. (2009). A scientific note on the lactic acid bacterial flora in honeybees in the USA – A comparison with bees from Sweden. *Apidologie*, vol. 40, 1, pp. 26–28. DOI: 10.1051/apido:2008063 [in English].

151) Butler, È. et al. (2013). Proteins of novel lactic acid bacteria from *Apis mellifera mellifera*: an insight into the production of known extra-cellular proteins during microbial stress. *BMC Microbiology*, vol. 13, art. 235. DOI:10.1186/1471-2180-13-235 [in English].

152) Corby-Harris, V. et al. (2014). Origin and Effect of Alpha 2.2 *Acetobacteraceae* in Honey Bee Larvae and Description of *Parasaccharibacter apium* gen. nov., sp. nov.. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 80, 24, pp. 7460–7472. DOI:10.1128/AEM.02043-14 [in English].

153) Talarico, T.L. et al. (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 32, 12, pp. 1854–1858. DOI: 10.1128/AAC.32.12.1854 [in English].

154) Mangal Patel, R., Wei Denning, P. (2013). Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: what is the current evidence?. *Clinics in Perinatology*, vol. 40, 1, pp. 11–25. DOI: 10.1016/j.clp.2012.12.002 [in English].

155) Kullisaar, T. et al. (2002). Two antioxidative strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 72, 3, pp. 215–224. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00674-2 [in English].

156) Tsilingiri, K. et al. (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: Comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut*, vol. 61, 7, pp. 1007–1015. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300971 [in English].

- 157) Amaretti A. et al. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013. 97(2). P. 809-817. doi:10.1007/s00253-012-4241-7
- 158) Raymann K., Shaffer Z. et al. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS Biol.* 2017. 15(3):e2001861. doi:10.1371/journal.pbio.2001861
- 159) Kasiotis, K.M. et al. (2014). Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: reported death incidents in honeybees. *Science of The Total Environment*, vol. 485–486, pp. 633–642. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.042 [in English].
- 160) Rumke, J.C.O. et al. (2017). Modeling Effects of Honeybee Behaviors on the Distribution of Pesticide in Nectar within a Hive and Resultant in-Hive Exposure. *Environmental Science & Technology*, vol. 51, 12, pp. 6908–6917. DOI: 10.1021/acs.est.6b04206 [in English].
- 161) Kaur, S., Kaur, R., Rani, N., Sharma, S., & Joshi, M. (2021). Sources and Selection Criteria of Probiotics. In: Goel G., Kumar A. (eds) *Advances in mics for Sustainable Food and Medicine. Microorganisms for Sustainability*, vol 21. Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-15-6795-7\_2.
- 162) Єфіменко, Т. М., Односум, Г. В. & Воробій, О. А. (2022). Перебіг мішечкуватого розплоду за створення в бджолиних сім'ях безрозплідного періоду порівняно з обробленням сімей витяжками з евкаліпту і деревію та засобами-аналогами. *Науково-виробничий журнал "Бджільництво України"*, 1(6). <https://doi.org/10.46913/Beekeepingjournal.2021.6.03>
- 163) <https://exo.in.ua/news/66327>
- 164) Лясковський Т. М., Підгорський В. С., Коваленко Н. К., Гармашева І. Л., Мучник Ф. В. Ідентифікація пробіотичних штамів молочнокислих бактерій. *Мікробіологічний журнал.* 2008. Т. 70. № 6. С. 3–9.
- 165) Цісарик О. Й., Сливка І. М. Методи ідентифікації лактобактерій. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького.* 2012. Том 14. № 3(53). Ч. 3. С. 363–370.

- 166) Прилуцкий В.И. (1997) Электрохимически активированная вода: аномальные свойства, механизмы биологического действия / В.И. Прилуцкий, В.М. Бахир. – Москва: ВНИИИМТ. – 228 с.
- 167) Мандигра М.С., Постоенко В.О., Лисиця А.в., Бялецький С.А., Грищук В.П., Мандигра Ю.М., Воловик Г.П., Мандигра С.С., Постоенко Г.В. та ін. (2021) Удосконалення ветеринарно-санітарних заходів з метою отримання органічної продукції бджільництва. Науково-методичний посібник. - Київ: ТОВ “Діа”, 2021. - 54 с.
- 168) Мандигра М.С. «Використання електрохімічних активованих (ЕХА) розчинів у ветеринарній медицині і органічному виробництві» / М.С. Мандигра, А.В. Лисиця, Д.М. Гнатюк [та ін.]. – Луцьк: ПП. Іванюк В.П., 2020. – 81 с.
- 169) Gram-Positive Bacteria with Probiotic Potential for the Apis mellifera L. Honey Bee: The Experience in the Northwest of Argentina. DOI: 10.1007/s12602-016-9231-0
- 170) Компедіум – довідник лікарських препаратів. URL: <https://compendium.com.ua/dec/526752>.
- 171) Ветеринарна аптека онлайн VetPreparaty. 2023. URL: <https://vetpreparaty.com/imunobakterin-d-1-g/>.
- 172) Офіційний сайт компанії “PURINA ProPlan”. 2023. URL: <https://www.purina.ua/proplan/ratsiony/dog-food/fortiflora-canine-probiotic>.
- 173) ДСТУ 4497:2005 «Мед натуральний. Технічні умови».
- 174) ДСТУ ISO 6887-1:2003 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Готування досліджуваних проб, вихідної суспензії та десятикратних розведень для мікробіологічного досліджування.
- 175) ISO 6887-1:2017 Microbiology of the food chain. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.
- 176) ДСТУ ISO 4833:2006 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод підрахунку мікроорганізмів. Техніка підрахування колоній за температури 30°C.

