

**ВИВЧЕННЯ АНТАГОНІЗМУ «ЕНТЕРОНОРМІНУ» ЩОДО ПАТОГЕННИХ
ЕНТЕРОБАКТЕРІЙ МЕДОНОСНИХ БДЖІЛ**

Галатюк О.Є., Романишина Т.О., Лемешинська Л.Ф., Лахман А.Р.

Житомирський національний агроєкологічний університет

У статті досліджений антагонізм «Ентеронорміну» щодо патогенних ентеробактерій бджіл - Klebsiella Pneumoniae та Enterobacter Aerogenes in vitro методом просочених дисків на двох поживних середовищах. Яскраво цю дію видно на середовищі МРС, що пояснюємо високою концентрацією лактобактерій Ентеронорміну і безпосереднім їх контактом з досліджуваними патогенними ентеробактеріями бджіл.

Ключові слова: медоносна бджола, ентеробактерії, Ентеронормін, антагонізм

Вступ. Бджола—незамінний лікар та цілитель для людини. Перспективною та розвинутою галуззю сільського господарства в Україні є бджільництво, що окрім меду забезпечує людину цілим рядом інших цінних продуктів, які володіють лікувальними властивостями [1]. Сучасні умови ведення бджільництва, зменшення кількості пасік, погіршення екологічних умов спонукають до дій, направлених на підтримку бджолиних сімей, активізацію їх та збереженість у різні періоди продуктивного року. Відомо, що медоносна бджола є невід’ємним компонентом біогеоценозу планети. Її організм, відповідно, являється біологічним об’єктом, що реагує на вплив різноманітних зовнішніх факторів: кількість медоносів, їх екологічну чистоту, наявність інфекційних хвороб на пасіці, якість проведення ветеринарно-санітарних та зоотехнічних заходів, використання лікувальних препаратів [4]. Знання складу мікробіоти бджолиного кишечника важливо для забезпечення збалансування мікробного стану кишечника та покращення здоров’я медоносних бджіл [15]. Згідно останніх праць вітчизняних та іноземних авторів, бактеріальні хвороби бджіл набирають все більшого поширення на пасіках України, деяких країн Європи та Америки [3,14], що завдає бджільництву значних економічних збитків. На здоров’я медоносних бджолосімей в Україні та у всьому світі, впливають численні біотичні та абіотичні фактори [9,10,14,17,18]. На додаток до патогенів, інші фактори, включаючи сезонні зміни розмірів бджолиних сімей, потреби в годівлі, харчування, впливають на здоров’я бджіл [3,11,14,17,19].

Встановлено, що в кишечнику бджоли міститься представники не менше 10 родів бактерій, що належать до родин *Enterobacteriaceae Klebsiella, Enterobacter, Providencia, Proteus, Citrobacter, Hafnia, Escherichia, Pantoea, Morganella, Serratia* [7]. Аналізуючи дослідження вітчизняних та зарубіжних авторів, необхідно відмітити, що мало уваги приділяють саме ролі мікроорганізмів, та мікрофлорі вулика, в цілому. У той же час зрушення мікрофлори в бік патогенних представників призводить до захворювання [2,3,6]. Ідентифікація та з’ясування патогенних ентеробактерій (*Klebsiella Pneumoniae, Enterobacter Aerogenes*) у медоносних бджіл [3] дозволяють поглибити ще обмежені знання про ці збудники, які впливають на одного з найважливіших запилювачів екосистем [12,18]. Ці умовно-патогенні збудники проникають у більш глибокі осередки травного тракту бджіл стають патогенними, та викликають дисбактеріози. Також слід врахувати, що вони розширили свій діапазон проживання, що включає гемолімфу, яєчники, слинні залози тощо [13,16,18]. Бактерії чинять патогенний вплив на організм бджіл, що проявляється різким проносом та загальною слабкістю бджолиної сім’ї, якщо не лікувати перші симптоми з літа то ймовірно, що сім’я не перезимус. В Україні періодично реєструється масова загибель бджіл. З’ясовано, що колапс

бджолиних сімей спостерігається внаслідок масового розмноження умовно-патогенної мікрофлори кишечника бджіл, поширення збудників у вулику та на пасіці в результаті зниження резистентності у частини сімей. Інша частина сімей лишається стійкою до прояву клінічних ознак захворювання [3].

