


МІКРОБІОЛОГІЯ, ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

УДК 619:638.15-08

Визначення напрямку дії «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» щодо збудників бджолиних дисбіозів *in vitro*

Лахман А.Р. 

Поліський національний університет

 Лахман А.Р. E-mail: nastyalahman@gmail.com



Лахман А.Р. Визначення напрямку дії «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» щодо збудників бджолиних дисбіозів *in vitro*. Науковий вісник ветеринарної медицини, 2021. № 2. С. 72–81.

Lakhman A. Determination of the direction of action of «EM® PROBIOTIC FOR BEES» against bee dysbacteriosis pathogens *in vitro*. *Nauk. visn. vet. med.*, 2021. № 2. PP. 72–81.

Рукопис отримано: 21.09.2021 р.

Прийнято: 04.10.2021 р.

Затверджено до друку: 09.12.2021 р.

Doi: 10.33245/2310-4902-2021-168-2-72-81

У багатьох країнах світу відмічено масове скорочення чисельності бджолиних колоній внаслідок поліфакторного впливу екзо- та ендогенних чинників. Розвиток опортуністичних інфекцій у бджіл виникає внаслідок дисбалансу умовно-патогенної мікрофлори, що колонізує середню кишку комах. Проблема дисбактеріозів тварин різних видів, зокрема і бджіл, викликає зацікавлення ветеринарних лікарів. Тому пошук нових засобів, альтернативних до антибіотиків, є першочерговим завданням у бджільництві. На сьогодні як нові та безпечні ліки, щодо терапії і профілактики дисбактеріозів у гуманній та ветеринарній медицині, запропоновано пробіотичні препарати. Пробиотики – засоби, які містять у своєму складі живі мікроорганізми та здатні, у певному дозуванні, ефективно впливати на макроорганізм. Застосуванню таких лікувальних добавок на організм комах передують їх попереднє випробування *in vitro*. Тому визначення напрямку дії (бактеріостатичного, бактерицидного, антагоністичного) «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», розведеного розчином цукрового сиропу та водою у різних концентраціях, щодо бактерій бджіл виду *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* та змішаної мікробної асоціації *in vitro*, стало основною метою дослідження. Експеримент *in vitro* щодо вказаного пробіотичного засобу здійснювали методом дифузії в агарових лунках (метод лунок) та модифікованим методом Кірбі-Бауера для галузі бджільництва (диско-дифузійний метод). Бактеріостатичний, бактерицидний і антагоністичний ефекти визначали візуально та через вимірювання відповідних зон навколо лунок і дисків. Експериментально встановлено, що бактеріостатичний ефект пробіотичних мікроорганізмів щодо ентеробактерій бджіл виду *Klebsiella pneumoniae* зберігався на однаковому рівні за розведення 50 % розчином цукрового сиропу у концентраціях від 0,5 до 30 %. Розведення «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» водою мало виражений антагоністичний вплив щодо бактерій виду *Klebsiella pneumoniae* методом дифузії в агарових лунках на третю добу експерименту за концентрацій 0,5 % – 75,4±1,04 мм, 1 % – 61,2±0,42 мм відповідно. За розведення пробіотика 50 % цукровим сиропом відмічали пригнічення росту ентеробактерій виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* у концентраціях препарату до 50 % у межах від 18,2±0,42 до 25,4±0,45 мм (диско-дифузійний метод). Бактерицидна дія «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» щодо змішаної мікробної асоціації, виділеної від бджолосімей з ознаками кишкових розладів, відмічена у концентрації 10 % препарату розведеного водою з діаметром зони просвітлення 18,6±0,57 мм диско-дифузійним методом. «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» має антагоністичний, бактеріостатичний та бактерицидний ефекти щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, та змішаної мікробної асоціації. Прояв дії вказаного пробіотичного засобу залежить від розчинника та його концентрації, що визначає напрям та мету застосування препарату.

Ключові слова: бджільництво, дисбіози, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, бактерицидний та бактеріостатичний ефекти, антагоністична дія.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. У багатьох країнах світу останнім часом реєструють скорочення чисельності бджіл [1–2]. Масова загибель бджолиних сімей є наслідком дії таких чинників як порушення рівноваги умовно-патогенної мікрофлори кишечнику бджіл; поширення збудників у вулику та на пасіці в результаті зниження резистентності у частини бджолосімей; дії сублетальних доз пестицидів тощо [3]. Згідно з працями зарубіжних та вітчизняних авторів, бактеріальні хвороби бджіл поширені на пасіках країн Європи, зокрема України, та Америки [2–4], що завдає бджільництву значних економічних збитків. Отже, зазначені вище етіологічні чинники здатні порушувати баланс кишкової мікробіоти комах, що призводить до розвитку опортуністичних інфекцій [5, 6].

Ентеробактерії видів *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* – факультативні анаероби, представники резидентних бактерій шлунково-кишкового тракту людини, теплокровних і холоднокровних тварин (зокрема бджіл) [7].

Корисні мікроорганізми (*Bacillus subtilis* spp., *Lactobacillus* spp. тощо) здатні до конкуренції щодо патогенних бактерій шлунково-кишкового тракту медоносних бджіл. Власність пробіотичних спороутворювальних бактерій проявляти антагоністичний вплив щодо вірулентних штамів мікроорганізмів слугувало основою для синтезу препаратів – самоелімінуючих антагоністів [8–10]. Дія складових препаратів для лікування та попередження дисбіозів (ентеробактеріозів) бджіл вивчена недостатньо. Тому важливим етапом в організації профілактичних заходів є визначення напрямку дії нових сучасних препаратів для оздоровлення бджіл [11, 12].

Мета дослідження – визначення та оцінювання бактеріостатичного, бактерицидного та антагоністичного ефектів «EM® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» щодо бактерій бджіл видів *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* та змішаної мікробної асоціації, виділеної від бджолосімей уражених дисбіозами.

Матеріал і методи дослідження. Матеріалом експерименту слугували дві чисті тест-культури ентеробактерій видів *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, виділених від бджолосімей Житомирської, Київської, Хмельницької областей з клінічними ознаками дисбіозів методом відбору хворих бджіл та частини стільника з ураженням розплодом [2, 12]. Дані штами ідентифіковано на кафедрі мікробіології, фармакології та епізоотології факультету ветеринарної медицини Поліського

університету та за участю Державної установи "Житомирський обласний лабораторний центр міністерства охорони здоров'я України" у 2019 р. [2, 12]. Змішана мікробна асоціація виділена від 22 бджолосімей з приватних пасік Житомирської області з ознаками кишкових розладів, отримана методом змивів зі стільників вуликів у 2020 році. Досліджувані культури (тест-культури та змішана культура бактерій) зберігали за температури +5 °С; пересів здійснювали методом штриха на скошеному агарі з інтервалом 21 доба на м'ясо-пептонному агарі (далі – МПА) та агарі Мюллера–Хінтона (далі – АМХ).

