

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
ПОЛІСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЛАХМАН АНАСТАСІЯ РУСЛАНІВНА

УДК 619:638.15:616.9

ДИСЕРТАЦІЯ

**УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДІВ ПРОФІЛАКТИКИ
ЕНТЕРОБАКТЕРІОЗІВ БДЖІЛ**

Спеціальність 211 «Ветеринарна медицина»
Галузь знань 21 «Ветеринарна медицина»

*Подається на здобуття наукового ступеня
доктора філософії*

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

_____ Анастасія ЛАХМАН

Науковий керівник: Галатюк Олександр Євстафійович доктор ветеринарних
наук, професор

Дисертація є ідентична іншим примірникам

Житомир – 2023

АНОТАЦІЯ

Лахман А. Р. Удосконалення методів профілактики ентеробактеріозів бджіл. – *Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.* Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина», галузь знань 21 «Ветеринарна медицина», Поліський національний університет, Міністерства освіти і науки України, Житомир, 2023 р.

Дисертація присвячена дослідженню інфекційних хвороб бджіл, зокрема ентеробактеріозів (дисбіозів), у Північно-Західному регіоні України. Удосконалено методи виділення та ідентифікації збудників ентеробактеріозів бджіл – мікроорганізмів видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*. Проведено пошук ефективних засобів щодо нейтралізації вищевказаних збудників. Вивчена та сформована патогенетичної картина розвитку клебсієльозу у бджіл. Вивчений вплив пробіотиків та дезінфектантів *in vitro* та визначено дію «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» на морфологічні, деякі біохімічні показники гемолімфи і тривалість життя робочих бджіл української степової породи *in vivo*. Удосконалені оптимальні схеми для проведення лікувально-профілактичних заходів за дисбіозів бджіл.

Для характеристики епізоотичного стану щодо заразних захворювань бджіл була проведена систематизація та аналіз офіційних даних управлінь Держпродспоживслужб Житомирської, Рівненської та Волинської областей за 2019 – 2022 роки. У Волинській області встановлена тенденція щодо зменшення діагностичних досліджень хвороб бджіл у 2021 та 2022 роках, порівняно із 2019 роком. Щорічне збільшення кількості діагностичних досліджень зареєстровано у Житомирській та Рівненській областях. Максимальні показники інфікованості щодо вароозу – 30,24% (2021 рік) –

встановлено у Волинській області; ноземозу – 7,45% (2019 рік) у Рівненській області; американського гнильця – 0,81% (2019 рік) у Житомирській області. Важко описати поширеність заразних хвороб комах, спираючись лише на планові дослідження. Перспективним є удосконалення системи моніторингу інвазійних, вірусних та бактеріальних хвороб бджіл.

У дисертаційній роботі представлені сучасні методи ізоляції, ідентифікації та індикації чистих культур патогенних бактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*. Лабораторна діагностика дисбіозів бджіл включає: 1. Висів патологічного матеріалу, відібраного від хворих бджіл, на елективні поживні середовища для ентеробактерій та виділення чистої культури; 2. Мікроскопія типових колоній; 3. Визначення родової належності; 4. Визначення рухової активності бактерій; 5. Тест на уреазу; 6. Тест на індол; 7. Фенілаланіновий тест; 8. Дослідження основних ферментативних властивостей бактерій (біохімічне типування). За культуральними, морфологічними, тинкторіальними властивостями та результатами біохімічного типування мікроорганізми культури № 1 належать до Родини *Enterobacteriaceae*, Роду *Klebsiella* та Виду *Klebsiella pneumoniae*. Мікроорганізми культури № 2 належать до родини *Enterobacteriaceae*, роду *Klebsiella* та виду – *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, що встановлено за аналогічною схемою. Запропонований нами алгоритм дозволяє чітко та економічно діагностувати дисбактеріози у бджіл. За аналогічною схемою нами були виділені та ідентифіковані бацили виду *Bacillus subtilis* із 5 видів медів (липового, гречаного, квіткового, лісового, акацієвого).

Випробовування препаратів *in vitro* щодо тест-культур ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* були першим етапом пошуку ефективних засобів щодо лікування та профілактики дисбіозів бджіл. Дослідження проводили диско-дифузійним методом та

методом лунок. Оцінювали антагоністичну активність *Bacillus subtilis*, виділеної з медів різних видів (липового, гречаного, квіткового, лісового, акацієвого), щодо тест-культури бджіл виду *Klebsiella pneumoniae*. Найбільш дієві ізоляти виділені з акацієвого ($47,2 \pm 0,48$ мм) та лісового медів ($36,6 \pm 0,24$ мм). Тому, *Bacillus subtilis* може представляти собою альтернативний компонент при терапії та профілактиці ентеробактеріозів (дисбіозів) бджолиних колоній.

Надалі визначали ефективність дезінфекційних засобів щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* диско-дифузійним методом. Вивчали вплив дезінфектанту «Йодіс дез №2» на досліджувані культури ентеробактерій бджіл. Даний дезінфекційний засіб мав бактеріостатичну дію на мікроорганізми видів *Klebsiella pneumoniae* (від нативного до 1:100) та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* (від нативного до 1:10). Через 14 діб зберігання дезінфектанту його антимікробна активність стрімко падала з діаметром зони пригнічення росту 10 та 8 мм (у розведеннях від нативного до 1:5) щодо бактерій виду *Klebsiella pneumoniae*. Також нами досліджена активність розчину міді і цитрату срібла щодо тест-культур та змішаної мікробної асоціації. Найбільш активний вплив даного засобу реєструвався при нативному застосуванні на усі вищевказані культури, причому зона просвітлення у змішаній культурі була достовірно більшою (на 28,8%), ніж у чистій культурі виду *Klebsiella pneumoniae* ($14,14 \pm 0,35$ мм). Так, перспективним є удосконалення складу дезінфектантів («Йодіс дез №2» та «Розчин міді і цитрату срібла») з метою посилення бактерицидного впливу на патогенні ентеробактерії бджіл.

Пробіотики – засоби, які у своєму складі містять мікроорганізми, що у певному кількісному та якісному співвідношенні сприятливо впливають на організм. Активність «Ентеронормін з Йодіс + Se» щодо бактерій виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* та *Klebsiella pneumoniae* розведеного

медовими ситами (медовими сиропами) з акацієвого та лісового медів вивчали диско-дифузійним методом. Зареєстрований найбільший бактеріостатичний ефект щодо ентеробактерій виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* при розведенні препарату ситою з акацієвого меду ($27,9 \pm 0,48$ мм). На культури виду *Klebsiella pneumoniae* найактивніше діяв препарат, розведений ситою із лісового різнотрав'я з діаметром зони пригнічення росту $28,50 \pm 0,57$ мм. Дані результати свідчать про можливість розведення «Ентеронормін з Йодіс + Se» ситами із даних видів медів з профілактичною метою у складі комплексної терапії за ентеробактеріозів бджіл. Дослідження дії «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» *in vitro* щодо бактерій бджіл виду *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* та змішаної мікробної асоціації здійснювали методом дифузії в агарових лунках та диско-дифузійним методом. ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» застосовували у нативному стані і в таких концентраціях – 0,5%; 1%; 2,5%; 5%; 10%; 20%; 30%; 50%. Розводили 50% розчином цукрового сиропу та водою. Бактеріостатичний ефект щодо ентеробактерій виду *Klebsiella pneumoniae* зберігався на однаковому рівні при розведенні 50% розчином цукрового сиропу у концентраціях від 0,5% до 30%. Розведення «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» водою мало виражений антагоністичний вплив щодо бактерій виду *Klebsiella pneumoniae* методом лунок на третю добу експерименту при концентраціях 0,5% – $75,4 \pm 1,04$ мм, 1% – $61,2 \pm 0,42$ мм. При розведенні пробіотика 50% цукровим сиропом відмічали бактеріостатичну дію щодо ентеробактерій виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* у концентраціях до 50% у межах від $18,2 \pm 0,42$ мм до $25,4 \pm 0,45$ мм (диско-дифузійний метод). Бактерицидна дія відмічена при 10% концентрації препарату розведеного водою з діаметром зони просвітлення $18,6 \pm 0,57$ мм щодо змішаної мікробної асоціації диско-дифузійним методом. «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» має

антагоністичний, бактеріостатичний та бактерицидний ефекти щодо досліджуваних ентеробактерій бджіл і змішаної мікробної асоціації *in vitro*.

Наступним етапом стало вивчення дії даного пробіотику на організм робочих бджіл зимової генерації української степової породи в садковому експерименті (*in vivo*). Вплив «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» на збереженість життя визначали шляхом щоденного аналізу і підрахунку кількості загиблих комах в ентомологічних садках. Препарат розводили медовою гречаною ситою та розчином цукрового сиропу у концентраціях 5%; 2,5%; 1,25%; контрольні групи бджіл отримувати нативні розчини цукрового сиропу та гречаної медової сити. Зареєстрована сприятлива дія препарату розведеного цукровим сиропом у концентраціях 1,25%–5%, що призводить до збільшенні тривалості їх життя до 18 та 16 діб, відповідно. При розведенні препарату медовою гречаною ситою найдовша тривалість життя комах зареєстрована при концентрації 1,25% (14 діб), порівняно із контрольною групою бджіл. Про перевагу цукрового сиропу як розчинника для «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» у порівнянні з гречаною медовою ситою в лабораторних умовах свідчить показник коефіцієнта середньої тривалості життя бджіл. Надалі вивчали вплив даного пробіотику на морфологічні показники та деякі біохімічні параметри гемолімфи бджіл. Гемолімфу для морфологічних досліджень відбирали з грудної та черевної ділянок. Морфологічний склад гемолімфи вивчали на 7 та 10 добу експерименту. При розведенні «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» гречаною медовою ситою виявлено, що кількість гемоцитів гемолімфи всіх дослідних груп варіювала з гемограмою бджіл контрольної групи. Задавання 5% пробіотику, розведеного медовою гречаною ситою, стимулювало синтез сферулоцитів, 2,5%–на концентрація активізувала синтез імунокомпетентних клітин, а 1,25%–на впливала на диференціацію прогемоцитів до фагоцитарних клітин здатних до імунної відповіді. Найвищу концентрацію фагоцитарних клітин ($72,4 \pm 0,45\%$)

zareєстровано у бджіл, які отримували 1,25%–ний розчин «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» розведеного цукровим сиропом. Так, «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» має стимулюючу та імуностимулюючу дії щодо робочих бджіл зимової генерації української степової породи. Деякі біохімічні параметри гемолімфи бджіл (загальний білок, альбуміни, глюкозу, α -амілазу, лужну фосфатазу, аспартатамінотрансферазу, гамма-глутамілтранспептидазу та креатинін) визначали на «граничну» добу відносно терміну їх загибелі. Деякі біохімічні показники бджіл дослідних груп (лабораторні умови) порівнювали з гемолімфою *Apis mellifera* контрольної (природні умови) групи з цієї ж пасіки. Нами визначені концентрації пробіотика, розведеного розчином цукрового сиропу, які зумовлюють підвищення вмісту глобулінів у гемолімфі дослідних комах, що має важливе імунологічне значення. Зареєстровано зниження вмісту креатиніну в гемолімфі експериментальних комах, які отримували «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведений розчином цукрового сиропу (5% – 780 мкмоль/л; 2,5% – 700,8 мкмоль/л; 1,25% – 623,4 мкмоль/л). Такі показники свідчать про задовільну роботу екскреторної системи дослідних бджіл. Таким чином, «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» диференційовано впливає на біохімічні показники гемолімфи бджіл у досліджуваних концентраціях при розведенні різними розчинниками.

Заключним етапом дисертаційного дослідження стало удосконалення оптимальної лікувально-профілактичної схеми за ентеробактеріозів (дисбіозів) бджіл. З терапевтичною метою бджолам необхідно задавати: 0,15% розчин «Біоконтакту-плюс» (300–350 см³ препарату на 1 бджосім'ю) – 5 обробок через 3–4 доби та 2,5–5% розчин «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» (в дозі 300–400 см³ препарату на 1 сім'ю) – 3–4 обробки через 3–4 доби, де обидва засоби розведені 50% розчином цукрового сиропу. З профілактичною метою рекомендовано застосовувати «Ентеронормін з Йодіс + Se» – 20 см³

розведеного 200 см³ 50% розчином цукрового сиропу (*per os*) – 3–5 разів з інтервалом 5 діб. «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» – 12–15 см³ препарату на 1 літр води (в дозі 10 см³ робочого розчину на 1 вуличку бджолої сім'ї) – 2 обробки, з інтервалом 7–14 діб та дотримання загальних профілактичних заходів на пасіках.

Ключові слова: бджільництво, *Apis mellifera*, епізоотичний моніторинг, інфекційні хвороби, робочі бджоли, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes*, дисбіози бджіл, цитрат міді та срібла, «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», «Ентеронормін з Йодіс + Се», збереженість життя, гемолимфа, морфологічні показники

ABSTRACT

A. R. Lakhman Improvement of bees enterobacteriosis prevention methods. – *Qualifying scientific work as a manuscript*. Dissertation for PhD in the field of knowledge 21 «Veterinary Medicine», speciality 211 «Veterinary Medicine». Polissia National University, Ministry for Education and Science of Ukraine. Zhytomyr, 2023.

The dissertation is about the research of infectious diseases of bees, in particular enterobacteriosis (dysbiosis), in the North-West region of Ukraine. Methods of isolation and identification of pathogens of enterobacteriaceae species *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* have been improved. Effective means were searched for to neutralise the above pathogens. The products found can be used for the prevention or treatment of this pathological of bees. We have studied and formed a pathogenetic profile for the development of Klebsiellosis in bees. The effect of probiotics and disinfectants *in vitro* was studied. The effect of the most effective preparation «ЕМ[®] PROBIOTIC FOR BEES» on the morphological, some biochemical parameters of hemolymph and viability of worker honeybees the Ukrainian steppe breed *in vivo* was determined.

The optimum schemes for treatment and prevention of dysbiosis (enterobacteriosis) in bees have been improved.

In addition, a systematisation and analysis of official data from the Zhytomyr, Rivne and Volyn regions Departments of the State Production and Consumer Service for 2019 – 2022 was carried out to characterise the epizootic state of contagious diseases of bees. In the Volyn region, a downward trend in diagnostic tests for bee diseases in 2021 and 2022, compared to 2019, has been established. We have recorded an annual increase in the number of diagnostic tests in Zhytomyr and Rivne regions. The highest rates of infection were recorded in Volyn region for varroosis (30,24% – 2021); in Rivne region for nosemosis (7,45% – 2019); in Zhytomyr region for American foulbrood (AFB) (0,81% – 2019). It is difficult to describe the prevalence of contagious insect (bees) diseases on the basis of only routine tests. It is therefore promising to improve the monitoring system for invasive, viral and bacterial diseases of bees.

This dissertation presents modern methods of isolation, identification and indication of pure cultures of pathogenic bacteria of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*. The laboratory diagnosis of the dysbiosis of bees are as follows: 1. Planting of pathological material from diseased bees on elective nutrient media for enterobacteria and isolation of pure culture; 2. Microscopy of typical colonies; 3. Definition of genus; 4. Definition of bacterial motility; 5. Urease test; 6. Indole test; 7. Phenylalanine test; 8. Investigation of basic enzymatic properties of bacteria (biochemical typing). According to cultural, morphological, tinctorial characteristics and results of biochemical typing, the microorganisms of culture No. 1 belong to the family *Enterobacteriaceae*, the genus *Klebsiella* and the species *Klebsiella pneumoniae*. The microorganisms of culture No. 2 belong to the family *Enterobacteriaceae*, the genus *Klebsiella* and the species *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, which is established in a similar way. Our proposed algorithm allows us to enables a clear and economical

diagnosis of dysbacteriosis in bees. We isolated and identified bacteria species *Bacillus subtilis* species from 5 types of honey (linden, buckwheat, flower, forest, acacia) in the same way.

The first step in the search for effective treatments and prevention of bee dysbiosis was to test preparations on test cultures of enterobacteriaceae species *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes in vitro*. Research at this step was carried out using the disk diffusion method and the diffusion in agar wells (well method). We evaluated the antagonistic activity of *Bacillus subtilis* isolated from different honeys (linden, buckwheat, flower, forest, acacia) against a test culture of enterobacteriaceae species *Klebsiella pneumoniae*. The most effective isolates antagonists against *Klebsiella pneumoniae* were isolated from acacia honey ($47,2 \pm 0,48$ mm) and forest honey ($36,6 \pm 0,24$). Therefore, *Bacillus subtilis* can be an alternative component in the treatment and prevention of dysbiosis in bees.

We tested the efficacy of disinfectants against bee enterobacteriaceae species *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* by the disc diffusion method. The effect of the iodine-containing disinfectant «Jodis Des No. 2» against the tested cultures of enterobacteriaceae bees was determined. This disinfectant had a bacteriostatic effect against microorganisms of the *Klebsiella pneumoniae* (from native to 1:100) and *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* (from native to 1:10). After 14 days to storage the antimicrobial activity of the disinfectant decreased rapidly, the bacteriostatic effect and the diameter of the growth inhibition zone against a test culture of *Klebsiella pneumoniae* were 10 and 8 mm (from native to 1:5). We also investigated the activity of a sample of copper solution and silver citrate against test cultures and mixed microbial association. The most active effect sample of this solution was recorded in native application, and the bacterial growth inhibition zone in the mixed culture was significantly larger (28,8%) than in the pure culture of *Klebsiella pneumoniae* species

(14,4±0,35 mm). Therefore, the disinfectants «Jodis Des No. 2» and «Sample of copper citrate and silver citrate solution» need to be improved. The aim of the improvement is to enhance the bactericidal effect on pathogenic enterobacteriaceae bees.

Probiotics are treatments that contain live microorganisms. These microorganisms can positively influence the body in central quantitative and qualitative proportions. The activity of the probiotic «ENTERONORMIN PLUS JODIS + SE» diluted with honey syrups from acacia honey and forest herb honey against bacteria from *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* species was studied using the disc diffusion method. The highest bacteriostatic effect of probiotic diluted with acacia honey syrup (27,9±0,48 mm) against enterobacteriaceae species *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* was registered. «ENTERONORMIN PLUS JODIS + SE» diluted with honey syrup from forest herbs was active against bacterial cultures of *Klebsiella pneumoniae* species with a growth inhibition zone diameter of 28,05±0,57 mm. These results indicate the possibility of diluting «ENTERONORMIN PLUS JODIS + SE» with honey syrups from these types of honey for prevention purposes as part of complex therapy for enterobacteriosis of bees. Action «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES» against bacteria of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* and a mixed microbial association was carried by diffusion in agar wells (well method) and disk diffusion method *in vitro*. «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES» was applied in the native and in the concentrations 0,5%, 1%, 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 50%. The dilution was carried out with 50% sugar syrup solution and water. The bacteriostatic effect against enterobacteriaceae species *Klebsiella pneumoniae* was retained at the similar level when diluted with 50% sugar syrup solution in concentrations from 0,5% to 30%. «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES» diluted with water demonstrated an antagonistic effect against *Klebsiella pneumoniae* test cultures in the agar well diffusion method on the third day of the experiment at a

concentration of 0,5% – 75,4±1,04 mm and 1% – 61,2±0,42 mm. In dilution of probiotic with 50% sugar syrup was observed bacteriostatic action against bacteria species of *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* in the concentration of the preparation up to 50% in the range from 18,2±0,42 mm to 25,4±0,45 mm (disk diffusion method). Antibactericidal effect of «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES» diluted with water against mixed microbial association was observed at 10% concentration with bactericidal diameter of 18,6±0,57 mm by disc diffusion method. «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES» has antagonistic, bacteriostatic and bactericidal effects against *Enterobacteriaceae* of bee's species *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* and against mixed microbial associations *in vitro*.

The next stage of the PhD research was to investigate the effect of this probiotic of Ukrainian steppe worker bees of the winter generation in an wooden entomological cage experiment (*in vivo*). The effect of the «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES» on bee viability was determined by daily analysis and counting the number of dead insects in a wooden entomological cage. The probiotic was diluted with buckwheat honey syrup solution and sugar syrup solution at concentrations of 5%; 2,5%; 1,25%; control groups of bees received native solution of the sugar syrup and buckwheat honey syrup. A beneficial effect of the probiotic diluted in sugar syrup at concentrations of 1,25% to 5% has been registered on the bee organism, which increased their lifespan to 18 and 16 days. When the product was diluted with buckwheat honey syrup, the longest viability of the insects was recorded at a concentration of 1,25% compared (14 days) to the control group of bees. The coefficient of average life expectancy of bees indicates the predominance of sugar syrup as a solvent for «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES» compared to buckwheat honey syrup under laboratory conditions. We also investigated the effect of the «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES» on the morphological and some biochemical parameters of the hemolymph. Hemolymph

for morphological analysis was collected from the thoracic and abdominal regions of bee. The morphological composition of bee hemolymph was studied 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 hemocytes in the hemolymph of all studied groups bees differed from the hemogram of control groups bees. Feeding 5% of the probiotic diluted with honey buckwheat syrup solution stimulated the synthesis of spherulocytes, 2,5% concentration activated the synthesis of different groups of immunocompetent cells. Feeding with 1,25% promoted the differentiation of prohemocytes into phagocytic cells capable of immune response. 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. «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES» has a stimulating and immune-stimulating effect on Ukrainian steppe bees of the winter generation. Some biochemical parameters of the bee's hemolymph were determined at the «limit» day in relation to the time of their death. Some biochemical parameters of the bee's hemolymph (total protein, albumin, glucose, α -amylase, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, gamma-glutamul transpeptidase and creatinine) from experimental group (laboratory conditions) were compared with the hemolymph *Apis mellifera* of the control (natural conditions) group from the same apiary. We determined concentration of probiotic diluted with sugar syrup solution, which caused an increase in the content of globulins in the hemolymph of experimental insects, which has important immunological importance. There was a decrease in creatinine in the hemolymph of experimental insects, which had been fed «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES», diluted with sugar syrup solution (5% – 780 $\mu\text{mol/l}$; 2,5% – 700,8 $\mu\text{mol/l}$; 1,25% – 62,4 $\mu\text{mol/l}$). Such indicators demonstrate the satisfactory functioning of the excretory system of the experimental insects. «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES» a

differentiated effect on biochemical parameters of bee hemolymph in the studied concentrations when diluted with different solutions.

The final step of the PhD research was the improvement of the optimal treatment and prevention scheme for enterobacteriosis (dysbiosis) of bees. Based on our research it was found that treatment of bees it is necessary to apply 0,15% solution of «Biocontact Plus» (300–350 cm³ of preparation per 1 bee family) – 5 treatments 3–4 days and 2,5–5% solution of «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES» (300–400 cm³ of preparation per 1 bee family) – 3–4 treatments 3–4 days. «Biocontact Plus» and «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES» must be diluted with 50% sugar syrup solution. For preventive purposes, we recommend «ENTERONORMIN PLUS JODIS + SE» – 20 cm³ diluted with 200 cm³ 50% sugar syrup solution (*per os*) 3-5 times at 5-day intervals. «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES» – 12–15 cm³ of this probiotic diluted with water – 2 treatments with interval of 7–14 days and compliance general preventive measures in apiaries.

Key words: beekeeping, *Apis mellifera*, epizootic monitoring, infectious diseases, worker bees, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes*, bee dysbiosis, copper citrate and silver solution, «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES», «Enteronotmin with Iodine + Se», preservation of life, hemolymph, morphological indicators

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних науково метричних баз (список «А»):

1. Стійкість патогенних ентеробактерій бджіл до експериментального йодовмісного дезінфектанту «Йодіс Дез №2» / Галатюк О. Є., Романишина Т. О., **Лахман А. Р.**, Лисенко О. М., Шиманська В. В. *Наукові горизонти*. 2020. Вип. 1, № 86. С. 71–78. DOI: [10.33249/2663-2144-2020-86-1-71-78](https://doi.org/10.33249/2663-2144-2020-86-1-71-78). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,42/0,08 д. а.).

Статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних науково метричних баз (список «Б»):

1. Галатюк О. Є., Романишина Т. О., **Лахман А. Р.** Чутливість хвороботворних бактерій бджіл до зразка розчину міді і цитрату срібла. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки*. 2020. Т. 22, № 97. С. 106–111. DOI: [10.32718/nvlvet9717](https://doi.org/10.32718/nvlvet9717). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,73/0,24 д. а.).

2. Застосування біохімічного типування у ветеринарній медицині при ентеробактеріозах бджіл для визначення *Klebsiella Pneumoniae* / Галатюк О. Є., Романишина Т. О., **Лахман А. Р.**, Бегас В. Л., Андрійчук А. М., Солодка Л. О. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки*. 2020. Т. 22, № 99. С. 101–106. DOI: [10.32718/nvlvet9916](https://doi.org/10.32718/nvlvet9916). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних,

проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,67/0,11 д. а.).

3. Вплив «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» на динаміку тривалості життя бджіл в садковому досліді / **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О., Чирта-Синельник К. О., Бегас В. Л., Зілько О. Ю. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки.* 2020. Т. 23, № 103. С. 27–34. DOI: [10.32718/nvlvet10305](https://doi.org/10.32718/nvlvet10305). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,92/0,15 д. а.).

4. **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О., Бегас В. Л. Зміни морфологічного складу гемолімфи бджіл української степової породи під час застосування «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» у садковому експерименті. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина.* 2021. Т. 3, № 54. С. 39–47. DOI: [10.32845/bsnau.vet.2021.3.6](https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.3.6). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,37/0,09 д. а.).

5. Галатюк О. Є., **Лахман А. Р.**, Романишина Т. О., Бегас В. Л. Перспективи створення і застосування парних та множинних кореляційно-регресійних моделей для ветеринарного забезпечення бджільництва. *Науковий вісник ветеринарної медицини.* 2021. № 1. С. 58–63. DOI: [10.33245/2310-4902-2021-165-1-58-63](https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-165-1-58-63). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,25/0,06 д. а.).

6. **Лахман А. Р.** Визначення напрямку дії «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» щодо збудників бджолиних дисбіозів *in vitro*. *Науковий вісник ветеринарної медицини.* 2021. № 2. С. 72–81. DOI: [10.33245/2310-4902-2021-](https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-)

168-2-72-81. (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,29/0,29 д. а.).

7. Bioprospectives in the treatment and prevention of enterobacteriosis of bees in organic production of beekeeping products / Galatiuk O., **Lakhman A.**, Romanishina T., Zastulka O., Kurtyak B., Kovalchuk I., Pundyak T. *The Animal Biology*. 2021. V. 23, № 3. P. 41. DOI: [10.15407/animbio23.03](https://doi.org/10.15407/animbio23.03). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,09/0,01 д. а.).