Закон «Про бджільництво» зобов'язує виробників використовувати лише препарати, внесені в державний реєстр пестицидів та агрохімікатів дозволених в Україні [5]. В Україні заборонено використання антимікробних препаратів у бджільництві (антибіотики та сульфаніламиди), тому важливим є створення безпечного та ефективного засобу для боротьби та профілактики виникнення дисбактеріозів у бджіл.

Виходячи із зазначеного, ми поставили за мету вивчити антагонізм «Ентеронорміну», який містить у своєму складі бактерії роду *Enterococcus faecalis*, бактерії роду *Lactobacillus salivarius*, та бактерії *Bacillus subtilis* [8], щодо патогенних штамів ентеробактерій (*Klebsiella Pneumoniae*, *Enterobacter Aerogenes*) медоносних бджіл, які були виділені та ідентифіковані нами [3].

Методика і матеріали для дослідження. Дослідження проводили на культурах *Klebsiella Pneumoniae* та *Enterobacter Aerogenes*, отриманих нами в 2018 році, які зберігаються в холодильнику при $t\ 5-7^{\circ}\text{C}$ і пересіваються глибинним методом з інтервалом в 30 діб на середовище АМХ (Агар Мюллера-Хінтона) та агар МРС (Ман, Рогоза, Шарп). Препарат «Ентеронормін» готували за інструкцією: до 40г сухої речовини «Ентеронорміну» додавали 200 см³ водного розчину «Йодіс + Селен», витримували 18 годин при $t\ 24-26^{\circ}\text{C}$ (кімнатна температура в літній період). Препарат застосовували в концентрації відповідно до настанови щодо застосування.

Дослідження проводили за допомогою дисків, які власноруч обробляли препаратом «Ентеронормін» в різних концентраціях, а саме: нативний розчин, розчин, розведений цукровим сиропом в концентрації 1:2 та чистий диск, який виступав контролем у даному дослідженні. Експозиція просочення дисків становила 20 хв, після чого диски підсушували на фільтрувальному папері протягом 15 хв.

В чашку Петрі вносили по 1 мл бактеріальних суспензій та по 20 мл середовища АМХ та МРС, після чого круговими рухами розмішували вміст чашок до однорідності. Після застигання середовища на горизонтальній поверхні столу на поверхню викладали диски просочені препаратом «Ентеронормін» за часовою стрілкою: чистий диск, нативний препарат, препарат у розведенні із цукровим сиропом. Дослідження проводили на п'яти чашках Петрі для кожної культури та середовища, за якими спостерігали протягом трьох діб.

Результати дослідження. При обстеженні неблагополучних пасік були відібрані та досліджені змиви з вуликів уражених бджолосімей. Після проведення комплексу мікробіологічних досліджень було виявлено у хворих сім'ях ентеробактерії роду *Klebsiella* та *Enterobacter*. Найперше та найголовніше – це санація організму бджіл щодо патогенних ентеробактерій

Результати проведених нами досліджень щодо дії препарату «Ентеронормін» на ентеробактерію *Klebsiella Pneumoniae*, виділену з організму бджіл *in vitro* представлені в таблиці 1.

Табл. 1. Зони росту та антагонізму препарату «Ентеронормін» на середовищах АМХ та МРС з культурою *Klebsiella Pneumoniae* (n=5)

Середовище АМХ								Середовище МРС							
Перша доба				Третя доба				Перша доба				Третя доба			
Е.натив.		Е.+Ц.С.		Е.натив.		Е.+Ц.С.		Е.натив.		Е.+Ц.С.		Е.натив.		Е.+Ц.С.	
З.р.	З.а.	З.р.	З.а.	З.р.	З.а.	З.р.	З.а.	З.р.	З.а.	З.р.	З.а.	З.р.	З.а.	З.р.	З.а.
0,5±0,025	0,12 ±0,026	0,5 ±0,045	0,25± 0,025	0,52±0,026	0,24±0,012	0,64±0,05	0,34±0,04	0,56±0,025	0,38±0,035	0,5±0,035	0,24±0,08	0,56±0,025	0,24±0,06	0,58±0,08	0,34±0,04

Примітка:

Е.натив.- «Ентеронормін» нативний ; Е.+Ц.С. – «Ентеронормін»+ 50 % розчин цукрового сиропу;