Комерційно доступний «EM® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» представлений корпорацією EMRO (Японія) разом з ТОВ «EM Україна» (Україна), являє собою пробіотичну формулу кількох видів молочнокислих бактерій, дріжджів та фотосинтезуючих мікроорганізмів [13, 14]. Напрямок дії вказаного пробіотичного засобу щодо досліджуваних штамів мікроорганізмів визначали в лабораторних умовах (*in vitro*) модифікованим методом Кірбі–Бауера [15] (далі – ДДМ) та методом дифузії в агарових лунках (далі – МЛ) [16]. Відповідні ефекти пробіотичного засобу визначали візуально та за допомогою вимірювання діаметра відповідних зон навколо лунок і дисків.

«EM® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» застосовували у нативному стані в концентраціях – 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20; 30; 50 %. Розведення здійснювали 50 % розчином цукрового сиропу та водою. Дослідження проводили у п'яти повтореннях для кожної культури на середовищі МПА. Облік результатів реєстрували через 24 та 72 години.

Обробку цифрових даних (середню арифметичну (M), помилку середньої арифметичної (m), середнє квадратичне відхилення (δ)) проведено за допомогою варіаційно-статистичних методів з використанням програми *Statistica 8.0*; суттєва різниця між двома варіаціями – за критерієм вірогідності (td) та таблицями Стьюдента [17].

Результати дослідження. Складові «EM® ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» у вигляді поєднання симбіотичних мікроорганізмів проявили різний вплив щодо досліджуваних тест-культур видів *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* та змішаної мікробної асоціації.

За даними таблиць 1 і 2 бактеріостатичний ефект (БС) зберігався на однаковому рівні за розведення «EM® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» 50 % розчином цукрового сиропу у концентраціях від 0,5 до 30 %.

Діаметр зон пригнічення росту патогенних ентеробактерій виду *Klebsiella Pneumoniae* ста-

новив 24,2±0,55–28,6±0,27 мм (МЛ) (табл. 1); 20,6±0,27 – 25,6±0,57 мм (ДДМ) (табл. 2).

Зокрема, антагоністичну дію реєстрували на 3 добу експерименту у концентраціях від 50 % до нативного розчину препарату із діаметрами зон антагонізму – 5,2±0,42 – 19,6±0,45 мм відповідно. Причому, результати прояву бактеріостатичного ефекту за ДДМ не мали високої достовірної різниці на першу і третю добу (рис. 1).

За розведення «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» водою проявлялася яскраво виражена антагоністична дія щодо досліджуваного штаму ентеробактерій бджіл *Klebsiella pneumoniae* ДДМ у концентраціях від 2,5 % до нативного стану з діаметрами відповідних зон 11,6±0,27 – 25,2±0,42 мм на першу добу експерименту (табл. 3). Найбільший діаметр антагоністичного росту пробіотичних мікроорганізмів реєстрували на третю добу експерименту методом дифузії в агарових лунках – за концентрацій 0,5 % – 75,4±1,04 мм, 1 % – 61,2±0,42 мм (рис.1 С).

Розведення препарату 50 % цукровим сиропом зумовило пригнічення росту патогенних ентеробактерій виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* (бактеріостатична дія) у концентраціях до 50 % у межах: 16,4±0,27 – 27,8±0,42 мм (МЛ); 18,2±0,42 – 25,4±0,45 мм (ДДМ) (табл. 4).

Мінімальна антагоністична дія препарату, розведеного водою (рис. 2), характеризує стійкість ентеробактерій виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* до конкурентного росту щодо складових цього засобу.

Вплив «ЕМ®ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» щодо змішаної мікробної асоціації відрізнявся наявністю *бактерицидного ефекту* та незначної *бактеріостатичної дії* (рис. 3).

Зокрема, розведення пробіотика 50 % розчином цукрового сиропу обумовило прояв *бактерицидного ефекту* за нативного застосування препарату – 7±0,35 (МЛ) та 9,2±0,42 мм – 12 мм (ДДМ). Водночас прояв найбільш активної *бактерицидної дії* реєстрували за використання «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» у концентрації 10 % розведеного водою, де діаметр зони просвітлення становив 18,6±0,57 мм відповідно (ДДМ) (рис. 4).

Прояв дії пробіотичного засобу залежить від розчинника (50 % цукровий сироп та вода), що визначає напрям та мету його застосування.

Обговорення. Для визначення ефективності терапевтичних засобів та впровадження їх у лікувально-профілактичні схеми існує необхідність у лабораторному випробуванні (*in vitro*) щодо конкретних, основних етіологічних чинників хвороби, тобто збудників [18]. Зорієнтованість виробника будь-якого лікарського засобу на певний вид тварин передбачає здійснення перевірки наявності прямої дії щодо специфічних збудників інфекційного захворювання [19]. Пробіотикотерапія на сьогодні відносно доступна, ефективна та нетоксична у застосуванні для тварин багатьох видів, зокрема бджіл.

Таблиця 1 – Особливості взаємодії «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», розведеного 50 % розчином цукрового сиропу на тест-культуру виду *Klebsiella pneumoniae* на середовищі МПА (n=5) – метод лунок (МЛ)

		Концентрації робочих розчинів «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», %								
		Нативний	50	30	20	10	5	2,5	1	0,5
Зона взаємодії, мм (M±m)	24 год	(A) 18,8±0,42	-	(BC) 25,2±0,42	(BC) 26,4±0,27	(BC) 30,2±0,42	(BC) 23,2±0,42	(BC) 21,8±0,55	(BC) 22,6±1,10	(BC) 26,8±0,42
	72 год	(A) 19,6±0,45	(A) 5,2±0,42***	(BC) 25,2±0,42	(BC) 26,6±0,27	(BC) 28,6±0,27*	(BC) 24,2±0,55	(BC) 25,4±0,27*	(BC) 28,4±0,27*	(BC) 26,6±0,27

Примітка: BC – бактеріостатична дія, мм; A – антагоністична дія, мм;
* – P<0,05, *** – P<0,001 стосовно першої доби обліку результатів.