- 177) ISO 4833-1:2013 Microbiology of the food chain. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Colony count at 30°C by the pour plate technique.
- 178) ГОСТ 10444.2-94 Продукты харчові. Методи виявлення та визначення кількості *Staphylococcus aureus*.
- 179) ДСТУ ISO 7932:2007 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод визначення кількості ймовірно *Bacillus cereus*. Техніка підрахунку за температури 30°C (ISO 7932:2004, IDT).
- 180) ISO 7932:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*. Colony count technique at 30 degrees C.
- 181) ДСТУ EN 12824:2004 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення *Salmonella* (EN 12824:1997, IDT).
- 182) H. M. Elzeini et al. (2021) Isolation and identification of lactic acid bacteria from the intestinal tracts of honey bees, *Apis mellifera L.*, in Egypt. Journal of Apicultural Research. Vol. 60. Issue 2. P. 349–357. DOI: 10.1080/00218839.2020.1746019
- 183) K. M. Ellegaard et al. (2015). Extensive intra-phylogroup diversity in lactobacilli and bifidobacteria from the honeybee gut. BMC genomics. Vol. 16. Issue 1. 284 p. DOI:10.1186/s12864-015-1476-6
- 184) N. O. Abdelsamad et al. (2022). Evaluation of different bacterial honey isolates as probiotics and their efficient roles in cholesterol reduction. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 38. 106 p. DOI:10.1007/s11274-022-03259-8
- 185) M. E. Goli Mehdi Abadi et al. (2023). Isolation and characterization of the lactobacillus strain from honey and its probiotic properties Iranian journal of microbiology. Vol. 15. No 3. P. 439–447. DOI:10.18502/ijm.v15i3.12905
- 186) Lashani E., Davoodabadi A., Soltan Dallal M. M. (2020). Some probiotic properties of Lactobacillus species isolated from honey and their antimicrobial activity against foodborne pathogens. Veterinary research forum: an international quarterly journal. Vol. 11. Issue 2. P. 121–126. DOI:10.30466/vrf.2018.90418.2188
- 187) Tajabadi N., Mardan M., Abdul Manap M. Y., Mustafa S. (2015). Molecular identification of Lactobacillus spp. isolated from the honey comb of the honey bee

- (*Apis dorsata*) by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Apicultural Research*. Vol. 52. Issue 5. P. 235–241. DOI:10.3896/IBRA.1.52.5.10
- 188) Feizabadi F., Sharifan A., Tajabadi N. (2021). Isolation and identification of lactic acid bacteria from stored *Apis mellifera* honey. *Journal of Apicultural Research*. Vol. 60. Issue 3. P. 421–426. DOI:10.1080/0021 8839.2020.1765490
- 189) Shigwedha N., Ji L. (2013). *Bifidobacterium* in Human GI Tract: Screening, Isolation, Survival and Growth Kinetics in Simulated Gastrointestinal Conditions [Internet]. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. InTech.. DOI:10.5772/50457
- 190) N. Tajabadi et al. (2013). Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee. *Brazilian Journal of Microbiology*.. Vol. 44. Issue 3. P. 717–722. DOI:10.1590/ S1517-83822013000300008
- 191) K. A. Abd El-Razik et al. (2020). *Enterococcus faecium* isolated from healthy dogs for potential use as probiotics *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. Vol. 23. No 2. P. 197–205. DOI:10.15547/bjvm.2213
- 192) Khalesi, S., Bellissimo, N., Vandelanotte, C., Williams, S., Stanley, D., & Irwin, C. (2019). A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype?. *Eur J Clin Nutr*, 73, 24–37. DOI: 10.1038/s41430-018-0135-9.
- 193) Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E. et al (2020). Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. *Frontiers in microbiology*, 11, 1662. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01662.
- 194) De Vos, W. M., Tilg, H., Van Hul, M., & Cani, P. D. (2022). Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut*, 71(5), 1020–1032. DOI: 10.1136/gutjnl-2021-326789.
- 195) Liu, Y., Peng, J., Zhu, S., Yu, L., Tian, F., Zhao, J. et al (2022) A screening model for probiotics against specific metabolic diseases based on caco-2 monolayer membrane. *Engineering*. DOI: 10.1016/j.eng.2022.02.014.
- 196) Bonilla-Rosso, G., & Engel, P. (2018). Functional roles and metabolic niches in the honey bee gut microbiota. *Curr. Opin. Microbiol*, 43, 69–76.



DOI: 10.1016/j.mib.2017.12.009.

197) Чечет, Ольга & Вячеслав, Коваленко & Горбатюк, Ольга & Гайдей, Ольга & Кравцова, Оксана & Андріяшук, Валентина & Мусієць, Ірина & Ординська, Діана. (2022). Визначення антагоністичної активності пробіотичного препарату «Біозапін». *Bulletin of Sumy National Agrarian University. The series: Veterinary Medicine*. 61-68. 10.32845/bsnau.vet.2022.2.8.

198) Чечет, О. М., Коваленко, В. Л., Горбатюк, О. І., Гейдей, О. С., Курята, Н. В., Мусієць, І. В., Ординська, Д. О., Шалімова, Л. О., & Бучковська, Г. А. (2023). Виявлення *in vitro* рівнів антагоністичної активності ізолятів *Enterococcus faecium* та відбір перспективних пробіотичних штамів. *Scientific Progress & Innovations*, 26(1), 90-95. <https://doi.org/10.31210//spi2023.26.01.14>

# ДОДАТКИ

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ  
З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ  
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА  
ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ



THE STATE SERVICE OF UKRAINE  
ON FOOD SAFETY AND  
CONSUMER PROTECTION

## РЕЄСТРАЦІЙНЕ ПОСВІДЧЕННЯ REGISTRATION CERTIFICATE

Відповідно до Закону України "Про ветеринарну медицину", постанови Кабінету Міністрів України від 21.11.2007 р. № 1349 "Про затвердження положень про державну реєстрацію ветеринарних препаратів, кормових добавок, преміксів та готових кормів" та на підставі експертного висновку від 27.02.2018 р. № 1 рекомендацій Державної фармакологічної комісії ветеринарної медицини, наказу Державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів від 06.03.2018 р. № 190 зареєстровано:

препарат Апінормін  
у формі порошку

Власник реєстраційного посвідчення:

**ТОВ "Дочірня компанія товариства "САКС",  
01024, м. Київ, вул. Пилипа Орлика, 16/12, Україна**

зареєстровано в Україні за № ВВ-00861-02-18 від 06.03.2018

Виробник:

**ТОВ "Дочірня компанія товариства "САКС",  
01024, м. Київ, вул. Пилипа Орлика, 16/12, Україна  
ТОВ "Фармацевтична компанія "Ензифарм",  
24321, Вінницька обл., м. Ладизжин,  
вул. Хлібозаводська 3, Україна**

При будь-якій зміні в реєстраційному досьє власник посвідчення (виробник) повинен повідомити орган реєстрації.

Обов'язкові додатки:

- коротка характеристика препарату (додаток 1);
- листівка-вкладка (додаток 2);
- етикетка (додаток 3);

Реєстраційне посвідчення дійсне до 05.03.2023

Це посвідчення не є зобов'язанням щодо закупівлі даного препарату.

Директор Департаменту безпеки харчових продуктів та ветеринарної медицини  
Director of Department for Food Safety and Veterinary Medicine



**Б.І. Кобаль**

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ  
АГРАРНИХ НАУК  
НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ  
ЦЕНТР  
ІНСТИТУТ БДЖІЛЬНИЦТВА  
ІМЕНІ П. І. ПРОКОПОВИЧА  
03143, Україна, Київ,  
вул. Академіка Заболотного, 19



NATIONAL ACADEMY  
OF AGRARIAN SCIENCES  
NATIONAL SCIENTIFIC CENTER  
P. I. PROKOPOVICH  
BEEKEEPING INSTITUTE  
Acad. Zabolotnogo St., 19,  
03143, Ukraine, Kyiv

Тел./Ph. (044) 526-67-98, Факс/Fax (044) 526-31-89  
e-mail: nnc\_ibkiev@ukr.net http://prokopovych.com.ua

ЛАБОРАТОРІЯ  
МЕТОДІВ ОЦІНКИ ЯКОСТІ ТА БЕЗПЕЧНОСТІ ПРОДУКЦІЇ БДЖІЛЬНИЦТВА  
(Сертифікат визнання вимірювальних можливостей № ПТТ – 443/20 від 30.11.2020)  
/e-mail: lab.meda@gmail.com / тел.526 43 95

ПРОТОКОЛ від 06.06.22 р. (дійсний до червня 2023 року)

Замовник	ІНЦ „Інститут бджільництва ім. П. І. Прокоповича”,
Адреса та телефон замовника	вул. Заболотного, 19, м. Київ, 03143
Вид продукції, рік збору та маса (об'єм) партії	Мед, 2022 р., зразок
Місце збору продукції	
Акт відбору зразка та/або номер договору	
Дата отримання зразка	06.06.2022
Дата проведення випробувань	06.06 -08.06.22
Нормативний документ, за яким проведено дослідження	ДСТУ 4497:2005 “Мед натуральний. Технічні умови”

Назва показника	Вимоги ДСТУ (вищий/перший ґатунки)	Результат	Похиб- ка
1	2	3	4
Колір	Безколований, білий, світло-жовтий, жовтий, темно-жовтий, темний з різними відтінками	Світло-жовтий	
Смак	Солодкий, ніжний присмний, терпкий, подразнює слизову оболонку ротової порожнини, без сторонніх присмаків	Солодкий, подразнює слизову оболонку ротової порожнини, без сторонніх присмаків	
Аромат	Специфічний, присмний, від слабого до сильного, ніжний, без сторонніх запахів	Присмний, без сторонніх запахів	
Консистенція	Рідка, в'язка, дуже в'язка, щільна	Рідка	-
Кристалізація	Від дрібно - до крупнозернистої	Відсутня	-
Ознаки бродіння	Не дозволені	Не виявлені	-
Механічні домішки	Не дозволені	Не виявлені	-
Масова частка води, %, не більше	18,5/21,0	16,2	0,1
Діагностичне число (до безводної речовини), од. Готе, не менше	15,0/10,0	19,7	0,5
Вміст гідроксиметилфурфуролу (ГМФ), мг на 1 кг, не більше	10,0/25,0	1,54	0,1
Пилковий аналіз (спектр пилкових зерен)		Плодові дерева-25, верба-11, медузика-8, бузина-7, хрестоцвітні-14, лех-3, кропива двозонна-6, суніця-5	

**ВИСНОВОК:** зразок меду натурального за дослідженими органолептичними та фізико-хімічними показниками відповідає вимогам ДСТУ 4497:2005 **МЕДУ ВИЩОГО ҐАТУНКУ**

Директор ІНЦ “Інститут бджільництва ім. П. І. Прокоповича”,  
доктор сільськогосподарських наук, професор

В.О. Постосенко

Зав. лабораторії методів оцінки якості та  
безпеки продукції бджільництва,  
кандидат сільськогосподарських наук

Л.М. Лазарєва



НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ  
АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ  
ЦЕНТР  
ІНСТИТУТ БДЖІЛЬНИЦТВА  
ІМЕНІ П. І. ПРОКОПОВИЧА  
03143, Україна, Київ,  
вул. Академіка Заболотного, 19



NATIONAL ACADEMY  
OF AGRARIAN SCIENCES UKRAINE  
NATIONAL SCIENTIFIC CENTER  
P. I. PROKOPOVICH  
BEEKEEPING INSTITUTE  
Acad. Zabolotnogo St., 19,  
03143, Ukraine, Kyiv