8. **Lakhman A. R.**, Galatiuk O. Ye., Romanishina T. A., Behas V. L. Antagonistic effect of *Bacillus subtilis* isolated and identified from different honey species against *Klebsiella pneumoniae* bee pathogens. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*. 2021. V. 4, № 3. P. 48–53. DOI: [10.32718/ujva-s4-3.08](https://doi.org/10.32718/ujva-s4-3.08). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,76/0,19 д. а.).

9. **Ляхман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О., Бегас В. Л. Епізоотична ситуація щодо контагіозних хвороб бджіл у Північно-Західному регіоні України. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки*. 2022. Т. 24, № 106. С. 49–53. DOI: [10.32718/nvlvet10608](https://doi.org/10.32718/nvlvet10608). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,53/0,13 д. а.).

10. **Ляхман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О., Бегас В. Л. Вплив «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» на біохімічні параметри гемолімфи бджіл в садковому досліді. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки*. 2022. Т. 24, № 107. С. 125–130. DOI:

10.32718/nvlvet10720. (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,65/0,16 д. а.).

Фахові статті у міжнародних наукових журналах, які індексуються в міжнародних наукометричних базах *Scopus* та *Web of Science Core*

Collection:

1. Стійкість патогенних ентеробактерій бджіл до експериментального йодовмісного дезінфектанту «Йодіс Дез №2» / Галатюк О. Є., Романишина Т. О., **Лакман А. Р.**, Лисенко О. М., Шиманська В. В. *Наукові горизонти*. 2020. Вип. 1, № 86. С. 71–78. DOI: 10.33249/2663-2144-2020-86-1-71-78. (*Scopus*) (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,42/0,08 д. а.).

2. Isolation and identification of *Klebsiella aerogenes* from bee colonies in bee dysbiosis / Galatiuk O., Romanishina T., **Lakhman A.**, Zastulka O., Ralitsa B. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 2020. V. 50, № 3. P. 353–361. URL: https://he01.tci-thaijo.org/index.php/tjvm/article/view/245844. (*Scopus, Web of Science Core Collection*) (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,9/0,18 д. а.).

3. Bees klebsiellosis: key aspects of pathogenesis / **Lakhman A.**, Galatiuk O., Romanishina T., Behas V., Zastulka O. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 2021. V. 9, № 8. P. 1190–1193. DOI: 10.17582/journal.aavs/2021/9.8.1190.1193. (*Scopus*) (Здобувач провела збір і обробку теоретичних даних, інтерпретувала їх й оформила статтю; 0,48/0,09 д. а.).

Статті, що опубліковані у науковому періодичному виданні іншої держави:

1. Isolation and identification of *Klebsiella aerogenes* from bee colonies in bee dysbiosis / Galatiuk O., Romanishina T., **Lakhman A.**, Zastulka O., Ralitsa B. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 2020. V. 50, № 3. P. 353–361. URL: <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/tjvm/article/view/245844>. (*Scopus та Web of Science Core Collection*) (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,9/0,18 д. а.).

2. Bees klebsiellosis: key aspects of pathogenesis / **Lakhman A.**, Galatiuk O., Romanishina T., Behas V., Zastulka O. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 2021. V. 9, № 8. P. 1190–1193. DOI: [10.17582/journal.aavs/2021/9.8.1190.1193](https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.8.1190.1193). (*Scopus*) (Здобувач провела збір і обробку теоретичних даних, інтерпретувала їх й оформила статтю; 0,48/0,09 д. а.).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Матеріали наукових конференцій

1. Галатюк О. Є., Романишина Т. О., Лемешинська Л. Ф., **Лакхман А. Р.** Вивчення антагонізму «Ентеронорміну» щодо патогенних ентеробактерій медоносних бджіл. *Актуальні проблеми епізоотології та заразних хвороб* : матеріали Міжн. наук.-практ. конф., 24–26 жовтня 2019 р. Одеса : Одеський державний аграрний університет, 2019. С. 159–166. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,18/0,05 д. а.)

2. **Лакхман А. Р.**, Лемешинська Л. Ф., Галатюк О. Є., Романишина Т. О. Перспективи застосування пробіотиків за ентеробактеріозів бджіл. *Освітньо-наукові аспекти контролю інфекційних хвороб тварин в Україні* : зб. тез мат.

учасн. Міжнар. наук.-практ. конф., 28 листопада 2019 р. Київ : Науково-методичний центр ВФПО, 2019. С. 123–127. *(Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,21/0,05 д. а.)*

3. Галатюк О. Є., Романишина Т. О., **Лахман А. Р.** Визначення активності зразка розчину цитрату міді і цитрату срібла у профілактиці ентеробактеріозів бджіл. *Сучасний рух науки* : тези доп. X Міжн. наук. -практ. інтернет-конф., 2-3 квітня 2020 р. Дніпро, 2020. С. 269–272. *(Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,14/0,05 д. а.)*

4. Галатюк О. Є., **Лахман А. Р.**, Романишина Т. О. Особливості лабораторної діагностики за ентеробактеріозів бджіл. *Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи* : мат. V Міжн. наук. -практ. конф. викладачів і студентів., 6-7 травня 2020 р. Дніпро, 2020. С. 142–143. *(Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,14/0,05 д. а.)*

5. **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О. Перспективи використання органічних дезінфектантів для виробництва продукції бджільництва. *Органічне виробництво і продовольча безпека* : мат. доп. учасн. VIII Міжн. наук. -практ. конф., 21-22 травня 2020 р. Житомир : Поліський університет, 2020. С. 343–348. *(Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,26/0,09 д. а.)*

6. Галатюк О. Є., Романишина Т. О., **Лахман А. Р.** Лабораторно – експериментальне дослідження впливу різних рецептів Канді щодо патогенних ентеробактерій бджіл. *Шляхи розвитку науки в сучасних кризових умовах* : тези доп. I Міжн. наук. -практ. інтернет-конф., 28-29 травня 2020 р.

Дніпро, 2020. С. 229–232. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,1/0,03 д. а.)

7. Романишина Т. О., **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є. Дослідження антимікробної дії розчину міді і цитрату срібла за ентеробактеріозів бджіл. *Advances in the Natural Sciences and Engineering* : мат. Міжн. наук. -практ. конф., 28 червня 2020 р. Будапешт : Science and Education a New Dimension, 2020. С. 70–72. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,3/0,1 д. а.)

8. **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О. Визначення властивостей дезінфектанту «ЙОДІСДЕЗ» щодо ентеробактерій бджіл. *Наукові читання 2020. Сучасні підходи забезпечення здоров'я тварин та якості кормів і харчових продуктів* : матеріали шостої Всеукр. наук.-практ. конф., листопад-січень 2019 р. Житомир : ЖНАЕУ, 2020. С. 143–146. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,09/0,03 д. а.)

9. **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О. Чутливість змішаної мікробної асоціації, виділеної з вулика при опоношенні бджіл до дії підкормок різних рецептів *in vitro*. *Сучасний рух науки* : тези доп. XI Міжн. наук. -практ. інтернет-конф., 8-9 жовтня 2020 р. Дніпро, С. 379–380. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,12/0,04 д. а.)

10. **Лахман А. Р.**, Шевчук С. Ф. Любов до Бога та бджіл. *Водні і наземні екосистеми та збереження їх біорізноманіття – 2020* : матеріали третьої Всеукр. наук.-практ. конф., 3-5 червня 2020 р. Житомир : Поліський нац. ун-т, 2020. С. 110–112. (Здобувач виконала аналіз інформаційних даних та підготувала тезу до друку; 0,18/0,09 д. а.)

11. **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О. Вивчення напрямку дії «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» щодо змішаної асоціації бактерій

виділених при бджолиних дисбактеріозах. *Наукові читання 2020. Еколого-регіональні проблеми сучасного тваринництва та ветеринарної медицини* : матеріали сьомої Всеукр. наук.-практ конф., 10 грудня 2020 р. Житомир : Полісся, 2020. С. 124–127. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,13/0,04 д. а.)

12. Галатюк О. Є., **Лахман А. Р.**, Романишина Т. О. Модифікований метод Кірбі-Баурера-як початкова ланка у діагностиці ентеробактеріозів бджіл та вивченні напрямку дії «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ». *Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин* : матеріали наук.-практ. Міжнародної дистанційної конф., 17 березня 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. С. 17–19. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,17/0,06 д. а.)

13. Галатюк О. Є., **Лахман А. Р.**, Романишина Т. О. Застосування мікробіологічних методів дослідження у виборі розчинника для пробіотика «Ентеронормін з Йодіс + Se» *in vitro* Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині : матеріали наук.-практ. Міжнародної дистанційної конф., 26 березня 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. С. 178–179. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,13/0,04 д. а.)

14. **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О., Бегас В. Л. Лабораторна ідентифікація та перспективи застосування *Bacillus Subtilis*, виділеної з весняного меду, за ентеробактеріозів бджіл. *Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи* : матеріали VI Міжн. наук.-практ. конф. викл. і студ., 6-7 травня 2021 р. Дніпро : ДДАЕУ, 2021. С. 97. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,08/0,02 д. а.)

15. Галатюк О. Є., Бегас В. Л., Романишина Т. О., **Лакман А. Р.** Організація профілактики хвороб в органічному тваринництві та її законодавчі передумови. *Органічне виробництво і продовольча безпека* : мат. доп. учасн. ІХ Міжн. наук. -практ. конф., 27-28 травня 2021 р. Житомир: Поліський нац. ун-т, 2021. С. 28–36. (Здобувач виконала аналіз інформаційних даних та підготувала тезу до друку; 0,29/0,07 д. а.)

16. Galatiuk O. Ye., **Lakhman A. R.**, Romanishina T. O., Zastulka O. O., Kurtyak V. M., Kovalchuk I. I., Pundyak T. O. Bioperspectives in the treatment and prevention of enterobacteriosis of bees in organic production of beekeeping products. *Науковий журнал «Біологія тварин»* : тези доп. І українсько-польського наукового форуму «АГРОБІОПЕРСПЕКТИВИ», 29–30 вересня 2021 р., Львів : Інститут біології тварин НААН, 2021, С. 41. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,09/0,01 д. а.)

17. **Лакман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О., Бегас В. Л. Чутливість бактеріальної культури бджіл виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* до дії «Ентероонормін з йодіс + Se» *in vitro*. *In Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Winter Debates* : Proceedings of the 3rd International Scientific and Practical Internet Conference., February 3-4 2022 year. Dnipro, 2022. P. 319–321. (Здобувач виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,15/0,04 д. а.)

18. Галатюк О. Є., Бегас В. Л., Романишина Т. О., **Лакман А. Р.** Значення досягнень Прокоповича П. І. і Вітвицького М. М. для розвитку промислового бджільництва. *Наукові читання 2022. Еколого-регіональні проблеми сучасного тваринництва та ветеринарної медицини* : матеріали дев'ятої Всеукр. наук.-практ конф., 17 листопада 2022 р. Житомир : Полісся, 2022. С. 28–32. (Здобувач виконала аналіз інформаційних даних та підготувала тезу до друку; 0,13/0,03 д. а.)

19. Галатюк О. Є., **Лахман А. Р.**, Романишина Т. О., Свиридюк К. П., Балканська Р. Вивчення дії Натрію гіпохлориду щодо патогенних ентеробактерій бджіл виду *Klebsiella pneumoniae*. *Сучасний стан розвитку ветеринарної медицини, науки і освіти* : матеріали Міжн. наук.-практ. конф., присв. 35-річчю заснування факультету вет. медицини., м. Житомир, 12-13 жовтня 2022 р. Житомир : Поліський нац. ун-т, 2022. С. 179–181. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,18/0,02 д. а.)

20. Галатюк О. Є., **Лахман А. Р.**, Романишина Т. О., Бегас В. Л. Забезпечення епізоотичного благополуччя бджільництва України. «Єдине здоров'я – 2022»: збірник праць учасників Міжн. наук.-практ. конф., м. Київ, 22-24 вересня 2022 р. Київ : НУБіП, 2022. С. 261–262. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,08/0,02 д. а.)

21. Галатюк О. Є., **Лахман А. Р.**, Романишина Т. О., Бегас В. Л. Чутливість змішаної мікробної асоціації, виділеної за ентеробактеріозів бджіл до Натрію гіпохлориту (3%) в лабораторних умовах. *Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту* : зб. тез мат. учасн. Міжнар. наук.-практ. конф., м. Біла Церква, 20 жовтня 2022 р. Біла Церква : БНАУ, 2022. С. 34–36. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,19/0,05 д. а.)

22. Галатюк О. Є., Романишина Т. О., **Лахман А. Р.**, Бегас В. Л. Дослідження чутливості *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* до дії Натрію гіпохлориду *in vitro*. *Біобезпека, захист та благополуччя тварин* : зб. тез мат. учасн. Міжнар. наук.-практ. конф., 21 листопада 2022 р. Київ : Науково-методичний центр ВФПО, 2022. С. 162–164. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,1/0,03 д. а.)

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації

Патенти на корисну модель:

1. Спосіб ідентифікації бджолиних ентеробактерій видів *Klebsiella Pneumoniae* та *Enterobacter Aerogenes (Klebsiella Aerogenes)*: пат. 143166 Україна. № u202001272; заявл. 26.02.2020; опубл. 10.07.2020, Бюл. № 13. 62 с. *(Здобувач підготувала матеріали для оформлення патенту та приймала участь в ідентифікації бджолиних ентеробактерій видів Klebsiella Pneumoniae та Enterobacter Aerogenes (Klebsiella Aerogenes))*

2. Спосіб приготування препарату «Ентеронормін з ЙОДІС + SE» на медовій ситі з лісового різнотрав'я для застосування у бджільництві: пат. 143400 Україна. № u202001273; заявл. 26.02.2020; опубл. 27.07.2020, Бюл. № 14. 5 с. *(Здобувач підготувала матеріали для оформлення патенту та приймала участь в експериментальних дослідженнях)*

3. Спосіб визначення чутливості ентеробактерій бджіл до пробіотиків та дезінфектантів методом Кірбі-Бауера. пат. 143401 Україна. № u202001274; заявл. 26.02.2020; опубл. 27.07.2020, Бюл. № 14. 67 с. *(Здобувач підготувала матеріали для оформлення патенту та приймала участь в експериментальних дослідженнях)*

Науково-методичні рекомендації

1. **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О. Використання метода Кірбі-Бауера (модифікованого) для випробування пробіотиків та дезінфектантів за ентеробактерозів бджіл *in vitro*. Науково-методичні рекомендації. Житомир : Поліський національний університет, 2023. 23 с. *(Здобувач провела провела практичну частину дослідів, сформувала та оформила науково-методичні рекомендації; 0,84/0,28 д. а.)*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	30
ВСТУП	31
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	44
1.1 Характеристика збудників ентеробактеріозів бджіл	44
1.2 Особливості культивування та ідентифікації збудників ентеробактеріозів бджіл	50
1.3 Діагностика ентеробактеріозів у бджіл	56
1.4 Застосування ветеринарних препаратів за ентеробактеріозів бджіл для санації бджолиних сімей, інвентарю та вуликів	59
1.5 Проведення лікувальної та профілактичної обробок за ентеробактеріозів бджіл	63
Висновки до Розділу 1	66
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ	68
2.1 Матеріали для виконання роботи	70
2.2 Мікробіологічні методи досліджень	71
2.3 Фармакологічні методи досліджень	75
2.4 Фізіологічні методи досліджень на бджолах	77
2.5 Дослідження гемолімфи бджіл	79
2.5.1 Морфологічні дослідження	80
2.5.2 Біохімічні дослідження	82

2.6 Аналіз епізоотологічної ситуації та проведення статистичних досліджень	83
Висновок до Розділу 2	85
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	86
3.1 Моніторинг заразних хвороб бджіл у Житомирській, Рівненській та Волинській областях за 2019 – 2022 роки	86
3.1.1 Моніторинг заразних хвороб бджіл за 2019 – 2021 роки	86
3.1.2 Моніторинг заразних хвороб бджіл за 2022 рік	91
3.2 Удосконалення методів культивування, виділення та ідентифікації ентеробактерій видів <i>Klebsiella pneumoniae</i> та <i>Klebsiella (Enterobacter) aerogenes</i> у бджіл	92
3.3 Вивчення ключових аспектів патогенезу за клебсієльозів у бджіл	98
3.4 Визначення антагоністичної активності <i>Bacillus subtilis</i> виділеної та ідентифікованої з різних видів меду щодо патогенних мікроорганізмів бджіл виду <i>Klebsiella pneumoniae in vitro</i>	103
3.5 Вивчення дії (бактеріостатична/бактерицидна/антагоністична) фармакологічних засобів щодо ентеробактерій бджіл видів <i>Klebsiella pneumoniae</i> та <i>Klebsiella (Enterobacter) aerogenes in vitro</i>	108
3.5.1 Визначення дії експериментального дезінфектанту «Йодіз дез №2» щодо ентеробактерій бджіл видів <i>Klebsiella pneumoniae</i> та <i>Klebsiella (Enterobacter) aerogenes in vitro</i>	109
3.5.2 Визначення дії зразка розчину цитрату міді і цитрату срібла щодо ентеробактерій бджіл видів <i>Klebsiella pneumoniae</i> та <i>Klebsiella</i>	113

(Enterobacter) aerogenes in vitro

- 3.5.3 Визначення дії «Ентеронормін з Йодіс + Se» щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes in vitro* 117
- 3.5.4 Визначення дії «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* та змішаної мікробної асоціації *in vitro* 120
- 3.6 Вивчення впливу різних концентрацій «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», з цукровим сиропом та медовою гречаною ситою на морфологічні, деякі біохімічні параметри гемолімфи та тривалість життя бджіл 126
- 3.6.1 Вивчення динаміки тривалості життя бджіл української степової породи за впливу різних концентрацій «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» з цукровим сиропом та медовою гречаною ситою в садковому досліді 127
- 3.6.2 Вивчення впливу різних концентрацій «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», з цукровим сиропом та медовою гречаною ситою на морфологічні показники гемолімфи бджіл української степової породи 132
- 3.6.3 Аналіз деяких біохімічних параметрів гемолімфи бджіл української степової породи за впливу різних концентрацій «EM[®] ПРОБІОТИКа для БДЖІЛ» розведеного цукровим сиропом та медовою гречаною ситою 140
- 3.7 Перспективи лікування та профілактики дисбіозів бджіл за органічного бджільництва 146

РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА ЇХ АНАЛІЗ	149
Висновок до Розділу 4	176
ВИСНОВКИ	177
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	181
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	182
ДОДАТКИ	226

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

МПА – м'ясо-пептонний агар

МПБ – м'ясо-петонний бульйон

АМХ – агар Мюллер-Хінтона

MRS – агар MPC (Ман, Рогоза, Шарп)

BCA – вісмут-сульфітний агар

ФЧГЖА – фіолетово-червоний глюкозо-жовчний агар

КУО – колоніє утворюючі одиниці

ДДМ – диско-дифузійний метод

МК – метод колодязів

МЛ – метод лунок

КСТЖБ – коефіцієнт середньої тривалості життя бджіл

БС – бактеріостатична дія

БЦ – бактерицидна дія

А – антагоністична дія

ЛФ – лужна фосфатаза

АСТ – аспартатамінотрансфераза

ГГТ – гамма-глутамілтранспептидаза

БНАУ – Білоцерківський національний аграрний університет

СНАУ – Сумський національний аграрний університет

ПДАУ – Полтавський державний аграрний університет

ОДАУ – Одеський національний аграрний університет

ЛНУВМБ ІМЕНІ С. З. ГЖИЦЬКОГО – Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького

НУБіП – Національний університет біоресурсів та природокористування України

ВСТУП

Актуальність теми. Важливою та цінною галуззю агропромислового комплексу в Україні та у багатьох країнах світу – є бджільництво. Бджільництво – практика управління бджолиними колоніями в сільськогосподарських цілях [230]. В галузі бджільництва України працює біля 380 тисяч пасічників, які утримують близько 4 млн. бджолиних сімей, які виробляють близько 100 тисяч тон меду. Відомо, що бджола незамінний помічник у господарстві, адже сприяє перехресному запиленню, яке збільшує врожаї ентомофільних рослин. Здавна відомо, що головними запилювачами соняшнику – є медоносні бджоли [219]. Бджолозапилення - важливий елемент в агрономії, а саме в агротехніці, результатом якого є отримання достатньо великої кількості зерна, фруктів та інших «дарів» природи. Наразі європейські країни переживають «кризу запилення» викликану зменшенням числа запилювачів і великими втратами колоній вітчизняних медоносних бджіл [219, 230]. Європейський парламент відреагував на дану проблему, зазначивши про пошук ефективних заходів для відновлення бджолиних популяцій [91, 230].

Також відомо, що *Apis mellifera* є біондикатором забруднення навколишнього середовища [215]. Бджолині сім'ї також виробляють цінні продукти бджільництва. Адже з пасіки, окрім меду різних видів (квітковий, падевий, змішаний), отримують такі продукти як: прополіс, який є природнім антибіотичним засобом і володіє широким спектром протибактеріальних властивостей, пилок, пергу, маточне молочко, бджолиний віск, бджолині стільники, бджолиний підмор, забрус та гомогенат личинок трутня [230]. Кожен з вищевказаних продуктів має свій оригінально-індивідуальний вплив на організм людини та тварини, наприклад, мед – містить велику кількість вітамінів, амінокислот та має широкі антимікробні властивості; наприклад, перга відома великою кількістю вітамінів (А, В, С тощо), мінеральних

речовин і мікроелементів; бджолиний пилок – чинить імуностимулюючу дію; бджолиний віск знайшов широке використання у косметології та промисловості; маточне молочко активує регенеративні властивості клітин та чинить протизапальну дію [43]. Апітерапія є однією з перспективних лікувальних альтернатив, що застосовуються як у гуманній так і у ветеринарній практиці [43]. Наприклад, за хвороби Паркінсона, деяких серцево-судинних захворюваннях, цукрового діабету та онкологічних захворювань активно використовують прополіс та королівське желе або маточне молочко (*Royal Jelly*), яким годують бджолиних маток (королев) протягом усього життя, саме воно сприяє довготривалості життя та високій фізіологічній формі маток [43]. Широке використання продуктів бджільництва та цінна роль медоносної бджоли свідчать про необхідність регулярно удосконалювати заходи щодо профілактики хвороб бджіл. Серед найбільш погрозливих хвороб бджіл реєструють інфекційні патології (американський гнилець, європейський гнилець, септицемія бджіл, паратиф, мішечкуватий розплід, ентеробактеріози), інвазійні або паразитарні (амебіаз, нозематоз, грегаріоз, варроатоз, акарапідоз, мермітідо, сенотаїніоз, мелеоз, браульоз, фізоцефалез) та хвороби, незаразної етіології (отруєння, токсикологічний вплив пестицидів) [1, 15, 99, 114]. При вивченні колапсу (масової загибелі) бджолиних колоній на території України, деяких країн Європи та Америки [1, 114], часто реєструють факторні бактеріальні захворювання, а саме – дисбіози бджіл, або так звані ентеробактеріози бджіл. Вперше це захворювання було виявлено на промислових пасіках, куди були завезені південні породи бджіл – італійську, кавказьку, бакфаст. Такі породи важко переносять зимівлю в Україні. Тому в зимовий та весняний періоди бджоли масово гинуть. Колапс призводить до щорічних втрат бджолиних сімей на пасіках (у США приблизно 33% та щорічно зростають приблизно на 12%) [156, 261], що у свою чергу веде до затрат як в агропромисловому

виробництві, так і при отриманні продукції бджільництва. Лікування бактеріальних хвороб бджіл ускладнене, так як застосовувати ветеринарні препарати, зокрема антибіотичні препарати важко, навіть неможливо. Основою недопущення будь-якого захворювання як у гуманній медицині, так і у ветеринарній є попередження його виникнення. Тому саме профілактика інфекційних хвороб залишається однією з основних причин стурбованості у всьому світі [217].

Таким чином, наші дослідження були направлені на вивчення аспектів діагностики та профілактики ентеробактеріозів бджіл, які, в даний час, активізувалися на пасіках світу.

Зв'язок дисертаційної роботи з науковими програмами і темами.

Дисертаційне дослідження виконане згідно з планом науково-дослідної роботи аспірантки кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології Поліського національного університету за державним реєстраційним номером 0119U103867 (03-12-2019) «Удосконалення методів профілактики ентеробактеріозів бджіл».

Мета роботи – провести епізоотологічний моніторинг інфекційних хвороб бджіл та удосконалити методи профілактики ентеробактеріозів бджіл.

Завдання:

- Провести епізоотологічний моніторинг інфекційних хвороб бджіл за 2019 – 2022 роки;
- Удосконалити методи культивування та зберігання збудників ентеробактеріозів бджіл;
- Провести пошук ефективних засобів, щодо патогенних збудників ентеробактеріозів бджіл;
- Вивчити вплив найбільш ефективного засобу на морфологічні і деякі біохімічні показники гемолімфи та тривалість життя бджіл;

- Удосконалити оптимальну лікувально-профілактичну схему за ентеробактеріозів (дисбіозів) бджіл.

Об'єкт дослідження: бактеріози, змішані бактеріози бджіл, здорові та хворі бджолосім'ї.

Предмет дослідження: епізоотологічний моніторинг, методи профілактики ентеробактеріозів бджіл.

Методи дослідження: епізоотологічні (визначення динаміки кількості досліджених проб хвороб бджіл по роках); клінічні (дослідження бджолосімей на предмет ознак заразних хвороб бджіл); бактеріологічні (виділення патогенних мікроорганізмів з організму бджіл); фармакологічні (визначення оптимальних концентрацій ефективного засобу для бджіл); фізіологічні (оцінка впливу ефективного засобу на життєздатність бджіл); аналітичні (аналіз та систематизація препаратів та методів їх застосування для профілактики щодо ентеробактеріозів бджіл); варіаційно – статистичні (обробка показників результатів та їх вірогідність).

Наукова новизна отриманих результатів.

Вивчена епізоотична ситуація щодо контагіозних хвороб бджіл у Північно-Західному регіоні України за 2019 – 2022 роки.

Вперше в Україні ідентифіковані збудники дисбіозів бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* методом біохімічного типування, що застосовується у гуманній медицині та удосконалена методика виділення даних збудників. Вивчені фізіологічні властивості цих збудників в аспекті патогенетичного впливу щодо бджолиного організму.

