

## ЗМІНИ МОРФОЛОГІЧНОГО СКЛАДУ ГЕМОЛІМФИ БДЖІЛ УКРАЇНСЬКОЇ СТЕПОВОЇ ПОРОДИ ПІД ЧАС ЗАСТОСУВАННЯ «ЕМ® ПРОБІОТИКА ДЛЯ БДЖІЛ» У САДКОВОМУ ЕКСПЕРИМЕНТІ

**Лахман Анастасія Русланівна**

здобувач третього освітньо-наукового рівня PhD  
Поліський національний університет, м. Житомир, Україна  
ORCID: 0000-0002-3171-9734  
nastyalahman@gmail.com

**Галатюк Олександр Євстафійович**

доктор ветеринарних наук, професор  
Поліський національний університет, м. Житомир, Україна  
ORCID: 0000-0002-9720-0660  
olekhalatyuk@gmail.com

**Романишина Тетяна Олександрівна**

кандидат ветеринарних наук, доцент  
Поліський національний університет, м. Житомир, Україна  
ORCID: 0000-0003-3483-2887  
tveterinar@gmail.com

**Бегас Василь Леонідович**

кандидат ветеринарних наук, доцент  
Поліський національний університет, м. Житомир, Україна  
ORCID: 0000-0002-1853-4700  
behav.vl@gmail.com

Нині масова загибель бджіл є актуальною темою у світовому масштабі. Адже ці комахи – основні запилювачі рослин на нашій планеті, завдяки чому людство отримує продукти рослинного походження, апітерапія все частіше застосовується для підтримання здоров'я людини. Україна – одна із перших держав, яка має значний внесок в експорт меду у країни Європи та інші країни світу, тому важливо підтримувати здоров'я бджолиних колоній у належному стані. Профілактика хвороб тварин, зокрема бджіл, у вигляді підвищення їхньої резистентності є першочерговою ланкою для забезпечення ветеринарного благополуччя. Використання пробіотиків як альтернативних засобів для профілактики і лікування бактеріальних хвороб бджіл є досить новим напрямком. «ЕМ®пробіотик для бджіл» - засіб, який окрім пригнічення патогенної та умовно-патогенної мікрофлори також підвищує резистентність бджолиних сімей. Тому визначення характеру впливу цього пробіотичного засобу на морфологічний склад гемолімфи бджіл української степової породи зимової генерації було основною метою експерименту. «ЕМ®пробіотик для бджіл» розводили у концентраціях 5%; 2,5%; 1,25% медовою гречаною ситою і розчином цукрового сиропу. Контрольні групи бджіл отримували нативні розчини гречаної медової сити і сиропу. Морфологічний склад гемолімфи вивчали шляхом світлової мікроскопії (×1000) у ста клітинах мазка на 7-му і 10-ту добу експерименту. Під час розведення «ЕМ® пробіотика для бджіл» гречаною медовою ситою виявлено, що кількість гемоцитів гемолімфи всіх дослідних груп варіювала із гемограмою бджіл контрольної групи. Додавання 5% пробіотика спричинило синтез сферулоцитів у гемолімфі бджіл, 2,5%-на концентрація активізувала синтез різних груп імунокомпетентних клітин, а 1,25%-на концентрація впливала на диференціацію прогемоцитів на фагоцитарні клітини, здатні до імунної відповіді. У свою чергу, найвищу концентрацію фагоцитарних клітин (72,4±0,45%) зареєстровано у бджіл, які отримували 1,25%-ний розчин «ЕМ® пробіотика для бджіл», розведеного цукровим сиропом. Таким чином, «ЕМ® пробіотик для бджіл» має стимулюючу та імуностимулюючу дію на бджіл української степової породи зимової генерації.

**Ключові слова:** бджоли української степової породи, «ЕМ® пробіотик для бджіл», гемолімфа, гемоцити, гречана медова сита, цукровий сироп.

DOI <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.3.6>

### Вступ

Важливою проблемою сучасної ветеринарної медицини, зокрема у галузі бджільництва, є масова загибель бджолиних колоній у всьому світі (Glenny et al., 2017; vanEngelsdorp et al., 2017; Zaccopini et al., 2021). До такого світового колапсу бджолосімей причетний багатofакторний вплив різних етіологічних чинників (вплив

пестицидів, електромагнітного випромінювання, застосування антибіотикотерапії для лікування хвороб бактеріальної етіології, неналежний ветеринарно-санітарний стан пасік, відсутність медодайної бази тощо) (Glenny et al., 2017; Sánchez-Bayo et al., 2016). Слід пам'ятати, що попередження захворювання економічно доцільніше, ніж лікування хвороби. Відомими засобами для профі-

лактики хвороб бджіл різної етіології є застосування пробіотиків (Mishukovskaya et al., 2019). Пробиотики – засоби, які містять певні групи та види мікроорганізмів, які за правильного використання позитивно впливають на макроорганізм пацієнта. Але потрібно зважати, що ненормоване доповнення раціону бджіл пре- та пробіотиками може порушувати природній склад мікробіоти середньої кишки (Ptaszyńska et al., 2016). Тому застосування такої терапії можливе лише за правильних пропорцій (концентрацій) препарату та за використання ефективнішого розчинника. Відомим фактором для профілактики хвороб бджіл є підтримання їхнього імунного статусу. Стимуляція імункомпетентних гемоцитів є першочерговою ланкою у формуванні імунітету комах до дії несприятливих чинників під час зимування та за дії на них умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів (Rodrigues et al., 2020; Lakhman et al., 2021). Імунітет комах великою мірою залежить від кількісно-якісного складу мікробіоти кишечника (DeGruttola et al., 2016), оскільки травна система бджоли піддається важкому антигенному навантаженню, а саме міцність перитрофічної мембрани і визначає імунний статус *Apis mellifera* (Lakhman et al., 2021). Відомо, що використання антибіотиків для лікування і профілактики бактеріальних хвороб бджіл заборонено, тому що частина шкідливих речовин із препарату дифундує в мед. Останній, у свою чергу, стає непридатним для споживання (можлива сенсibiliзація людського організму, кумуляція в органах і тканинах тощо). Тому підтримання імунного статусу бджіл шляхом використання альтернативних підтримуючих лікувально-профілактичних засобів задля отримання органічної продукції бджільництва є актуальною світовою проблемою.