Тел./Ph. (044) 526-67-98, Факс/Fax (044) 526-31-89  
e-mail: nnc\_ibkiev@ukr.net http://prokopovych.com.ua

ЛАБОРАТОРІЯ  
МЕТОДІВ ОЦІНКИ ЯКОСТІ ТА БЕЗПЕЧНОСТІ ПРОДУКЦІЇ БДЖІЛЬНИЦТВА  
(Сертифікат визнання вимірювальних можливостей № ПТ – 285/22 від 12.12.2022)  
e-mail: lab.meda@gmail.com / тел. 298 42 83

ПРОТОКОЛ від 20.06.22 р. (дійсний до червня 2023 року)

Замовник	ІНЦ „Інститут бджільництва ім. П. І. Прокоповича”,
Адреса та телефон замовника	вул. Заболотного, 19, м. Київ, 03143
Вид продукції, рік збору та маса (об'єм) партії	Мед, 2022 р., зразок
Місце збору продукції	
Акт відбору зразка та/або номер договору	
Дата отримання зразка	06.06.2022
Дата проведення випробувань	06.06 -08.06.22
Нормативний документ, за яким проведено дослідження	ДСТУ 4497:2005 “Мед натуральний. Технічні умови”

Назва показника	Вимоги ДСТУ (вищий/перший ґатунок)	Результат	Похиб- ка
1	2	3	4
Колір	Безкольоровий, білий, світло-жовтий, жовтий, темно-жовтий, темний з різними відтінками	Світло-жовтий	
Смак	Солодкий, ніжний присмний, терпкий, подразнює слизову оболонку ротової порожнини, без сторонніх присмаків	Солодкий, подразнює слизову оболонку ротової порожнини, без сторонніх присмаків	
Аромат	Специфічний, присмний, від слабкого до сильного, ніжний, без сторонніх запахів	Присмний, без сторонніх запахів	
Консистенція	Рідка, в'язка, дуже в'язка, щільна	Рідка	-
Кристалізація	Від зрібно - до крупнозернистої	Відсутня	-
Ознаки бродіння	Не дозволені	Не виявлені	-
Механічні домішки	Не дозволені	Не виявлені	-
Масова частка води, %, не більше	18,5/21,0	16,8	0,1
Діастазне число (до безводної речовини), од. Готте, не менше	15,0/10,0	10,22	0,5
Вміст гідроксиметилфурфуролу (ГМФ), мг на 1 кг, не більше	10,0/25,0	0,76	0,1
Видовий склад пилкових зерен, %, не менше	10	Акація-25, карагана-5, плодові дерева-9, чорнокорінь-13, лядвенець-7, жимолость-3, аморфа-8, малина-6, коношина-8	

Примітка. Для меду з акації біле діастазне число має бути не менше ніж 5 од. Готте  
**ВИСНОВОК:** зразок меду натурального за дослідженими органолептичними та фізико-хімічними показниками **відповідає** вимогам ДСТУ 4497:2005 **МЕДУ ВИЩОГО ҐАТУНКУ**

Директор ІНЦ “Інститут бджільництва ім. П. І. Прокоповича”,  
доктор сільськогосподарських наук, професор



В.О. Постоєнко

Зав. лабораторії методів оцінки якості та  
безпеки продукції бджільництва,  
кандидат сільськогосподарських наук

Л.М. Лазарева

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ  
АГРАРНИХ НАУК  
НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ  
ЦЕНТР  
ІНСТИТУТ БДЖІЛЬНИЦТВА  
ІМЕНІ П. І. ПРОКОПОВИЧА  
03143, Україна, Київ,  
вул. Академіка Заболотного, 19



NATIONAL ACADEMY  
OF AGRARIAN SCIENCES  
NATIONAL SCIENTIFIC CENTER  
P. I. PROKOPOVICH  
BEEKEEPING INSTITUTE  
Acad. Zabolotnogo St., 19,  
03143, Ukraine, Kyiv

Tel/Ph. (044) 526-67-98, Факс/Fax (044) 526-31-89  
e-mail: nnc\_ibkiev@ukr.net http://prokopovych.com.ua

**ЛАБОРАТОРІЯ**  
**МЕТОДІВ ОЦІНКИ ЯКОСТІ ТА БЕЗПЕЧНОСТІ ПРОДУКЦІЇ БДЖІЛЬНИЦТВА**  
(Сертифікат визнання вимірювальних можливостей № ПТ – 443/20 від 30.11.2020)  
/e-mail: lab.meda@gmail.com / tel.526 43 95

**ПРОТОКОЛ № 5581 від 08.08.22 р. (дійсний до серпня 2023 року)**

Замовник	ННЦ „Інститут бджільництва ім. П. І. Прокоповича”,
Адреса та телефон замовника	вул. Заболотного, 19, м. Київ, 03143
Вид продукції, рік збору та маса (об'єм) партії	Мед, 2022 р., зразок
Місце збору продукції	
Акт відбору зразка та/або номер договору	
Дата отримання зразка	08.08.2022
Дата проведення випробувань	08.08 -09.08.22
Нормативний документ, за яким проведено дослідження	ДСТУ 4497:2005 “Мед натуральний. Технічні умови”