Вперше модифікований метод Кірбі-Бауера щодо визначення чутливості ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* до пробіотиків та дезінфектантів *in vitro*. Даний метод вперше використаний для визначення напрямку дії (бактерицидної;

бактеріостатичної та антагоністичної) засобів різних фармакологічних груп (експериментальний дезінфектант «Йодіз дез №2»; зразок розчину міді і цитрату срібла; «Ентеронормін з Йодіс + Se»; «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ») щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes in vitro*.

Виділені та ідентифіковані бацили виду *Bacillus subtilis* методом біохімічного типування із 5 видів меду. Визначена антагоністична активність *Bacillus subtilis* щодо патогенних мікроорганізмів бджіл виду *Klebsiella pneumoniae in vitro*.

Вперше використаний спосіб приготування препарату «Ентеронормін з Йодіс + Se» на медовій ситі із лісового різнотрав'я, де як цукри використовують розчин медової сити з лісового різнотрав'я, а як пробіотик використовують «Ентеронормін з Йодіс + Se», який розводять з 50%-им розчином медової сити для застосування у бджільництві.

Вперше визначено напрямок дії «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведеного 50% розчином цукрового сиропу та водою щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* та змішаної мікробної асоціації *in vitro*.

Вперше в Україні вивчена динаміка тривалості життя бджіл української степової породи зимової генерації за впливу різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведених цукровим сиропом та медовою гречаною ситою в садковому досліді. Встановлений найкращий ефект тривалості життя бджіл при згодовуванні 1,25–5% «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» розведеного цукровим сиропом.

Вперше в Україні визначений вплив різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», розведених цукровим сиропом та медовою гречаною ситою на морфологічні показники та деякі біохімічні параметри гемолімфи бджіл української степової породи зимової генерації. Виявлено,

що використання «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» у концентрації 1,25%, розведеного, як цукровим сиропом, так і гречаною ситою, має імуностимулюючу дію на організм бджіл. Розведення «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» цукровим сиропом у 2,5% концентрації чинить стимулюючу дію на бджіл. Удосконалена оптимальна схема проведення лікувально-профілактичних заходів при ентеробактеріозах (дисбіозах) бджіл.

Наукова новизна виконаної роботи підтверджена науковими працями та трьома патентами на корисні моделі: Патент 143166 Україна, МПК (2020.01) C12N 1/00 «Спосіб ідентифікації бджолиних ентеробактерій видів *Klebsiella Pneumoniae* та *Enterobacter Aerogenes (Klebsiella Aerogenes)*», 143400 Україна, МПК (2020.01) A01K 49/00 A61K 35/741 (2015.01) «Спосіб приготування препарату «Ентеронормін з ЙОДІС + SE» на медовій ситі з лісового різнотрав'я для застосування у бджільництві», Патент 143401 Україна, МПК (2020.01) C12N 1/00 «Спосіб визначення чутливості ентеробактерій бджіл до пробіотиків та дезінфектантів методом Кірбі-Бауера (Додаток А – В).

Практична значимість отриманих результатів.

Створені діаграми та графіки епізоотичної ситуації щодо контагіозних хвороб бджіл у Житомирській, Волинській та Рівненській областях за 2019 – 2022 роки.

Розроблена оптимальна схема виділення та ідентифікації патогенних ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, та бацил виду *Bacillus subtilis*. Схема може бути використана для ідентифікації інших ентеробактерій та штамів бацил виду *Bacillus subtilis*.

Модифікована методика для випробування фармакологічних засобів (бактеріостатичний, бактерицидний ефекти та антагоністична дія) щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes in vitro*. На основі даних результатів опубліковані науково –

методичні рекомендації: «Використання метода Кірбі-Бауера (модифікованого) для випробування пробіотиків та дезінфектантів за ентеробактерозів бджіл *in vitro*». (Лахман А. Р., Галатюк О. Є., Романишина Т. О.) (Додаток Г)

Встановлені концентрації та способи використання «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» з метою лікування та профілактики дисбіозів бджіл. Удосконалена оптимальна схема проведення лікувально-профілактичних заходів за ентеробактеріозів бджіл.

Результати проведених досліджень є рекомендаціями для наукових договорів: Договір № 05-02 від 14.05.2020 на проведення науково-технічних робіт з ТОВ «ЕМ-Україна» на тему «Вивчення антагонізму препарату «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» щодо патогенних ентеробактерій бджіл» (Додаток Г); Договір № 19-04 від 19.04.2021 на проведення науково-технічних робіт з ТОВ «ЕМ-Україна» на тему «Вплив різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИКа для БДЖІЛ», розведених цукровим сиропом та медовою ситою на морфологічні показники гемолімфи бджіл» (Додаток Д). Результати досліджень апробовані і впровадженні на пасіках Житомирської та Хмельницької областей (Додаток Е – И). Теоретична інформація висвітлена під час засідань ГО «Клуб професійних пасічників Житомирщини». Результати дисертаційної роботи впроваджені у навчальний процес ЗВО (м. Київ, м. Львів, м. Біла Церква, м. Одеса, м. Суми та м. Полтава) (Додаток І – М).

Особистий внесок здобувача.

Самостійне виконання теоретичної, практичної (експериментальної) та статистичної частин дисертаційної роботи. Дисертантом самостійно вивчена та проаналізована епізоотична ситуація щодо заразних хвороб бджіл у Північно-Західному регіоні України на основі статистичних даних звітів регіональних лабораторій Держпродспоживслужб Житомирської, Рівненської та Волинської областей.

Автором вивчений патогенетичний вплив патогенних клібсієл видів

Klebsiella pneumoniae та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* щодо організму бджіл. Проаналізовані механізми дії засобів різних фармакологічних груп щодо досліджуваних мікроорганізмів та макроорганізму бджіл. Автором власноруч разом з лікарями-бактеріологами Державної установи «Житомирського обласного лабораторного центру Міністерства охорони здоров'я України» та «Житомирської регіональної державної лабораторії державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів» виділені та ідентифіковані чисті культури ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*. Також, разом із співробітниками кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології Поліського національного університету та з лікарями-бактеріологами Державної установи «Житомирського обласного лабораторного центру Міністерства охорони здоров'я України» виділені та ідентифіковані бацили із різних видів меду виду *Bacillus subtilis*.

Дисертантом власноруч проведені усі експериментальні дослідження по темі дисертаційної роботи. Отримані результати особисто проаналізовані, інтерпретовані та висвітлені у наукових публікаціях.

Апробація матеріалів дисертації.

Матеріали, які висвітлені у дисертаційній роботі, попередньо апробовані на міжнародних та всеукраїнських науково-практичних конференціях, семінарах, виставках тощо.

Міжнародні конференції, які передбачали публікування тез:

Міжнародна науково-практична конференція присвячена 80-річчю від дня народження професора Атамася В. Я. «Актуальні проблеми епізоотології та заразних хвороб», м. Одеса, 24 – 26 жовтня 2019 р.;

Міжнародна науково-практична конференція «Освітньо-наукові аспекти контролю інфекційних хвороб тварин в Україні», м. Київ, 28 листопада 2019 р.;

X Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Сучасний рух науки», м. Дніпро, 2 – 3 квітня 2020 р.;

V Міжнародна науково-практична конференція викладачів і студентів «Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи», м. Дніпро, 6 – 7 травня 2020 р.;

VIII Міжнародна науково – практична конференція «Органічне виробництво і продовольча безпека», м. Житомир, 21 – 22 травня 2020 р.;

I Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Шляхи розвитку науки в сучасних кризових умовах», м. Дніпро, 28 – 29 травня 2020р.;

Міжнародна науково-практична конференція «Advances in the Natural Sciences and Engineering», м. Будапешт, 28 червня 2020 р.;

XI Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Сучасний рух науки», м. Дніпро, 8 – 9 жовтня 2020 р.;

Науково-практична міжнародна дистанційна конференція «Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин», м. Харків, 17 березня, 2021 р.;

Науково-практична міжнародна дистанційна конференція «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині», м. Харків, 26 березня, 2021 р.;

VI Міжнародна науково-практична конференція викладачів і студентів «Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи», м. Дніпро, 6 – 7 травня 2021 р.;

IX Міжнародна науково-практична конференція «Органічне виробництво і продовольча безпека», м. Житомир, 27 – 28 травня 2021 р.;

I українсько-польський науковий форум «АГРОБІОПЕРСПЕКТИВИ», м. Львів, 29 – 30 вересня 2021 р.;

III Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «In Integration

of Education, Science and Business in Modern Environment: Winter Debates: Proceedings of the 3rd International Scientific and Practical Internet Conference», м. Дніпро, 3 – 4 лютого, 2022 р.;

Міжнародна науково-практична конференція присвячена 35-річчю заснування факультету ветеринарної медицини, 12-13 жовтня 2022 р.;

Міжнародна науково-практична конференція «Єдине здоров'я – 2022», м. Київ, 22 – 24 вересня 2022 р.;

Міжнародна науково-практична конференція «Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту», м. Біла Церква, 20 жовтня 2022 р.

Міжнародна науково-практична конференція «Біобезпека, захист та благополуччя тварин», м. Київ, 21 листопада 2022 р.

Всеукраїнські конференції, які передбачали публікування тез:

Шоста науково-практична конференція «Наукові читання 2020. Сучасні підходи забезпечення здоров'я тварин та якості кормів і харчових продуктів», м. Житомир, листопад – січень 2019 р.;

Третя Всеукраїнська науково-практична конференція «Водні і наземні екосистеми та збереження їх біорізноманіття», м. Житомир, 3 – 5 червня, 2020 р.;

Сьома науково-практична конференція «Наукові читання 2020. Еколого-регіональні проблеми сучасного тваринництва та ветеринарної медицини», м. Житомир, 10 грудня, 2020 р.;

Дев'ята всеукраїнська науково-практична конференція «Наукові читання 2022. Еколого-регіональні проблеми сучасного тваринництва та ветеринарної медицини», 17 листопада 2022.

Всеукраїнські конференції, семінари та виставки, які передбачали апробації у вигляді усної доповіді:

Третя Всеукраїнська науково-практична конференція на тему: «Підготовка бджіл до зимівлі та профілактика захворювань у осінній період», м. Житомир, 19 жовтня 2019 р.;

Четверта Всеукраїнська науково-практична конференція на тему: «Успішний розвиток бджолиних сімей у весняний період», м. Житомир, 8 лютого 2020 р.;

XII Міжнародна виставка INTERNATIONAL EXHIBITION «Антибіотикорезистентні мікроорганізми в об'єктах харчового ланцюга», присвячений 100-річчю заснування факультету ветеринарної медицини, м. Київ. 25 – 27 вересня 2019 р.;

Другий науково–практичний семінар на тему: «Моніторинг зимівлі та органічне виробництво продукції бджільництва», м. Житомир, 16 листопада 2019 р.;

Третій науково–практичний семінар на тему: «Мед, медотерапія, медові масажі, медові укутування», м. Житомир, 14 грудня 2019 р.;

Шоста всеукраїнська науково–практична конференція «Нарощування сили бджолиної сім'ї, спеціалізація у бджільництві», м. Житомир, 19 вересня 2020 р.;

Сьома всеукраїнська науково–практична конференція «Продуктивні резистентні матки та їх вплив на рентабельність пасіки», м. Житомир, 17 жовтня 2020 р.;

Восьма всеукраїнська науково-практична конференція «Весняні роботи на пасіці, особливості запилення ентомофільних культур», м. Житомир, 27 лютого, 2021 р.;

Дев'ята всеукраїнська науково–практична конференція «Осінні роботи на пасіці, особливості чистопородного розведення бджіл української степової породи», м. Житомир, 3 жовтня 2021 р.;

Одинадцята всеукраїнська науково–практична конференція «Осінні

роботи на пасіці, методологічні основи створення житомирського типу чистопородних бджіл української степової породи», 24 вересня 2022 р.;

Дванадцята всеукраїнська науково-практична конференція «Медоваріння – один з шляхів підвищення рентабельності пасік, уміння керувати бджолиними сім'ями», 26 листопада 2022 р.

Міжнародні конференції, які передбачали апробації у вигляді усної доповіді:

Міжнародна науково-практична конференція «Проблеми сучасного бджільництва (Problems of modern beekeeping)», м. Київ, 19 листопада 2020 р.;

Міжнародна науково-практична конференція присвячена бджільництву «Сучасні аспекти селекції бджіл» м. Київ, 16 березня, 2021 р.

Публікації.

За темою дисертаційної роботи опубліковано 39 наукових праць, з них 13 наукових публікацій (статей), з яких: 1 стаття – у науковому фаховому виданні України, включеного до міжнародних науково метричних баз (список «А» – Scopus); 10 статей – у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних науково метричних баз (список «Б»); 2 – у міжнародних наукових журналах, які індексуються в міжнародних наукометричних базах Scopus та Web of Science Core Collection; 2 статті – опубліковані у науковому періодичному виданні іншої держави. Опубліковано 22 тези у матеріалах конференцій, з яких: 18 міжнародних та 4 всеукраїнські; 3 патенти на корисну модель та 1 науково – методичні рекомендації.

Структура та обсяг дисертації.

Зміст дисертаційного дослідження складається з таких структурних елементів: титульного аркушу, анотації, змісту, переліку умовних позначень, основної частини (вступу, огляду літератури, матеріалів та методів виконання роботи, результатів власних досліджень, обговорення отриманих

результатів та їх аналізу, висновків, пропозицій виробництву), списку використаних джерел та 24 додатків. Основна частина дисертації викладена на 150 сторінках комп'ютерного тексту, містить 34 рисунки та 14 таблиць. Список використаних літературних джерел містить 288 найменувань, з яких 225 – латиницею.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Характеристика збудників ентеробактеріозів бджіл

Для того щоб знати як ефективно та адекватно втручатися в кожен конкретний інфекційний процес необхідно розуміти, які патогенні агенти викликають те чи інше інфекційне захворювання, саме цього вимагає профілактика інфекцій [135].

Усі локальні мікробіоми (ротова порожнина, кишечник, легені, тощо) організму людини, тварини (включаючи комах) складаються із різнофункціональних спеціалізованих мікроорганізмів, які перебувають у постійній взаємодії між собою та макроорганізмом, утворюючи єдину надогранізову систему [41]. Мікробіота кишечника функціонує як справжній механізм за принципом роботи ендокринного органа, генеруючи ферменти, біологічно активні речовини, біоактивні метаболіти, невеликі молекули, які навіть у невеликій кількості можуть впливати на фізіологічний стан господаря [177]. Зміна складу мікробіоти кишечника характеризує потенційний патогенний механізм дисбіозів, що включає виділення в організм сигнальних молекул кишкових мікроорганізмів [177]. Є повідомлення щодо кореляції між змінами у складі кишкових господарів та сприйнятливістю живих організмів до ентеробактеріозів [79]. Після імунодифіцитних станів, використання антибіотикотерпії або супутніх інфекційних захворювань кишечник переходить у стан дисбактеріозу. Це може бути пов'язано з надмірним зростанням, так званим «цвітінням», потенційно шкідливих бактерій (наприклад, ентеробактерій) [251].

У даний час кишкову мікрофлору як людей, так і тварин дисоціюють на дві великі групи: умовно-патогенні та непатогенні мікроорганізми. Нормальна мікрофлора – взаємопов'язана система, яка відображає

благополуччя комплексу макроорганізму і його кишкової мікрофлори [230]. Склад кишкової мікрофлори бджолиних особин може змінюватись залежно від віку, пори року та сезону. Встановлено, що кишковий тракт бджоли є місцем для життєдіяльності ентеробактерій, молочнокислих бактерій, стафілококів, ентерококів, псевдомонад, дріжджів та цвілевих грибів. У різні пори року їх кількість - неоднакова. Протягом року у складі кишкової мікробіоти бджіл найчисленнішими представниками є ентеробактерії і стафілококи [200]. Друге місце займають псевдомонади і дріжджі, на третій позиції переважають ентерококи [230].

Кишечник бджоли містить близько 10 родів бактерій, які належать до родини *Enterobacteriaceae*, родів *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Escherichia*, *Pantoea*, *Morganella*, *Serratia* [230]. Вміст ентеробактерій, як типових мешканців ШКТ бджіл варіює залежно від сезону року. Їх мінімальний рівень - в вересні, а максимальний - в січні [230]. При взаємодії деяких факторів: вплив пестицидів, порушення ветеринарно-санітарного стану пасіки, вплив хвиль радіоактивного випромінювання, низької медодайної бази тощо, кількісний склад мікробіоти середньої кишки бджіл порушується, що призводить до мутування та генерації мікробних організмів у агресивно-патогенні штами, які викликають захворювання. Збудниками ШКТ бджіл називають – ентеробактеріози. Поява хвороб, таких як, ешеріхіоз, цитробактеріоз, клебсіольоз зумовлюють не тільки сапрофітні мікроорганізми, але і потенційно патогенні мікроорганізми, так як мікробіоценоз бджіл багато в чому визначається місцем їх існування та станом загальної резистентності організму [230]. Останніми роками пасічників турбує масова загибель бджолиних колоній, яку ще називають так званим «колапсом бджолиних колоній» [99, 100].

Поведінкові реакції бджіл характеризуються псевдо роїннями, діареєю та загибеллю. Загальною назвою кишкових хвороб бджіл, викликаних

порушенням балансу кількісно-якісного складу мікробіоти зі зрушенням у бік патогенних мікробів, є ентеробактеріози (дисбіози) [100]. Збудники, які викликають симптоматику даних захворювань є опортуністичними патогенами і належать до родини *Enterobacteriaceae*, видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* [100], хоча іноді клінічну картинку даних кишкових порушень спричинює інфекційний агент у вигляді *Escherichia coli* [8].

Бактерії з родини *Enterobacteriaceae* – грамнегативні, анаеробні і широко поширені в природі мікроорганізми [49]. Причому деякі види ентеробактерій є членами *ESKAPE* (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Enterobacter*), які є причиною внутрішньолікарняних інфекцій у всьому світі [49, 80, 237]. *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* наразі виступають як зоонозні агенти, які високо значимі для людини та тварин [92]. Бактерії належать до родини ентеробактерій. *Klebsiella pneumoniae* грамнегативна, неспороутворююча, капсулоутворююча, лактозо-бродильна паличка, яка має стрижнеподібну форму, добре росте на простих живильних середовищах (АМХ, МПА) [216]. Патоген значно поширений у ротовій порожнині, шкірі, легенях, кишечнику людини та тварин [158]. Мікроорганізми даного виду викликають широкий спектр інфекцій: пневмонії, інфекції сечовивідних шляхів, бактеріємії, і абсцеси печінки [205]. Історично відомо, що *Klebsiella pneumoniae* викликає захворювання у низькорезистентних людей та тварин, але не так давно виявлено гіпервірулентні штами, які здатні викликати хворобу у імуноефективних, здорових організмів [205]. Причому дані мікроорганізми здатні викликати патології не лише у людей, але і у тварин, включаючи комах. Наприклад, навіть здорові тварини-компаньйони, які живуть у тісному контакті з людиною (собаки, коти) мають подібну фекальну колонізацію

мікроорганізмами виду *Klebsiella pneumoniae*, що у подальшому свідчить про потенційну роль здорових собак як резервуару *Klebsiella pneumoniae* для людей і навпаки [174, 175]. Також відомо, про можливість зараження тварин – компаньйонів від людей клональними лініями гіперрезистентних мікроорганізмів виду *Klebsiella pneumoniae*, такими як ST15, який продукує СТХ-М-15 [92, 166, 175]. Також відомо, що виділення деяких високорезистентних штамів *Klebsiella pneumoniae* з худоби свідчить про тісні взаємозв'язки між цими мікроорганізмами, людиною та худобою [81, 82]. Існують дослідження щодо потенційної передачі антибіотикорезистентних штамів *Klebsiella pneumoniae* через продаж м'яса від продуктивних тварин [82]. Малодослідженим питанням є інфікування високопатогенними штамми бактерій комах, а саме бджіл. Як відомо у кишечнику бджіл у різні пори року домінують саме ентеробактерії, а чисельні діареї свідчать про порушення роботи середньої кишки комах [100]. У людей *Klebsiella pneumoniae* викликає нозокоміальні інфекції, це пояснюється здатністю бактерій утворювати біоплівки на медичних приладах, що забезпечує утворення джерела інфекції у катетеризованих пацієнтів [157]. Причому, зазвичай інфекції викликані цими мікроорганізмами є хронічними, так як біоплівки забезпечують захист бактерій від імунних реакцій макроорганізму та спричиняють їх стійкість щодо антиобітиків, додатково мультирезистентність бактерій забезпечується наявністю β -лактамаз (кодується плазмідною і таким чином циркулюючи легко переноситься серед ентеробактеріальних видів [198] розширеного спектру [140] або карбапенемаз. Саме продукування специфічних бактеріальних ферментів дають можливість бактеріям родини *Enterobacteriaceae* розщеплювати всі типи β -лактамних антибіотиків [157, 192, 193]. Інший опортуністичний патоген нещодавно мав назву *Enterobacter aerogenes*, у 2017 році мікроорганізми отримали біноміальну назву - *Klebsiella aerogenes* із

збереженням синонімів *Klebsiella mobilis* [56] та *Enterobacter aerogenes* [257]. *Klebsiella aerogenes* грамнегативна, паличковидна, неспороутворююча бактерія, яка культивується на простих поживних середовищах (АМХ, МПА). Викликають ряд патологічних станів, таких як інфекції кровообігу, шкіри і м'яких тканин, дихальних шляхів і сечовивідних шляхів [80, 210].

Основними факторами вірулентності, якими володіє *Klebsiella pneumoniae* є: капсула (додатково – гіперкапсула в окремих штаммах, яку складає муковісцидний екзополісахаридний бактеріальний каркас, тому вона більш стійка, ніж типова капсула); сидерофори, які хелатують йони заліза. Залізо є обмеженим ресурсом для бактерій, яке необхідне для «процвітання» інфекції., таким сидерофором є ієрсиніабактин, кодований специфічними генами; пілі (фімбрії тип 1 – тонкі ниткоподібні виступи та тип 3 – спіралевидні нитки) – важливі медіатори адгезії; ліпополісахариди (ЛПС) – ендотоксин, який є необхідним компонентом клітинної стінки усіх грамнегативних мікроорганізмів, і складається з О антигена, олигосахаридного ядра и ліпиду А [205]. Можливо, завдяки використанню пристосувальних факторів, зокрема фімбрій, бактерії здатні протистояти хвилям перистальтики. Неосновними факторами вірулентності є системи транспортування заліза, гени, які використовуються для синтезу бета-лактамаз тощо [205]. Цікавим є те, що фактори вірулентності мікроорганізм застосовує не для нападу на організм, а для захисту від імунної системи [205] протидіючи інтерлейкіну та іншим імунним реакціям.

Вірулентні фактори *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* мало є вивчені. Але виявлено наявність генів у геномі бактерій, генетичні послідовності яких кодують стійкість мікроорганізмів до цефалоспоринів, інші генетичні послідовності визначають стійкість мікробів до бета-лактам [210]. Також зв'язок мультирезистентності до антибіотиків у деяких ізолятів *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* пов'язане з поринами, або так званими білками

зовнішньої мембрани, які підрозділяються на різні спеціалізації [181]. Бактерії виду *Escherichia coli* – грамнегативні, рухливі, неспороутворюючі палички, які викликають захворювання названі «колібактеріозами» у різних видів тварин, спричиняючи порушення роботи шлунково-кишкового тракту, що згодом може призвести до сепсису. Даний вид бактерій вражає переважно молодняк сільськогосподарських, декоративних тварин та дорослих бджіл [8, 167]. Ешеріхіози або колибактеріози у різних видів тварин характеризуються схожою клінічною картиною та симптоматикою [167]. Зокрема у дорослих бджіл з пониженою резистентністю спостерігають діарею, ослаблення сили бджолої сім'ї, септицемію та загибель [8]. Особливістю генетичного складу кишкової палички є мутагенні штами, які можуть спричиняти захворювання, тому існують такі патогенні серотипи: діареагенна кишкова паличка (DEC), уропатогенна кишкова паличка (UPEC), септикемічна кишкова паличка (SePEC), асоційована з новонародженим менінгітом кишкова паличка (NMEC) [167], які викликають захворювання різних систем та органів. *Escherichia coli* має широкі вірулентно-агресивні фактори, що допомагають виживати в умовах імуномодуляції макроорганізму. Серед адгезинів і факторів колонізації відомі три різні класи, які становлять фімбрії (4 типи), фібрили, кучері, зовнішні мембранні білки (OMP), такі як інтимін (забезпечує пошкодження та руйнування еритроцитів) [167]. Усі адгезини забезпечують прикріплення та локалізацію збудника у певному місці організму господаря, наприклад, SePEC та EPEC є кодованими хромосомними генами, дозволяють бактерії продукувати кучері, які, у свою чергу, забезпечують приєднання бактерії до позаклітинного матриксу слизової оболонки, утворюючи біоплівки, після руйнування та ослаблення епітелію [167]. Не менш важливу роль у приєднанні бактерій до живих організмів грають мембранні протеїни [167]. Більшість з них забезпечує рецептивну роль для вторгнення до цитоплазматичної мембрани

еритроцитів хазяїна, спричиняючи їх лізис [167]. Колібактерії, окрім капсульних антигенів та адгезинів, володіють патогенними екзотоксинами: 1. олігопептидні токсини – шляхом активації внутрішньоклітинного скелету, забезпечують непряме втручання в метаболізм еукаріотичних клітин; 2. токсини АВ – після ендоцитозу, забезпечують пряме втручання в метаболізм еукаріотичних клітин; 3. ферментативні та RTX пороутворюючі цитолізени – руйнують цитоплазматичну мембрану еукаріотичних клітин [167]. Таким чином умовно-патогенні бактерії родини *Enterobacteriaceae* володіють широким спектром вірулентних факторів, які успішно активуються при виникненні наданні сприятливих умов у кишечнику низькорезистентних бджолиних сім'ях.

Тому сукупність мультирезистентно-вірулентних факторів бактерій, які належать до родини *Enterobacteriaceae* та зокрема до видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, можуть свідчити про можливість зумовлювати ентеробактеріози у високопродуктивних порід чи ліній бджіл, які не мають високорезистентних захищених властивостей. Вірулентність збудників при розвитку і прояву хвороби підвищується, що зумовлює захворювання інших порід, які мали високовірулентні захисні властивості до умовно-патогенної мікрофлори.