#### Аналіз останніх досліджень і публікацій

Думка про використання пробіотиків у схемі лікування і як профілактика хвороб бджіл різниться. Наприклад, Aneta A. Ptaszyńska та іншими авторами (2016) досліджено вплив комерційного пробіотику *Lactobacillus rhamnosus* і пребіотику інуліну на тривалість життя бджіл, здорових та інфікованих *Nosema ceranae*. Цікавим фактом було виявлення негативного впливу дії пробіотику та пребіотику із пробіотиком на тривалість життя бджіл і сприйнятливості до *Nosema ceranae* (Ptaszyńska et al., 2016). На противагу цим авторам дослідження Tushak, S. (2018) свідчать про позитивні кількісні зміни у гемограмі бджіл за використання пробіотику «Ентеронормін» (активізація клітинного імунітету бджіл) (Tushak, 2018). Пробиотики АпиВрач, СпасиПчел та ПчелоНормоСил сприяють подовженню тривалості життя бджіл (Mishukovskaya et al., 2019) Новий підхід становить використання бактерій виду *Bacillus subtilis* як пробіотиків; цей вид спорових бактерій активно застосовується у складі деяких пробіотичних засобів (Paytuví-Gallart et al., 2020; Irkitova et al., 2018). Ефективним виявилися деякі штами *Bacillus* проти збудника *Paenibacillus larvae* у *Apis mellifera* (Daisley et al., 2020). Групою науковців Хорватії і Словенії встановлено позитивний вплив харчової добавки EM® for bees у вигляді зменшення спор *ноземозу* у вуликах після застосування препарату (Gajger, et al., 2020). Клітинний

імунітет комах вивчала низка науковців різних країн світу (Barribeau et al., 2015; Burritt et al., 2016; Kysterna et al., 2017; Tlak Gajger et al., 2020; Tushak, 2018; Morfin et al., 2020). E. Gabor et al., (2020) виявили еталонні маркери для визначення класів гемоцитів медоносної бджоли (*Apis mellifera*) (Gábor et al., 2020). Отже, тема застосування пробіотиків як альтернативних до антимікробних препаратів набула широкого поширення, тому актуальним є пошук нових засобів, які мають імуностимулюючий вплив на гемограму бджоли.

**Мета роботи** – з'ясування характеру впливу «EM® пробіотика для бджіл» на морфологічний склад гемолімфи бджіл української степової породи зимової генерації у садковому експерименті.

#### Матеріали і методи дослідження

Зміни морфологічного складу гемолімфи під час застосування «EM® пробіотика для бджіл» вивчали щодо бджіл української степової породи зимової генерації в умовах науково-дослідних лабораторій кафедри мікробіології, фармакології та епізоотології і внутрішніх хвороб тварин та кафедри фізіології Поліського національного університету (м. Житомир). Експеримент тривав у такій послідовності:

1) *вдбір* бджіл української степової породи зимової генерації здійснювали методом аналогів (480 особин) із бджолиного господарства ФОП Затулка М.В. (с. Вереси, Житомирський район Житомирської області);

2) *поселення* відібраних комах здійснювали у 8 дерев'яних ентомологічних садках розміром 20×15×6 см. Утримували їх у вентилязованому термостаті (+24-+25°C; вологість повітря – 50-70%). Робочі розчини готували на основі підкормок у вигляді гречаної медової сити (1 частина меду : 1 частина джерельної води) і цукрового сиропу (2 частини цукру : 1 частина джерельної води). Бджоли садків № 1-3 отримували розведену водою гречану медову сити (перша серія дослідів), куди відповідно додано 5%; 2,5% і 1,25% пробіотику. Комахи садків № 5-7 отримували розведений джерельною водою цукровий сироп (друга серія дослідів), куди в аналогічних концентраціях додано «EM® пробіотика для бджіл». Садки №4 та №8 (контрольні) отримували нативні розчини медової сити і цукрового сиропу. Робочі розчини готували щоденно та вносили по 3-5 см<sup>3</sup> на одну годівлю для кожного садочка тричі на добу. Для порівняння показників гемолімфи бджіл у природних умовах досліджено гемолімфу комах, відібраних із пасіки у кількості 20 осіб у день початку дослідів;

3) *вдбір гемолімфи* здійснювали на 7 та 10 добу експерименту. Із грудного відділу біологічний матеріал відбирали шляхом декапітації, де гемолімфа виділялась у вигляді прозорої «горошини» (Kysterna et al., 2014). Із черевця гемолімфу відбирали шляхом препарування скальпелем черевця комах (прокол венозного синуса), не травмуючи жовте тіло і кишечник (Łoś et al., 2018);

4) *після приготування і висихання* протягом 120 годин (+18°C) мазків здійснювали їх фіксацію 96%-ним етиловим спиртом. Фарбування здійснювали методом нашарування концентрованим азур-еозинном (без буфера). Після змивання барвника і висушу-

вання мазки піддавали мікроскопічному дослідженню ( $\times 1000$ ), використовуючи мікроскоп «Біолам» і цифрову камеру-насадку моделі «A59.4910 Input USB 5V 500 mA; 5.0m; OPTO-EDU A59.4910». Використовували рекомендовану комп'ютерну програму Micro Capture Ver 6.21. Підрахунок проводили на 100 клітинах в одному мазку, водночас оцінюючи морфологічний склад гемолімфи бджіл (Barakat et al., 2016; Şarcaliu et al., 2009).

Використовували пробіотичний засіб «EM<sup>®</sup> пробіотика для бджіл», який містить пробіотичну формулу молочнокислих бактерій декількох видів дріжджів і фотосинтезуючих мікроорганізмів (EMRO, Japan), наданий корпорацією EMRO (Японія) разом із ТОВ «EM-Україна» (Україна, м. Кропивницький).

Експеримент проводили згідно зі статтею 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження (правила поводження із тваринами, що використовуються у наукових експериментах, тестуванні, навчальному процесі та виробництві біопрепаратів)» (Закон України від 08.08.2021) та європейською конвенцією про захист тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей 1986 р. (zakon.rada.gov.ua/laws/show/994\_137#Text). Отримано висновок комісії із біоетики факультету ветеринарної медицини Поліського національного університету № 10 від 26.10.2020 р.

Статистичне оброблення результатів експерименту здійснено за допомогою пакета прикладних програм STATISTICA 8.0 компанії StatSoft із пакету послуг Microsoft Office-2019.