Таблиця 2 – Особливості взаємодії «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», розведеного 50 % розчином цукрового сиропу на тест-культуру виду *Klebsiella pneumoniae* на середовищі МПА (n=5) – диско-дифузійний метод (ДДМ)

		Концентрації робочих розчинів «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», %								
		Нативний	50	30	20	10	5	2,5	1	0,5
Зона взаємодії, мм (M±m)	24 год	-	(BC) 24,6±0,45	(BC) 21,2±0,42	(BC) 23,6±0,27	(BC) 25,2±0,42	(BC) 24,6±0,27	(BC) 24,2±0,42	(BC) 25,2±0,42	(BC) 24,4±0,45
	72 год	(BC) 10,8±0,42***	(BC) 25,6±0,45	(BC) 20,6±0,27	(BC) 24,8±0,42	(BC) 24,6±0,27	(BC) 23,6±0,27	(BC) 24,2±0,42	(BC) 25,6±0,57	(BC) 24,8±0,42

Примітка: BC – бактеріостатична дія, мм;
*** – P<0,001 стосовно першої доби обліку результатів.

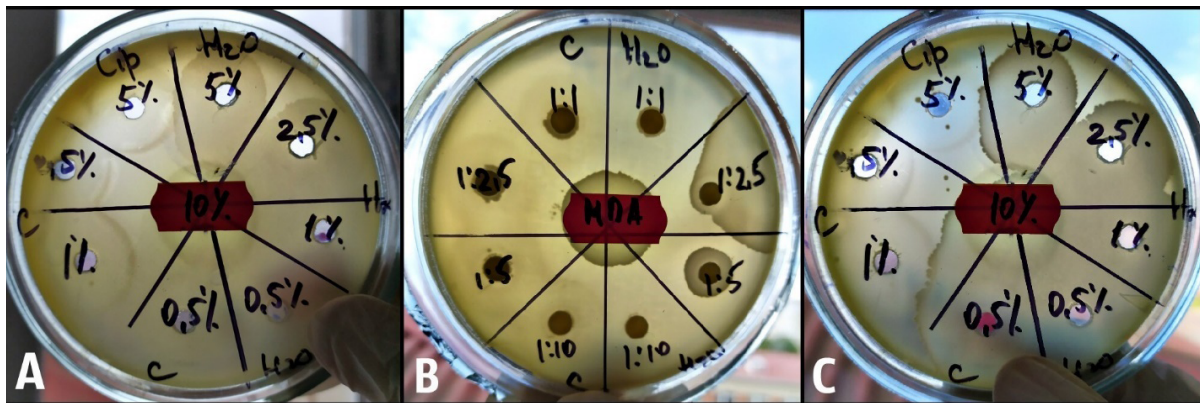


Рис. 1. Дія різних концентрацій «EM® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», розведеного 50 % цукровим сиропом (С) та водою (H₂O) на культуру *Klebsiella pneumoniae*: А – бактеріостатичний ефект на 24 год експерименту (метод лунок); В – прояв антагоністичної дії на 24 год експерименту (диско-дифузійний метод); С – прояв антагоністичної дії на 72 год експерименту (метод лунок).

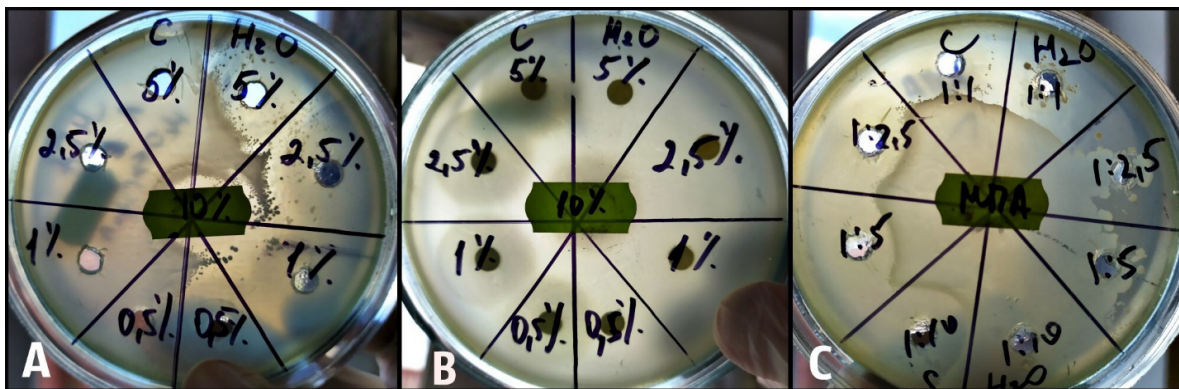


Рис. 2. Дія різних концентрацій «EM® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», розведеного 50 % цукровим сиропом (С) та водою (H₂O) на культуру *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*: А – бактеріостатичний ефект на 72 год експерименту (концентрація 0,1–5 %) (метод лунок); В – прояв антагоністичної дії на 24 год експерименту (диско-дифузійний метод); С – бактеріостатичний ефект на 72 год експерименту (концентрація 10–50 %) (метод лунок).

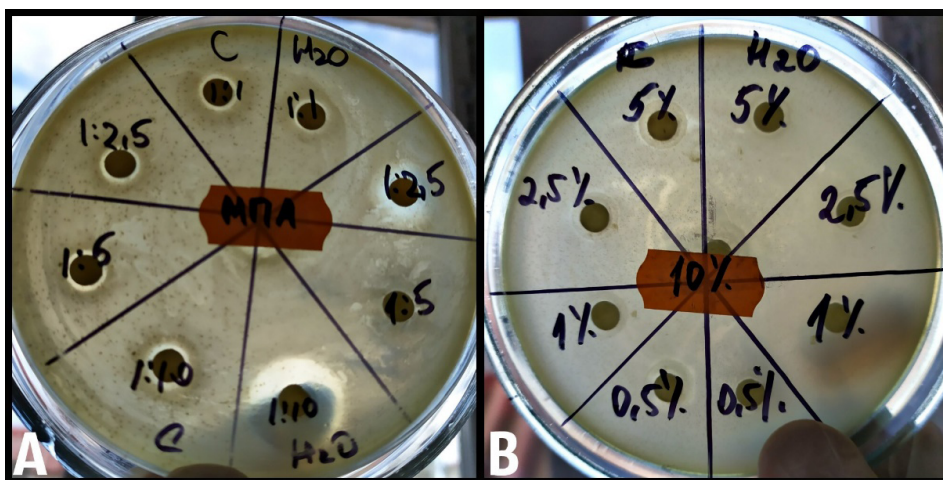


Рис. 3. Дія різних концентрацій «EM® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», розведеного 50 % цукровим сиропом (С) та водою (H₂O) на змішану мікробну асоціацію (диско-дифузійний метод): А – бактеріостатичний та бактерицидний ефекти на 72 год експерименту (концентрація 10–50 %), В – дія низьких концентрацій (0,5–5 %).