1.2 Особливості культивування та ідентифікації збудників ентеробактеріозів бджіл

Зв'язок між мікроорганізмами та етіологічним чинникам будь - якого інфекційного захворювання відображається виділенням, культивуванням, ізоляцією та ідентифікацією патогенних мікробів. Ідентифікація бактерій є актуальною сферою досліджень, оскільки виявлення інфекційного агента певного захворювання є корисною для різних галузей, як для ветеринарної так і для гуманної медицини [206]. Для розробки ефективного лікування, яке

точно може впливати на збудник, важливим є виділення чистої культури. Відомий дослідник Роберт Кох відмічав, що виділення ізольованої культури бактерій одного виду є фундаментом для всіх досліджень в галузі інфекційних захворювань [138]. Для проведення молекулярно-генетичного аналізу послідовності генів у певному геномі мікробів першим і основним кроком є виділення типових колоній мікроорганізмів. Виявлення збудників нових захворювань бджіл наразі затруднене, так як бджола має невеликий розмір і виділити достатню кількість патологічного матеріалу досить важко [176]. Нові ентеробактеріози бджіл викликані високим титром бактерій видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* у середній кишці бджіл [100], як і будь-яка бактеріальна інфекція, вимагає підтвердження діагнозу шляхом проведення культивування та ідентифікації ентеробактерій даних видів.

Чотири основні елементи, які визначають ріст бактерій будь-якого виду включають: *вибір поживного середовища, температури, часу інкубації та атмосфери (кисневе та безкисневе середовище)* [143, 288]. Іншим важливим пунктом для забезпечення ефективного культивування мікроорганізмів є дотримання вимог до часу збору і транспортування в лабораторію патматеріалу, наприклад, використання неефективного пробовідбірника може призвести до неправильної ідентифікації патогенів [143]. Неселективні поживні середовища не мають у своєму складі інгібуючих елементів, тому вони можуть забезпечувати ріст більшості мікроорганізмів [143]. Основними компонентами таких середовищ є м'ясні настійки або екстракти серця та мозку, дріжджові екстракти залишаються одними з основних компонентів деяких культуральних засобів [143]. Як поживні добавки використовують пептони, які є продуктами ферментативного гідролізу білків [143]. Опис бактеріальних видів у культурах можливий при використанні твердих культуральних середовищ, які створені за допомогою желатину, агару, чи

коагульованих яєць, як при культивуванні мікобактерій у середовищі Левенштейна-Єнсена [143]. Для забезпечення росту вибагливих мікроорганізмів, використовують збагаченні кров'ю агарові середовища (ріст анаеробних мікроорганізмів) [143]. Проблемою клінічної ветеринарної мікробіології є виділення певного виду мікроорганізмів з поживного середовища, саме з цією ціллю застосовують селективні поживні середовища. У якості інгібіторів грампозитивних бактерій використовують дезоксихолічні кислоти, солі жовчних кислот, а використання кристалічної фіалки призводить до припинення росту грампозитивної мікрофлори [48]. Для культивування ентеритних бацил (кишкових паличок) застосування вісмут сульфід агару дозволяє інгібувати більшу частину грампозитивних та грамнегативних коменсалів завдяки наявності вісмуту у складі середовища [254].

Стафілококи мають здатність рости в середовищах з високою концентрацією NaCl (7,5%), тому для їх культивування застосовують агар Чампена [143]. До складу селективних середовищ можуть входити антибіотики та антисептики. Антибіотики використовуються, наприклад, для вирощування мікобактерій, а антисептики, такі як бромокрезол фіолетовий раніше використовувався для відбору ентеробактерій у різних санітарно-лабораторних дослідженнях [143]. Для культивування ентеробактерій універсальними є такі поживні середовища: середовище Левіна, агар Ендо, бактоагар Плоскірева, гліцериновий бульйон, середовища Левенштейна-Єнсена, Петрова, Петран'яні, цитратна кров, ацетатний агар, вісмут-сульфід агар, малонат агар, середовище Кітта-Тароцці, лактобакагар тощо [41]. Один з важливих факторів культивування є підтримання адаптивної для росту мікроорганізмів температури та атмосфери – ана- чи аеробної. Більшість досліджених мікроорганізмів є мезофільними видами, які ростуть за температур від +25°C до +45°C [143], так, оптимальною температурою для

росту ентеробактерій є від +36 до +38°C [32]. Наприклад, для культивування строго анаеробних мікроорганізмів необхідне використання спеціальних бактеріологічних методів, які можуть передбачати застосування складних поживних середовищ, які містять багато додаткових адаптогенів для їх росту [60]. Факторами росту поживних середовищ для культивування анаеробних мікроорганізмів є рідини, які містять леткі жирні кислоти та гем (дріжджовий екстракт, пептон, казитон, кислоти казаміно тощо) [143]. Іноді середовище модифіковане стерилізованим екстрактом калу, для того, щоб забезпечити вищий відсоток відновлення анаеробів [143]. Деякі лабораторії застосовують спеціальні інкубаційні системи для підвищення здатності до культивування анаеробів (анаеробні камери та анаеробні банки) [60]. Метод використання анаеробної камери найбільш ефективний спосіб забезпечення життєздатності анаеробних організмів, який не вимагає спеціальної підготовки, є недорогим і використовується як в дослідних, так і в клінічних лабораторіях [143]. Іншим важливим аспектом культивування мікроорганізмів, зокрема ентеробактерій, є час інкубації. Так, 24-48 годин – час протягом якого інкубуються більшість клінічних хвороботворних мікроорганізмів, але існують і винятки, наприклад *Helicobacter pylori* – росте близько 5 діб, *Bartonella species* – 14 діб, *Legionella pneumophila* – 3 доби, *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* – 18-24 години [100, 143, 162]. Тому культури анаеробних мікроорганізмів повинні інкубуватися принаймні 5 діб [143]. Інокуляція сприятливим тваринам - ще один метод культивування збудників. Але такий метод дорогий, трудомісткий, складний і застосовується тільки в спеціалізованих лабораторіях, так як кожен вид бактерії специфічний для певного виду тварини, тому вони відбираються [143].

Наступним кроком після культивування та виділення чистих культур на спеціальних поживних середовищах є ідентифікація мікроорганізмів. У 2018 році групою іранських вчених були ізольовані та ідентифіковані

лактобактерії *Lactobacillus*, які були виявлені в шлунково-кишковому тракті карликової медоносної бджоли *Apis florea Fabricius* [209]. Для виділення лактобактерій застосовують спеціальне поживне середовище MRS [172]. Після культивування для попереднього скринінгу мікроскопують типові колонії, застосовуючи фарбування методом Грама [209]. Після виділення ДНК бактерій методом, модифікованого Ward L. J. (1994) [272] та Parichehreh S. (2018) [209] проводять ПЛР-діагностику, секвенування генетичного матеріалу та філогенетичний аналіз матеріалу, у результаті виявлення певної кількості фенотипів визначають види, які можуть формувати окрему групу, яка за генетичними ознаками і формує роду та видову приналежність мікроорганізмів. Деякі дослідники для ідентифікування ентеробактерій, після культивування на селективних поживних середовищах та мікроскопії, застосовують біохімічні методи за допомогою системи біохімічного набору API-20E (Bio-Mérieux) та ручних біохімічних тестів згідно інструкції від виробника, за сукупністю культуральних, морфологічних та біохімічних ознак відносять мікроорганізми до певного таксономічного виду [172]. Ще один цікавий метод ідентифікації мікроорганізмів у складних зразках передбачає застосування комбінованої (Раман) спектроскопії [206]. Рамановська спектроскопія передбачає використання ефекту розсіяного лазерного світла при взаємодії із зразком [158, 287]. Але застосування даного методу ефективно лише у тому випадку, якщо досліджувані мікроорганізми фактично доступні для спектроскопії, і зразок не містить будь-яких забруднюючих речовин [172]. У гуманній медицині для ідентифікації ентеробактерій видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* застосовують немолекулярні тести (модифікований тест Ходжа, тести засновані на інгібуванні тазобаком, за допомогою УФ-випромінювання – спектрофотометр (має 100% чутливість) [18 199], тест Carba NP9 – забезпечує 100% чутливість) [199]; молекулярно-генетичні тести (одиначна,

або мультиплексна ПЛР-діагностика – дає результат через 4-6 годин) [73]; скринінг колонізованих пацієнтів [199]. В основному ідентифікація направлена на виявлення карбапенем-гідролізуючих бета-лактамаз, які гідролізують майже всі бета-лактамі антибіотики, що затрудняє терапію хворих [199]. Проблема полягає у кодуванні цих лактамаз плазмідною, що дозволяє передачу здатності резистентності до антибіотиків ентеробактеріальними видами мікроорганізмів [199]. На даний час ідентифікацію здійснюють поетапно: 1. Виявлення ізолятів бактерій в інфікованих зразках патологічного матеріалу; 2. Біохімічне виявлення карбапенемаз-синтезуючих штамів; 3. Молекулярні методи (за необхідності) - скринінг ректальних мазків на селективних поживних середовищах (хромогенне середовище SUPERCARBA) [199]. Широко розповсюджена диференціація різних видів ентеробактерій, наприклад, застосування секвенування клінічного ізоляту використовують при диференціюванні *Klebsiella variicola* від *Klebsiella pneumoniae* [109]. При ідентифікації *Klebsiella pneumoniae*, окрім виявлення здатності продукувати карбапенемазу, визначають наявність у геномі капсульного антигену, так як полісахаридна капсула є основним детермінантом вірулентності [274]. Для визначення локусу капсульного синтезу (К-локусів) застосовують методи аналізування кластерного кодування білків та аналіз послідовностей нуклеотидів К-локусу, за допомогою системи ПЛР [274]. А для ідентифікації *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* використовують бактеріофаг phiEap-2, який здатний до лізису мультирезистентного *E. aerogenes 3-SP* [274].

Методи культивування та ідентифікації бактерій, зокрема ентеробактерій, у світі є досить різноманітні – від культивування на селективних поживних середовищах та застосування ручного біохімічного типування, до молекулярно-генетичних процесів секвенування нуклеотидних послідовностей у геномі мікроорганізмів. Завдяки аналізу сукупності різних

методик можливо встановити єдину систему ідентифікації та культивування ентеробактерій, які спричиняють бджолині дисбіози.

1.3 Діагностика ентеробактеріозів у бджіл

Постійно виникаючі інфекційні захворювання звертають увагу на першочергову значимість правильної постановки діагнозу. Заразні патології вимагають швидкої реакції від лікаря, своєчасна та правильна діагностика може бути критичною для цілої групи чи популяції тварин. Діагностика будь-якого бактеріального захворювання є комплексною, тобто передбачає збір анамнезу, аналіз епізоотологічних даних, клінічних ознак та відбір патологічного матеріалу для лабораторної діагностики [100].

Наприклад, для діагностики тонкокишкового бактеріального надлишкового росту у гуманній медицині звертають увагу на розвиток та специфічність клінічних ознак [213, 235]. Причому, симптоматика ентеробактеріозів у людей, декоративних, продуктивних тварин і комах є аналогічною [100, 235, 255]. Наприклад, у людей зазвичай відмічають діарею, біль у епігастральній ділянці, нудоту та здуття живота [235]; у собак та котів – анорексію, діарею та пригнічений стан, причому, у молодих собак-боксерів (зазвичай віком до 4 років) виявлена генетична сприйнятливність до даних кишечних порушень [255]; у бджіл, за ураженнями ентеробактерій, відмічають велику кількість підмору, ослабленість бджолиних сімей, масові діареї та потовщене, забруднене фекаліями черевце, також звертають увагу на розплід, який стає нерівномірним [99].

Відбір проб передбачає наступний етап у діагностуванні дисбактеріозів. При підозрі на бактеріальні захворювання бджіл, спричинені ентеробактеріями, для лабораторних досліджень патологічний матеріал (від кожної хворої сім'ї по 50 хворих бджіл, живих – у скляному посуді з отворами для дихання, мертвих – у паперових пакетах; частину стільника

розміром 10 см на 15 см з ураженим розплодом, забрудненого фекаліями; змиви з 5 контрольних точок стільника) та супровідну направляють у ветеринарну лабораторію [3]. У ветеринарних лабораторіях візуально оцінюють стан стільників та підмору, оглядають бджіл під лупою, далі проводять діагностичний розтин бджіл, мікроскопують нативні мазки, висівають бактеріологічні суспензії на загальних, а потім селективних поживних середовищах, вивчають культурально-біохімічні властивості збудника, за необхідності проводять серодіагностику та біопробу, максимальний термін лабораторної діагностики становить 7 діб [3, 5]. Проводячи паралель між діагностичними критеріями у ветеринарній та гуманній медицині, відмічено застосування інвазивних та неінвазивних (не передбачене використання ендоскопії) методів діагностики. Наприклад, при постановці діагнозу на гастродуоденальний гастрит, спричинений спіралеподібною грамнегативною бактерією виду *Helicobacter pylori*, локалізація якого спостерігається у пілоричній частині шлунка та дванадцятипалої кишки [271].

Інвазивні методи: 1. Ендоскопія – метод, який використовують для взяття біосії живої тканини з організму для подальших досліджень, але за деяких захворювань біоскопічні дослідження малоінформативні, наприклад, розподіл деяких видів мікроорганізмів у шлунку чи кишечнику пацієнта є нерівномірним [134, 271]; 2. Гістологія – найкращий метод для виявлення багатьох бактеріальних інфекцій шлунково-кишкового тракту як людини, так і тварини [152, 255]. Недоліком даного методу є неточність фарбування гістологічних зразків, що може призвести до хибно позитивних, позитивних та негативних результатів, іншим мінусом є висока вартість реагентів для проведення високочутливої специфічної щодо збудника гістології. Наприклад, для визначення пептидної нуклеїнової кислоти *Helicobacter pylori* застосовують флуоресцентну гібридизацію - (PNA-FISH), яка є економічно

затратно [152]. 3. Застосування експрес-тестів на уреазу – не дорогий, легкий у використанні, досить специфічний, щодо певного збудника біохімічний метод дослідження, застосовується для діагностики захворювань, викликаних бактеріями, у яких цей фермент є активний (*Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*) [271]. 4. Використання ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) – широко розповсюджений метод, який є найбільш точним, так як виявляє генетичні фрагменти ДНК чи РНК досліджуваного виду бактерії. Відоме широке застосування цього методу для виявлення генетичних фрагментів *Helicobacter pylori* у зразках біопсії зі шлунка, слини, фекалій, шлункового соку [134, 271]. Метод є специфічним, точним, чутливим, але високовартісним та потребує спеціально навченого персоналу. Неінвазивні тести: 1. Тест на дихання сечовини – заснований на гідролізації у шлунку міченого CO₂, попередньо наданого пацієнту у вигляді міченої ¹³C- або ¹⁴C сечовини, мічений CO₂ всмоктуючись у кров'яне русло видихується пацієнтом, що можливо виміряти [268]; 2. Тест на антигени у фекаліях – виявляє наявність антигену досліджуваного мікроорганізму у зразку фекалій [139]. Для визначення антигенів у біоматеріалі застосовують імуноферментний аналіз (ІФА) або імунохроматографічний аналіз (ІХА) використовуючи моно- чи поліклональні антитіла [134, 271]; 3. Тести на дослідження антитіл (серодіагностика (IgG, IgA)) – зазвичай використовуються для моніторингових досліджень, так як є доступними та відносно недорогими [85, 139, 271]. Використання такого методу залежить від реагентів (певний штам досліджуваного організму, який слугує антигеном, використання нових маркерів для серологічної діагностики інфекції, наприклад, К-антиген для діагностики клебсієлозу [269], які забезпечили б 100% чутливість [271]. Необхідно відмітити, що використання серодіагностики не є специфічним методом для виявлення ефекту лікування, так як рівень антитіл у сироватці крові може зберігатись ще довгий час після

проведення терапевтичних заходів [169, 271]. Наразі у ветеринарній медицині стандартними методами оцінки кишкових дисбактеріозів у собак і кішок є молекулярні методи, але ці підходи поки малодоступні для повсякденного діагностування [255]. Удосконалення методів діагностики у ветеринарії полягає у поєднанні молекулярних інструментів, що включатиме ПЛР ампліфікацію генів 16S рРНК з використанням універсальних бактеріальних праймерів з подальшим кількісним визначенням специфічних таксонів методом кількісної ПЛР і використанням методу флюоресценції для візуалізації транслокації бактерій в слизовий оболонці кишкового епітелію [255]. Дисбактеріози кишечника у собак і котів діагностують методами, які є аналогічними до методик використаних у гуманній медицині: шляхом аналізу кількісного-якісного складу мікробіоти виділеної з калу тварин, які мають диспепсичні клінічні ознаки. Також проводять серодіагностичні тести сироватки крові та ПЛР виявляють генетичні складові певних видів бактерій [248, 255]. Діагностика ентеробактеріозів тварин знаходиться ще на ранній стадії методологічного розвитку, яку необхідно удосконалювати, так як нещодавні дослідження чітко характеризують зв'язок дисбіозів із низкою сукупністю патологічних ускладнень у тварин та людей.

1.4 Застосування ветеринарних препаратів за ентеробактеріозів бджіл для санації бджолиних сімей, вуликів, інвентарю

Санація бджолиних вуликів та пасічного інвентарю грає надзвичайно важливу роль у бджільництві, що у свою чергу передуює правильному вибору методу та засобу для дезінфекції, так як вони впливають на продуктивність усієї пасіки [100]. Мікробні, вірусні та паразитарні патогени постійно чинять інфекційний тиск на бджолині колонії [265]. Інфекційні агенти накопичуються в знаряддях праці пасічників, на стінках вуликів, у рамках в неблагополучних районах із захворюваннями бджіл. Зокрема, при

дисбактеріозах, коли збудники виділяються з організму інфекційно-активних комах з фекальними масами [40, 100, 265]. Наприклад, опортуністичний патоген *Klebsiella pneumoniae* здатна до продукування біоплівки, що забезпечує її розповсюдження на пасіці, локалізуючись у вуликах, інвентарі тощо [157]. Тому проведення попередньої (перед завезенням нових бджолосімей, інвентарю з інших пасік, тощо), профілактичної (один раз навесні після зимівлі), вимушеної (ліквідація епізоотичного осередку), поточної та заключної дезінфекції на пасіці є важливим етапом у профілактиці кишкових бактеріальних бджолиних інфекцій [8, 11]. Причому, незалежно від форми власності пасіки, фіксування її ветеринарно-санітарного стану у ветеринарно-санітарному паспорті є обов'язковим [8]. Таким чином дезінфекція сприяє профілактиці поширенню та виникненню захворювань у бджолиних колоніях. Санація, або очищення бджолиних сімей, вуликів, інвентарю може здійснюватися декількома методами: механічний (передбачає видалення механічних забруднювачів), фізичний (УФ-випромінювання, кип'ятіння тощо), хімічний (застосування дезінфікуючих речовин для знищення інфекційних мікроорганізмів) та комбіновані методи [8]. Зазвичай здійснюють комбіновану дезінфекцію у декілька етапів: механічна очистка – видалення забруднення з дна вулика, поверхонь стін, рамок тощо; власне дезінфекція – застосування дезінфікуючих засобів для остаточної обробки поверхонь та знищення збудників [40]. У 2018 році проведені дослідження щодо дії дезінфікуючого ветеринарного засобу нового покоління «Біоконтакт плюс», який містить глутаровий альдегід, гліоксалевої альдегід, формальдегід, четвертинні амонієві солі, триаміно, туманотвірних компоненти, воду до бактеріальних мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* [40]. Результатом лабораторних досліджень є прояв бактерицидно-високої чутливості дезінфектанту до ентеробактерій у концентраціях 1-2% [40], що активно застосовується на пасіках [5].

Ефективним є застосування дезінфектанту йодофору *in vitro*, використовуючи пероральну ін'єкцію та тесту на токсичність [265]. Після діагностики меду з вуликів, оброблених дезінфектантом, встановлена аналогічна контрольним пробам кількість йоду з досліджуваних зразків. Також не була встановлена оральна і контактна токсичність йодофори для бджіл, що свідчить про можливість використання дезрозчину на пасіках [265]. Широке застосування для санації вуликів, інвентарю та інших бджолиних приладів при ентеробактеріозах та інших бактеріальних чи вірусних захворюваннях мають водні розчини окислювачів (пергідроль, однохлористий йод, хлорамін тощо), які можливо активізувати за рахунок додавання певних кількостей лугів, кислот (мурашину або оцтову кислоту додають до розчинів формаліну) та дією різних температурних режимів (зменшення експозиції та збільшення ефективності знезараження виявляють за підняття температурного стану розчинів), причому температура навколишнього середовища має бути не нижче 10 градусів [8, 38]. Зазвичай санація здійснюється шляхом зрошення або замочування інвентарю та інших бджолиних приналежностей [38]. Вітчизняні автори відмічають високу ефективність використання газів, а саме суміші окису етилену і бромистого метилу, парів оцтової кислоти, формальдегіду та сірчаного газу [8, 38]. Досліджуючи порівняльну ефективність препаратів «ВетОкс 1000», «Бровадез 10» виробництва НПФ «Бровафарма» і розчинів перекису водню, встановлені антибактеріальні переваги даних засобів, що підтверджує можливість їх використання для дезінфекції інвентарю, стільників, вуликів тощо [8, 38]. Іншим цікавим дезінфекційним засобом, який набирає все ширшого поширення є використання озону або його застосування при технології виготовлення розчинів, які згодом використовуються для дезінфекції та санації [160]. Озон (алотропна форма кисню) має сильну окислювальну здатність, та на відміну від водних дезінфектантів, може легко дифундувати та поширюватись по

багатьох типах поверхонь. Часто його використовують як знезаражуючий засіб у медицині, харчовій промисловості та був перевірений як знезаражувач вуликів (усунення патогенних мікроорганізмів, які можуть зберігатися роками на обладнанні та у вуликах [129, 130, 160]. Ефективність озону полягає у екологічній безпечності, так як він не залишає будь-яких залишків після використання, так як після застосування озону він генерується у O_2 [129]. Механізм дії цієї алотропної речовини полягає у здатності ставати природним окисником та діяти як біоцид (здатність вбивати мікроби, спори тощо), після відокремлення атомів під час електричного розряду [231]. Іноді для боротьби з патогенною мікрофлорою, зокрема ентеробактеріями, використовують спектр електромагнітного короткохвильового випромінювання, один з фізичних методів дезінфекції – ультрафіолетове випромінювання (УФ) [231]. Перевагою даного методу є ураження електромагнітними хвилями живих клітин, причому, головною мішенню ураження мікроорганізмів є їх генетичний матеріал (зокрема ДНК), що не впливає на хімічний стан, як при використанні хімічних дезінфектантів [231]. При застосуванні фізичних методів дезінфекції перевагу мають напівпровідникові світлодіоди в діапазоні 250-275 нм, що гарантує стерилізацію будь-яких поверхонь, та спричиняє деструкцію ДНК і РНК у мікроорганізмів [231]. Питання санації та дезінфекції бджолиних сімей, вуликів, інвентарю при дисбактеріозах є відкритим. Пошук нових деззасобів є затратним та довготривалим процесом, що потребує практично-теоретичного-специфічного спрямування на етіологічний фактор захворювання.

1.5 Проведення лікувальної та профілактичної обробок за ентеробактеріозів бджіл

Apis mellifera страждає від численних захворювань, у тому числі від ентеробактеріозів (дисбіозів), які вивчені недостатньо. Лікувати хвороби бджіл, викликані бактеріями, досить важко [259], так як антибіотик терапія заборонена. Дослідження деяких вчених виявляють дієвість антибіотикотерпії у вигляді енрофлосаціна [190, 191]. Результати дослідження виявляють зниження концентрації патогенних бактерій у травному тракті бджіл [190, 191], але лікування антибіотиками негативно впливає на якість меду, тому такі методи не мають популярності. У гуманній медицині застосування антибіотиків є спірним питанням, так як вони негативно впливають на деякі спектри здоров'я пацієнта, але знаючи генетичні локуси у геномі бактерій – білки, які кодують ці гени, застосування таких препаратів відносно конкретних видів мікробів можуть бути широко ефективними [51]. При дисбактеріозах шлунково-кишкового тракту, лікуванні синдрому роздратованого кишечника, запалення кишечника і раку товстої кишки людей та тварин [83] широкого застосування зазнала антагоністична пробіотикотерапія [84]. Пробиотики являють собою популяцію живих мікроорганізмів, які чинять сприятливий вплив на господаря при прийомі достатніх доз [64]. Прийом пробіотичних препаратів (таблетки біфідобактерій, тетрагенетичних життєздатних бактерій) відновлює кишкову мікробіоту, зменшує побічні ефекти від лікування іншими хіміотерапевтичними засобами, та різко скорочує популяцію патогенних мікроорганізмів [84]. Окрім пробіотиків застосуються також антибіотики, які мають прямий вплив на мікроорганізми кишківника, фекальні мікробні трансплантації, як новий метод, широко застосовуються у гуманній медицині (застосування замороженого посівного матеріалу у вигляді пероральних капсул, які застосовують без явних побічних ефектів

[281], створюючи симбіотичне втручання та стимулюючи імунну систему господаря з посиленням функцій кишкового бар'єру через епітеліальні клітини господаря [83, 244]. У деяких дослідженнях відмічена тимчасова заселеність кишечника лактобактеріями після застосування пробіотиків [83, 115]. Ще одним недоліком використання пробіотиків є визначення точної дози, яка дозволить дістатись саме тим, потрібним мікроорганізмам до кінцевих мішеней, наприклад, щоб дістатись до товстого кишечника перорально прийнятому пробіотику необхідно пройти важкі умови у шлунку та кишечника. Крім того, більшість живих мікробів, які є у складі пробіотики походять з кишечника (лактобактерії, біфідобактерії та ешерихії тощо). Можливо штами могли втратити адаптацію, так як вирощені лабораторно, до умов середовища кишечника [83]. Широко використовують лікування пробіотиками і у ветеринарній медицині [110].

Наприклад, використання пробіотиків для підкормки аквакультури сприяє зменшенню рівню стресу і підвищенню продуктивності [184]. Для проведення лікувальної та профілактичної обробок при ентеробактеріозах бджіл також ефективним є використання пробіотиків [34, 264]. Вважається, що використання пробіотичних засобів у бджільництві призводить до стимулювання імунобіологічної реактивності організму, нормалізації мікробіоценоза кишківника та поліпшення кількісно-якісного складу мікробіоти шляхом антагоністичної активності щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів [33, 43, 264]. Деякі автори зазначають, що комерційні пробіотики, які є штучно синтезовані – не приживаються у бджолиному організмі. Натомість, їх експерименти показують, що культивовані штами місцевих бактерій бджолиного кишечника колонізуються в кишечнику бджоли і позитивно на нього впливають [190]. Інші вчені провели експериментальні дослідження щодо впливу пребіотиків та пробіотиків на медоносних бджіл (*Apis mellifera*), заражених

мікроспоридійним паразитом *Nosema ceranae* [62]. Результати досліджень виявили, що камедь акації сприяла зниженню кількості спор *Nosema ceranae* (67%), але і значно підвищила смертність бджіл (62,2%) [62]. А при застосуванні багаторазових доз 2,50 мг/мл «Vetafarm probiotic» реєстрували значне зменшення кількості спор [62]. Смертність також значно знижувалася при застосуванні 1,25 мг/мл концентрату протексину [62]. Практикується комплексна обробка бджолосімей пре- і пробіотиками, наприклад, поєднане використання молочної кислоти та пробіотика сприяє кращому розвитку воскових клітин бджіл [211]. Кормова добавка з пробіотичною дією Біосевен, виготовлена на підприємстві БТУ-Центр, у складі вуглеводної обробки бджолиних колоній, подовжує життя бджіл та знижує калове навантаження [33].