#### Результати дослідження та їх обговорення

Нині відомо, що активність декількох популяцій гемоцитів, яка визначається за морфологічними ознаками і характеристиками, формує клітинний імунітет медононої бджоли (*Apis mellifera*) (Gábor et al., 2020). Для інтерпретації здатності певного фармакологічного засобу чинити будь-яку дію на організм бджоли важливою є фіксація зміни морфологічного складу гемолімфи комах. Дія

«EM<sup>®</sup> пробіотика для бджіл» у садковому експерименті із бджолами української степової породи зимової генерації оцінювалася шляхом мікроскопії мазків гемолімфи під час застосування пробіотика у різних концентраціях, розведеного медовою гречаною ситою і цукровим сиропом. Диференціація гемоцитів базувалася на їхніх морфологічних властивостях (Barakat et al., 2016; Jazlovitskaya et al., 2016; Richardson et al., 2018).

У разі розведення «EM<sup>®</sup> пробіотика для бджіл» гречаною медовою ситою кількість гемоцитів усіх дослідних груп варіювала порівняно із показниками бджіл контрольної групи першої серії експерименту. У гемограмі комах цього садка виявляли низькодиференційовані пролейкоцити (прогемоцити), веретеноподібні фагоцити (рис. 1А) і секреторні клітини (табл. 1).

Ймовірно, наявність гранулоцитів свідчить про відповідь організму бджоли на мікробні складники гречаної медової сити (Shi et al., 2020; Danihlík et al., 2015). Антигенне навантаження на макроорганізм може чинити гречана медова сита, оскільки бактерії із меду за сприятливих для них умов, набуваючи вірулентності, порушують мікробний склад середньої кишки бджіл (Hussain, 2018; Saranraj et al., 2016) і проникають у гемолімфу, що і спричинює імунну відповідь на 7 добу експерименту. Цей феномен підтверджує найбільша кількість пролейкоцитів ( $51,2 \pm 0,42$ ) у гемолімфі бджіл четвертого садка порівняно із їхньою кількістю у бджіл усіх дослідних груп (табл. 1).

За 5%-ної концентрації «EM<sup>®</sup> пробіотика для бджіл» (садок № 1) зросла кількість секреторних клітин ( $89,40 \pm 0,67\%$ ) порівняно із бджолами четвертої групи, що свідчить про краще засвоєння поживних речовин макроорганізмом (рис. 1Б). Зокрема, комахи накопичують поживні речовини на 7-му добу експерименту, активно споживаючи робочу підкормку, до складу якої входить найбільша кількість ефективних мікроорганізмів<sup>®</sup> пробіотика. На 10-ту добу у гемограмі бджіл цієї групи домінують еозинофільні фагоцити (рис. 1В, рис. 2). Відомим

Таблиця 1

Динаміка кількості гемоцитів медоносних бджіл за використання препарату «EM<sup>®</sup> пробіотика для бджіл», розведеного гречаною медовою ситою

Дослідні групи	Кількість гемоцитів							
	Пролейкоцити (прогемоцити)		Фагоцити		Секреторні клітини		Інші клітини (платоцити)	
	7-ма доба	10-та доба	7-ма доба	10-та доба	7-ма доба	10-та доба	7-ма доба	10-та доба
<b>1-та група</b> 5%-ний розчин «EM <sup>®</sup> пробіотика для бджіл» на медовій ситі	2,80± 0,55	8,80± 0,42**	7,80± 0,65	50,80± 0,65***	89,40± 0,67	35± 0,50***	-	5,40± 0,45***
<b>2-га група</b> 2,5%-ний розчин «EM <sup>®</sup> пробіотика для бджіл» на медовій ситі	10,8± 0,42	60,2± 0,96***	51,2± 0,82	17,4± 0,27***	33,6± 0,57	17,6± 0,91***	4,4± 0,27	4,8± 0,42
<b>3-а група</b> 1,25%-ний розчин «EM <sup>®</sup> пробіотика для бджіл» на медовій ситі	4,8± 0,42	11,4± 0,45*	76,8± 0,65	79,4± 0,76*	18,4± 0,97	9,2± 0,65***	-	-
<b>4-та</b> (контрольна) група на медовій ситі	51,2± 0,42	-	40,6± 0,57	-	8,2± 0,89	-	-	-

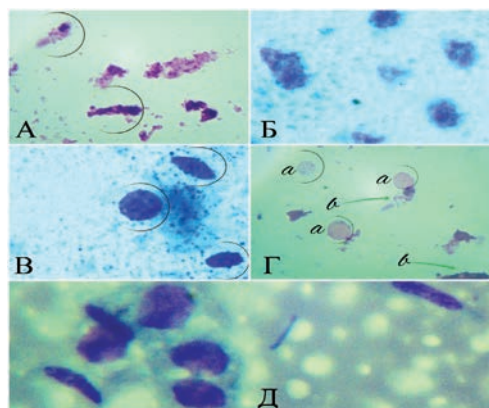
Примітка: \* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$ , \*\*\* –  $P < 0,001$  стосовно сьомої доби обліку результатів.

маркером алергії у ветеринарній медицині є еозинофіли (Fleischer et al., 2021), а зазвичай суттєвими розчинними алергенами є білки різної природи і походження. Гречаний мед багатий на білки (Ahmad et al., 2017), тому його білкові антигени спричинюють сенсibilізацію бджолиного організму у лабораторних умовах. Корпускулярні антигени у вигляді мікроорганізмів меду і пробіотика та їхніх метаболітів, що визначаються як антигени розчинної природи, у своїй сукупності чинять токсичний вплив на організм бджоли (Ogrodowczyk et al., 2020).

Під час згодовування бджолам 2,5%-ного розчину «EM® пробіотика для бджіл» на сьому добу реєстрували синтез різних груп імунокомпетентних клітин (рис. 1Г, рис. 2). Збільшення клітин попередників фагоцитів ми пояснюємо реакцією макроорганізму на проникнення чужорідних агентів у кишечник бджоли у невеликій кількості. Діяльність імунної системи спрямована на створення гемоцитів імунного ряду різного віку, роль яких полягає переважно у фагоцитозі, інкапсуляції та меланізації антигенів (Larsen et al., 2019).