Таблиця 3 – Особливості взаємодії «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», розведеного водою на тест-культуру виду *Klebsiella pneumoniae* на середовищі МПА (n=5) – диско-дифузійний метод (ДДМ)

		Концентрації робочих розчинів «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ»,%								
		Нативний	50	30	20	10	5	2,5	1	0,5
Зона взаємодії, мм (M±m)	24 год	(A) 25,2±0,42	-	(A) 40,8±0,42	(A) 16,6±0,45	-	(A) 21,6±0,45	(A) 11,6±0,27	-	-
	72 год	(A) 25,8±0,65	(A) 9,6±0,27***	(A) 40,2±0,65	(A) 15,2±0,42	(A) 21,4±0,57***	(A) 23,2±0,42	(A) 14,2±0,42*	(A) 11,6±0,27***	(A) 7,6±0,27***

Примітка: А – антагоністична дія, мм;

* – P<0,05, *** – P<0,001 стосовно першої доби обліку результатів.

Таблиця 4 – Особливості взаємодії «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», розведеного 50 % розчином цукрового сиропу на тест-культуру виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* на середовищі МПА (n=5) – диско-дифузійний метод (ДДМ)

		Концентрації робочих розчинів «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ»,%								
		Нативний	50	30	20	10	5	2,5	1	0,5
Зона взаємодії, мм (M±m)	24 год	-	-	(БС) 18,2±0,42	(БС) 20,8±0,65	(БС) 23,8±0,42	(БС) 23,8±0,42	(БС) 24,4±0,45	(БС) 24,6±0,27	(БС) 23,6±0,45
	72 год	-	(БС) 22,2±0,42***	(БС) 19,8±0,42	(БС) 24,4±0,45*	(БС) 25,4±0,45	(БС) 24,4±0,27	(БС) 24,2±0,42	(БС) 22,6±0,57*	(БС) 22,6±0,57

Примітка: БС – бактеріостатична дія, мм;

* – P<0,05, *** – P<0,001 стосовно першої доби обліку результатів.

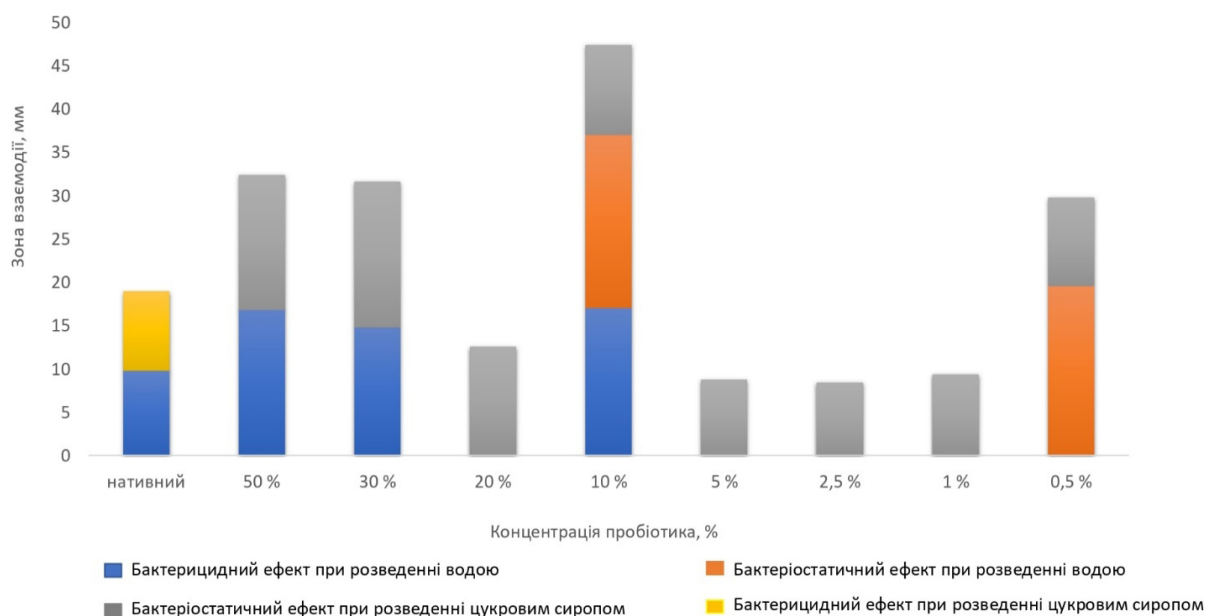


Рис. 4. Результати взаємодії «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ», розведеного 50 % цукровим сиропом та водою на змішану мікробну асоціацію, виділену за бджолиних дисбіозів.

Пробіотичні засоби являють собою сукупність живих мікроорганізмів, які проявляють корисну дію щодо травної системи за прийому їх у певному дозуванні [20]. Такі властивості пробіотиків як здатність до адгезії до епітеліальних клітин у кишечнику живих організмів, відносна стійкість до жовчі та панкреатичної рідини обумовлює широкий спектр їх застосування [21]. Механізм дії певних комбінацій цих мікроорганізмів спрямований на регуляцію кількісного складу флори кишечника, дезактивацію та порушення адгезії патогенних та умовно-патогенних бактерій до епітеліоцитів кишечника, поліпшення засвоєння вітамінів та кальцію, запобігання сенсibiliзації організму та лікування порушень роботи шлунково-кишкового тракту [20]. Застосування пре- та пробіотиків відоме у галузі бджільництва країн Центральної Європи та Канади [22, 23]. Наприклад, застосування протексिनного концентрату одностамового та багаторазові дози пробіотиків сприяло значному зменшенню спор *Nosema ceranae*, а бджоли, які приймали *Vetafarm probiotic* мали довшу тривалість життя [23]. Прояв дії пробіотиків залежить від його складу, симбіотичних властивостей прокаріотичних та еукаріотичних організмів та розчинника, що обумовлює здатність чинити антимікробний ефект у різних напрямках (антагоністичний, бактерицидний чи бактериостатичний вплив). Визначення специфічності впливу штамів пробіотичних бактерій можливе за наявності бактеріальних клітинних ліній (зокрема *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*) методом скринінгу *in vitro* [24–27].