Деякі засоби активно застосовується при кишкових бактеріальних інфекціях бджіл, має згубний вплив на патогенні мікроби кишківника комахи [34, 187]. Останнім часом широко застосовується зазнає ветеринарний пробіотичний препарат Ентеронормін, який є комплексом симбіозу корисних бактерій різних видів [34]. Препарат сприяє формуванню нормальної мікрофлори, має імуностимулюючі властивості, підвищує продуктивність сімей та антагонізує щодо патогенної мікрофлори [34]. Даним препаратом проводять обробки у різні пори року з профілактичною та лікувальною метою [34]. Дослідження вчених свідчать, що на кишкову мікробіоту комах, включаючи медових бджіл, діють пробіотичні мікроорганізми [275]. Аналізи досліджень *in vivo* виявили зниження смертності личинок медоносної бджоли [273]. Препарати, які містять у своєму складі живі активні мікроорганізми використовують не лише при лікуванні та профілактиці ентеробактеріозів, але і при інших захворюваннях бджіл, таких як нозематоз та європейський гнилець бджіл [76, 221, 222]. Серед зарубіжних фахівців активно використовують пробіотичний препарат BioPatty – розроблений кандидатом

наук Брендан Дейслі і його колегами (2020) [76]. Обробка вуликів даним препаратом при ураженні бджолосімей американським гнильцем, продемонструвала зниження навантаження даними патогенами та підвищення протеолітичної активності личинок медоносних бджіл. Бактерії видів *Lactobacillus plantarum* Lp39, *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 *rhamnosus* GR-1 та *Lactobacillus kunkeei* BR-1, які містяться у складі препарату покращують виживання бджіл [76]. Більшість пробіотичних препаратів містять лактобактерії у своєму складі, які зазвичай проявляють позитивний вплив [10], але така дія повинна бути максимально точно підтверджена певною концентрацією таких бактерій. Проведені дослідження щодо впливу пробіотиків хребетних на мікробіоту дріжджів виділених з бджіл, де були застосовані рекомендовані у бджільництві пробіотики двох складів: 1. *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae* та *Rhodopseudomonas palustris*; 2. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* та *Bifidobacterium bifidum*, встановили обережність використання лактовмісних препаратів, так як у кишківнику комах поширюється неконтрольований ріст лактобактерій, що призводить до підвищення кислотності у середній кишці та підвищення рівню лізоциму [221]. Таким чином додавання лактобактерій до дієтичних добавок та кормова обробка такою добавкою бджолосімей повинно застосовуватись з деякою обережністю. Тому для створення гомеостатичного балансу між організмом бджоли і її кишковою мікробіотою, забезпечення сприятливих умов процвітання симбіотичних мікроорганізмів, позитивним є використання імуностимулюючих пробіотичних препаратів.

Висновки до Розділу 1

1. Дисбактеріози людей та тварин становлять потенційну новинку для інфекціоністів та терапевтів, так як існують численні кореляції між

сприятливістю живих організмів до ентеробактеріозів та зміною складу мікробіоти кишківника.

2. Так як *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* є опортуністичними патогенами, то профілактика бджолиних дисбіозів має ґрунтуватись на підтримці та стимуляції імунного статусу комах.

3. Особливості ідентифікації збудників ентеробактеріозів ґрунтуються на використанні немолекулярних тестів, молекулярних тестів для виявлення генів карбапенемаз, молекулярного типування для виявлення геномних локусів капсульного антигену та скринінгу колонізованих пацієнтів, що у сукупності становить підґрунтя для створення алгоритмів застосування нових методик у бджільництві.

4. Діагностика шлунково-кишкових бактеріальних захворювань є комплексною, і передбачає використання інвазивних та неінвазивних клініко-діагностичних методів, що може слугувати матеріалом для створення алгоритму удосконаленої діагностики ентеробактеріозів у бджільництві.

5. Особливості санації бджолиних сімей, вуликів та інвентарю становлять відкриту проблему у бджільництві. Пошук та створення альтернативних, економічних та екологічних дезінфікуючих засобів, які можна використовувати у присутності бджіл, наразі є пріоритетом.

6. Пробіотикотерапія – новий перспективний метод у лікуванні та профілактиці дизбактеріозів тварин та людей. Антагоністична конкуренція пробіотичних та патогенних мікроорганізмів кишківника бджіл служить альтернативним способом до заміни застосування антибактеріальних препаратів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Дисертаційне дослідження містить результати щодо удосконалення методів профілактики проблеми дисбактеріозів (ентеробактеріозів) бджолиних сімей. Наукову роботу було виконано протягом 2019 – 2022 років з метою проведення епізоотичного моніторингу ентеробактеріозів бджіл та розробки оптимальної лікувально-профілактичної схеми за даної патології. Дослідження були виконані в умовах навчальної лабораторії кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології та навчально-науково-клініко-діагностичної лабораторії кафедри внутрішньої патології, акушерства, хірургії і фізіології Поліського національного університету. Виділення та ідентифікацію патогенних ентеробактерій бджіл було проведено у «Житомирській регіональній державній лабораторії Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів» (Додаток Н) та Державній установі «Житомирський обласний лабораторний центр міністерства охорони здоров'я України» (Додаток О). Виділення та ідентифікацію бактерій-антагоністів виду *Bacillus subtilis* щодо патогенних бактерій бджіл виду *Klebsiella pneumoniae* проводили в умовах навчальної лабораторії кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології Поліського національного університету та Державної установи «Житомирський обласний лабораторний центр міністерства охорони здоров'я України» (Додаток П). Польові дослідження проведені на приватних бджологосподарствах Хмельницької області (с. Новоселиця), Житомирського та Бердичівського районів, Житомирської області (ФОП Застулка М. В., с. Вереси; Савіна О. А. ПП «Райгородське», с. Райгородок).

Наукові дослідження проводили поетапно, що представлено на рис 2.1.

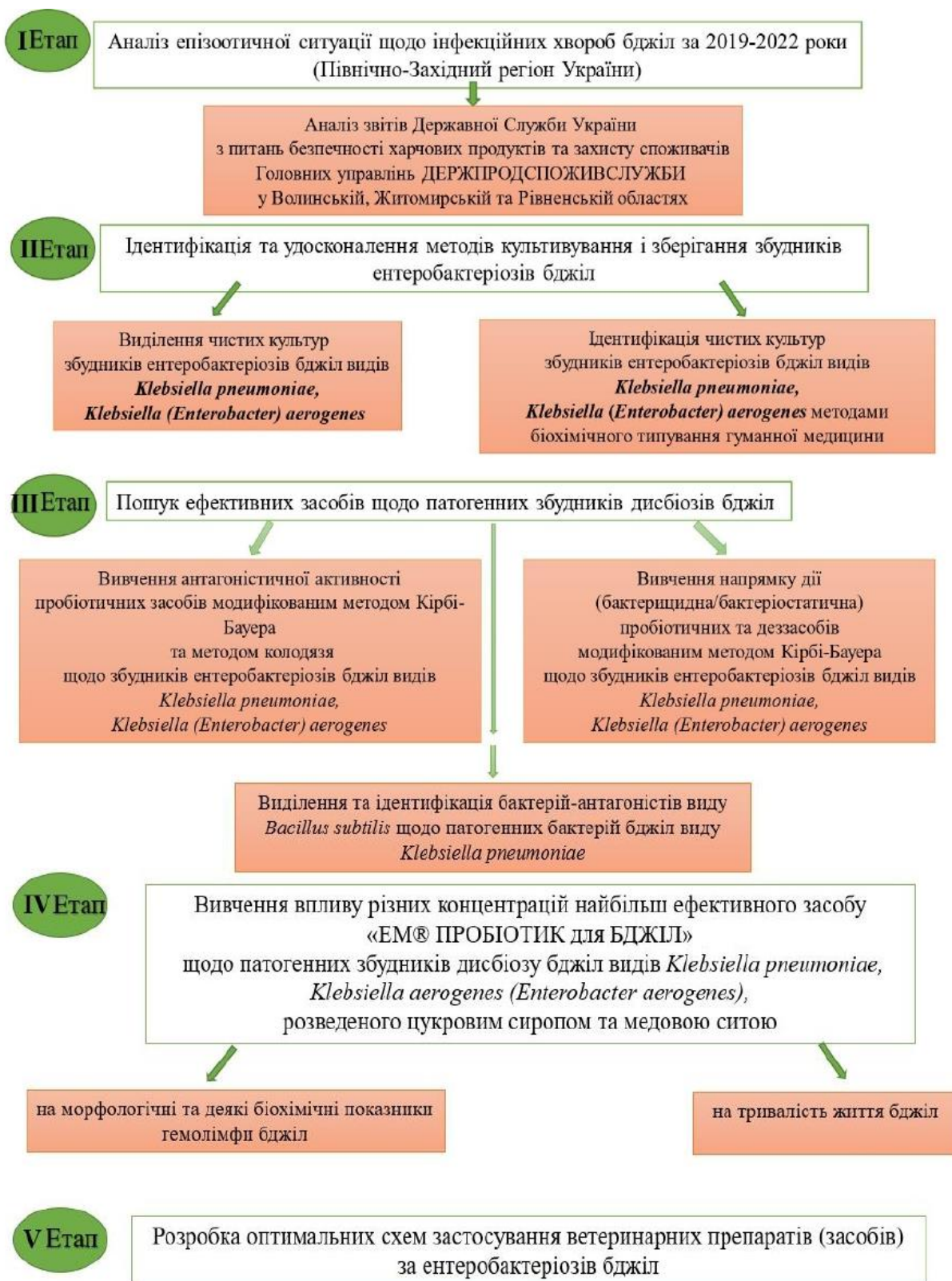


Рис. 2.1. Поетапна схема проведення дисертаційного дослідження

2.1 Матеріали для виконання роботи

Матеріалами для виконання роботи слугували:

1. Бджолосім'ї з пасіки ФОП Застулка М. В., с. Вереси, Житомирської області, Житомирського району (*Додаток Р – С*).
2. Змішана мікробна асоціація відібрана з вуликів приватних пасік Житомирської та Хмельницької областей;
3. Мікробні бактеріальні культури клітин відібрані від бджолосімей, які мали клінічні прояви дисбактеріозів (ентеробактеріозів) з приватних пасік м. Житомира, Житомирської області - м. Черняхів; Житомирського району, с. Вереси, с. Тетерівка; Романівського району, с. Прутівка; Хмельницької області, м. Полонне, Київської області, м. Біла Церква [40].

Пробіотик «Ентеронормін з Йодіс + Se» («Ентеронормін») (склад: живі культури корисних мікроорганізмів, роду *Lactobacillus spp*, *Enterococcus spp* і бактерій *Bacillus subtilis spp.*, хітозан водорозчинний, а також пептони) [14], експериментальний дезінфектант «Йодіс Дез №2» (до складу входить атомарний йод та біологічно активний елемент Se) та зразок розчину цитрату міді та цитрату срібла надані ТОВ «СГП «МБС»» м. Обухів-4, Київської області [36]. «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» (склад: ефективні мікроорганізми[®] (молочнокислі бактерії, фототрофні бактерії, дріжджі, патока цукрової тростини, вода) надані ТОВ «ЕМ Україна» м. Кіровоград [13]. Мед для проведення досліджень (липовий, гречаний, квітковий, лісове різнотрав'я, акацієвий) представлений магазином «Бджолина лавка», м. Житомир, вул. Домбровського 25. Середовища для культивування та виділення (ЕНДО, ВСА, ФЧГЖ, середовище Левіна, АМХ, МПА, MRS, МПБ) бактеріальних мікроорганізмів видів *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* та *Bacillus subtilis* застосовували разом з лікарями-бактеріологами Державних установ «Житомирський обласний лабораторний центр міністерства охорони здоров'я України» та «Житомирський обласний

лабораторний центр міністерства охорони здоров'я України». Матеріали для біохімічного типування (диски для тестування на оксидазну та каталазну активність, середовище Кліглера, середовище Сімонса, Ацетат Na та Малонат Na; реактиви для дослідження тесту на уреазу, чутливості до пеніциліну та вивчення пептолітичних властивостей ентеробактерій (індоловий тест); «Системи індикаторні паперові диски для ідентифікації мікроорганізмів номер 2») використовували разом з лікарями-бактеріологами Державної установи «Житомирський обласний лабораторний центр міністерства охорони здоров'я України». Для вивчення впливу різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» щодо патогенних збудників дисбіозу бджіл видів *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, розведеного цукровим сиропом та медовою ситою, бджоли української степової породи були надані 480 ФОП Застулкою М. В., с. Вереси.

2.2 Мікробіологічні методи досліджень

Виділення чистих бактеріальних культур (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* та *Bacillus subtilis*)

Мікробіологічні дослідження під час виділення чистих культур мікроорганізмів видів (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* та *Bacillus subtilis*) проводили методом Голда, для забезпечення росту ізольованих колоній [9], у такі етапи:

1. Підготовка боксу, посуду, матеріалу (патогенних мікробних бактеріальних культур бджіл та бацил виділених з медів різних видів) до посіву та середовищ спеціального та загального призначення для культивування бактеріальних мікроорганізмів різних видів;

* Контроль поживних середовищ проводили відповідно до ДСТУ ISO\TS 11133-1:2000 IDT «Мікробіологія харчових продуктів і кормів для

тварин. Настанови щодо готування і виробництва поживних середовищ» частини 1 та 2 [16].

2. Висів патологічного матеріалу (патогенних мікробних бактеріальних культур бджіл, бацил виділених з медів різних видів) на поживних середовищах різного призначення (ЕНДО, ВСА, ФЧГЖ, середовище Левіна, АМХ, МПА, MRS, МПБ);

3. Культивування бактеріальних культур проводили у термостаті за температури +37–37, 2°С впродовж 24–72 год;

4. Оцінка концентрації, культуральних та тинкторіальних ознак мікроорганізмів після культивування (оцінку проводили протягом 1–5 діб, так як для різних видів мікроорганізмів необхідний певний час, температура для росту тощо);

5. Оцінка виконаної роботи.

Для визначення напрямку дії пробіотичних та дезінфекційних засобів щодо чистих культур бактерій видів (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* застосовували загальноприйняті мікробіологічні методи: 1. підготовка боксу, посуду та поживних середовищ до висіву; 2. Поверхневий та глибинний висіви у чашку Петрі; 3. Візуальна оцінка концентрації, культуральних та тинкторіальних ознак мікроорганізмів після культивування [23, 37, 224].

Бактеріологічні методи досліджень використані для виділення та ідентифікації патогенних мікроорганізмів бджіл видів *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* та бактерій, виділених з акацієвого меду та меду із лісового різнотрав'я – *Bacillus subtilis*).

Для визначення родової приналежності мікроорганізмів здійснювали поверхневий висів методом Голда [9] на спеціальні поживні середовища; агар Ендо – для ентеробактерій; агар Левіна – для диференції мікробів від шигел; Фіолетово-червоний-жовчний-агар для виявлення колиформних бактерій;

Вісмут-сульфідний агар – для диференції від сальмонел; середовище MRS – агар для лактобактерій та бактерії *Bacillus subtilis*. Культуральні ознаки вивчали візуально [23, 37]. Морфологічно-тинкторіальні ознаки визначали після фарбування за Грамом [23, 37, 116] шляхом мікроскопії світовим мікроскопом Primo Star 3153010289415500 – 0059 – 000. Наявність мукозної капсули у *Klebsiella pneumoniae* досліджували фарбуванням методом Буррі.

Родову та видову ідентифікацію патогенних мікроорганізмів бджіл видів *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* та бактерій, виділених з акацієвого меду, та меду із лісового різнотрав'я – *Bacillus subtilis* здійснювали по їх біохімічних (фізіологічних) властивостях. У роботі використовували методи біохімічного типування гуманної медицини. Для родової ідентифікації визначали оксидазну та каталазну ферментативну активність мікроорганізмів («Оксидазні диски») згідно з інструкції по застосуванню. Тест-системи «Системи індикаторні паперові диски для ідентифікації мікроорганізмів номер 2», реактиви та середовища Кліглера, Сімонса, Ацетат Na та Малонат Na, набір для реакції Фогес-Проскауера, середовища для споживання бактеріями арабінози та ксилози як єдиного джерела вуглецю використовували для біохімічного типування згідно настанов у Державній установі «Житомирський обласний лабораторний центр міністерства охорони здоров'я України». Для диференціації *Bacillus subtilis* від інших видів спороутворюючих аеробів застосовували постановку специфічних тестів (чутливість до пеніциліну, гемоліз еритроцитів барана у спеціальному середовищі, здатність чистих культур до інтенсивного росту при $t +28-30^{\circ}\text{C}$ і одночасно при $t +50^{\circ}\text{C}$) згідно їх настанов у Державній установі «Житомирський обласний лабораторний центр міністерства охорони здоров'я України».

Для визначення напрямку та активності дії засобів (пробіотичних та деззасобів) щодо ідентифікованих ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella*

pneumoniae, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* застосовували метод Кірбі-Бауера [6, 27, 57], шляхом його модифікації при вивченні чутливості збудників ентеробактеріозів бджіл до пробіотиків та дезінфектантів. Мікробний інокулюм, виготовлений прямим методом приготування бактеріологічної суспензії шляхом змиву стерильним фізіологічним 0,9% розчином мікробних 18–24 год колоній, культивованих на твердому поживному середовищі (АМХ/МПА), засівали глибинно у стерильні та витримані до кімнатної температури чашки Петрі діаметром 10 см (попередньо розграфлені на зони) у тверде живильне середовище (20 мл теплового рідкого середовища). У кожному дослідженні щільність бактеріальної суспензії визначали візуально згідно стандарта мутності Мак-Фарланда до 0,5 одиниць (додавання фізіологічного 0,9% розчину) [7]. Через 15 хв після глибинного посіву мікробного інокулюму у кожен чашку Петрі вносили стерильний диск, просочений відповідним досліджуванним засобом у певній концентрації протягом 15–25 хв, на відстані приблизно 1,5–2 см від краю чашки. Контакт диску з середовищем має бути щільним протягом відповідного терміну інкубації. Досліджувані чашки Петрі інкубували у термостаті за температури +37°C протягом 24–36 годин. Після культивування здійснювали оцінку характеру дії засобу (бактеріостатична/бактерицидна/антагоністична дії) шляхом вимірювання радіусу затримки, відсутності чи конкурентного росту (включаючи радіус самого диска). Для визначення антагоністичного напрямку дії засобів («ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ»; вплив бактерій виду *Bacillus subtilis* виділених з акацієвого меду, та меду із лісового різнотрав'я) застосовували метод лунок (колодязя) [7]. При якому у глибинно засіяних тестованими мікроорганізмами (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*) чашках Петрі стерильним скальпелем вирізали лунки діаметром 6–8 мм. В отримані поглиблення поміщали різні розведення досліджуваних засобів по

0,3 см³. Далі витримували чашки Петрі протягом 2 годин за температури 21–24°C та культивували 24–72 години (+37,2°C). Після інкубування проводили оцінку результатів. Кожен експеримент проводили у декілька повторів від 5 до 15.

2.3 Фармакологічні методи досліджень

Фармакологічні методи досліджень використовували для підбору засобів, які могли б чинити дезінфекційний, тобто бактерицидну дію у чашках Петрі, та пробіотичний (бактеріостатична дія і антагоністичний ріст пробіотичних мікроорганізмів) вплив щодо ідентифікованих збудників ентеробактеріозів бджіл видів *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* та змішаної мікробної асоціації. Ефекти найбільш дієвого засобу з метою розробки лікувально-профілактичних схем при бджолиних дисбіозах вивчали шляхом задавання бджолам української степової породи різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» розведеного різними розчинниками (медова гречана сита та цукровий сироп). Усі лабораторні дослідження спрямовані для визначення напрямку дії засобів виконували модифікованим нами методом Кірбі-Бауера.

- Дію дезінфектанту «Йодіс Дез №2» щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* вивчали *in vitro*. Цей експериментальний препарат був створений для знищення у середовищі збудників інфекційних хвороб бджіл. Диски просочували нативним засобом і у концентраціях: 1:5; 1:10; 1:100 (розведення проводили стерильним 0,9% NaCl).

- Дію експериментального зразка розчину цитрату міді та цитрату срібла щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* вивчали *in vitro*. Даний розчин володіє

антимікробною дією. Диски просочували нативним засобом та у таких концентраціях –1:2, 1:5, 1:10 (розведення проводили стерильним 0,9% NaCl).

- Вивчення напрямку дії «Ентеронормін з Йодіс + Се» щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* проводили *in vitro*. Диски просочували нативним розчином пробіотика «Ентеронормін з Йодіс + Се» («Ентеронормін») і у концентрації 1:1. Розчинником слугували розчини медових сит (1 частина меду: 1 частина теплої води). Пробіотик «Ентеронормін з Йодіс + Се» («Ентеронормін») готували згідно інструкції [14].

- Вивчення антагонізму препарату «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* виконували *in vitro* диско-дифузійним методом та методом колодязів (лунок). Розчинником слугували вода та 50%-ий цукровий сироп (1 частина колодязної води: 1 частина цукру). Препарат застосовували у нативному стані і в концентраціях: 0,5%; 1%; 2,5%; 5%; 10%; 20%; 30%; 50%, розведений 50%-им цукровим сиропом і водою.

- Вивчення впливу різних концентрацій «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ», щодо патогенних збудників дисбіозу бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, розведеного цукровим сиропом та медовою ситою проводили в садках з бджолами. При цьому вивчали тривалість життя бджіл, морфологічні та біохімічні показники їх гемолімфи. Для даного дослідження застосовували такі розведення пробіотика: 5%; 2,5%; 1,25%. Розчинниками слугували цукровий сироп (2 частини цукру: 1 частина води) та гречана медова сита (1 частина меду: 1 частина води).

* Під час виконання усіх дослідів використовували методичку десятикратних розведень [2, 29], правило «хреста», змішування або діагональну схему [35].

2.4 Фізіологічні методи досліджень на бджолах

Фізіологічні методи досліджень передбачають проведення експериментів, де теорія знає наочного підтвердження [28, 117]. **Перший етап експерименту** включав вивчення впливу різних концентрацій «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», щодо патогенних збудників дисбіозу бджіл видів *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, розведеного цукровим сиропом та медовою ситою. При цьому включав вивчення тривалості життя робочих бджіл осінньої генерації шляхом дослідження їх фізіологічної поведінки (рис. 2.2).

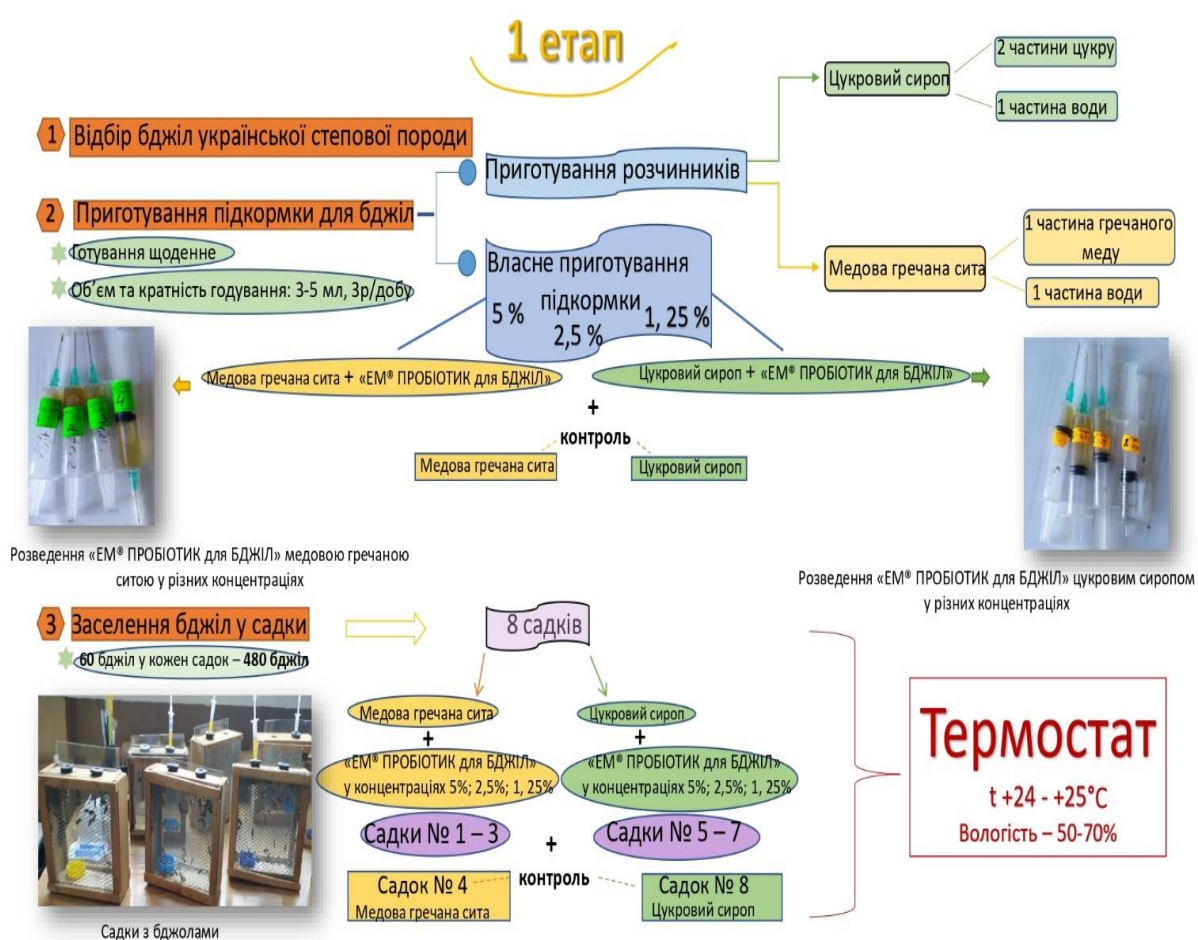


Рис. 2.2. Загальна схема 1-го етапу експерименту вивчення впливу різних концентрацій «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведеного цукровим сиропом та гречаною медовою ситою на тривалість життя, морфологічні та біохімічні показники гемолімфи робочих бджіл осінньої генерації

З вуликів бджіл відбирали та транспортували до лабораторії кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології Поліського національного університету згідно «Правил відбору зразків патологічного матеріалу, крові, кормів, води та пересилання їх для дослідження» [31]. Бджіл поміщали у скляні баночки, які обв'язували двома шарами марлі. Життєздатність комах української степової породи у садках (в лабораторних умовах) визначали методом щоденного спостереження, аналізу фізіологічного стану та підрахунку кількості загиблих бджіл. Ентомологічні садки заселяли бджолами (по 60 особин у кожному) – усього 8 садків, що дорівнює 480 особинам та утримували у термостаті при температурі +25°C і вологості повітря 50–70%. Дослід тривав 18 діб (загибель останньої бджоли в кожному садку). Ентомологічні садки мають вигляд дерев'яних коробочок, де - з однієї сторони присутній сляний екран, а з іншої – решітки з діаметром комірки 2 мм. Для попередження вильоту комах решітчаста сторона огорнена медичною марлею, верхня частина ентомологічних садків має спеціальний отвір, що забезпечує доступ для годівлі комах. Експеримент проводили шляхом поділу бджіл на 2 блоки: **перший дослідний блок отримував «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ»** розведений гречаною медовою ситою (1 частина меду: 1 частина води) у концентраціях 5%; 2,5%; 1,25% – садочки № 1, 2, 3; **другий дослідний блок** отримував пробіотик розведений цукровим сиропом (2 частини цукру: 1 частина води) в аналогічних концентраціях – садочки № 5, 6, 7 відповідно. Крім того, бджолам у садку № 4 згодовували нативну медову гречану ситу, а у садку № 8 – нативний сироп (бджоли контрольних груп).