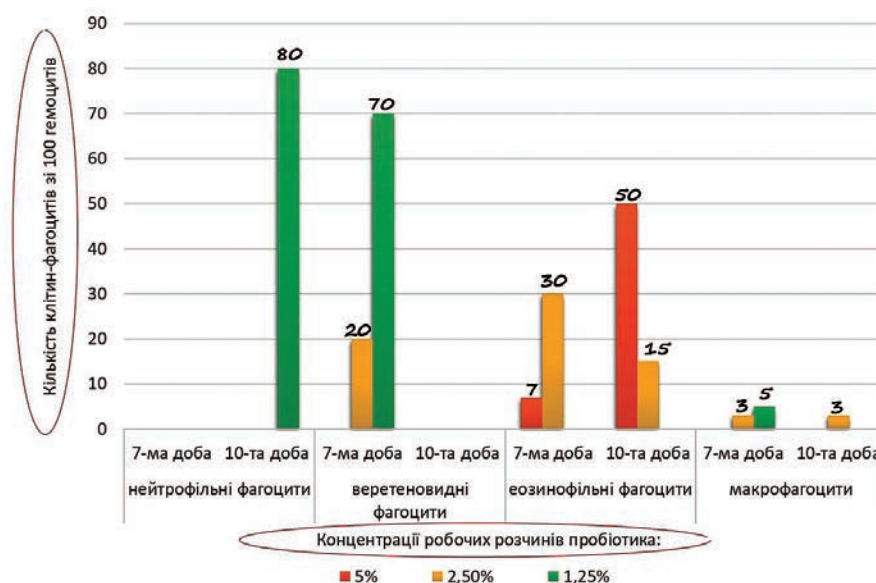
Найвищі показники фагоцитарної здатності ми відмічали під час дослідження морфологічного складу гемолімфи комах третього садка (рис. 2) із концентрацією «EM® пробіотика для бджіл» 1,25%, що свідчить про активне розмноження корисних бактерій в організмі бджіл, які, у свою чергу, стимулюють посилення захисної функції для підтримання гомеостазу організму (рис. 1Д).

На 10-ту добу досліду кількість фагоцитів бджіл третього садка залишалася стабільно високою (79,4±0,76%), але змінилося співвідношення пролейкоцитів і секреторних клітин (табл. 1) порівняно із сьомою добою. Ймовірно відбулася декомпенсація в організмі комах у вигляді диференціації гемоцитів на користь попередників імунокомпетентних клітин. Відмічено синтез гранулоцитів у вигляді нейтрофільних (молодих) і веретеновидних



**Рис. 1.** Морфологічний склад гемолімфи бджіл у разі застосування «EM® пробіотика для бджіл», розведеного гречаною медовою ситою (×1000): А – веретеновидні фагоцити бджіл контрольної групи на 7-мій добі експерименту; Б – секреторні клітини бджіл першої (5 %) дослідної групи на 7-мій добі експерименту; В – еозинофільні фагоцити бджіл першої (5 %) дослідної групи на 10-тій добі експерименту; Г – імунокомпетентні гемоцити другої (2,5 %) дослідної групи бджіл на 7-мій добі експерименту: а – еозинофільний фагоцит, б – веретеновидний фагоцит; Д – фагоцитарні гемоцити бджіл третьої дослідної групи (1,25 %) на 7-мій добі експерименту

(зрілих) фагоцитів. Окрім того, змінилося співвідношення різних видів фагоцитів (рис. 2). Саме така концентрація «EM® пробіотика для бджіл» слугує пусковим механізмом до синтезу гемоцитів різних груп (окрім еозинофільних фагоцитів), причому гемограма залишається стабільною протягом усього періоду експерименту.



**Рис. 2.** Диференціація фагоцитарних клітин гемолімфи бджіл під час згодовування різних концентрацій «EM® пробіотика для бджіл», розведеного гречаною медовою ситою

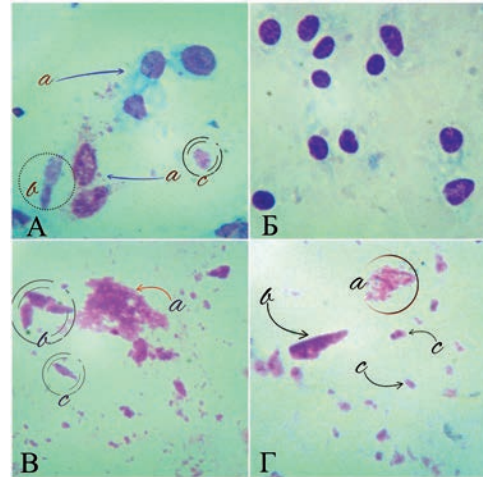
Відомо, що підгодівля комах цукровим сиропом – явище, поширене у періоди, коли бджолам не вистачає власного корму для існування. Крім того, цукровий сироп є відомим розчинником засобів, що використовуються із профілактичною і лікувальною метою (Ptaszyńska et al., 2016; Saranchuk et al., 2021; Frizzera et al., 2020). Друга серія досліджень була спрямована на виявлення змін морфологічної картини гемолімфи бджіл за застосування різних концентрацій «EM® пробіотика для бджіл», розведеного цукровим сиропом. Аналіз результатів, представлених у табл. 2, показав, що організм комах восьмої контрольної групи (отримували розчин цукрового сиропу) сприймає розчин сиропу як звичну підкормку, про що свідчить відсутність прогемоцитів (пролейкоцитів) і фагоцитарної активності у полі зору мікроскопу як на 7-му, так і на 10-ту добу експерименту.

Фізіологічний стан бджіл п'ятого садка відрізнявся гарним апетитом і більшою дозою споживання корму, що корелює із високим умістом секреторних клітин (рис. 3А (а)) як на 7-му, так і на 10-ту добу дослідження.

Ймовірно, така концентрація секреторних клітин у вигляді еноцитів і сферулоцитів спричинена накопиченням енергетичних складників після ферментування сахарози інвертазою бджолиного організму щодо глюкози і фруктози (Orčić et al., 2017; Manoochehr et al., 2020). Окрім того, цукор є поживним середовищем для складників Ефективних Мікроорганізмів® «EM® пробіотика для бджіл», тому бактерії із препарату також засвоюють необхідні енергетичні матеріали, але меншою мірою, ніж макроорганізм бджоли. Таким чином, антигенне навантаження на організм бджіл у вигляді мікробів засобу є нижчим, тому у гемолімфі комах цієї групи відмічено імунну відповідь у вигляді різновиду фагоцитарних клітин (рис. 3А (b, c), рис. 4).