Ймовірно, інгібування росту бактерій виду *Klebsiella pneumoniae* та мінімізація культивування у вигляді антагоністичного ефекту, відбулося саме завдяки активному симбіозу між молочнокислими, фототрофними бактеріями та дріжджами – основних складових пробіотика. Зокрема мікроорганізми виду *Klebsiella pneumoniae* здатні до синтезу мукополісахаридної гіпермукозної капсули завдяки наявності капсульних генів, які тісно пов'язані із НМV-гіпермуковіскозним фенотипом [4], що сприяє активному утворенню біоплівки на поверхні поживного середовища. Однак властивості у вигляді плівкоутворення та резистентності до різних видів лікарських засобів виявляються у бактерій різними генетичними детермінантами [18].

Бактеріостатична дія «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», розведеного 50 % сиропом щодо культур ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* обумовлена наявністю у складі пробіотика

дріжджів, ріст яких пов'язаний з наявністю відповідних амінокислот та вуглеводів (сахара, глюкоза), останні можуть бути використані еукаріотами для власного розмноження, що блокує синтез органел і генетичних структур бактеріальних клітин тест-культур та власних складових пробіотика, тому антагонізм майже не проявляється [28]. Крім того, відома проти-грибкова активність дріжджів, що пояснює їх високу стресостійкість, тому є перспективними для створення біологічно активних засобів у складі терапевтичних препаратів [28, 29]. Ентеробактерії виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* продукують карбапенемазу, що характеризує їх стійкість до ліків [4], а наявні джгутики, як домінуючі для цього виду мікроорганізму чинники вірулентності, сприяють активному руху у товщі та на поверхні агару, що забезпечує конкуруюче дифундування поживних складових субстрату швидше, ніж здатні поглинути мікроорганізми з «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» [19]. Бактерицидний вплив, тобто повну відсутність росту мікроорганізмів змішаної асоціації, виділеної з вуликів уражених збудниками дисбіозів бджіл, інтерпретуємо біорізноманіттям складових «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» і, відповідно, здатністю спричиняти деструктивні зміни бактеріальних клітин різних таксономічних груп. Ймовірно, процеси бродіння за культивування дослідних чашок Петрі (+ 37,4 °C), які зумовлені дріжджами «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ», призводять до виділення спиртів і газів. Спирти зумовлюють деструкцію та денатурацію структурних елементів бактеріальних клітин, а гази слугують окисниками, внаслідок чого відбувається лізис бактеріальних клітин змішаної мікробної асоціації.

Антагоністична дія досліджуваного пробіотика – один з векторів конкуруючого впливу корисних бактерій щодо патогенних мікроорганізмів бджіл. Такий ефект є багатофакторним і має корелятивний зв'язок з розчинником. Зокрема, вода не є поживним середовищем для дріжджів, які входять до складу «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», а часова експозиція росту останніх триваліша, ніж прокаріотичних бактеріальних клітин, тому мікробні складові пробіотика розростаються як на досліджуваних лабораторних культурах, так і на зонах пригнічення їх росту (*Klebsiella pneumoniae*), що підтверджує мультивекторний вплив «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» щодо збудників дисбіозів (ентеробактеріозів) бджіл.

Отже, згідно з результатами експерименту *in vitro*, «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» має здатність успішно проявляти антагоністичний,

бактерицидний та бактериостатичний впливи і тому може бути застосований як альтернативна терапія за інфекцій, зумовлених ентеробактеріями бджіл видів *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*.

Висновки. 1. Найбільший антагонізм «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» зареєстрований щодо мікроорганізмів виду *Klebsiella pneumoniae*, визначений методом лунок. За розведення препарату водою бактериостатична дія спостерігалась у концентраціях 0,5–1 %; за розведення 50 % цукровим сиропом у концентраціях від 0,5 до 30 %.

2. Встановлено, що «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» за розведення від 0,5 до 50 % цукровим сиропом проявляв найбільш виражений бактериостатичний ефект щодо ентеробактерій бджіл виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*.

3. Для прояву бактерицидної дії «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» щодо змішаної асоціації мікроорганізмів бджолосімей уражених ентеробактеріозами, його необхідно розводити водою у концентрації 1:10 (діаметр зони проствітлення *in vitro* становив 18,6±0,57 мм).

Відомості про дотримання біоетичних норм. Дослідження проведені згідно з Директивою 2010/63/ЄС "Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях", Європейською конвенцією про захист тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей 1986 р., та статтею № 26 Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження (правила поводження з тваринами, що використовуються в наукових експериментах, тестуванні, навчальному процесі та виробництві біопрепаратів)". Висновок комісії з біоетики факультету ветеринарної медицини Поліського національного університету № 8 від 20.05.2021 року.

Подяки. Директору ТОВ «ЕМ-Україна» (м. Кропивницький, Україна) Катерині Олександрівні Чирті-Сінельник за представлення препарату «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ».

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Fijan S., Šulc D., Steyer A. Study of the *in vitro* antagonistic activity of various single-strain and multi-strain probiotics against *Escherichia coli*. International journal of environmental research and public health. 2018. Vol. 15. No. 7. 1539 p. DOI:10.3390/ijerph15071539
2. Isolation and identification of *Klebsiella aerogenes* from bee colonies in bee dysbiosis/ O. Galatiuk et al. Thai Journal of Veterinary Medicine. 2020. Vol. 50. No. 3. P. 353–361.
3. Honey bee (*Apis mellifera*) colony health and pathogen composition in migratory beekeeping operations involved in California almond pollination/ W. Glenny et al. PloSOne. 2017. Vol. 12. No. 8. DOI:10.1371/journal.pone.0182814

4. Physiological and molecular characteristics of carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*/ R. Santo Pereira et al. The Journal of Infection in Developing Countries. 2016. Vol. 10. No. 6. P. 592–599. DOI:10.3855/jidc.6821.

5. Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and *Nosema* disease in the honeybee (*Apis mellifera*) / P.W. Maes et al. Mol. Ecol. 2016. Vol. 25. P. 5439–5450. DOI:10.1111/mec.13862.

6. Anderson K.E., Ricigliano V.A. Honey bee gut dysbiosis: A novel context of disease ecology. Curr. Opin. Insect Sci. 2017. Vol. 22. P. 125–132.

7. Fijan S., Šulc D., Steyer A. Study of the *in vitro* antagonistic activity of various single-strain and multi-strain probiotics against *Escherichia coli*. International journal of environmental research and public health. 2018. Vol. 15. No. 7. 1539 p. DOI:10.3390/ijerph15071539

8. Irkitova A.N., Grebenshchikova A.V., Matsyura A.V. Antagonistic activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from various sources. Ukrainian Journal of Ecology. Vol. 8. No. 2. P. 354–364. DOI:10.15421/2018_354

9. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides/ P.B. Beauregard et al. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013. Vol. 110. P. 16–21. DOI:10.1073/pnas.1218984110.