Кратність годівлі бджіл – тричі на добу по 3-5 см³ на одну годівлю (підкормки готували щоденно). При годівлі бджіл щоразу провітрювали термостат та забезпечували належний рівень вологості, мертвих комах видаляли з садків по мірі їх загибелі.

Тривалість життя бджіл аналізували шляхом визначення коефіцієнту середньої тривалості життя. Розрахунки проводили за формулою:

$KСТЖ = (a_1 + a_2 + a_3 + \dots + a_{12}) / N$, де КСТЖ – коефіцієнт середньої тривалості життя бджіл; $a_1 + a_2 + a_3 + \dots + a_{12}$ – кількість живих бджіл на 1, 2, 3, 4 і т.д. доби; N – кількість бджіл на початок досліджень [150].

2.5 Дослідження гемолімфи бджіл

Другим етапом експерименту було вивчення впливу різних концентрацій «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», щодо патогенних збудників дисбіозу бджіл видів *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*. При цьому проводився аналіз дії пробіотика різних розведень окремими розчинниками (гречана медова сита та цукровий сироп) на морфологічний склад та біохімічні параметри гемолімфи комах (рис. 2.3).

У 5 бджіл кожного садка на 7-му і 10-ту добу експерименту відбирали гемолімфу з грудей та черевця. Виготовлені мазки піддавали морфологічному дослідженню під мікроскопом.

Для дослідження ферментативної активності гемолімфи бджіл на **7-му** (садочок № 4), **10-ту** (садочок № 2, 3) і **11-ту** (садочок № 1, 5 та 8) добу відбирали гемолімфу від 18 – 23 бджіл для біохімічного дослідження.

У день початку досліджень з пасіки (ФОП «Застулка М. В.», с. Вереси) було відібрано 20 особин та через два тижні 25 особин для порівняння показників гемолімфи бджіл в природних умовах.

- Експеримент проводили згідно принципів гуманного ставлення до дослідних комах (Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей 1986 р. [280], Директива 2010/63/ЄС «про захист тварин, що використовуються в наукових цілях») [12] і відповідно вимог статті 26 «Закону України про захист тварин від жорстокого поводження (правила поводження з тваринами, що

використовуються в наукових експериментах, тестуванні, навчальному процесі та виробництві біопрепаратів» [283] (Додаток К).

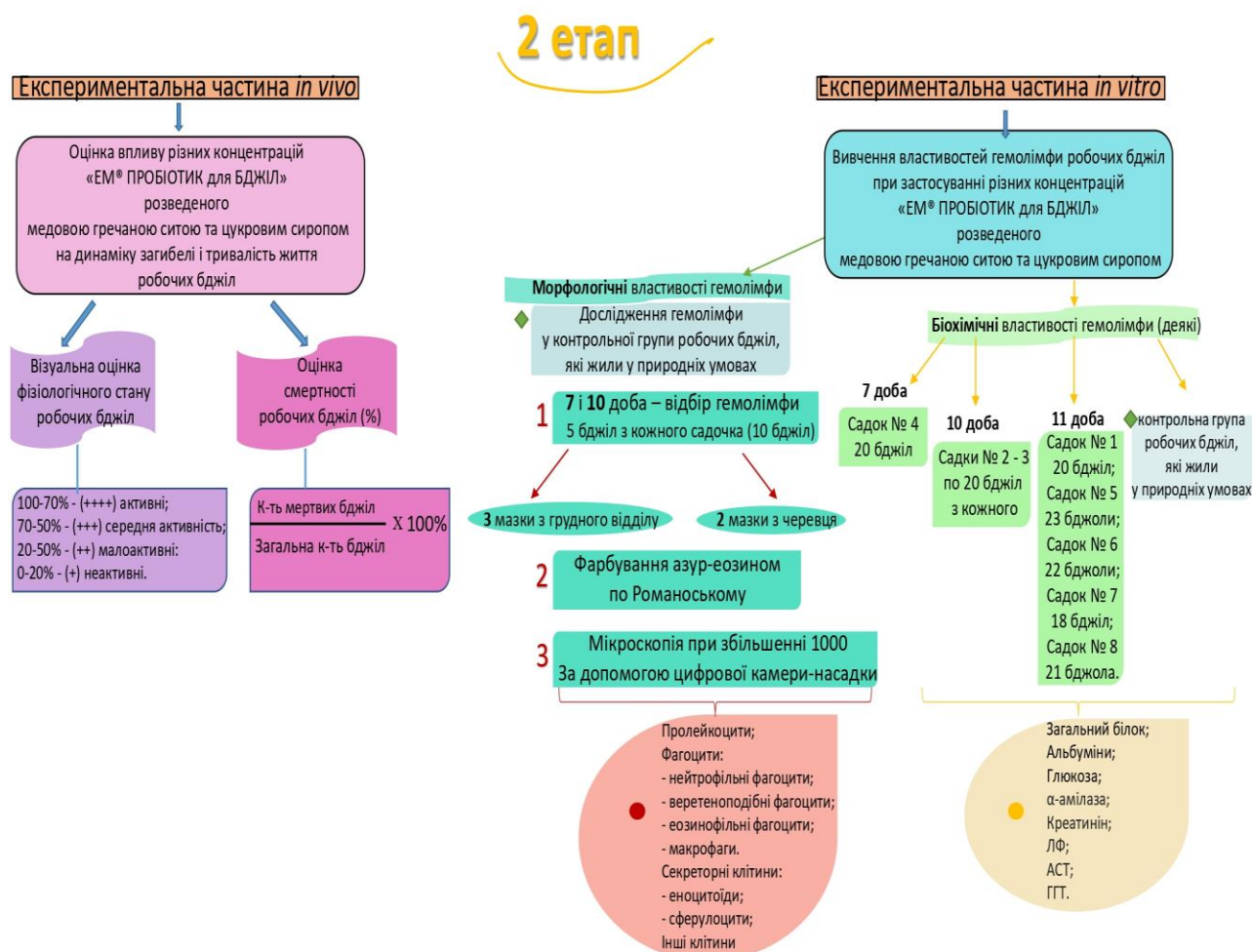


Рис. 2.3. Загальна схема 2-го етапу експерименту вивчення впливу різних концентрацій «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведеного цукровим сиропом та гречаною медовою ситою на тривалість життя, морфологічні та біохімічні показники гемолімфи робочих бджіл осінньої генерації

2.5.1 Морфологічні дослідження

Мікроскопія мазків гемолімфи бджіл

Гемолімфу для морфологічних досліджень відбирали з грудей та черевця. Проби брали від кожної окремої бджоли (1 крапля гемолімфи = 1 бджола = 1 мазок) на чисте, знежирене скельце. Перед відбором гемолімфи

кімната була простерилізована бактерицидною лампою. Для підтримання стерильності повітря робота проводилася біля спиртівки. Бджіл фіксували механічно – пінцетом, попередньо обробляючи поверхню тіла комахи турундою змоченою 40% етиловим спиртом (седація комахи) [19, 63]. З грудного відділу кров бджіл набирали шляхом декапітації, де прозора чи злегка жовтувата гемолімфа виділяється самовільно у вигляді краплини «горошини» (у разі малої кількості гемолімфи механічно притискували груди бджоли пінцетом). Відбір гемолімфи з черевця передбачав препарування скальпелем черевця комахи при чому «кров» виступала краплею злегка жовтуватого відтінку (препарування слід робити обережно, не травмуючи кишечник (середню кишку) та жовте тіло). Мазки: покривне скельце ставили під кутом 45° до краплі гемолімфи розміщеної на предметному скельці, так що вона розпливається по ребру цього скла, далі швидким рухом покривного скельця «кров» комахи розподіляють по поверхні предметного скла рівномірним та тонким шаром, виготовлені препарати висихали протягом 120 годин за температури 18°C . Далі здійснювали фіксацію мазків (3 – 5 хв) 96% етиловим спиртом. Фарбували мазки концентрованим азур – еозином без буфера методом нашарування (10 – 15 хв). Після змивання проточною водою препарати висушували за кімнатної температури та у подальшому піддавали мікроскопії (мікроскоп «Біолам» при збільшенні в 1000 разів, використовуючи цифрову камеру - насадку моделі «A59.4910 Input USB 5V 500 mA; 5.0m; OPTO-EDU A59.4910»). Рекомендована комп'ютерна програма : Micro Capture Ver 6.21.) з використанням імерсійного масла [146] (Lakhman et al., 2021b). У виготовлених мазках оцінювали морфологічні характеристики клітин гемоцитів [53, 240, 267], проводили їх підрахунок (100 клітин в 1 мазку) та різних груп клітин (пролейкоцити; фагоцити: нейтрофільні фагоцити, веретенovidні фагоцити, еозинофільні фагоцити, макрофагоцити; серкреторні клітини: еноцити, сферулоцити та інші клітини (платоцити)).

Характеристики морфологічної будови гемоцитів оцінювали за такими показниками: форма клітин, наявність зернистості, присутністю та розміри вакуолей, інтенсивність забарвлення ядра тощо [20, 40, 53, 240, 267].

2.5.2 Біохімічні дослідження

Нами була проведена робота оцінки деяких біохімічних параметрів гемолімфи за допомогою напівавтоматичного біохімічного аналізатора Chem 7 (Erba, Чеська Республіка), реактиви лінії фірми DAC (республіка Молдова). У результаті ми отримали значення деяких показників: загальний білок (PRO, g/L); альбуміни (ALB, g/L, г/л); глюкоза (GLU, mmol/L, ммоль/л); α -амілаза (AMY, U/L, ОД/л); лужна фосфатаза (ЛФ) (ALP, U/L, ОД/л); Аспаратаминотрансфераза (ACT) (SGOT, U/L, ОД/л); Гамма-глутамілтранспептидаза (ГГТ) (GGT, U/L, ОД/л); Лактатдегідрогеназа (ЛДГ) (LDH, U/L, ОД/л) та креатинін (umol/L, мкмоль/л). Для біохімічного дослідження гемолімфи бджіл української степової породи досліджували збірні проби від 18 до 23 бджіл з кожного садочка на «гранично - середню» добу життя. Для біохімічного дослідження гемолімфи бджіл її вилучення здійснювали шляхом декапітації голови (попередньо комахам була проведена седация) [19], методом запропонованого Grzegorz Borsuk, Aneta A. Ptaszyńska, Krzysztof Olszewski, Marcin Domaciuk, Patcharin Krutmuang, Jerzy Paleolog [63] та шляхом препарування черевця (прокол венозного синуса) [164]. Після відбору проб проводили визначення біохімічних показників гемолімфи [164, 253]. Біохімічні показники гемолімфи визначали після дворазового центрифугування збірних проб (7 тис обертів/ 2 хв), надосадовий матеріал використовували для визначення значень досліджуваних величин (згідно методики роботи на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі Chem 7 (Erba, Чеська Республіка); використовували реактиви лінії фірми DAC відповідно до їх настанови).

2.6 Аналіз епізоотологічної ситуації та проведення статистичних досліджень

Аналіз епізоотологічної ситуації щодо інфекційних хвороб бджіл за 2019-2022 роки проводили згідно з поставленими завданнями роботи. Для визначення епізоотичного стану поширеності інфекційних хвороб бджіл у Північно-Західному регіоні України використовували методи збору, аналізу та порівняння звітів Державної Служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів у Волинській, Житомирській та Рівненській областях - «Аналіз виконання плану проведення діагностичних досліджень по профілактиці заразних хвороб тварин» (форма 4-вет). Епізоотичний аналіз проводили комплексно за такими показниками:

1. Вивчення динаміки розповсюдження бактеріальних, паразитарних і хвороб бджіл, що викликаються найпростішими шляхом аналізу досліджених проб, спираючись на дані звітів Держпродспоживслужб кожної дослідженої області.

2. Аналіз систематизованих результатів здійснювали шляхом порівняння показників розвитку епізоотичного процесу [99, 136] розповсюджених інфекційних хвороб бджіл у Північно-Західному регіоні України [148].

3. Оцінка результатів епізоотичного моніторингу.

Закономірність поширення епізоотичного процесу вивчали, спираючись на методи описані у статтях присвячених моніторингу епізоотичної ситуації щодо змішаних інфекційних хвороб бджіл у Північно-Східному регіоні України» [136], епізоотичній ситуації щодо вароозу медоносних бджіл (*Apis Mellifera*) окремих районів Чернівецької області [39], значенню оцінки епізоотологічного профілю медоносних бджіл Північно-Східної України [6], епізоотичному моніторингу заразних хвороб медоносних бджіл у Північно-Західному регіоні України [6], і основам

бджільництва [3, 4]. Результати епізоотичного моніторингу та їх аналіз дають можливість визначити пріоритетність та своєчасність у дослідженнях заразних хвороб дорослих бджіл та розплоду, і також свідчать про необхідність впровадження моніторингових планових досліджень для контролю клібсієльозів бджіл.

Для написання дисертаційного дослідження використовували персональний комп'ютер із процесором Ryzen 5 40000 SERIES 3,3 ГГц, на базі операційної системи «Windows 10 Домашня». Числові результати експериментів обробляли за допомогою методів математичної статистики. Обробку даних проводили на кафедрі комп'ютерних технологій і моделювання систем Поліського національного університету (м. Житомир). Лінійні залежності виведені у програмному забезпеченні «MS Excel 2019», а багатофакторні залежності створені у програмі кореляційно-регресійного аналізу LPG [106], додатково був застосований пакет прикладних програм «Statistica – 8.0». Для оформлення тексту дисертаційної роботи використовували програмне забезпечення «Microsoft Word 2019», табличні дані, графіки та діаграми застосовували програмні забезпечення «Microsoft Word 2019», «MS Excel 2019» та «Power Point 2019». Математичні дані були опрацьовані статистичними методами Фішера – Стьюдента з урахуванням статистичних помилок середньоарифметичних величин. Для кожного показника визначали середнє арифметичне (M) та стандартну похибку середньоарифметичного (m), а вірогідність вважали за рівнем значимості більше ніж 96% ($p < 0,05$) [236]. Фотографії зроблені на фотоапарат Canon Coolpix L820 та додатково використане програмне забезпечення Fotor 3.9.2. Фотографування морфологічного складу гемолімфи бджіл було здійснене на цифрову камеру-насадку, розташовану на тубусі мікроскопа «Біолам» (Digital Camera A59.4910 «INPUT» USB 5V 500 mA; OPTO – EDU A59.4910) та рекомендованої комп'ютерної програми Micro Capture Ver 6.21. При

мікроскопії (модель мікроскопу Carl Zeiss Primo Star 3153010289415500 – 0059 – 000) бактеріальних клітин їх зображення автоматично були виведені на екран монітора за допомогою сумісного програмного забезпечення в форматі «JPEG». Біохімічні дослідження показників гемоліфи бджіл здійснювали напівавтоматичним біохімічним аналізатором Chem 7 (Erba, Чеська Республіка), реактиви фірми DAC).

Висновок до Розділу 2

Вибрані нами методи досліджень були найбільш оптимальними для досягнення поставленої мети та задач даної дисертаційної роботи. Досконале вивчення епізоотичної ситуації щодо бактеріальних інфекційних хвороб бджіл, ідентифікація збудників бджолиних дисбіозів та пошук оптимальних засобів профілактики та ліквідації даного захворювання дає змогу розробляти дієвих оптимальні профілактично-лікувальні схеми.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Моніторинг заразних хвороб бджіл за 2019 – 2022 роки

Різні чинники сприяють поширенню інфекційних хвороб бджіл не лише на території України, а і інших держав [114]. Адже торгівля між країнами, неконтрольований продаж та транспортування бджіл і маток сприяють поширенню заразних захворювань бджіл. Необхідним є контроль та постійний епізоотичний моніторинг цих хвороб з метою недопущення їх розповсюдження. Але вивчення реальної епізоотичної ситуації щодо захворювань цих комах різної етіології передбачає отримання даних не лише планових досліджень, а і результатів епізоотичного обстеження існуючих пасік, включаючи хвороби, які не входять у перелік запропонованих регіональними лабораторіями. Такий підхід розширить спектр діагностичних досліджень, що, у свою чергу, надасть більш чітку та реальну картину щодо епізоотичного стану конкретного регіону. Дослідження стаціонарних та виникнення емерджентних хвороб бджіл потребує постійного удосконалення методів профілактики, винайдення нових способів епізоотологічного моніторингу, адаптації ветеринарних препаратів для використання у бджільництві [148]. Метою даного етапу дослідження стала систематизація та аналіз офіційних даних управлінь Держпродспоживслужб Житомирської, Рівненської та Волинської областей щодо контагіозних хвороб бджіл [148].

3.1.1 Моніторинг заразних хвороб бджіл за 2019 – 2021 роки

Вивчена епізоотична ситуація Північно-Західного регіону України в межах Житомирської, Рівненської та Волинської областей за 2019 – 2021 роки. За офіційними даними Держпродспоживслужб вищевказаних областей регіональні лабораторії проводять планові та діагностичні дослідження щодо

гнильцевих хвороб (американський і європейський), паразитарних (акарапідоз, вароатоз, браульоз) та захворювань, що викликаються найпростішими (амебіоз і нозематоз) [126]. У всіх досліджуваних областях щорічно реєстрували вароатоз та нозематоз (рис. 3.1), а у Житомирській області виявлено також американський гнилець у 2019 році (рис. 3.2).

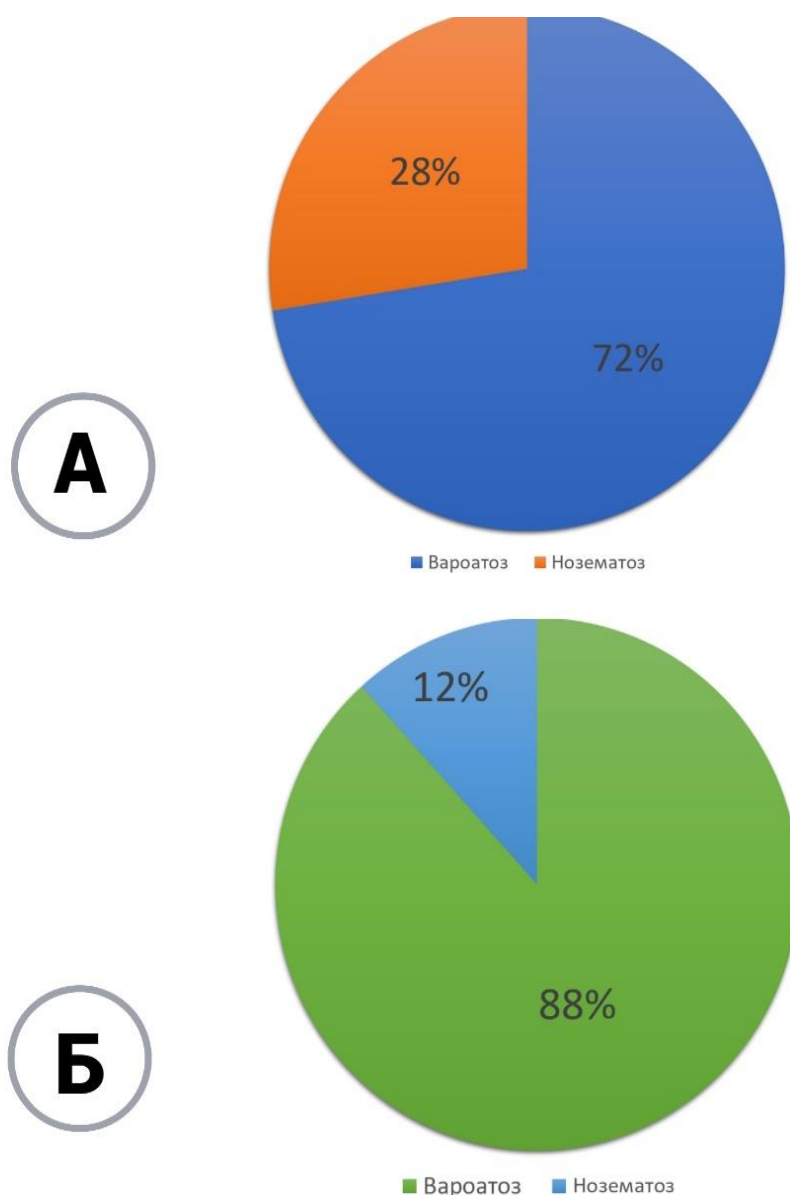


Рис. 3.1. Кількість випадків вароатозу та нозематозу бджіл у Рівненській (А) та Волинській (Б) областях за 2019 – 2021 рр

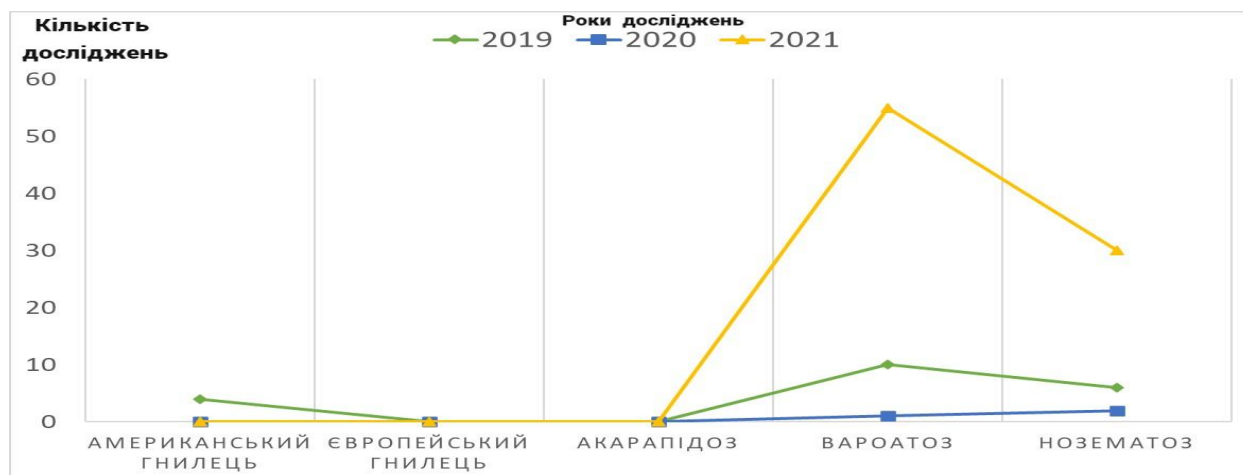


Рис. 3.2. Нозологічний профіль інфекційних хвороб бджіл у Житомирській області (2019 – 2021 рр.)

Аналіз отриманих даних у Рівненській та Житомирській областях свідчить про щорічне збільшення кількості планових досліджень щодо вказаних паразитарних захворювань, гнильців та нозематозу (табл. 3.1 – 3.2).

Таблиця 3.1

Результати досліджень щодо заразних хвороб бджіл у Житомирській області за 2019 – 2021 роки

Назва хвороби	Показники	Рік дослідження		
		2019	2020	2021
Американський гнилець	Кількість досліджень, вип. / Інфікованість, %	496 / 0,81	907 / 0	1230 / 0
Європейський гнилець	Кількість досліджень, вип. / Інфікованість, %	496 / 0	907 / 0	1237 / 0
Акарапідоз	Кількість досліджень, вип. / Інфікованість, %	551 / 0	1131 / 0	4398 / 0
Вароатоз	Кількість досліджень, вип. / Інфікованість, %	1134 / 0,88	1602 / 0,06	4418 / 1,24
Нозематоз	Кількість досліджень, вип. / Інфікованість, %	1111 / 0,54	1556 / 0,13	4413 / 0,68

Таблиця 3.2

Результати досліджень щодо заразних хвороб бджіл у Рівненській області за 2019 – 2021 роки

Назва хвороби	Показники	Рік дослідження		
		2019	2020	2021
Американський гнилець	Кількість досліджень, вип. / Інфікованість, %	521 / 0	562 / 0	968 / 0
Європейський гнилець	Кількість досліджень, вип. / Інфікованість, %	521 / 0	562 / 0	954 / 0
Акарапідоз	Кількість досліджень, вип. / Інфікованість, %	1678 / 0	1791 / 0	1881 / 0
Вароатоз	Кількість досліджень, вип. / Інфікованість, %	1678 / 14,30	1791 / 11,06	1881 / 12,76
Нозематоз	Кількість досліджень, вип. / Інфікованість, %	1678 / 7,45	1791 / 3,63	1881 / 3,62

Інша закономірність спостерігається у Волинській області (рис. 3.3), де найбільше діагностичних досліджень щодо бджолиних інфекційних та інвазійних хвороб зареєстрована у 2019 році, з тенденцією до зменшення у наступних роках.