У складі гемолімфи бджіл шостого садка відмічено найвищу кількість пролейкоцитів ( $39,2 \pm 0,42\%$ ) на 7-му добу дослідження, концентрація яких знизилася до  $5,8 \pm 0,82\%$  на 10-ту добу. Вірогідно, складники «EM® пробіотика для бджіл» є антигенами для бджолиного організму, тому на 7-мій добі експерименту спостерігалось збільшення інтенсивності синтезу прогемоцитів або пролей-

коцитів, які є попередниками імунокомпетентних клітин (Jazlovitskaya et al., 2016; Larsen et al., 2019; Vargas-Arévalo et al., 2019). Зростання секреторних гемоцитів (рис. 3Б) до  $78,8 \pm 0,42$  на 10 добу експерименту (табл. 2) ми пояснюємо нетоксичною концентрацією препарату (2,5%), який також є кормовою добавкою (EM-Ukraine, Effective microorganisms), що активує синтез сферулоцитів, які накопичують поживні речовини для їх подальшого енергетичного використання.



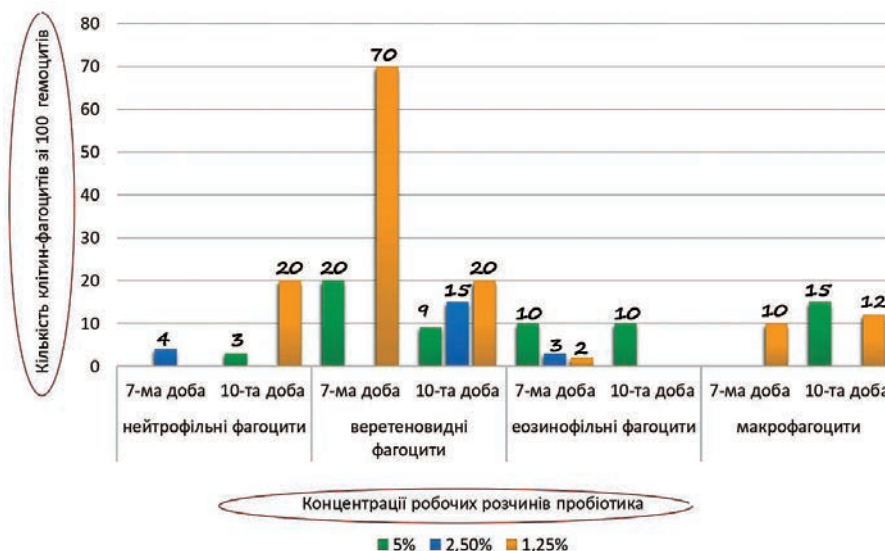
**Рис. 3. Морфологічний склад гемолімфи бджіл під час застосування «EM® пробіотика для бджіл», розведеного цукровим сиропом (×1000): А – гемоцити бджіл п'ятої дослідної групи (5%) на 10-тій добі експерименту: а – сферулоцит, b – веретеновидний фагоцит, c – нейтрофільний фагоцит; Б – секреторні гемоцити бджіл шостої дослідної групи (2,5 %) на 10-тій добі експерименту; В – фагоцитарні клітини бджіл сьомої дослідної групи (1,25%) на 7-ій добі експерименту: а – макрофагоцит, b, c – веретеновидні фагоцити; Г – фагоцитарні клітини бджіл сьомої дослідної групи (1,25%) на 10-мій добі експерименту: а – макрофагоцит, b – веретеновидний фагоцит, c – нейтрофільні фагоцити**

Таблиця 2

**Динаміка кількості гемоцитів медоносних бджіл за використання препарату «EM® пробіотика для бджіл», розведеного 50%-ним цукровим сиропом**

Дослідні групи	Кількість гемоцитів							
	Пролойкоцити (прогемоцити)		Фагоцити		Секреторні клітини		Інші Клітини (платоцити)	
	7-ма доба	10-та доба	7-ма доба	10-та доба	7-ма доба	10-та доба	7-ма доба	10-та доба
<b>5-та група</b> 5 %-ний розчин «EM® пробіотика для бджіл» на цукровому сиропі	10,4± 0,27	3,4± 0,27**	28,2± 0,55	37,4± 0,45**	61,4± 0,45	59,2± 0,65	-	-
<b>6-та група</b> 2,5%-ний розчин «EM® пробіотика для бджіл» на цукровому сиропі	39,2± 0,42	5,8± 0,82***	9,8± 0,96	15,4± 0,76**	46,6± 0,97	78,8± 0,42**	4,4± 0,45	-
<b>7-ма група</b> 1,25%-ний розчин «EM® пробіотика для бджіл» на цукровому сиропі	4,8± 0,65	5,6± 0,27	72,4± 0,45	49,8± 0,74**	14,6± 0,27	38,8± 0,42***	8,2± 0,42	5,8± 0,42*
<b>8-ма група</b> (контрольна) цукровий сироп	-	-	-	-	19,2± 0,42	11,6± 0,57**	80,8± 0,42	88,4± 0,57*

Примітка: \* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$ , \*\*\* –  $P < 0,001$  стосовно сьомої доби обліку результатів.



**Рис. 4. Диференціація фагоцитарних клітин гемолімфи бджіл під час згодовування різних концентрацій «EM® пробіотика для бджіл», розведеного цукровим сиропом**

Найвищу концентрацію фагоцитарних клітин реєстрували у бджіл сьомої групи на 7-му добу експерименту (рис. 3В) на рівні  $72,4 \pm 0,45\%$  із помірним зниженням на  $31,22\%$  на 10-ту добу (рис. 3Г), що є фізіологічним явищем функціонування організму (рис. 4). Імунна система комах не реагує агресивно на складники «EM® пробіотика для бджіл», які є антигенами для імунітету бджіл. Таке систематичне надходження низьких концентрацій пробіотика спричинює так званий ефект вакцинації (Babazadeh et al., 2016; Entrican et al., 2020), або явище імунізуючої субінфекції (Nasution et al., 2021; Larsen et al., 2019).

Важливо зазначити, що у гемолімфі бджіл, відібраних із пасіки як контрольної групи у природних умовах, ми спостерігали лише поодинокі клітини прогемоцитів та 80% секреторних клітин, що свідчить про підготовку бджіл до зимівлі.