З.р. – радіус зони росту, см, З.а. - радіус зони антагонізму, см

З даних таблиці 1 видно, що на першу добу зона росту нативного «Ентеронорміну» на середовищі АМХ становила $0,5 \pm 0,025$ см із зоною антагонізму $0,12 \pm 0,026$ см, а зона росту «Ентеронорміну» із цукровим сиропом була подібною і становила $0,5 \pm 0,045$ см, а зона антагонізму була в два рази більшою і становила $0,25 \pm 0,025$ см. На третю добу зона росту нативного «Ентеронорміну» зросла до 0,52 см, то зона росту «Ентеронорміну» із цукровим сиропом зросла на 0,12 см, а зона антагонізму до $0,34 \pm 0,04$ см.

В той же час видно, що на першу добу зона росту нативного «Ентеронорміну» на середовищі МРС становила $0,56 \pm 0,025$ см із зоною антагонізму $0,38 \pm 0,035$ см, але зона росту «Ентеронорміну» із цукровим сиропом була подібною і становила $0,5 \pm 0,035$ см, а зона антагонізму становила $0,24 \pm 0,08$ см. На третю добу зона росту нативного «Ентеронорміну» не змінилась, а зона росту «Ентеронорміну» із цукровим сиропом зросла до $0,58 \pm 0,08$ см. Зона антагонізму «Ентеронорміну» із цукровим сиропом зросла до $0,34 \pm 0,04$ см, що на 0,1 см більше в порівнянні із нативним «Ентеронорміном».

Візуальні зміни при бактеріологічних дослідженнях антагоністичної активності препарату «Ентеронормін» на середовищі МРС на культуру *Klebsiella Pneumoniae* представлені на рисунку 1.

Отже, антагонізм досліджуваних ентеробактерій яскраво видно при використанні дисків на середовищі МРС, що пояснюємо високою концентрацією лактобактерій «Ентеронорміну» і безпосереднім контактом лактобактерій з досліджуваними патогенними ентеробактеріями бджіл.

Результати проведених нами досліджень щодо дії препарату «Ентеронормін» на

культуру *Enterobacter Aerogenes*, виділену з організму бджіл *in vitro* подставлені в таблиці 2.



Рис. 1. Візуальні зміни при бактеріологічних дослідженнях антагоністичної активності препарату «Ентеронормін» на культуру *Klebsiella Pneumoniae* на дисках на 24 години культивування на середовищі MPC

Табл. 2. Зони росту та антагонізму препарату «Ентеронормін» на середовищах АМХ та MPC з культурою *Enterobacter Aerogenes* (n=5)

	Середовище MPC								Середовище АМХ							
	Перша доба				Третя доба				Перша доба				Третя доба			
	Е.натив.		Е.+Ц.С.		Е.натив.		Е.+Ц.С.		Е.натив.		Е.+Ц.С.		Е.натив.		Е.+Ц.С.	
	З.р.	З.а.	З.р.	З.а.	З.р.	З.а.	З.р.	З.а.	З.р.	З.а.	З.р.	З.а.	З.р.	З.а.	З.р.	З.а.
mm	0,44±0,04	0,2±0,03	0,48±0,05	0,24±0,025	0,46±0,01	0,26±0,05	0,46±0,05	0,36±0,025	0,5±0,025	0,52±0,026	0,5±0,045	0,26±0,025	0,52±0,026	0,24±0,012	0,64±0,05	0,34±0,04

Примітка:

Е.натив.- «Ентеронормін» нативний ; Е.+Ц.С. – «Ентеронормін»+ 50 % розчин цукрового сиропу;

З.р. – радіус зони росту, см, З.а. - радіус зони антагонізму, см

З даних таблиці 2 видно, що на першу добу зона росту нативного «Ентеронорміну» на середовищі MPC становила 0,44±0,04 см із зоною антагонізму 0,2±0,03 см, а зона росту «Ентеронорміну» із цукровим сиропом становила 0,48±0,05 см, але зона антагонізму була в два рази більшою і становила 0,24±0,025 см. На третю добу зона росту нативного

«Ентеронорміну» зросла до $0,46 \pm 0,01$ см, то зона росту «Ентеронорміну» із цукровим сиропом не змінилась, але зона антагонізму зросла до $0,36 \pm 0,025$ см, тобто на 0,1 см.