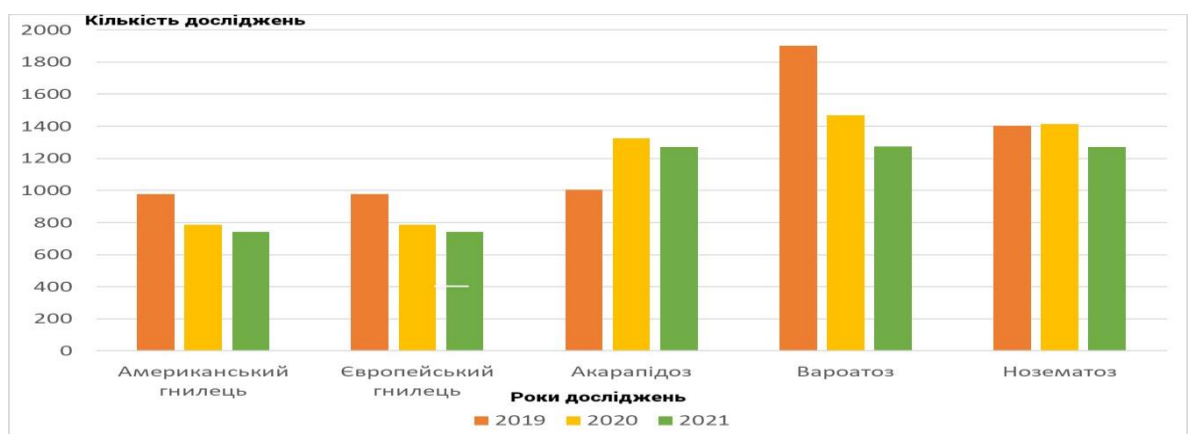


Рис. 3.3. Нозологічний профіль інфекційних хвороб бджіл у Волинській області (2019 – 2021 рр.)

У свою чергу, відмічали максимальні показники інфікованості досліджуваних інфекцій: вароатозу – 30,24% (2021 рік) у Волинській області (табл. 3.3); нозематозу – 7,45% (2019 рік) у Рівненській області (табл. 3.2);

американського гнильця – 0,81% (2019 рік) у Житомирській області (табл. 3.1).

Спираючись на статистичні офіційні дані, важко описати весь спектр поширення інфекційних хвороб бджіл, так як це результати планових досліджень, які є економічними для пасічника і проводяться найчастіше за рахунок держбюджету з метою отримання паспорту пасіки. Надана регіональними лабораторіями інформація не відображає об'єктивної епізоотичної ситуації щодо хвороб бджіл, не дозволяє достовірно охарактеризувати всі ланки епізоотичного ланцюга, тому доцільно удосконалити систему моніторингу захворювань бджіл, враховуючи ареал їх існування та породні особливості.

Таблиця 3.3

Результати досліджень щодо заразних хвороб бджіл у Волинській області за 2019 – 2021 роки

Назва хвороби	Показники	Рік дослідження		
		2019	2020	2021
Американський гнилець	Кількість досліджень, вип. / Інфікованість, %	976 / 0	787 / 0	743 / 0
Європейський гнилець	Кількість досліджень, вип. / Інфікованість, %	976 / 0	787 / 0	742 / 0
Акарапідоз	Кількість досліджень, вип. / Інфікованість, %	1003 / 0	1324 / 0	1271 / 0
Вароатоз	Кількість досліджень, вип. / Інфікованість, %	1901 / 17,41	1467 / 8,38	1273 / 30,24
Нозематоз	Кількість досліджень, вип. / Інфікованість, %	1404 / 1,64	1413 / 0,35	1270 / 6,54

Так, для забезпечення благополуччя бджологосподарств доцільним є раннє виявлення етіологічного чинника конкретного захворювання (джерела збудника інфекції) для попередження зараження всієї пасіки з одночасними заходами підвищення індивідуальної резистентності бджіл [148].

3.1.2 Моніторинг заразних хвороб бджіл за 2022 рік

Аналіз даних управління безпеки харчових продуктів та акредитованих лабораторій ветеринарної медицини Північно-Західного регіону України (Житомирської, Волинської та Рівненської областей) щодо діагностичних досліджень паразитарних хвороб бджіл за 2022 рік показав, що найбільша кількість проб, а саме щодо вароозу, була досліджена у лабораторіях Житомирській області у кількості 3443 проби, причому, всі вони були негативні. У Рівненській та Волинській областях зареєстровані випадки вароозу бджіл – 331 позитивна проба з 1494 досліджених зразків (Волинська область) та 472 позитивні результати з 3184 досліджених (Рівненська область). У свою чергу, збудників браульозу (*Braula coeca*) та акарапідозу бджіл (*Acarapis woodi*) – не виявлено в жодному досліджуваному зразку у лабораторіях ветеринарної медицини Північно-Західного регіону України.

Діагностичні дослідження щодо інфекційних захворювань бджіл включали виявлення бактеріальних збудників гнильцевих хвороб. Так, протягом 2022 року у лабораторіях Рівненській області було проведено 906 досліджень щодо американського та європейського гнильців, у Волинській області – 653 дослідження, і 746 – у Житомирській області. Всі проби – негативні.

Дослідження щодо виявлення збудників протозойних хвороб ((*Malpighamoeba mellifica* (амебіаз) та *Nozema apis* (нозематоз)) від бджолосімей Житомирської області у 2022 році також мали негативний результат. У Рівненській та Волинській областях кількість досліджень з цього напрямку (нозематозу) становила 3184 (213 зразків були позитивні) і 1494 (30 зразків були позитивні).

Отже, зазначаємо про те, що позитивних проб у результаті діагностики бактеріальних хвороб бджіл протягом 2022 року у лабораторіях Державної

служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів не виявлено. А випадки паразитарних та протозойних захворювань, а саме, вароозу та нозематозу, зареєстровані у Волинській та Рівненській областях.

Таким чином, регіональними лабораторіями Держпродспоживслужб Північно-Західного регіону України регулярно проводиться щорічний моніторинг бактеріальних (американський та європейський гнильці), паразитарних (вароатоз, акарапідоз) захворювань бджіл і хвороб, збудниками яких є найпростіші мікроорганізми (нозематоз, амебіаз) [148].

3.2 Удосконалення методів культивування, виділення та ідентифікації ентеробактерій видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* у бджіл

Ентеробактеріози (дисбіози) бджіл – бактеріальне захворювання бджіл, яке виникає при порушенні кількісного складу умовно-патогенної мікробіоти кишечника бджоли медоносної. За наявності сприятливих умов для розвитку умовно-патогенної мікрофлори ентеробактерії набувають вірулентності та здатні викликати захворювання. Для успішної діагностики, лікування та профілактики даної групи хвороб існує необхідність у виділенні та ідентифікації основних збудників даного захворювання у бджіл.

Для культивування, виділення та ідентифікації бактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* використовували методи ветеринарної медицини (для виявлення Родової приналежності, та визначення Родини) та методики біохімічного типування гуманної медицини (для видової ідентифікації). Бактеріальні культури відібрані від бджолосімей з приватних пасік м. Житомира, Житомирської області – м. Черняхів; Житомирського району, с. Вереси, с. Тетерівка; Романівського району, с. Прутівка; Хмельницької області, м. Полонне, Київської області, м. Біла

Церква [264]. Для виділення чистих культур повторно пасажування схожих мікробних колоній здійснювали методом Голда на диференційно-діагностичні середовища для ентеробактерій [105]. Бактеріологічні суспензії для кожного виду бактерій висівали на середовище Ендо, культивували за температури 37°C впродовж 24 – 36 год у термостаті [104, 105]. При культивуванні бактерій виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* виявляли схожі за культуральними ознаками колонії S-форми – дрібні, круглі, матові, плоскі, з рожевим відтінком, без металевого блиску, розміщені скупченнями або поодинокі. (рис. 3.4 – А) [105].

При рості бактерій виду *Klebsiella pneumoniae* на середовищі Ендо спостерігали – рожеві, великі, випуклі, слизові, блискучі колонії, які тягнуться при доторкуванні петлею (рис. 3.5 – А) [104]. Досліджувані мікроорганізми за культуральними ознаками відрізнялись від росту типових патогенних бактерій – родів *Salmonella* та *Escherichia*. На вісмут-сульфітному агарі бактерії виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* через 48 годин виростили поверхневі, коричневі, матові, колонії мікроорганізмів без забарвлення ділянки середовища під ними (рис. 3.4 – А), схожі на колонії *Escherichia coli*, але інші, ніж колонії лабораторного штаму *Salmonella typhimurium* [105]. На фіолетово-червоному жовчному агарі з глюкозою досліджувані бактерії обох видів утворювали колонії у вигляді нальоту пурпурового кольору з ореолом преципітації чи без нього (рис. 3.4, 3.5 – А) [104, 105]. *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* на середовищі Левіна формували світло-рожеві, випуклі, матові колонії, розміщені з різною щільністю (від злитих до поодиноких колоній) (рис. 3.4 – А), які дуже відрізняються від росту колоній *Escherichia coli* на цьому ж середовищі [105]. *Klebsiella pneumoniae* на цьому ж середовищі мала вигляд світло-коричневих, випуклих, слизових, блискучих колоній, які тягнуться при доторкуванні петлею (рис. 3.5 – А) [104].

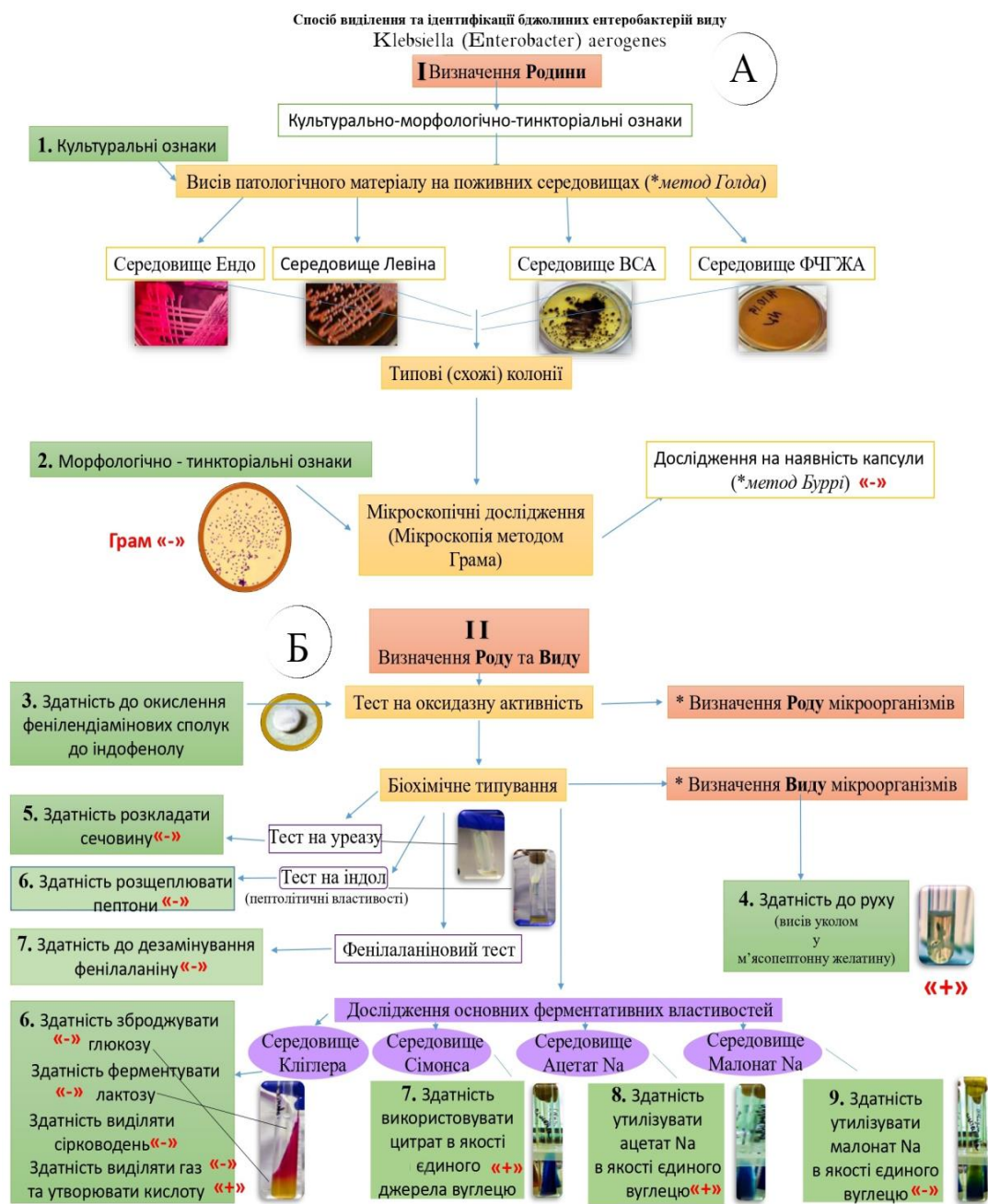


Рис. 3.4. Загальна схема виділення та ідентифікації *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* (А – Визначення Родини мікроорганізмів; Б – Визначення Родової та Видової приналежності мікроорганізмів)

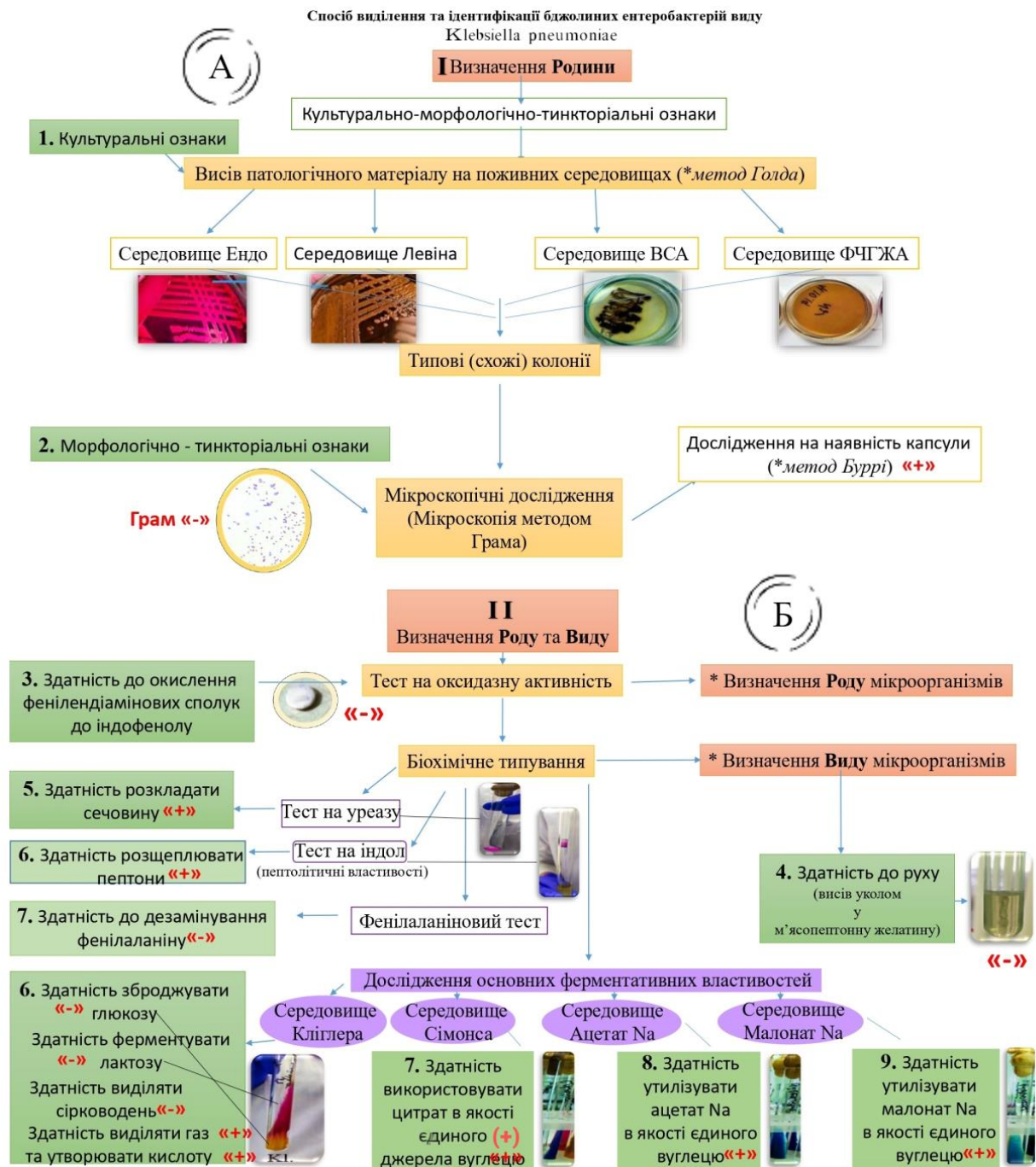


Рис. 3.5. Загальна схема виділення та ідентифікації *Klebsiella pneumoniae* (А – **Визначення Родини** мікроорганізмів; Б - **Визначення Родової та Видової** приналежності мікроорганізмів)

Культуральний ріст бактерій обох видів на різних середовищах був схожий між собою. Після визначення культуральних ознак типові (схожі) колонії для кожного виду бактерій піддавали мікроскопії методом Грама [116] з метою визначення тинкторіально - морфологічних ознак. Для культури виду

Klebsiella (Enterobacter) aerogenes реєстрували – грамнегативні, короткі палички, дрібні, розміщені разом і поодинокі, без капсули (рис. 3.4 – А) [105]; для культури виду *Klebsiella pneumoniae* – грамнегативні, товсті, короткі палички, які розміщені разом та поодинокі (рис. 3.5 – А) [104]. Після фарбування методом Буррі виявлена капсула у бактерій виду *Klebsiella pneumoniae* (рис. 3.5 – А) [104]. Отже, за культурально-тинкторіально-морфологічними ознаками досліджувані бактеріальні культури належать до родини *Enterobacteriaceae*. У подальшому, досліджувані культури вивчали щодо оксидазної активності (рис. 3.4, 3.5 – Б). Після нанесення культур на диск з реактивом виявили їх оксидазо негативність [104, 105].

З метою встановлення родової та видової приналежності досліджуваних бактеріальних культур ізольовані колонії кожного виду мікроорганізмів піддавали реакціям біохімічного типування. Досліджувані ентеробактерії виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* на середовищі Кліглера зброджують глюкозу без утворення газу, про що свідчить зміна кольору нижньої частини стовпчика середовища з оранжевого на жовтий (рис. 3.4 – Б); лактозо-негативні - скошений агар червоно-рожевий; сірководень не утворювався - чорне кільце відсутнє (рис. 3.4 – Б). Активні щодо ацетату натрію, підвищують рН середовища Сімонса (зміна кольору з зеленого на синій); неактивні щодо малонату натрію - середовище залишається зеленим (рис. 3.4 – Б). Пептолітичні властивості вивчали за допомогою спиртового розчину парадиметиламідобензальдегіду – індикатор реакції колір не змінив (рис. 3.4 – Б). Ентеробактерії не утворюють уреазу, тому гідроліз сечовини з утворенням аміаку неможливий – розчин залишається безбарвним (рис. 3.4 – Б). У фенілаланіновому тесті результат був негативний – колір жовтий. При пересіві культури уколом в 0,3%-ий м'ясопептонний агар (МПА) через 24 години спостерігали відгалудження бактерій у товщу середовища від уколу (рис. 3.4 – Б) [105]. Досліджувані

бактерії виду *Klebsiella pneumoniae* при висіві на скошений агар середовища Кліглера колір середовища не змінювався і чорне кільце не утворювалось, чим можемо інтерпретувати інертність бактерій до лактози та глюкози (рис. 3.5 – Б) [104, 229]. Мікроорганізми даного виду «здатні використовувати цитрат гідрофосфату аммонію як єдине джерело вуглецю з середовища Сімонса з продукцією лугів, що підвищує рН і змінює колір з зеленого на синій (рис. 3.5 – Б). Властивість мікроорганізмів утилізувати вуглець малонату та ацетату натрію зумовлює аналогічну зміну кольору середовищ на синій (рис. 3.5 – Б) [104]. Досліджувана *Klebsiella pneumoniae* здатна розщеплювати продукти неповного гідролізу білка – проявляє пептолітичні властивості, колір парадиметиламідобензальдегіда (індикатора) змінився з безбарвного на рожево-бузковий, внаслідок виділення індолу (рис. 3.5 – Б) [104, 229]. Зміна кольору індикатора середовища з жовтого на малиновий свідчить про зміну рН внаслідок здатності бактерій виділяти фермент уреазу, який гідролізує сечовину з утворенням лужних продуктів реакції – аміаку (рис. 3.5 – Б) [104, 163]. При дослідженні даної культури щодо дезамінування фенілаланіну, фенілпіровиноградна кислота не утворювалась, тому вона не могла взаємодіяти з хлорним залізом, утворюючи сполуку зеленого кольору - *Klebsiella pneumoniae* не здатна дезамінувати фенілаланін (рис. 3.5 – 7) [104]. Пересів даної бактеріальної культури уколом у 0,3%-ий м'ясопептонний агар не спровокував відгалуджень у товщі через 24 – бактерії не здатні до руху (рис. 3.5 – Б).

Виділені та ідентифіковані даними методами (бактеріологічні методи та біохімічне типування) мікроорганізми видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* зберігаються у науково-дослідній лабораторії кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології факультету ветеринарної медицини Поліського національного університету у пробірках зі скошеним м'ясопептонним агаром (МПА) за

температури +5°C і підтримуються шляхом пасажування з інтервалом в 15 діб [104, 105].

Отже, представлений нами алгоритм виділення, культивування та ідентифікації збудників дисбіозів бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* може бути використаний для лабораторної діагностики збудників бактерій, які належать до Родини *Enterobacteriaceae* [104, 105]. А ідентифіковані нами *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* можуть бути використані як випробувальні культури для вивчення напрямку дії фармакологічних засобів для лікування та профілактики кишкових інфекцій у бджіл (*in vitro*), зумовлених бактеріями виду *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* [104, 105].

3.3 Вивчення ключових аспектів патогенезу за клебсієльозів у бджіл

Кишкові клебсієльози – група захворювань людей та тварин, які проявляються у вигляді запалення слизової оболонки тонкого чи товстого кишківника або шлунка [83, 276]. Основними збудниками даного захворювання є бактерії родини *Enterobacteriaceae* [135]. У тварин, зокрема і у бджіл, дану хворобу викликають бактерії, що належать до роду *Klebsiella* [83]. Ідентифіковані бактерії бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* є одними із збудників дисбіозів *Apis mellifera*. Знання патогенетичних аспектів впливу цих бактерій на макроорганізм бджоли медоносної формують чітку картину патологічного стану. Важливим є розуміння кожної ланки патогенезу, так як, це, у свою чергу, дає можливість своєчасно застосувати лікувальний чи профілактичний засіб для не допущення більш складного перебігу захворювання, попереджуючи загибель бджолосімей.

Результатом даного етапу досліджень стала наукова інтерпретація ключових аспектів патогенезу клебсієльозу у бджіл. Для наукового пояснення механізмів прояву даної патології та вивчення токсигенного впливу збудників на макроорганізм хазяїна є обізнаність у будові його найважливіших структур. Гістологічно стінка кишечника бджоли складається із м'язової [22] (пучки поперечносмугастих м'язових симпластів, що забезпечують перистальтичні рухи і слизової оболонки (формують ентероцити, які стимулюють пристінкове травлення завдяки роботі мікрівіль на апікальному полюсі клітин [22]). З внутрішнього боку мукозного шару розстеляється базальна мембрана, основу складову якої являє хітин, що сприяє формуванню еластичного каркаса шлунка комахи, виконуючи опорно-трофічну функцію. Окрім того, клітини слизової оболонки стінки кишечника обволікаються шаром особливої перитрофічної мембрани [22], щільність якої забезпечується білками та хітином. Перитрофічна мембрана безпосередньо визначає імунний статус бджоли, впливаючи на можливість проникнення інфекційних агентів у гемолімфу. Саме наявність базальної та перитрофічної мембран є суттєвою відмінністю у будові стінки тонкої кишки ссавців та комах. Вони забезпечують вибіркочну проникність перетравлених поживних речовин у вигляді простих сполук до клітин ентероцитів слизового шару кишківника, тим самим диференціюючи високомолекулярні частинки до повної обробки травними ферментами середньої кишки комахи. Тому важливою патогенетичною ланкою у розвитку клебсієльозів бджіл виступають процеси порушення морфо-функціонального складу клітин кишківника комах, які спричинені дією екзо- та ендоктоксинів бактерій виду *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*. Під дією сприятливих факторів (рис 3.6 – 1) вище названі умовно-патогенні мікроорганізми, набуваючи патогенності, шляхом активації високовірulentних полісомних генетичних структур, активно безсистемно

розмножуючись, зумовлюють інтоксикаційно-імуносупресивну дію на макроорганізм [205].

Деякі штами *Klebsiella pneumoniae* містять генетичні елементи, які дозволяють синтезувати молекули ієрсініябактину здатних до засвоєння заліза, підсилюючи можливість викликати хворобу [151]. Тому при неконтрольованому розмноженні цих бактерій та наявності у них таких генетичних елементів мікроорганізми набувають здатності поглинати мікроелементи організму господаря, спричиняючи дефіцитний стан. Широкий спектр факторів вірулентності бактерій виду *Klebsiella pneumoniae* (капсульні ліпополісариди, фібрії типу 1 та 3, сідерофори, порини, метаболізм алантоїну тощо) дозволяє проявляти полівекторну дію на фізіологічний стан бджоли [205]. При системній інфекції наявність капсули дуже важливий фрагмент для прогресування *Klebsiella pneumoniae*. Деякі штами здатні продукувати гіпермуковіскозну капсулу, яка складається з слизово-в'язкого екзополісахаридного покриву і суттєво сприяє патогенності цього мікроорганізму [205]. Наявність такої капсули надає захисної здатності бактерії до активного мігрування гемолімфою господаря, уникаючи імунокомпетентних клітин. Цей природній гіперслизовий шар блокує синтез антитіл, екранує поверхневі клітини антигенів та блокує фагоцитоз нейтрофілів. Зовнішні мембранні білки (OMPs) мікроорганізмів виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* грають важливу роль у забезпеченні антибіотикорезистентності та бактеріальної вірулентності, що впливає на патогенну здатність бактерії [181]. Патогенні штами *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* високоінвазивні та, володіючи адгезивними властивостями, проявляють високу реактивну здатність до виділення кисню в нейтрофілах гемолімфи, окрім того OMPs є рецепторами гемолізіну та бактеріоцинів [181].