10. *Bacillus thuringiensis* C 25 which is rich in cell wall degrading enzymes efficiently controls lettuce drop caused by *Sclerotinia minor*/ A. Shrestha et al. European Journal of Plant Pathology. 2015. Vol. 142. No. 3. P. 577–591. DOI:10.1007/s10658-015-0636-5

11. Tran Q.H., Nguyen V.Q., Le A.T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol. 2013. Vol. 4. P. 1–13. DOI:10.1088/2043-6262/4/3/033001

12. Application of biochemical typing in veterinary medicine in bee enterobacterioses to determine *Klebsiella pneumoniae*/ O. Galatiuk et al. Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences. 2020. Vol. 22. No 99. P. 101–106. Doi:10.32718/nvlvet9916

13. EMRO, Japan. Effective Microorganisms Research Organization, 1478-Kishaba, Kitanakagusuku-Sun, Nakagami-Gun, Okinawa. 901-2311. Japan. URL: <https://emrojapan.com>

14. Effects on Some Therapeutical, Biochemical, and Immunological Parameters of Honey Bee (*Apis mellifera*) Exposed to Probiotic Treatments, in Field and Laboratory Conditions/ I. Tlak Gajger et al. Insects. 2020. Vol. 11. No. 9. 638 p. DOI:10.3390/insects11090638

15. Спосіб визначення чутливості ентеробактерій бджіл до пробіотиків та дезінфікантів методом Кірбі-Бауера/ О.Є. Галатюк, А.Р. Лахман, Т.О. Романишина, О.О. Застулка (патент №143401) Україна. 2020 (Бюл. № 14). https://sis.ukrpatent.org/media/UTILITY_MOD/2020/u202001274/published_description.pdf

16. Gummuluri S., Kavalipurapu V.T., Kaligotla, A.V. Antimicrobial efficacy of Novel Ethanol Extract of *Morinda Citrifolia* Against *Enterococcus Faecalis* by Agar Well Diffusion Method and Minimal Inhibitory Concentration-An *In vitro* Study. Brazilian Dental Science. 2019. Vol. 22. No. 3. P. 365–370. DOI:10.14295/bds.2019.v22i3.1731

17. Sahu P.K. Statistical Inference. In: Applied Statistics for Agriculture, Veterinary, Fishery, Dairy and Allied Fields. Springer, India: NewDelhi, 2016. P. 133–194. DOI:10.1007/978-81-322-2831-8_6

18. Relation ship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in acinetobacter baumannii/ L. Qi et al. Front. Microbiol. 2016. Vol. 7. 483 p. DOI:10.3389/fmicb.2016.00483

19. Dahlen G., Basic A., Bylund J. Importance of virulence factors for the persistence of oral bacteria in the inflamed gingival crevice and in the pathogenesis of periodontal disease. Journal of clinical medicine. 2019. Vol. 8. No. 9. P. 1339–1345. DOI:10.3390/jcm8091339

20. Hesari M. R., Darsanaki R. K., Salehzadeh A. Antagonistic activity of probiotic bacteria isolated from traditional dairy products against *E. coli O157: H7*. Journal of Medical Bacteriology. 2017. Vol. 6. No. 3–4. P. 23–30.

21. Stavropoulou E., Bezirtzoglou E. Probiotics in medicine: a long debate. Frontiers in Immunology. 2020. Vol. 11. No 2192. P. 1–20. DOI:10.3389/fimmu.2020.02192

22. Dietary aminoacid and vitamin complex protects honey bee from immunosuppression caused by *Nosema ceranae*/ U. Glavinic et al. PLoS ONE. 2017. Vol. 12. DOI:10.1371/journal.pone.018772

23. Borges D., Guzman-Novoa E., Goodwin P.H. Effects of prebiotics and probiotics on honey bees (*Apis mellifera*) infected with the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. Microorganisms. 2021. Vol. 9. No. 3. 481 p. DOI:10.3390/microorganisms9030481

24. *Lactobacillus reuteri* inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to human intestinal epithelium/ A.D. Walsham et al. Front Microbiol. 2016. Vol. 7. 244 p. DOI:10.3389/fmicb.2016.00244

25. Jessie Lau L.Y., Chye F.Y. Antagonistic effects of *Lactobacillus plantarum* 0612 on the adhesion of selected foodborne enteropathogens in various colonic environments. Food Control. 2018. Vol. 91. P. 237–247. DOI:10.1016/j.foodcont.2018.04.001

26. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus strains*/Y. Tuo et al. J Dairy Sci. 2013. Vol. 96. P. 4252–4257. DOI:10.3168/jds.2013-6547

27. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health/ A. Monteagudo-Mera et al. Applied microbiology and biotechnology. 2019. Vol. 103. No. 16. P. 6463–6472. DOI:10.1007/s00253-019-09978-7

28. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications/ F.M. Freimoser et al. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2019. Vol. 35. No. 10. P. 1–19. DOI:10.1007/s11274-019-2728-4

29. Callaway E. Synthetic species made to shun sex with wild organisms. Nature. 2018. Vol. 553. P. 259–260. DOI:10.1038/d41586-018-00625-1

REFERENCES

1. Fijan, S., Šulc, D., Steyer, A. (2018). Study of the in vitro antagonistic activity of various single-strain and multi-strain probiotics against *Escherichia coli*. International journal of environmental research and public health. Vol. 15, no. 7, 1539 p. DOI:10.3390/ijerph15071539

2. Galatiuk, O., Romanishina, T., Lakhman, A., Zastulka, O., & Balkanska, R. (2020). Isolation and

identification of *Klebsiella aerogenes* from bee colonies in bee dysbiosis. Thai Journal of Veterinary Medicine. Vol. 50, no. 3, pp. 353–361.

3. 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. Vol. 12, no. 8. DOI:10.1371/journal.pone.0182814

4. SantoPereira, R., Dias, V. C., Ferreira-Machado, A. B., Resende, J. A., Bastos, A. N., Bastos, L. Q., Diniz, C. G. (2016). Physiological and molecular characteristics of carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*. The Journal of Infection in Developing Countries. Vol. 10, no. 6, pp. 592–599. DOI:10.3855/jidc.6821

5. Maes, P. W., Rodrigues, P. A., Oliver, R., Mott, B. M., Anderson, K. E. (2016). Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and *Nosema* disease in the honeybee (*Apis mellifera*). Molecular Ecology. Vol. 25, pp. 5439–5450. DOI:10.1111/mec.13862

6. Anderson, K. E., Ricigliano, V. A. (2017). Honey bee gut dysbiosis: A novel context of disease ecology. Curr. Opin. Insect Sci. Vol. 22, pp. 125–132.