В той же час видно, що на першу добу зона росту нативного «Ентеронорміну» на середовищі АМХ становила $0,5 \pm 0,026$ см із зоною антагонізму $0,52 \pm 0,026$ см, а зона росту «Ентеронорміну» із цукровим сиропом становила $0,5 \pm 0,045$ см, але зона антагонізму була в два рази меншою і становила $0,26 \pm 0,025$ см. На третю добу зона росту нативного «Ентеронорміну» зросла до $0,52 \pm 0,26$ см, то зона росту «Ентеронорміну» із цукровим сиропом зросла до $0,64 \pm 0,05$ см, але зона антагонізму до $0,34 \pm 0,04$ см майже в 3 рази більше в порівнянні із нативним «Ентеронорміном».

Візуальні зміни при бактеріологічних дослідженнях антагоністичної активності препарату «Ентеронормін» на середовищі МРС на культуру *Enterobacter Aerogenes* представлені на рисунках 2-3.

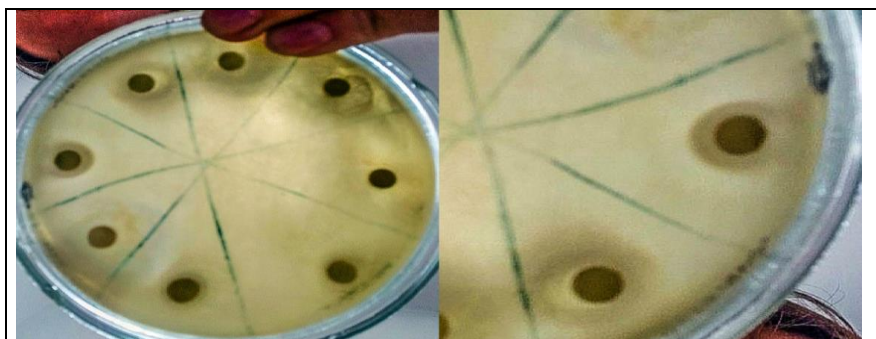


Рис. 2. Візуальні зміни при бактеріологічних дослідженнях антагоністичної активності препарату «Ентеронормін» на культуру *Enterobacter Aerogenes* на дисках на 24 годину культивування на середовищі МРС

Антагоністична дія «Ентеронорміну» краще виражена з *Enterobacter Aerogenes* вже через 24 години після контакту з ентеробактеріями, тоді як на культурі *Klebsiella Pneumoniae* дія проявляється повільніше так як зона просвітлення реєструється тільки на 48 годину.

Антагоністичну дію «Ентеронорміну» пояснюємо підвищенням концентрації лактобактерій в середовищі, які і в кишечнику бджоли, завдяки своїй концентрації стримують розвиток умовно-патогенних ентеробактерій. Отже, виходячи з усього вище описаного, можна стверджувати про активно виражену антагоністичну дію препарату «Ентеронормін» щодо ентеробактерій *Klebsiella Pneumoniae* та *Enterobacter Aerogenes*.

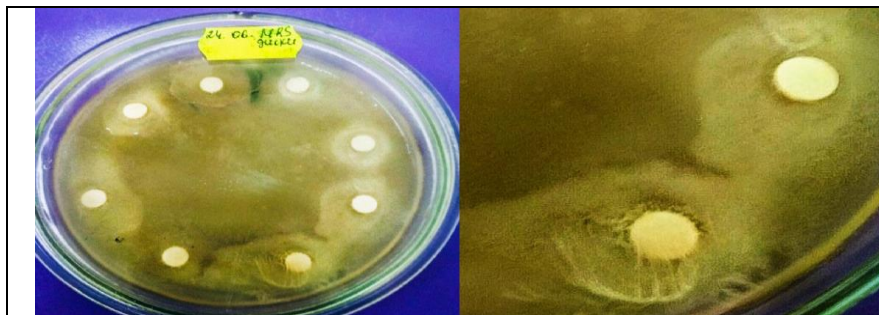


Рис. 3. Візуальні зміни при бактеріологічних дослідженнях антагоністичної активності препарату «Ентеронормін» на культуру *Enterobacter Aerogenes* на дисках на 72 годину культивування на середовищі МРС