Досліджений характер впливу «EM® пробіотика для бджіл» на морфологічний склад гемолімфи бджіл української степової породи зимової генерації у садковому експерименті свідчить про стимулюючий та імуностимулюючий ефекти цього засобу. Підтримка імунітету бджіл – важлива ланка для профілактики низки інфекційних захворювань. Зокрема, клітинні механізми імунного захисту *Apis mellifera* відповідають за низку захисних бар'єрів, що сприяють знищенню чужорідних агентів і забезпечують здатність фагоцитарних клітин відповідати реакціями лізису або фагоцитозом на проникнення інфекційних збудників бактеріальних хвороб або зумовлюють їхнє поглинання для нейтралізації (Larsen et al., 2019). Але потрібно відмітити, що активність фагоцитарних нейтрофілів гемолімфи у лабораторних умовах є дещо нижчою, ніж в умовах природного існування (Pashajan et al., 2011). Причому у бджолосімей, які мешкають у вуликах, існує явище так званого соціального імунітету, за якого бджоли певної колонії здатні перо-

ально переносити імунологічні сполуки між членами вулика (Harwood et al., 2021). Такий вид імунного обміну, ймовірно, активізується в разі підвищення резистентності кожної із комах колонії (синтезу певних антитіл).

Отримані нами результати свідчать, що для зимової генерації бджіл доцільно використовувати низькі концентрації (1,25%-2,5%) «EM® пробіотика для бджіл» із цукровим сиропом чи підкормкою для бджіл у вигляді канді у ролі стимулятора для підтримання і підвищення резистентності бджолосімей у період зимівлі.

#### Висновки

«EM® пробіотика для бджіл», розведений гречаною медовою ситою і цукровим сиропом, чинить різний характер впливу в усіх досліджених концентраціях щодо бджіл української степової породи зимової генерації у садковому експерименті у лабораторних умовах.

Використання пробіотика у концентрації 1,25 %, розведеного як цукровим сиропом, так і гречаною ситою, має імуностимулюючу дію на організм бджіл, оскільки активізуються імунокомпетентні клітини, зокрема веретеновидні нейтрофільні гемоцити.

Застосування 2,5%-ного «EM® пробіотика для бджіл», розведеного цукровим сиропом, сприяє синтезу сферулоцитів, що свідчить про стимулюючу дію препарату. Пробиотик у період зимівлі слід розводити тільки цукровим сиропом.

#### Перспективи подальших досліджень у цьому напрямку

Зазначена проблема потребує подальшого дослідження із використанням полімеразної ланцюгової реакції для виявлення генетичної схильності рецепторних ділянок на поверхні фагоцитів гемолімфи бджіл до адсорбуючої здатності. У період зимівлі бджололиних колоній існує необхідність досліджувати вплив різних концентрацій (1,25%; 0,62%; 0,31%; 0,15%; 0,075%) «EM® пробіотика для бджіл» в умовах пасіки.

### Конфлікт інтересів.

Конфлікт інтересів відсутній.

### Подяки

За представлення препарату «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» ми дякуємо ТОВ «ЕМ-Україна» (м. Кропивницький, Україна) та її директору К. О. Чирті-Синельник.

### Бібліографічні посилання:

1. 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: 10.1371/journal.pone.0182814.
2. VanEngelsdorp, D., Traylor, K. S., Andree, M., Lichtenberg, E. M., Chen, Y., Saegerman, C., & Cox-Foster, D. L. (2017). Colony Collapse Disorder (CCD) and bee age impact honey bee pathophysiology. *PLoS One*, 12(7). doi:10.1371/journal.pone.0179535.
3. Zacepins, A., Kvišis, A., Komasilovs, V., & Brodschneider, R. (2021). When It Pays to Catch a Swarm—Evaluation of the Economic Importance of Remote Honey Bee (*Apis mellifera*) Colony Swarming Detection. *Agriculture*, 11(10), 967. doi: 10.3390/agriculture11100967.
4. Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., & Desneux, N. (2016). Are bee diseases linked to pesticides? A brief review. *Environment international*, 89, 7-11. doi:10.1016/j.envint.2016.01.009.
5. Mishukovskaya, G. S., Giniyatullin, M. G., Kuznetsova, T. N., Smol'nikova, Ye. A., Naurazbayeva, A. I., & Giniyatullin, S. S. (2019). Rezul'taty sadkovykh opytov po ispol'zovaniyu probiotikov v podkormke pchel [Results of cage experiments on the use of probiotics in feeding bees]. *Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, (1), 62-70. doi: 10.31563/1684-7628-2019-49-1-62-70 [in Russian].
6. Ptaszyńska, A. A., Borsuk, G., Zdybicka-Barabas, A., Cytryńska, M., & Matek, W. (2016). Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee nosemosis C? *Parasitology research*, 115(1), 397-406. doi: 10.1007/s00436-015-4761-z.
7. Rodrigues, M. X., Yang, Y., de Souza Meira Jr, E. B., do Carmo Silva, J., & Bicalho, R. C. (2020). Development and evaluation of a new recombinant protein vaccine (YidR) against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Vaccine*, 38(29), 4640-4648. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.03.057.
8. Lakhman, A., Galatiuk, O., Romanishina, T., Behas, V., & Zastulka, O. (2021). Bees klebsiellosis: key aspects of pathogenesis. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 9(8), 1190-1193. doi: 10.17582/journal.aavs/2021/9.8.1190.1193.
9. DeGruttola, A. K., Low, D., Mizoguchi, A., & Mizoguchi, E. (2016). Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflammatory bowel diseases*, 22(5), 1137-1150. doi: 10.1097/mib.0000000000000750.
10. Tushak, S. (2018). Quantitative changes in hemogram of bees using probiotic «Enteronormin». *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 20(83), 61-65. doi: 10.15421/nvlvet8312.
11. Paytuví-Gallart, A., Sanseverino, W., & Winger, A. M. (2020). Daily intake of probiotic strain *Bacillus subtilis* DE111 supports a healthy microbiome in children attending day-care. *Beneficial Microbes*, 11(7), 611-620. doi: 10.3920/BM2020.0022.
12. Irkitova, A.N., Grebenshchikova, A.V., Matsyura, A.V. (2018). Antagonistic activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from various sources. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(2), 354-364. doi: 10.15421/2018\_354.
13. Daisley, B., Pitek, A., Chmiel, J., Al, K., Chernyshova, A., Faragalla, K., Burton, J., Thompson, G., Reid, G. (2020). Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. *The ISME journal*, 14(2), 476-491. doi: 10.338/s41396-019-0541-6.
14. Tlak Gajger, I., Vlanić, 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*, 11(9), 638. doi:10.3390/insects11090638.
15. Gábor, E., Cinege, G., Csordás, G., Rusvai, M., Honti, V., Kolics, B., Török, T., Williams, M., Kurucz, É. & Andó, I. (2020). Identification of reference markers for characterizing honey bee (*Apis mellifera*) hemocyte classes. *Developmental & Comparative Immunology*, 109, 103701. doi: 10.1016/j.dci.2020.103701.
16. Barribeau, S. M., Sadd, B. M., du Plessis, L., Brown, M. J., Buechel, S. D., Cappelle, K., ... & Schmid-Hempel, P. (2015). A depauperate immune repertoire precedes evolution of sociality in bees. *Genome biology*, 16(1), 1-21. doi:10.1186/s13059-015-0628-y.
17. Burritt, N.J. Foss, E.C. Neeno-Eckwall, J.O. Church, A.M. Hilger, J.A. Hildebrand, D.M. Warshauer, N.T. Perna, J.B. (2016). Burritt Sepsis and hemocyte loss in honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Serratia marcescens* strain sicaria. *PLoS One*, 1. doi: 10.1371/journal.pone.0167752.
18. Kysterna, O. S., Musiyenko, O. V., Harkava, V. V., Musiyenko, V. M. (2017). Tsytolohichni zminy v hemolimfi bdzholy medonosnoyi za vykorystannya imunnykh preparativ [Cytological changes in the hemolymph of the honey bee with the use of immune drugs]. *Visnyk Sums'koho natsional'noho ahrarnoho universytetu. Seriya: Vetrynarna medytsyna*, 1 (40), 42-49 [in Ukrainian].
19. Morfin, N., Goodwin, P. H., & Guzman-Novoa, E. (2020). Interaction of *Varroa destructor* and sublethal clothianidin doses during the larval stage on subsequent adult honey bee (*Apis mellifera* L.) health, cellular immunity, deformed wing virus levels and differential gene expression. *Microorganisms*, 8(6), 858. doi: 10.3390/microorganisms8060858.
20. Kysterna, O. S., Harkava, V. V., & Musiyenko, O. V. (2014). Osoblyvosti pidhotovky mazkiv hemolimfy bdzholy-imaho [Features of preparation of smears of hemolymph of an imago bee]. *Bioloziya tvaryn*, 16 (4), 188 [in Ukrainian].
21. Łoś, A., & Strachecka, A. (2018). Fast and cost-effective biochemical spectrophotometric analysis of solution of insect "blood" and body surface elution. *Sensors*, 18(5), 1494. doi: 10.3390/s18051494.