Назва показника	Вимоги ДСТУ (вищий/перший ґатунк)	Результат	Похиб- ка
1	2	3	4
Колір	Безкольоровий, білий, світло-жовтий, жовтий, темно-жовтий, темний з різними відтінками	Жовтий	
Смак	Солодкий, ніжний присмний, терпкий, подразнює слизову оболонку ротової порожнини, без сторонніх присмаків	Солодкий, подразнює слизову оболонку ротової порожнини, без сторонніх присмаків	
Аромат	Специфічний, присмний, від слабкого до сильного, ніжний, без сторонніх запахів	Присмний, без сторонніх запахів	
Консистенція	Рідка, в'язка, дуже в'язка, щільна	Рідка	-
Кристалізація	Від дрібно - до крупнозернистої	Відсутня	-
Ознаки бродіння	Не дозволені	Не виявлені	-
Механічні домішки	Не дозволені	Не виявлені	-
Масова частка води, %, не більше	18,5/21,0	17,6	0,1
Діастазне число (до безводної речовини), од. Готе, не менше	15,0/10,0	18,9	0,5
Вміст гідроксиметилфурфуролу (ГМФ), мг на 1 кг, не більше	10,0/25,0	2,3	0,1
Пилковий аналіз (спектр пилкових зерен)		Соняшник-36, гречані-6, гвоздичні-4, лядвенець-12, материнка-5, осот-3, хрестоцвітні-8, коношина-6, фацелія-5, злаки-4, малина, акація, салі<3	

**ВИСНОВОК:** зразок меду натурального за дослідженими органолептичними та фізико-хімічними показниками відповідає вимогам ДСТУ 4497:2005 **МЕДУ ВИЩОГО ҐАТУНКУ**

Директор ННЦ “Інститут бджільництва ім. П. І. Прокоповича”,  
доктор сільськогосподарських наук, професор

В.О. Постоско

Зав. лабораторії методів оцінки якості та  
безпеки продукції бджільництва,  
кандидат сільськогосподарських наук

Л.М. Лазарєва



ЗАТВЕРДЖУЮ



Директор підприємства ФОП «Ковальчук»

О.М. Ковальчук

10 08 2021 р.

## Акт

**про виробничу перевірку ефективності комбінованого застосування  
пробіотичного препарату «Апінормін» та Аноліту для лікування  
бактеріальних хвороб бджіл**

Ми, що нижче підписались, директор ФОП «Ковальчук» О.М. Ковальчук; науковий керівник, доктор ветеринарних наук, професор В.В. Недосеков, доктор сільськогосподарських наук, професор, директор ННЦ «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича» В.О. Постоєнко; здобувач ОНС «Доктор філософії» Г.В. Постоєнко склали цей акт в тому, що за період з червня 2021 року до липня 2021 року було проведено виробничі дослідження з визначення ефективності застосування пробіотичного препарату «Апінормін» для лікування бактеріальних хвороб бджіл в с. Майдан-Карачієвський, Віньковецького району Хмельницької області. З цією метою за принципом аналогів сформовано 3 групи – контрольну та 2 дослідні по 7 бджолосімей в кожній. Відібрані бджолосімії мали клінічні ознаки Європейського гнильцю (строкатий розплід, запах столярного клею, ослабленість сімей). Препарат «Апінормін» для дослідження попередньо активували питною водою (група 1) та Анолітом (група 2) протягом 12-16 годин. В ході дослідження препарат у дозі 4г на одну сім'ю згодовувався бджолам з 50% цукровим сиропом 3 рази з інтервалом 7 днів. Контрольна група отримувала цукровий сироп з антибактеріальними засобами тетрациклінового ряду згідно інструкції. Ефективність препарату оцінювали за інтенсивністю проявів захворювання та активністю бджіл на кінець дослідження.

Результати виробничої перевірки наведені в Таблиці 1.

**Таблиця 1. Інтенсивність прояву клінічних ознак Європейського  
гнильцю в дослідних сім'ях**

Показник	Група		
	контрольна	Дослідна 1	Дослідна 2
Специфічний запах (столярного клею)	Специфічний (столярного клею)	Запах меду та воску	Запах меду та воску
Характеристика розплоду	Рівномірний з незначною строкатістю	рівномірний	рівномірний
Активність бджіл у вулику	Малоактивні, менше третини	Активні, більшість рамок	Активні, всі рамки

(обсидженість рамок у вулику бджолами)	рамок обсиджені бджолами	обсиджені бджолами	обсиджені бджолами
--	--------------------------	--------------------	--------------------

При застосуванні препарату Апінормін для бджолиних сімей, хворих на Європейський гнилець, у запропонованій схемі достовірно зникають ознаки захворювання. У контрольній групі, де застосовувався Апінормін, активований Анолітом, спостерігається значне підвищення активності комах, що проявляється повною обсидженістю рамок бджолами.

Таким чином, проведені дослідження доводять ефективність комплексного застосування пробіотичного препарату «Апінормін» та Аноліту у наведених схемах для лікування гнильцевих хвороб розплоду та обґрунтовує можливість заміни ними використання антибіотиків. Додатковою перевагою застосування пробіотичних препаратів є їх екологічна безпечність та відсутність впливу на якість отриманої продукції бджільництва.

Науковий керівник  
доктор ветеринарних наук, професор



В.В. Недосєков

доктор сільськогосподарських наук, професор



В.О. Постоєнко

Здобувач ОНС «Доктор філософії»



Г.В. Постоєнко

Пасічник



О.М. Ковальчук



ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор Директорства ФОП «Ковальчук»

О.М. Ковальчук

2023 р.



### Акт

#### про виробничу перевірку ефективності комбінованого застосування пробіотичного препарату «Апінормін» та Аноліту для профілактичної обробки бджіл перед зимівлею

Ми, що нижче підписались, директор ФОП «Ковальчук» О.М. Ковальчук; науковий керівник, доктор ветеринарних наук, професор В.В. Недосеков, доктор сільськогосподарських наук, професор, директор ННЦ «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича» В.О. Постосенко; здобувач ОНС «Доктор філософії» Г.В. Постосенко склали цей акт в тому, що за період з листопада 2022 року по квітень 2023 року було проведено виробничі дослідження для визначення ефективності комбінованого застосування пробіотичного препарату «Апінормін» та Аноліту для профілактичної обробки бджіл перед зимівлею в с. Майдан-Карачієвський, Віньковецького району Хмельницької області. З цією метою за принципом аналогів сформовано 3 групи – контрольну та 2 дослідні по 7 бджолосімей в кожній. Препарат для дослідження попередньо, за 12-16 годин до початку згодовування, активували питною водою (група 1) та Анолітом (група 2). В ході дослідження препарат у дозі 4г на одну сім'ю згодовувався бджолам з 50% цукровим сиропом 2 рази з інтервалом 7 днів. Контрольна група отримувала чистий цукровий сироп. Ефективність препарату оцінювали за низкою показників, наведених в таблиці.