7. Fijan, S., Šulc, D., Steyer, A. (2018). Study of the in vitro antagonistic activity of various single-strain and multi-strain probiotics against *Escherichia coli*. International journal of environmental research and public health. Vol. 15, no. 7, 1539 p. DOI:10.3390/ijerph15071539

8. Irkitova, A. N., Grebenshchikova, A. V., Matsyura, A. V. (2018). Antagonistic activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from various sources. Ukrainian Journal of Ecology. Vol. 8, no. 2, pp. 354–364. DOI:10.15421/2018_354

9. Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 110, pp. 16–21. DOI:10.1073/pnas.1218984110

10. Shrestha, A., Sultana, R., Chae, J. C., Kim, K., Lee, K. J. (2015). *Bacillus thuringiensis* C25 which is rich in cell wall degrading enzymes efficiently controls lettuce drop caused by *Sclerotinia minor*. European Journal of Plant Pathology. Vol. 142, no. 3, pp. 577–591. DOI:10.1007/s10658-015-0636-5

11. Tran, Q. H., Nguyen, V. Q., Le, A. T. (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol. Vol. 4, pp. 1–13. DOI:10.1088/2043-6262/4/3/033001

12. Galatiuk, O. Y., Romanishina, T. A., Lakhman, A. R., Behas, V. L., Andriichuk, A. M., & Solodka, L. O. (2020). Application of biochemical typing in veterinary medicine in bee enterobacterioses to determine *Klebsiella pneumoniae*. Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences. Vol. 22, no. 99, pp. 101–106. DOI:10.32718/nvlvet9916

13. EMRO, Japan. Effective Microorganisms Research Organization, 1478-Kishaba, Kitanakagusuku-Sun, Nakagami-Gun, Okinawa 901–2311. Japan. Available at: <https://emrojapan.com>

14. TlakGajger, I., Vlainić, J., Šoštarić, P., Prešern, J., Bubnič, J., & Smodiš Škerl, M. I. (2020). Effects on Some

Therapeutical, Biochemical, and Immunological Parameters of Honey Bee (*Apis mellifera*) Exposed to Probiotic Treatments, in Field and Laboratory Conditions. *Insects*. Vol. 11, no. 9, 638 p. DOI:10.3390/insects11090638

15. Galatiuk O.Ye., Lakhman A.R., Romanishina T.O., Zastulka O.O. (2020) Sposib vyznachennya chutlyvosti enterobakteriy bdzhil do probiotyktiv ta dezinfiktantiv metodom Kirbi-Bauera [A method for determining the sensitivity of bee enterobacteria to probiotics and disinfectants by the Kirby-Bauer method]. Patent UA, no. 143401 (in Ukrainian). Available at: https://sis.ukrpatent.org/media/UTILITY_MOD/2020/u202001274/published_description.pdf

16. Gummuluri, S., Kavalipurapu, V.T., & Kaligotla, A.V. (2019). Antimicrobial efficacy of Novel Ethanolic Extract of *Morinda Citrifolia* Against *Enterococcus Faecalis* by Agar Well Diffusion Method and Minimal Inhibitory Concentration-An Invitro Study. *Brazilian Dental Science*. Vol. 22, no. 3, pp. 365–370. DOI:10.14295/bds.2019.v22i3.1731

17. Sahu, P. K. (2016). Statistical Inference. In: *Applied Statistics for Agriculture, Veterinary, Fishery, Dairy and Allied Fields*. Springer, India: NewDelhi, pp. 133–194. DOI:10.1007/978-81-322-2831-8_6

18. Qi, L., Li, H., Zhang, C., Liang, B., Li, J., Wang, L., Du Xi., Liu Xu., Qiu Sh., Song H. (2016). Relation ship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* Vol. 7, 483 p. DOI:10.3389/fmicb.2016.00483

19. Dahlen, G., Basic, A., Bylund, J. (2019). Importance of virulence factors for the persistence of oral bacteria in the inflamed gingival crevice and in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of clinical medicine*. Vol. 8, no. 9, pp. 1339–1345. DOI:10.3390/jcm8091339.

20. Hesari, M.R., Darsanaki, R.K., & Salehzadeh, A. (2017). Antagonistic activity of probiotic bacteria isolated from traditional dairy products against *E. coli*O157: H7. *Journal of Medical Bacteriology*. Vol. 6, no. 3–4, pp. 23–30.

21. Stavropoulou, E., Bezirtoglou, E. (2020). Probiotics in medicine: a long debate. *Frontiers in Immunology*. Vol. 11, no. 2192, pp. 1–20. DOI:10.3389/fimmu.2020.02192

22. Glavinic, U., Stankovic, B., Draskovic, V., Stevanovic, J., Petrovic, T., Lakic, N., Stanimirovic, Z. (2017). Dietary aminoacid and vitamin complex protects honey bee from immunosuppression caused by *Nosema ceranae*. *PloSone*, Vol. 12. DOI:10.1371/journal.pone.018772

23. Borges, D., Guzman-Novoa, E., & Goodwin, P. H. (2021). Effects of prebiotics and probiotics on honey bees (*Apis mellifera*) infected with the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Microorganisms*. Vol. 9, no. 3, 481 p. DOI:10.3390/microorganisms9030481

24. Walsham, A. D., MacKenzie, D. A., Cook, V., Wemyss-Holden, S., Hews, C. L., Juge, N., Schüller, S. (2016). *Lactobacillus reuteri* inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to human intestinal epithelium. *Front Microbiol.* Vol. 7, 244 p. DOI:10.3389/fmicb.2016.00244

25. Jessie Lau L.Y., & Chye, F. Y. (2018). Antagonistic effects of *Lactobacillus plantarum* 0612 on the adhesion of selected foodborne enteropathogens in various colonic environments. *Food Control*. Vol. 91, pp. 237–247. DOI:10.1016/j.foodcont.2018.04.001

26. Tuo, Y., Yu, H., Ai, L., Wu, Z., Guo, B., Chen, W. (2013). Aggregation and adhesion properties of 22 Lacto-

bacillus strains. *Journal of dairy science*. Vol. 96, pp. 4252–4257. DOI:10.3168/jds.2013-6547

27. Montegudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied microbiology and biotechnology*. Vol. 103, no.16, pp. 6463–6472. DOI:10.1007/s00253-019-09978-7

28. Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 35, no.10, pp. 1–19. DOI:10.1007/s11274-019-2728-4.