22. Barakat, E.M., AboKersh, M.O., Gomaa, S.A. (2016). Haemocyte Activity and Cellular Defense Reactions in Various Larval Instars of Honey Bee (*Apis mellifera* L.) following. *Natural and Experimental Bacterial Infections. Greener Journal of Biological Sciences*, 6 (2): 020-033. <http://doi.org/10.15580/GJBS.2016.2.012016017>.
23. Şapcaliu, A., Rădoi, I., Pavel, C., Tudor, N., Căuia, E., Siceanu, A., & Meiu, F. (2009). Research regarding haemocyte profile from *Apis mellifera* carpatica bee haemolymph originated in the south of Romania. *Lucrari Stiintifice-Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara*, 42(2), 393-397.
24. EMRO, Japan. Effective Microorganisms Research Organization, 1478-Kishaba, Kitanakagusuku-Sun, Nakagami-Gun, Okinawa 901–2311. Japan. URL:<https://emrojapan.com>
25. Закон Украйны: Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokoho povodzhennya [Law of Ukraine: On protection of animals from cruel treatment] (redaktsiya vid 08.08.2021). Retrieved from <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text> [in Ukrainian].
26. Yevropeyska konventsia pro zakhyst khrebetnykh tvaryn, shcho vykorystovuyutsya dlya doslidnykh ta inshykh naukovykh tsiley [European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Research and Other Scientific Purposes], (redaktsiya vid 18.03.1986). Retrieved from [https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994\\_137#Text](https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137#Text) [in Ukrainian].
27. Yazlovitskaya, L. S., Cherevatov, V. F., Savchuk, G. G., & Khlus, V. K. (2014). Tipologicheskiye osobennosti kletok gemolimfy pchel *Apis Mellifera* L., rayonirovannykh v Chernovitskoy oblasti [Typological features of hemolymph cells of APIS MELLIFERA L. bees, zoned in the Chernivtsi region]. *Ekologicheskyy monitoring i bioraznoobrazie*, (1), 134-138 [in Russian].
28. Richardson, R. T., Ballinger, M. N., Qian, F., Christman, J. W., & Johnson, R. M. (2018). Morphological and functional characterization of honey bee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities. *Apidologie*, 49(3), 397-410. doi: 10.1007/s13592-018-0566-2.
29. Shi, J., Yang, H., Yu, L., Liao, C., Liu, Y., Jin, M., Wu, X. B. (2020). Sublethal acetamiprid doses negatively affect the lifespans and foraging behaviors of honey bee (*Apis mellifera* L.) workers. *Science of the Total Environment*, 738. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139924.
30. Danihlík, J., Aronstein, K., & Petřivalský, M. (2015). Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity: Physiology, biochemistry, and chemical ecology. *Journal of Apicultural Research*, 54(2), 123-136. doi: 10.1080/00218839.2015.1109919
31. Hussain, M. B. (2018). Role of honey in topical and systemic bacterial infections. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 24(1), 15-24 doi: 10.1089/acm.2017.0017.
32. Saranraj, P., Sivasakthi, S., & Feliciano, G. D. (2016). Pharmacology of Honey: A Review. *Advances in Biological Research*, 10(4), 271-289. doi: 10.5829/idosi.abr.2016.10.4.104104
33. Fleischer, D. M., Chan, E. S., Venter, C., Spergel, J. M., Abrams, E. M., Stukus, D., ... & Greenhawt, M. (2021). A consensus approach to the primary prevention of food allergy through nutrition: guidance from the American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology; American College of Allergy, Asthma, and Immunology; and the Canadian Society for Allergy and Clinical Immunology. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 9(1), 22-43. doi: 10.1016/j.jaip.2020.11.002.
34. Ahmad, R. S., Hussain, M. B., Saeed, F., Waheed, M., & Tufail, T. (2017). Phytochemistry, metabolism and ethnomedical scenerio of honey: A concurrent review. *International Journal of Food Properties*, 1–16. doi: 10.1080/10942912.2017.1295257.
35. Ogradowczyk, A. M., Zakrzewska, M., Romaszko, E., & Wróblewska, B. (2020). Gestational dysfunction-driven diets and probiotic supplementation correlate with the profile of allergen-specific antibodies in the serum of allergy sufferers. *Nutrients*, 12(8), 2381. <https://doi.org/10.3390/nu12082381>.
36. Larsen, A., Reynaldi, F. J., & Guzmán-Novoa, E. (2019). Fundaments of the honey bee (*Apis mellifera*) immune system. Review. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 10(3), 705-728. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i3.4785>
37. Saranchuk, I. I., Vishchur, V. Y., Gutyj, B. V., & Klim, O. Y. (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
38. Frizzera, D., Del Fabbro, S., Ortis, G., Zanni, V., Bortolomeazzi, R., Nazzi, F., & Annoscia, D. (2020). Possible side effects of sugar supplementary nutrition on honey bee health. *Apidologie*, 51(4), 594-608. doi: 10.1007/s13592-020-00745-6.
39. Orčić, S., Nikolić, T., Purać, J., Šikoparija, B., Blagojević, D. P., Vukašinić, E., ... & Kojić, D. (2017). Seasonal variation in the activity of selected antioxidant enzymes and malondialdehyde level in worker honey bees. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 165(2-3), 120-128. doi: 10.1111/eea.12633.
40. Manoochehri, H., Hosseini, N. F., Saidijam, M., Taheri, M., Rezaee, H., & Nouri, F. (2020). A review on invertase: Its potentials and applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101599. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101599.
41. Barroso-Arévalo, S., Vicente-Rubiano, M., Puerta, F., Molero, F., & Sánchez-Vizcaino, J. M. (2019). Immune related genes as markers for monitoring health status of honey bee colonies. *BMC veterinary research*, 15(1), 1-15. doi: 10.1186/s12917-019-1823-y.
42. EM-Ukraine (Effective microorganisms). Retrieved from <http://embio.in.ua/bees.html> [in Ukrainian].
43. Babazadeh, T., Nikbakhat, H. A., Daemi, A., Yegane-Kasgari, M., Ghaffari-Fam, S., & Banaye-Jeddi, M. (2016). Epidemiology of acute animal bite and the direct cost of rabies vaccination. *Journal of Acute disease*, 5(6), 488-492. doi: 10.1016/j.joad.2016.08.019.
44. Entrican, G., Lunney, J. K., Wattedegera, S. R., Mwangi, W., Hope, J. C., & Hammond, J. A. (2020). The Veterinary Immunological Toolbox: Past, Present, and Future. *Frontiers in Immunology*, 11, 1651. doi: 10.3389/fimmu.2020.01651.
45. Nasution, H., Sitompul, P., & Sinaga, L. P. (2021, March). Effect of the Vaccine on the Dynamics of Spread of Tuberculosis SIR Models. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1819, No. 1, p. 012062). IOP Publishing. doi:10.1088/1742-6596/1819/1/012062.