Облік результатів виробничої перевірки проводився навесні 2023 року на початку обльоту. Отримані результати наведені в Таблиці 1.

Таблиця 1. Вплив профілактичного застосування препарату «Апінормін» в осінній період (при підготовці до зимівлі) на стан і продуктивність бджолиних сімей

№ п/п	Показники	Контрольна група	Дослідна група 1	Дослідна група 2
1	Стан сімей навесні	Задовільний, загинула 1 із 7 бджолосімей	Добрий, зменшилася кількість помору	Добрий, зменшилася кількість помору

2	Якість розплоду	Не щільний, з пропусками	Щільний, практично без пропусків	Щільний, без пропусків
3	Активність бджіл	Бджоли менш активні, менше третини рамок обсижені бджолами	Бджоли активні, ранній обліт, більшість рамок обсижена бджолами	Бджоли активні, ранній та інтенсивний обліт бджіл, всі рамки обсижені бджолами
4	Стан гнізда	Чистий, без плям	Чистий, без плям	Чистий, без плям

При застосуванні препарату Аліпінормін у запропонованій схемі покращується стан бджолиних сімей під час виходу із зимівлі за всіма досліджуваними показниками. Зокрема, в дослідній групі, де комплексно застосовувались Аліпінормін та Аноліт достовірно підвищилась активність бджіл у вулику. Стан гнізда в усіх дослідних групах був добрий, всі гнізда були чистими, що свідчить про якість залишеного на зиму корму.

Науковий керівник  
доктор ветеринарних наук, професор



V.V. Недосєков

доктор сільськогосподарських наук, професор



V.O. Постоєнко

Здобувач ОНС «Доктор філософії»



G.V. Постоєнко

Пасічник

O.M. Ковальчук

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор підприємства ФОП «Ковальчук»

О.М. Ковальчук

2023 р.



### Акт

### про виробничу перевірку ефективності комбінованого застосування пробіотичного препарату «Апінормін» та Аноліту для профілактичної обробки бджіл перед у весняно-літній період

Ми, що нижче підписались, директор ФОП «Ковальчук» О.М. Ковальчук; науковий керівник, доктор ветеринарних наук, професор В.В. Недосеков, доктор сільськогосподарських наук, професор, директор ННЦ «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича» В.О. Постоєнко; здобувач ОНС «Доктор філософії» Г.В. Постоєнко склали цей акт в тому, що за період з березня 2023 року до серпня 2023 року було проведено виробничі дослідження для визначення ефективності комбінованого застосування пробіотичного препарату «Апінормін» та Аноліту для підгодівлі (профілактичної обробки) бджіл у весняно-літній період в с. Майдан-Карачієвський, Віньковецького району Хмельницької області. З цією метою за принципом аналогів сформовано 3 групи – контрольну та 2 дослідні по 7 бджолосімей в кожній. Препарат для дослідження попередньо, за 12-16 годин до початку згодовування, активували питною водою (група 1) та Анолітом (група 2). В ході дослідження препарат у дозі 4г на сім'ю згодовувався бджолам з 50% цукровим сиропом 2 рази на місяць (у квітні, червні та липні) з інтервалом в 7 днів. Контрольна група отримувала чистий цукровий сироп. Ефективність препарату оцінювали за рядом показників, наведених в таблиці.

Облік результатів виробничої перевірки проводився 1 раз/місяць протягом всього сезону медозбору. Отримані результати наведені в Таблиці 1.

**Таблиця 1. Вплив профілактичного застосування препарату «Апінормін» та Аноліту у весняно-літній період на стан і продуктивність бджолиних сімей**

№ п/п	Показники	Контрольна група	Дослідна група 1	Дослідна група 2
1	Стан сімей	Добрий	Добрий	Добрий
2	Якість розплоду	Не щільний, 1 сім'я із 7 з пропусками	Щільний, практично без пропусків	Щільний, практично без пропусків
3	Активність бджіл	Бджоли активні	Бджоли більш активні, рамки	Бджоли більш активні, рамки

			обсиджені бджолами	обсиджені бджолами
4	Стійкість до збудників інфекційних хвороб	Виявлено 1 із 7 бджолосімей з ознаками Європейського гнильцю	Стійкі	Стійкі
5	Медозбір за сезон, %	100	135 - 161	158 - 178
6	Яйценокiсть маток за сезон, %	100	140 - 153	156 - 174

При застосуванні препарату Апінормін у запропонованій схемі в обох дослідних групах покращується стан бджолиних сімей під час сезону медозбору за всіма досліджуваними показниками. За показником стійкості до збудників захворювань у дослідних групах не виявлено ознак бактеріальних хвороб бджіл, порівняно з контролем. В дослідних групах достовірно підвищився показник медозбору та яйценокiсть маток. В дослідній групі 1 показник медозбору підвищився на 35 – 61%, а яйценокiсть маток на 40– 53% протягом всього сезону. В дослідній групі 2 показник медозбору зріс на 58 – 78%, а яйценокiсть на 56 – 74% порівняно з контролем.