Препарат починає оптимально діяти через 48 годин після його застосування на обидві патогенні культури. Пронеси бджіл та ураження розплоду виникають при зниженні концентрації біфідобактерій в кишечнику, як результату неправильної годівлі та утримання бджіл, зміни рН кишечника, внаслідок чого починають розвиватись хвороботворні *Klebsiella Pneumoniae* та *Enterobacter Aerogenes* – основні фактори розладу травлення. Для профілактики і лікування ентеробактеріозів бджіл доцільно застосовувати «Ентеронормін» на водному розчині «Йодіс+селен», так як цей препарат володіє антагоністичною дією і подавляє розвиток патогенних *Klebsiella Pneumoniae* та *Enterobacter Aerogenes*.

Висновки

1. Пробиотичний препарат «Ентеронормін» з водним розчином йодіс плюс селен виростає за 24-36 годин моно шаром. Причому на середовищі МРС - суцільною плівкою, а на середовищі АМХ - густими випуклими колоніями жовтуватого кольору.
2. На середовищі МРС зона просвітлення помітна вже на 24 годину, ріст препарату «Ентеронормін» проявляється активніше, колонії мають опуклий вигляд і поширюються в усі сторони.
3. При застосуванні методу просочених дисків дія «Ентеронорміну» на культуру *Enterobacter Aerogenes* проявляється уже через 24 години, як на середовищі АМХ так і на МРС. Проте зони просвітлення (антагонізму) виражені не яскраво. В той час дія пробіотику на культуру *Klebsiella Pneumoniae* спочатку проявляється появою зони просвітлення, а зона росту препарату стає візуально помітною через 48 годин.
4. Вивчення антагонізму «Ентеронорміну» щодо ентеробактерій бджіл доцільно проводити на середовищі МРС

Перспективи подальших досліджень у даному напрямку

1. Дослідження допоможуть надати перспективу щодо епідеміології хвороб медоносних бджіл для міжнародної галузі бджільництва.
2. Удосконалення схеми застосування пробіотиків у бджільництві в залежності від потреб в регіонах підготовки бджіл до головного взятку та зимівлі.
3. Виявити залежність від застосування пробіотиків на збереженість, продуктивність, захворюваність бджіл.

Список літератури

1. Галатюк О. Є., Романишина Т. О., Лемешинська Л. Ф., Лахман А. Р. Використання продуктів бджільництва для здоров'я людей / Трофологія (вчення про закономірності живлення біоти та правильного харчування людей) – новітній міждисциплінарний напрям в Україні : матеріали Всеукраїнської науково-освітньо-практичної конференції (м. Житомир, 25–26 квітня 2019 р.), Житомир : Житомирський національний агроекологічний університет. 2019 : 163–165.
2. Галатюк О. Є., Романишина Т., Тушак С. (2018) Нові ентеробактеріози бджіл в Україні: характеристика збудників, діагностика, лікувально-профілактичні обробки. *Пасічник, Хмельницький*. 12 : 4-7.
3. Галатюк О.Є., Тушак С. Ф. (2016) Епізоотологічний моніторинг заразних хвороб медоносних бджіл у північно-західному регіоні України. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва.* –: 237: 372-379.
4. Кистерна, О. С., та інші. "Оцінка гемолімфи медоносних бджіл при використанні біологічних стимуляторів у лабораторних умовах." *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина* 7 (2012): 34-40.
5. Міжнародна громадська організація українців [Електронний ресурс] – Режим доступу до сайту: <http://4hvyliа.com/novyny-usim/henotsyd-ukrainskykh-bdzhil-i-ukraintsiv.html>
6. Технологія ефективних мікроорганізмів у бджільництві [Електронний ресурс] – Режим входу: http://beekeeping.com.ua/user/agrosvitukr/articles/02_2007_02_2006.html
7. Энтеробактерии в составе микрофлоры пищеварительной системы медоносных пчёл в различные сезоны года / Чечёткина, У. Е., Евтеева, Н. И., Речкин, А. И., & Радаев, А. А. *Нижегородский университет им. Н.И.Лобачевского*, 2011: 2.
8. Энтеронормин и Йодис Se [Електронний ресурс] – Режим входу: <https://pasika.com.ua/ru/enteronormin-ru/>
9. Cavigli I, Daughenbaugh KF, Martin M, Lerch M, Banner K, Garcia E, et al. (2016) Pathogen prevalence and abundance in honey bee colonies involved in almond pollination. *Apidologie* 47: 251–266. doi: [10.1007/s13592-015-0395-5](https://doi.org/10.1007/s13592-015-0395-5)
10. Cepero A, Ravoet J, Gomez-Moracho T, Bernal JL, Del Nozal MJ, et al. (2014) Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. *BMC Res Notes* 7: 649 doi: [10.1186/1756-0500-7-649](https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-649)
11. Chechetkina, U.E., Evteeva, N.I. and Rechkin, A.I. (2010) Comparison of the Composition of Enterobacteria in Honey Bees *Apis mellifera* L. during the Wintering and in the Active Honey Season. *Herald Nizhegor University* N, 2, 475-478.
12. Evans, J. D., & Schwarz, R. S. (2011). Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in microbiology*, 19(12), 614-620. doi: [10.1016/j.tim.2011.09.003](https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.003)
13. Forsgren, E., Locke, B., Sircoulomb, F., & Schäfer, M. O. (2018). Bacterial diseases in honeybees. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5(1), 18-25.
14. Glenny, W., Cavigli, I., Daughenbaugh, K. F., Radford, R., Kegley, S. E., & Flenniken, M. L. (2017). Honey bee (*Apis mellifera*) colony health and pathogen composition in migratory beekeeping operations involved in California almond pollination. *PLoS one*, 12(8), doi: e0182814