29. Callaway, E. (2018). Synthetic species made to shun sex with wild organisms. *Nature*. Vol. 553, pp. 259–260. DOI:10.1038/d41586-018-00625-1

Определение направления действия «ЕМ® ПРОБИОТИК для ПЧЕЛ» относительно возбудителей пчелиных дисбиозов *in vitro*

Лахман А. Р.

Во многих странах мира отмечено массовое сокращение численности пчелиных колоний как следствие полифакторного влияния экзо- и эндогенных факторов. Развитие оппортунистических инфекций у пчел возникает вследствие дисбаланса условно-патогенной микрофлоры, которая колонизирует среднюю кишку насекомых. Проблема дисбактериозов животных различных видов, в том числе и пчел, вызывает интерес ветеринарных врачей. Поэтому поиск новых средств, альтернативных к антибиотикам, является первоочередной задачей в пчеловодстве. На сегодня, как новые и безопасные лекарства, по терапии и профилактике дисбактериозов в гуманной и ветеринарной медицине, предложены пробиотические препараты. Пробиотики – средства, которые способны, в определенной дозировке, эффективно влиять на макроорганизм, и содержат в своем составе живые микроорганизмы. Применению таких лечебных добавок на организм насекомых предшествует их предварительное испытание *in vitro*. Поэтому определение направления действия (бактериостатического, бактерицидного, антагонистического) «ЕМ® ПРОБИОТИК для ПЧЕЛ», разбавленного раствором сахарного сиропа и водой в различных концентрациях, относительно бактерий пчел вида *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* и к смешанной микробной ассоциации *in vitro*, стало основной целью исследования. Эксперимент *in vitro* по указанному пробиотическому средству осуществлялся методом диффузии в агаровых лунках (метод лунок) и модифицированным методом Кирби-Бауэра для отрасли пчеловодства (диско-диффузионный метод). Бактериостатический, бактерицидный и антагонистический эффекты определяли визуально и путем измерения соответствующих зон вокруг лунок и дисков. Экспериментально установлено, что бактериостатический эффект пробиотических микроорганизмов относительно энтеробактерий пчел вида *Klebsiella pneumoniae*, сохранялся на одинаковом уровне при разведении 50 % раствором сахарного сиропа в концентрациях от 0,5 до 30 %. Разведенный водой «ЕМ® ПРОБИОТИК для ПЧЕЛ» имел выраженное антагонистическое влияние относительно бактерий вида *Klebsiella pneumoniae* методом диффузии в агаровых

лунках на третій сутки експеримента в концентраціях 0,5 % – 75,4±1,04 мм і 1 % – 61,2±0,42 мм відповідно. При розведенні пробіотику 50 % сахарним сиропом відзначали угнетення росту ентеробактерій виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* в концентраціях препарату до 50 % в межах від 18,2±0,42 до 25,4±0,45 мм (диско-дифузійний метод). Бактерицидне дієвство «EM® ПРОБІОТИКА для ПЧЕЛ», розведеного водою, к смешанной мікробної асоціації виділеної від пчелосемей з ознаками кишечних розладів, відзначено в концентрації 10 % з діаметром зони просвітлення 18,6±0,57 мм диско-дифузійним методом. Таким образом, «EM® ПРОБІОТИК для ПЧЕЛ» має антагоністичний, бактериостатичний і бактерицидний ефекти відносно ентеробактерій пчел видів *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, і смешанной мікробної асоціації. Проявлення дієвства вказаного пробіотического засобу залежить від розчинителя і його концентрації, що визначає напрямлення і мету застосування препарату.

Ключевые слова: пчеловодство, дисбіозы, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, бактерицидний і бактериостатический ефекти, антагоністическое дієвство.

Determination of the direction of action of «EM® PROBIOTIC FOR BEES» against bee dysbacteriosis pathogens *in vitro*

Lakhman A.

In many countries around the world, massive declines in bee colonies have been reported as a consequence of the multifactorial effects of exogenous and endogenous factors. The development of opportunistic infections in bees is due to an imbalance of opportunistic pathogenic microflora that colonise the midgut of insects. The problem of dysbacteriosis in various animal species, including bees, is of interest to veterinarians. Therefore, the search for new remedies alternative to antibiotics is a high priority in beekeeping. Probiotic preparations have been proposed as new and safe medicines for the treatment and prevention of dysbacteriosis in human and veterinary medicine. Probiotics are products containing live micro-organisms that are able, in a certain

dosage, to influence the macro-organism effectively. The application of such therapeutic additives to insects is preceded by their preliminary *in vitro* testing. Therefore, the main aim of the study was to determine the direction of action (bacteriostatic, bactericidal, antagonistic) of «EM® PROBIOTIC FOR BEES», diluted with sugar syrup solution and water in different concentrations, against *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* bacteria and on mixed microbial association *in vitro*. An *in vitro* experiment on the above probiotic agent was carried by diffusion in agar wells (well method) and a modified Kirby-Bauer method for the beekeeping industry (disk diffusion method). Bacteriostatic, bactericidal and antagonistic effects were determined visually and by measuring diameter of the agar around the discs and wells. The bacteriostatic effect of probiotic microorganisms against enterobacteriaceae of *Klebsiella pneumoniae* species was recorded to be maintained at the same level when diluted with 50 % sugar syrup solution in concentrations from 0.5 % to 30 %. «EM® PROBIOTIC FOR BEES» diluted with water had pronounced antagonistic effect against *Klebsiella pneumoniae* bacteria by diffusion in agar wells method at concentrations of 0.5 % - 75,4±1,04 mm and 1% - 61,2±0,42 mm on the third day of the experiment. By diluting the probiotic with 50% sugar syrup solution, inhibition of the growth of *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* bacteria was observed in concentrations of up to 50%, ranging from 18,2±0,42 mm to 25,4±0,45 mm (disk diffusion method). Bactericidal effect of «EM® PROBIOTIC FOR BEES» diluted with water against mixed microbial association isolated from bee colonies with signs of intestinal disorders was observed at a concentration of 10% with a diameter of 18,6±0,57 mm by the disk diffusion method. Thus, «EM® PROBIOTIC FOR BEES» has antagonistic, bacteriostatic and bactericidal effects against enterobacteriaceae of bees *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* species and against mixed microbial associations. The nature of the action of this probiotic depends on the solvent and its concentration, which in turn determines the direction and purpose of its application.

Key words: beekeeping, dysbiosis, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, bactericidal and bacteriostatic effects, antagonistic action.



Copyright: Лакман А.Р. © This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



ORCID iD:
Лакман А.Р.

<https://orcid.org/0000-0002-3171-9734>