Науковий керівник  
доктор ветеринарних наук, професор

 В.В. Недосеков

доктор сільськогосподарських наук, професор

 В.О. Постоєнко

Здобувач ОНС «Доктор філософії»

 Г.В. Постоєнко

Пасічник

 О.М. Ковальчук

**СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ*****Статті у наукових фахових виданнях України,  
включених до міжнародних наукометричних баз даних***

1. **Постоєнко Г. В.**, Постоєнко В. О., Єфіменко Т. М., Односум Г. В., Балян А. В. (2022) Нешкідливість, біостимулювальна та антивірусна дія пробіотика “Апінормін” для медоносних бджіл. НВ ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: Ветеринарні науки, 24(107), с. 64-70. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10711> (*Постоєнко Г.В. проведено літературний науковий пошук даних щодо застосування пробіотичних препаратів для бджіл, визначення їх нешкідливості та ефективності їх застосування для корисних комах, проведено збір та статистичну обробку дослідних даних, узагальнення результатів та формулювання основних висновків. Постоєнко В. О. визначено актуальність та сформульовано наукову новизну, здійснено загальне управління в ході проведення дослідження. Єфіменко Т.М. визначено практичне значення та мету проведених досліджень, сформовано план та схему проведення досліджень, а також сформульовано висновки. Односум Г.В. проведено літературний науковий пошук, збір, аналіз та статистичну обробку дослідних даних. Балян А.В. проведено літературний науковий пошук, аналіз дослідних даних та формулювання первинних висновків).*

2. **Постоєнко Г. В.** (2023) Нормофлора кишківника бджіл та перспективи її практичного застосування. Науково-виробничий журнал «Бджільництво України», Том 1, (9), с. 99 – 108. <https://doi.org/10.46913/beekeepingjournal.2022.9.14> (*Постоєнко Г.В. проведено літературний науковий пошук стосовно пробіотичних мікроорганізмів, що є характерними представниками нормофлори кишківника бджіл, їх культурально-морфологічних, біохімічних, структурних властивостей, генетичних особливостей та способів їх застосування в якості компонентів*

препаратів комплексної дії, визначено актуальність, наукову новизну та практичне значення, сформульовано мету та завдання дослідження, проведено систематизацію отриманих даних, сформульовано та викладено висновки, підготовлено публікацію до друку відповідно до вимог видання).

3. **Постоєнко Г. В.**, Постоєнко В. О., Єфіменко Т. М., Односум Г. В., Недосєков В. В. (2023) Видоспецифічність пробіотичних засобів для бджіл. Науково-виробничий журнал «Бджільництво України», 1, (10), 40-45. <https://doi.org/10.46913/beekeepingjournal.2022.10.06> (Постоєнко Г.В. проведено літературний науковий пошук, порівняльний аналіз наявних досліджень, які наближені до опублікованих авторами, проаналізовано ринок пробіотичних препаратів підібрано матеріали та методи досліджень, проведено статистичну обробку дослідних даних. Постоєнко В.О. визначено актуальність та сформульовано наукову новизну, здійснено загальне управління в ході проведення дослідження. Єфіменко Т.М. визначено практичне значення та мету проведених досліджень, сформовано план та схему проведення досліджень, сформульовано попередні висновки. Односум Г.В. проведено літературний науковий пошук, збір та статистичну обробку дослідних даних. Недосєковим В.В. проведено літературний науковий пошук наявних зарубіжних досліджень наближених до опублікованих авторами, збір та аналіз дослідних даних, сформульовано висновки).

4. **Постоєнко Г. В.**, Постоєнко В. О., Гордієнко О. І., Напненко О. О., Недосєков В. В. (2023) Удосконалення методики виділення пробіотичних культур зі свіжовідкачаного меду. Науковий вісник ветеринарної медицини, № 2. С. 101–110. Doi: 10.33245/2310-4902-2023-184-2-101-110 (Постоєнко Г.В. проведено літературний науковий пошук вітчизняних літературних даних стосовно методів, що застосовуються для виділення пробіотичних мікроорганізмів нормофлори кишківника бджіл, проаналізовано їх кількість та частоту застосування, проведено відбір та підготовку матеріалів для дослідження, проаналізовано отримані результати, оформлено первинну документацію, підготовлено статтю до публікації. Постоєнко В.О. визначено

практичне значення та мету досліджень, сформовано план та схему проведення досліджень, здійснено загальне управління в ході проведення дослідження, сформульовано висновки. Гордієнко О.І. проведено відбір та підготовку дослідних матеріалів, проаналізовано отримані результати, сформульовано попередні висновки. Напненко О.О. здійснено управління в ході відбору та підготовки дослідних матеріалів та визначення оптимальних методів досліджень. Недосєковим В.В. проведено літературний науковий пошук зарубіжних літературних даних, аналіз та узагальнення дослідних даних).

**Статті у науковому фаховому виданні, включеному до  
наукометричної бази даних Scopus**

5. Sidashova S., Adamchuk L., Yasko V., Kirovich N., Lisohurska D., **Postoienko H.**, Lisohurska O., Furman S., Bezditko L. (2022) The inhibitory effect of Ukrainian honey on probiotic bacteria. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 16, 149-160. <https://doi.org/10.5219/1721> (*Postoienko H.* проведено літературний науковий пошук, порівняльний аналіз наявних досліджень, які наближені до опублікованих авторами та визначено відповідні узгодження і відмінності, статистичний аналіз дослідних даних, проведено мелісопалінологічний аналіз проб меду для дослідження. *Sidashova S.* визначено актуальність та практичне значення досліджень, сформульовано наукову новизну, сформовано загальні висновки досліджень. *Adamchuk L.* визначено актуальність, сформульовано наукову новизну, практичне значення та мету проведених досліджень, проведено літературний науковий пошук, збір дослідних даних, підготовлено первинний варіант тексту, знаходження джерел фінансування. *Yasko V.* проведено літературний науковий пошук, статистичну обробку дослідних даних та аналіз отриманих результатів. *Kirovich N.* проведено літературний науковий пошук та збір дослідних даних. *Lisohurska D.* проведено літературний науковий пошук, підготовлено публікацію до друку відповідно до вимог видання. *Lisohurska O.* проведено збір та аналіз дослідних даних, сформульовано висновки та узагальнення результатів досліджень. *Furman S.* проведено проведено збір

дослідних даних, їх статистичну обробку та аналіз отриманих результатів. *Bezditko L.*- проведено збір дослідних даних).