46. Pashayan, S.A. Kalashnikova, M.V., Sidorova, K.A. Aktivnost' neytrofil'nykh fagotsitov gemolimfy pchel [Activity of neutrophilic phagocytes of bees' hemolymph]. Mezhdunarodnaya konferentsiya. Stavropol', 2011-12-12. Retrieved from [www.stgau.ru/science/conference/internet-conference/.v20.pdf/](http://www.stgau.ru/science/conference/internet-conference/.v20.pdf/) [in Russian].

47. Harwood, G., Salmela, H., Freitak, D., & Amdam, G. (2021). Social immunity in honey bees: royal jelly as a vehicle in transferring bacterial pathogen fragments between nestmates. *Journal of Experimental Biology*, 224(7). doi: 10.1242/jeb.231076.

**Lakhman A. R.**, Postgraduate student, Polissia National University, Zhitomir, Ukraine

**Galatiuk O. Ye.**, Doctor of Veterinary Sciences, Polissia National University, Zhitomir, Ukraine

**Romanishina T. A.**, PhD of Veterinary Sciences, Polissia National University, Zhitomir, Ukraine

**Behas V. L.**, PhD of Veterinary Sciences, Polissia National University, Zhitomir, Ukraine

**Changes in the morphological composition of the haemolymph of Ukrainian steppe bees with the use of «EM® PROBIOTIC FOR BEES» in an entomological cage experiment**

Today, the mass death of bees is a current topic on a global scale. After all, these insects are the main pollinators of plants on our planet, thanks to them mankind receives products of plant origin, and apitherapy is increasingly used to maintain human health. Ukraine is one of the first countries which has significant contribution in the export of honey to Europe and other countries of the world. Therefore, it is important to maintain the health of bee colonies in good condition. The prevention of animal diseases, including those of bees, by improving their resistance is of paramount importance for veterinary welfare. The use of probiotics as an alternative means for the prevention and treatment of bacterial diseases of bees is a rather new trend. «EM® PROBIOTIC FOR BEES» is a preparation that, in addition to suppressing pathogenic and opportunistic microflora, also increases the resistance of bee families. Therefore, determining the effects of this probiotic on the morphological composition of the haemolymph of Ukrainian steppe bees of the winter generation was the main aim of the experiment. «EM® PROBIOTIC FOR BEES» was diluted in concentrations of 5%; 2,5%; 1,25% with buckwheat honey syrup solution and sugar syrup solution. Control groups of bees received native solutions of honey buckwheat syrup and sugar syrup. The morphological composition of bee haemolymph was studied by light microscopy (x1000) in 100 cells on days 7 and 10 of the experiment. By diluting «EM® PROBIOTIC FOR BEES» with buckwheat honey solution, it was found that the number of haemocytes in the haemolymph of all studied groups differed from the haemogram of the control group bees. A 5% concentration of probiotic stimulated the synthesis of spherulocytes in the haemolymph of bees, a 2,5% concentration activated the synthesis of different groups of immunocompetent cells, and a 1,25% concentration influenced the differentiation of prohemocytes into phagocytic cells capable of an immune reaction. In turn, the highest concentration of phagocytic cells ( $72,4 \pm 0,45\%$ ) was observed in bees which received 1,25% solution of «EM® PROBIOTIC FOR BEES» diluted of sugar syrup solution. Thus, «EM® PROBIOTIC FOR BEES» has a stimulating and immune-stimulating effect on Ukrainian steppe bees of winter generation.

**Key words:** Ukrainian steppe bees, «EM® PROBIOTIC FOR BEES», haemolymph, haemocytes, buckwheat honey syrup, sugar syrup.