15. Kačániová, M., Gasper, J., Terentjeva, M., Kunová, S., Kluz, M., Hanus, P., & Puchalski, C. (2018). Antimicrobial Activity and Resistance of Microorganisms Isolated from Honey Bees. *Scientific Papers: Animal Science & Biotechnologies/Lucrari Stiintifice: Zootehnie si Biotehnologii*, 51(1).
16. Nagaraja, N., & Rajagopal, D. (2019). *Honey Bees: Diseases, Parasites, Pests, Predators and their Management*. MJF Publisher.
17. Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., De Smet, L., Wenseleers, T., Smagghe, G., & De Graaf, D. C. (2013). Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS One*, 8(8), doi: e72443
18. Rivera, A., Cedillo, L., Perez, J., Hernandez, F., Romero, O., & Rodriguez, N. (2018). Isolation of Enterobacteria and Spiroplasmas from *Apis mellifera*. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2018; 6(3): 900-902
19. Traynor KS, Rennich K, Forsgren E, Rose R, Pettis J, Kunkel G, et al. (2016) Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. *Apidologie* 47: 325–347.

ИЗУЧЕНИЕ АНТАГОНИЗМА «ЭНТЕРОНОРМИНА» ПО
ОТНОШЕНИЮ К ПАТОГЕННЫМ ЭНТЕРОБАКТЕРИЯМ
МЕДОНОСНЫХ ПЧЁЛ

Галатюк А.Е., Романишина Т.А., Лемешинская Л.Ф., Лахман А.Р.
Житомирский национальный агроэкологический университет

В статье исследован антагонизм Энтеронормина по отношению к патогенным энтеробактериям пчёл - *Klebsiella pneumoniae* и *Enterobacter aerogenes* in vitro методом пропитанных дисков на двух питательных средах. Активное действие препарата можно наблюдать на среде МРС, что объясняем высокой концентрацией лактобактерий Энтеронормина и непосредственным их контактом с исследуемыми патогенными энтеробактериями пчёл.

Ключевые слова: медоносная пчела, энтеробактерии, «Энтеронормин», антагонизм

STUDY OF ANTERONORMIN ANTAGONISM ON THE
PATHOGENIC ENTEROBACTERIA OF HONEYBEES

A.E.Galatiuk, T.O. Romanishina, L.F. Lemeshynska, A.R. Lakhman
Zhytomyr National Agroecological University

Enteronormin antagonism in pathogenic bee enterobacteria - *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* was investigated in vitro by the method of impregnated disks on two nutrient media. This effect is clearly seen in the MRS environment, which is explained by the high concentration of Enteronormin lactobacilli and their direct contact with the bee pathogenic enteric bacteria studied.

Keywords: honeybees, enterobacteria, «Enteronormin», antagonism