### **Статті в інших виданнях**

6. Postoienko Volodymyr, Bezpalyi Ivan, **Postoienko Hanna** (2022). Biotechnological Evaluation of Bee Ethology During Honey Collection and Probiotic Properties of Honey. American Journal of Agriculture and Forestry. Vol. 10, No. 3, pp. 94-99. doi:10.11648/j.ajaf.20221003.12. (*Postoienko H.* проведено літературний науковий пошук, порівняльний аналіз наявних досліджень, які наближені до опублікованих авторами, відбір дослідних матеріалів, проведено дослідження з виділення пробіотичних мікроорганізмів нормофлори кишківника бджіл, проаналізовано та статистично оброблено дослідні дані, . *Postoienko V.* визначено актуальність та практичне значення досліджень, сформульовано наукову новизну, здійснено загальне управління в ході проведення дослідження, сформовано загальні висновки досліджень. *Bezpalyi I.* сформульовано наукову новизну, практичне значення та мету проведених досліджень, проведено літературний науковий пошук, збір дослідних даних, знаходження джерел фінансування, підготовлено публікацію до друку відповідно до вимог видання).

7. Гордієнко О. І., **Постоєнко Г. В.**, Постоєнко В. О., Напненко О. О., Артеменко В. Ю., Тиндик В.С. (2022) Виділення, ідентифікація та характеристика пробіотичних культур з меду бджолиного. Науково-виробничий журнал "Бджільництво України", 1(6), с. 7-11. <https://doi.org/10.46913/beekeepingjournal.2021.6.01>. (*Постоєнко Г.В.* проведено літературний науковий пошук, порівняльний аналіз наявних досліджень, які наближені до опублікованих авторами, проведено дослідження з визначення антагоністичних властивостей пробіотичних мікроорганізмів , збір та статистичну обробку дослідних даних. *Гордієнко О.І.* проведено літературний науковий пошук, відбір дослідних матеріалів, які наближені до опублікованих авторами, здійснено контроль проведення досліджень мікробіологічних



досліджень, проаналізовано та статистично оброблено дослідні дані. *Постоєнко В.О.* визначено актуальність та практичне значення досліджень, сформульовано наукову новизну, здійснено загальне управління в ході проведення дослідження, сформовано загальні висновки досліджень. *Напненко О.О.*, проведено збір та аналіз дослідних даних, сформовано попередні висновки досліджень підготовлено первинний варіант тексту, знаходження джерел фінансування. *Артеменко В.Ю.* проведено збір, статистичну обробку та аналіз дослідних даних. *Тиндиком В.С.* проведено літературний науковий пошук, збір та статистичну обробку дослідних даних).

### ***Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації***

#### ***Тези наукових доповідей***

8. **Г. Постоєнко** Вплив згодовування препарату «Апінормін» на динаміку природного відмирання бджіл. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасне бджільництво: проблеми-досвід-нові технології». – Київ, Україна (20.08.2021). (*Постоєнко Г.В.* проведено літературний науковий пошук та порівняльний аналіз наявних досліджень, які наближені до опублікованих даних, сформульовано актуальність, новизну та практичне значення проведених досліджень, зібрано, проаналізовано та узагальнено дослідні дані, сформовано висновки, підготовлено публікацію до друку).

9. **Postoienko H. V.**, Postoienko V. O., Efimenko T. M., Odnosum H. V. Dynamics of natural extinction of bees (*Apis mellifera* L.) by conditions of feeding and body spraying by probiotic drug «Apinormin». Materials of the 4th International Scientific and Practical Conference “Experimental and theoretical research in modern science”. - Kishinev, Moldova (4-5.11.2021). (*Postoienko H.V.* проведено літературний науковий пошук, порівняльний аналіз наявних досліджень, які

наближені до опублікованих авторами, проаналізовано ринок пробіотичних препаратів підібрано матеріали та методи досліджень, проведено статистичну обробку дослідних даних, підготовлено публікацію до друку. *Postoienko V.O.* визначено актуальність та сформульовано наукову новизну, здійснено загальне управління в ході проведення дослідження. *Efimenko T.M.* визначено практичне значення та мету проведених досліджень, сформовано план та схему проведення досліджень, проведено збір та аналіз дослідних даних, сформульовано попередні висновки. *Odnosum H.V.* проведено літературний науковий пошук, збір та статистичну обробку дослідних даних.).

10. **О. Гордієнко, О. Напненко, Г. Постоєнко.** Оптимізація сублімаційного методу зберігання лактобактерій. Міжнародна науково-практична конференція науково-педагогічних працівників та молодих науковців «Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах Євроінтеграції» присвяченої 85-річчю заснування факультету ветеринарної медицини ОДАУ. 14-15.09.2023, Одеса, Україна. (*Постоєнко Г.В.* проведено літературний науковий пошук, визначено практичне значення та мету проведених досліджень, проведено дослідження з виділення пробіотичних мікроорганізмів роду *Lactobacillus plantarum* та *Bifidobacterium bifidum* для дослідження різних способів зберігання штамів за використання різних поживних середовищ, проведено статистичну обробку дослідних даних, сформовано попередні висновки. *Гордієнко О.І.* визначено актуальність та сформульовано наукову новизну, здійснено загальне управління в ході проведення дослідження, підготовлено публікацію до друку. *Напненко О.О.* проведено літературний науковий пошук, сформовано план та схему проведення досліджень, проведено збір, аналіз та узагальнення дослідних даних, сформовано остаточні висновки).