Рис. 3.6. Патогенез кишкового клебсієльозу бджіл (1 – фактори імуносупресивної дії на організм бджоли; 2 – інфільтрація грам негативних бактерій (а) видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* у морфологічно-функціональні елементи кишкової стінки бджоли; 3 – термінальна ланка клебсієльозу бджіл)

Таким чином, сукупна дія факторів вірулентності ентеробактерій видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* зумовлюють імуносупресивну дію на клітинному та гуморальному рівні організму бджоли (рис 3.6 – 2). Неконтрольоване розмноження цих умовно-патогенних мікроорганізмів порушує водно-електролітний баланс бджолиного кишечника і знижує концентрацію іонів водню. Кислотна рівновага у порожнині середньої кишки комах забезпечена постійною симбіотичною взаємодією непатогенних мікроорганізмів різних видів [133]. При зсуві рівноваги у будь-який бік ріст мікроорганізмів трансформується до конкуруючо-витісняючого типу, що обумовлено накопиченням високовірулентних штамів домінуючої концентрації (*Klebsiella pneumoniae*).

Кислі метаболіти патогенних мікроорганізмів роду *Klebsiella* контактують із білками перитрофічної мембрани, з утворенням вільних амінокислотних груп, які при гіпертермічному запальному процесі (ентерит) активно взаємодіють з полісахаридами хітину мембрани, що зумовлює її пористість (рис 3.6 – 2). Патогенетичний процес супроводжується виділенням та накопиченням газів, зокрема метану (CH_4) та аміаку (NH_3), що підвищують осмотичний тиск у середній кишці комахи, а це у свою чергу викликає діарею, що призводить до дегідратації організму. Відкриті ворота інфекції зумовлюють проникнення патогенних агентів у мукозний шар кишкової стінки, руйнуючи ворсинки, а згодом ентероцити слизової оболонки. Екзотоксини бактерій розм'якшують хітин базальної мембрани, шляхом розкладу полісахаридів до ди- та олігохаридів. Таким чином порушується опорна функція хітину, кишечник втрачає стабільне положення внаслідок послаблення механічного каркасу. Поперечносмугасті м'язові симпласти втрачають здатність до скорочення, тому продукти метаболізму бджолиного організму не екскретуються, заповнюють черевце, тим самим блокують здатність до польоту. Бактеріємія є останньою ланкою в патогенезі кишкового клебсієльозу бджіл. Бактерії видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* викликають дефіцит енергії в вузькоспеціалізованих клітинах нервової, дихальної та травної систем макроорганізму, а подальша інтоксикація викликає сепсис і смерть бджіл. (рис 3.6 – 3) [147].

Отже, розуміння поетапних ланок розвитку патогенезу кишкового клебсієльозу бджіл дозволяє обґрунтовано рекомендувати лікувально-профілактичні засоби на певному етапі розвитку патологічного стану.

3.4 Визначення антагоністичної активності *Bacillus subtilis* виділеної та ідентифікованої з різних видів меду щодо патогенних мікроорганізмів бджіл виду *Klebsiella pneumoniae in vitro*

Актуальним питанням у ветеринарній медицині, зокрема у галузі бджільництва, є пошук альтернативних засобів для лікування та профілактики захворювань тварин бактеріальної етіології. Антибіотикотерапія втратила значимість та попит, так як складові даних засобів дифундують у мед, що у свою чергу призводить до його непридатності. Існують засоби, які проявляють антагоністичний вплив щодо збудників дисбіозів у тварин [83]. Пробиотики містять складові у вигляді певних груп мікроорганізмів, які при потрапленні в організм, чинять сприятливу дію щодо функціонування різних систем організму. Часто до вмісту даних засобів входить бацилярна споро утворююча бактерія виду *Bacillus subtilis* [131, 286]. Часто ці бацилярні мікроби є складовими ґрунту, а у подальшому потрапляють на квіткові рослини, де завдяки медоносним бджолам потрапляють до складу меду [74]. Виділення даного виду мікроорганізмів з медів різних видів: липового, гречаного, квіткового, лісового, акацієвого здійснювали за загальними мікробіологічними методиками, ідентифікацію бактерій здійснювали методами біохімічного типування. Антагоністичну активність визначали методом дифузії в агарових лунках (метод лунок).

Результатом першого етапу експерименту стало визначення активності мікроорганізмів медів щодо чистої культури ентеробактерій бджіл виду *Klebsiella pneumoniae* [145]. Антагоністична активність мікроорганізмів меду щодо тест-культури бджіл виду *Klebsiella pneumoniae* характеризувалась конкурентним ростом великих поверхневих блискучих колоній білого кольору з ризоїдними краями (рис. 3.7 – А) навколо лунок з діаметром від 12 до 47 мм.

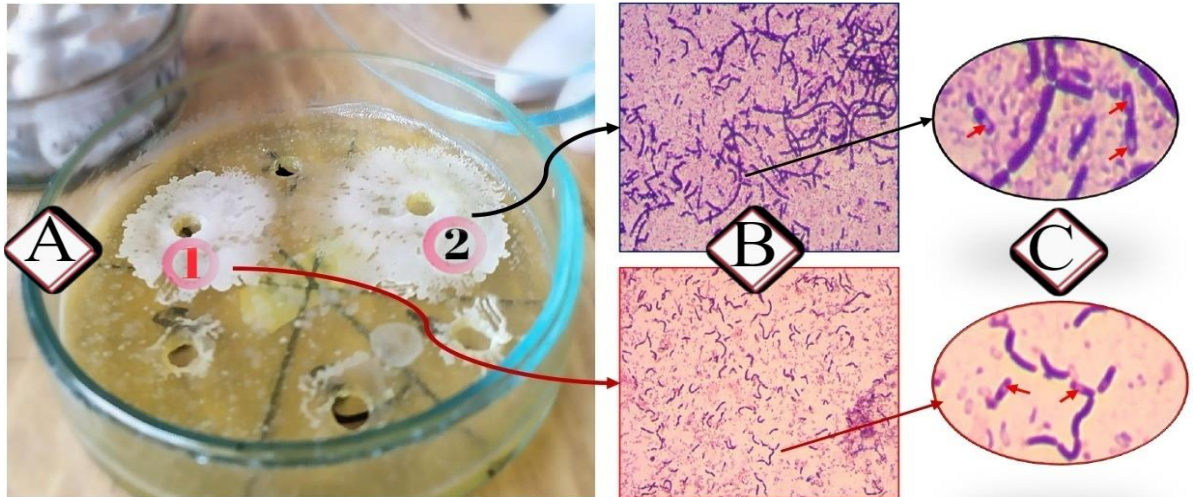


Рис. 3.7. Прояв антагонізму досліджуваних медів щодо тест-культури ентеробактерій бджіл виду *Klebsiella pneumoniae*. (А) культуральні ознаки бактерій - антагоністів (1. лісовий мед; 2. акацієвий мед). (В) вигляд бактерій – антагоністів при мікроскопії (метод Грама) x 1000. (С) ендоспори бактерій – антагоністів досліджуваних медів x 10000

Порівняльний аналіз антагоністичної активності різних видів меду показав, що лише у 2 з них зони пригнічення росту більше 30 мм (лісовий та акацієвий меду). А мікробний ріст гречаного та липового меду відрізнявся від акацієвого меду на 73,09% та 68,8% відповідно (рис. 3.8) [145].

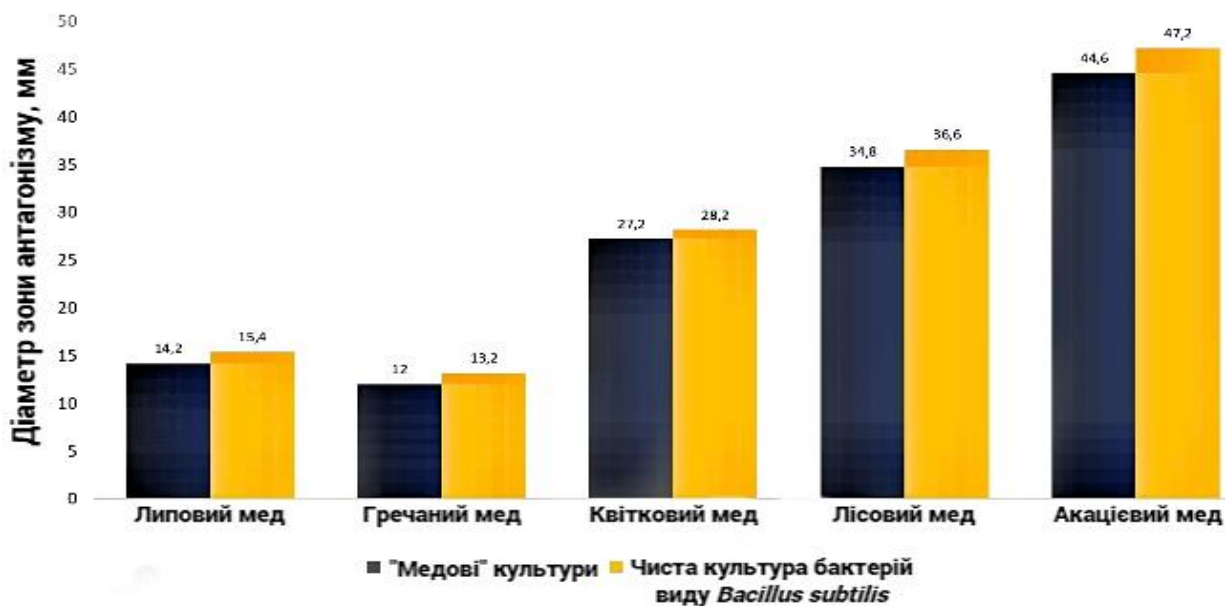


Рис. 3.8. Антагоністична дія мікрофлори меду та чистої культури *Bacillus subtilis* щодо чистої культури ентеробактерій бджіл виду *Klebsiella pneumoniae*

Підсумком другого етапу експерименту є виділення та ідентифікація *Bacillus subtilis* – бактерій-антагоністів проти збудника клебсієльоза бджіл бактерій виду *Klebsiella pneumoniae*. Результати культурно-тинкторіально-морфологічних характеристик мікроорганізмів з усіх досліджених медових сит відповідали характеристикам родини бактерій (*Bacillaceae*) [173]. При фарбуванні мікроорганізмів з бацилярних колоній методом Грама виявили грампозитивні палички з ендоспорами (рис. 3.7 – D), розміщені поодиноко та ланцюжками (рис. 3.7 – B) на фоні грамнегативних паличок тест-культури *Klebsiella pneumoniae*. Виділення чистої культури здійснювали поверхневим висівом на середовищі MRS (agar de Man, Rogossa and Sharpe) методом штриха (рис. 3.9 – A, B).

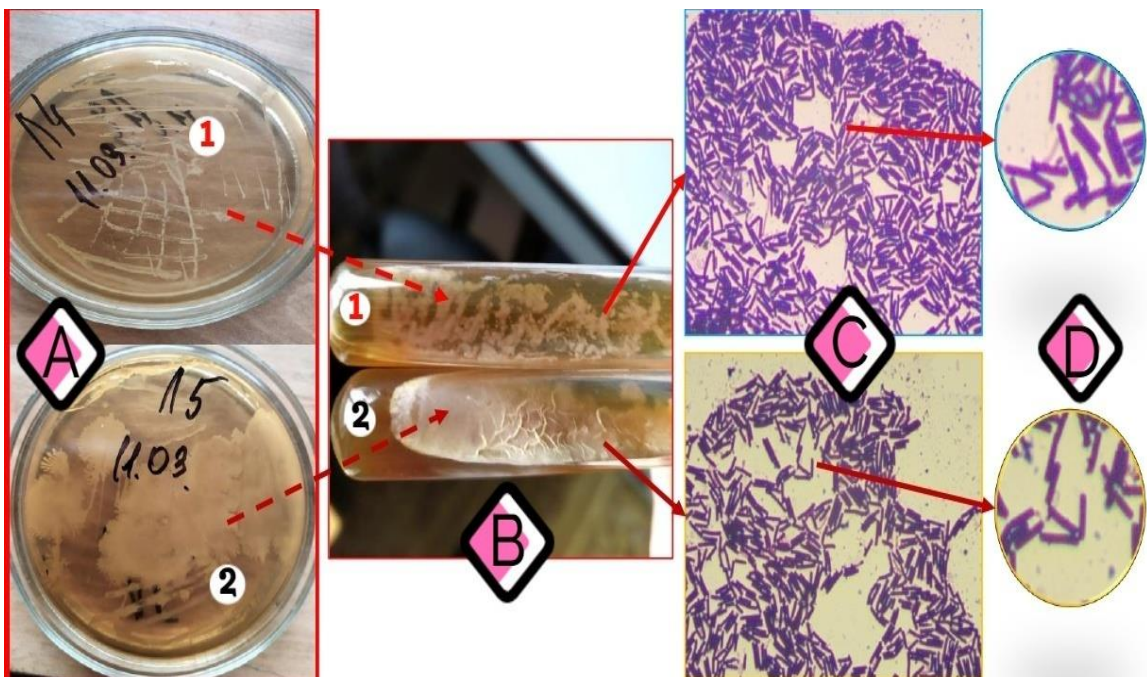


Рис. 3.9. Ріст чистих ізолятів *Bacillus subtilis* на середовищі MRS (de Man, Rogossa and Sharpe). (A) 24-годинні культури *Bacillus subtilis* в чашках Петрі (1. ізоляти лісового меду; 2. ізоляти акацієвого меду). (B) ріст ізолятів *Bacillus subtilis* на скошеному агарі MRS. (C) вигляд чистих культур бактерій – антагоністів при мікроскопії (метод Грама) x 1000. (D) вигляд чистих культур бактерій – антагоністів при мікроскопії (метод Грама) x 10000.

Морфологічні ознаки досліджуваних ізолятів були аналогічними до результатів мікроскопії мікроорганізмів з бацилярних колоній з меду (рис.3.9

– С, D). Рухливість мікроорганізмів виявлена мікроскопічно у препараті «висяча крапля» [58] та при утворенні повзучих колоній на стінках пробірки при висіві у м'ясо-пептонну желатину (рис. 3.10 – В).

При тесті на оксидазу, диск тест-системи не змінив кольору, що показує відсутність даного ферменту у бактерій – оксидазо негативні. Так, досліджувані мікроорганізми не здатні синтезувати цитохромоксидазу або індофенолоксидазу, тому є облігатними аеробами [58]. Окислювальні властивості досліджуваних бацилярних культур щодо можливості розкладання пероксиду водню до води і молекулярного кисню виявляли у реакції на каталазу (рис. 3.10 – А) – каталазо позитивні.

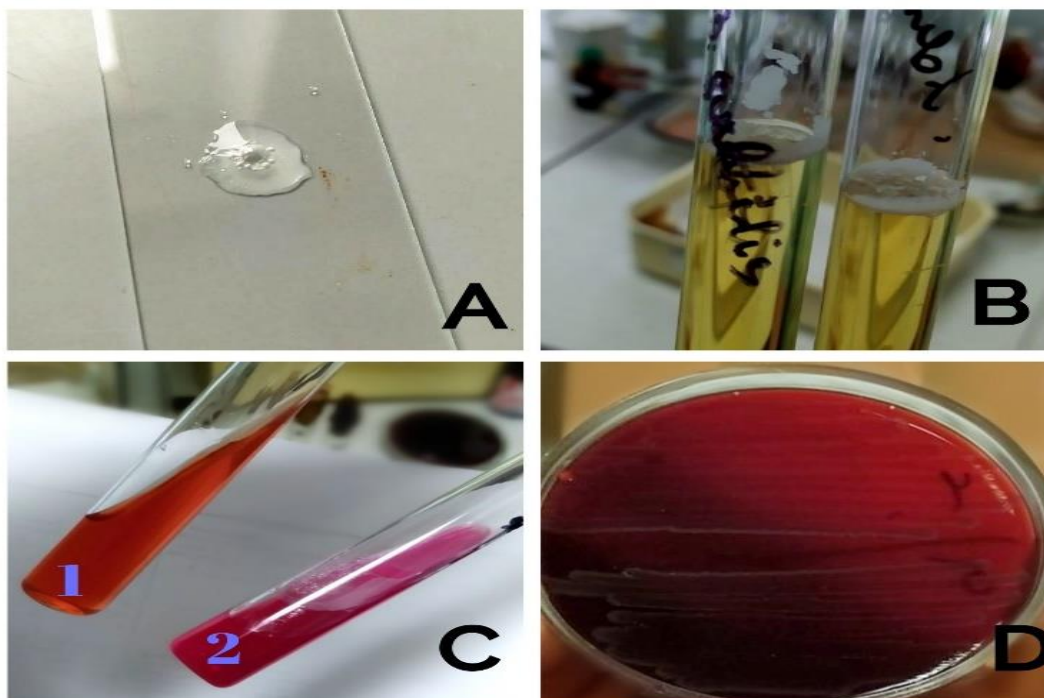


Рис. 3.10. Вивчення фізіологічних властивостей та рухливості виділеного ізоляту *Bacillus subtilis*. (А) каталазний тест. (В) тест на рухливість. (С) зміна кольору вуглеводного субстрату при ферментуванні моноцукрів (1. контрольна пробірка; 2. дослідна пробірка). (D) відсутність гемолізу при рості на кров'яному агарі.

Виділені з меду бактерії-антагоністи щодо тест-культури *Klebsiella pneumoniae* належать до роду *Bacillus* [145]. Визначення видової приналежності досліджуваних бацил здійснювали методом біохімічного

типування. Відсутність зон гемолізу при рості на середовищі з еритроцитами барана характеризує досліджувані мікроорганізми як сапрофітні бацили (рис. 3.10 – D). Чутливості до пеніциліну не виявлено – при інкубації культур з додаванням різних концентрацій пеніциліну форма бактеріальних клітин не змінилась, що виключає належність культури-антагоніста до виду *Bacillus anthracis*. Культура активна при розщепленні моносахаридів (ксилоза, арабіноза) вуглеводного субстрату (рис. 3.10 – C). Вказані прості цукри є джерелом вуглецю з наступним синтезом екзогенних органічних кислот, зданих змінювати ацидозно-водневий показник і відповідно колір індикаторного середовища до малинового (рис. 3.10 – C). При тесті на уреазу колір середовища залишився жовтим, тобто рН не змінилось, лужні продукти (аміак, утворений з сечовини) відсутні. Позитивна реакція Фогеста-Проскауера свідчить про здатність виділених з медових сит бактерій утворювати ацетоїн при додаванні до 2,5 см³ добової культури бактерій (з середовища Кларка) 1 см³ спиртового розчину α -нафтола та 0,4 см³ 40% КОН [58]. Виділені штами мікроорганізмів з досліджуваних медових сит – антагоністи ентеробактерій бджіл виду *Klebsiella pneumoniae* – належать до родини родини *Bacillaceae*, роду *Bacillus*, виду *Bacillus subtilis* [145].

Результатом третього етапу експерименту стало підтвердження антагоністичної активності виділеної та ідентифікованої нами чистої культури бактерій виду *Bacillus subtilis* щодо тест-культури *Klebsiella pneumoniae*. Усі ізольовані штами *Bacillus subtilis* виявляли антагоністичну активність при спільному культивуванні з *Klebsiella pneumoniae* з різними діаметрами росту (рис. 3.8). Порівняно з результатами першого етапу даного експерименту по активності мікрофлори меду щодо чистої культури *Klebsiella pneumoniae*, інгібуючий ефект чистих культур *Bacillus subtilis* був сильнішим. Різниця між діаметрами антагонізму впливу мікрофлори меду та чистої культури *Bacillus subtilis*: 7,79% (липовий мед); 9,09% (гречаний мед);

3,55% (квітковий мед); 4,92% (лісовий мед); 5,51% (акацієвий мед). Найефективніші ізоляти – антагоністи проти *Klebsiella pneumoniae* – були виділені з акаційного та лісового медів (рис. 3.8) [145].

Отже, виділений нами вид бактерій (*Bacillus subtilis*) володіє значними антагоністичними властивостями щодо збудника дисбіозу бджіл бактерій виду *Klebsiella pneumoniae*, що може бути використане як додаткова складова пробіотиків при лікуванні та профілактиці ентеробактеріозів бджолиних колоній.

3.5 Вивчення дії (бактеріостатична/бактерицидна/антагоністична) фармакологічних засобів щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes in vitro*

Ринок засобів для профілактики хвороб тварин має досить широкий спектр. Зокрема, у галузі бджільництва існує проблема з препаратами, які сприятливо діяли б на організм бджоли при негативному впливі щодо збудників інфекційних захворювань. Перспективним є використання пробіотиків, причому, не лише в Україні, а у всьому світі [62, 93, 250]. Адже такі засоби здатні позитивно впливати на макроорганізм, підвищуючи його резистентність [264].

Відоме використання дезінфекційних засобів для дотримання ветеринарно-санітарного стану у господарстві та профілактики хвороб тварин [247]. Адже дезінфекція передбачає повне зниження збудників інфекційних хвороб у навколишньому середовищі, предметах догляду, тощо [155, 161]. Критеріями сприятливої роботи дезінфекційних засобів є їх універсальність, не токсичність, можливість застосування у присутності тварин та інші [155]. Таким чином існує необхідність їх попередньої перевірки в лабораторних умовах для встановлення здатності знищувати збудників конкретних інфекційних захворювань.

Отже, попереднє визначення напрямку дії таких засобів (пробіотиків та дезінфектантів) щодо основних збудників ентеробактеріозів (дисбіозів) бджіл *in vitro* є першочерговою ланкою для подальшого застосування таких засобів *in vivo* з профілактичною або лікувальною метою.

3.5.1 Визначення дії експериментального дезінфектанту «Йодіз Дез №2» щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes in vitro*

Експериментальний дезінфектант «Йодіз Дез №2» — засіб наданий ТОВ «СПП» МБС м. Києва. Даний засіб містить у своєму складі активний йод. Як відомо даний мікроелемент може проявляти активну дію щодо мікроорганізмів. Дані дослідження проводили у два етапи (для перевірки активності експериментального засобу через 14 діб) диско-дифузійним методом у концентраціях препарату (1:5, 1:10, 1:100) розведеного 0,9% стерильним фізіологічним розчином [103] на середовищах АМХ (Агар Мюллера-Хінтона) та МПА (М'ясо-пептонний агар) [108]. Тривалість культивування – 36 годин.

Результати дії дезінфектанту «Йодіз Дез №2» на культуру *Klebsiella pneumoniae* представлені в таблиці 3.4. Діаметр зони просвітлення найбільший при нативному застосуванні препарату, і краще виражений на середовищі АМХ (Агар Мюллера-Хінтона), ніж на середовищі МПА (М'ясо-пептонний агар). Представлені дані характеризують *бактеріостатичну дію* дезінфектанту, так як в усіх випадках (крім нативного) на площі зони просвітлення реєструвався пригнічений ріст культури. *Бактерицидна* дія проявлялася при концентраціях від нативного стану до 1:10 (діаметром від 10 мм до 6 мм).

Таблиця 3.4

**Зони пригнічення росту культури *Klebsiella pneumoniae*
дезінфектантом «Йодіс Дез №2» на середовищах АМХ та МПА (n = 5)**

Зона затримки росту, М±m	Середовище АМХ								Середовище МПА							
	Перша доба				Четверта доба				Перша доба				Четверта доба			
	Нативний	1:5	1:10	1:100	Нативний	1:5	1:10	1:100	Нативний	1:5	1:10	1:100	Нативний	1:5	1:10	1:100
31,60±0,57	27,60±0,57*	24,40±0,76**	20,40±0,57***	32,20±0,74	30,60±0,76	27,80±0,89*	26,00±0,79***	12,80±0,42	відсутня	відсутня	відсутня	14,20±0,42	відсутня	відсутня	відсутня	відсутня

Примітка:

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ достовірність пораховано порівняно з дією нативного розчину

АМХ – Агар Мюллера-Хінтона; МПА – М'ясо-пептонний агар.

Візуальні зміни при бактеріологічних дослідженнях вивчення властивостей дезінфектанту на культуру *Klebsiella pneumoniae* представлені на рисунку 3.11.



Рис. 3.11. Візуальні зміни при бактеріологічних дослідженнях активності дезінфектанту «Йодіс Дез №2» на дисках на культуру *Klebsiella pneumoniae* на 1 добу (а), і на 4 добу (б) на середовищі АМХ

Отже, аналіз отриманих результатів свідчить про те, що препарат «Йодіс Дез №2» володіє бактеріостатичними та незначними бактерицидними властивостями щодо *Klebsiella pneumoniae*.

Згідно з таблицею 3.5 діаметр зони просвітлення при дії дезінфектанту «Йодіс Дез №2» на культуру *Enterobacter aerogenes* найбільший при нативному застосуванні препарату, і краще виражений на середовищі АМХ (агар Мюллера-Хінтона), ніж на середовищі МПА (м'ясо-пептонний агар).

Таблиця. 3.5

Зони пригнічення росту культури *Enterobacter aerogenes* дезінфектантом «Йодіс Дез №2» на середовищах АМХ та МПА (n = 5)

	Середовище АМХ								Середовище МПА							
	Друга доба				Четверта доба				Друга доба				Четверта доба			
	Нативний	1:5	1:10	1:100	Нативний	1:5	1:10	1:100	Нативний	1:5	1:10	1:100	Нативний	1:5	1:10	1:100
Зона затримки росту, М±m	25,20±0,42	19,00±0,35*	18,00±0,35**	13,80±0,42***	28,80±0,65	27,60±0,57	25,80±0,42*	17,80±0,42***	11,80±0,42	6,80±0,42**	відсутня	відсутня	12,40±0,27	відсутня	відсутня	відсутня

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ достовірність пороховано порівняно з дією нативного розчину

АМХ – Агар Мюллера-Хінтона; МПА – М'ясо-пептонний агар.

Табличні дані характеризують бактеріостатичну дію дезінфектанту, так як в усіх випадках на площі зони просвітлення реєструвався пригнічений ріст культури. Бактерицидна дія не проявилася, так як зона лізису ентеробактерій – відсутня [108].

Другий етап експерименту передбачав повтор дослідів через 14 діб після проведення першого етапу на середовищі АМХ. Активність дезінфектанту «Йодіс Дез №2» на культуру *Klebsiella pneumoniae* зменшилася. Бактерицидна дія не спостерігалась, а бактеріостатична дія

становила 10 – 8 мм (у розведеннях від нативного до 1:5) [108]. Візуальні зміни при бактеріологічних дослідженнях активності препарату «Йодіс Дез №2» на середовищі АМХ на культуру *Klebsiella pneumoniae* представлений на рисунку 3.12 – А [108].

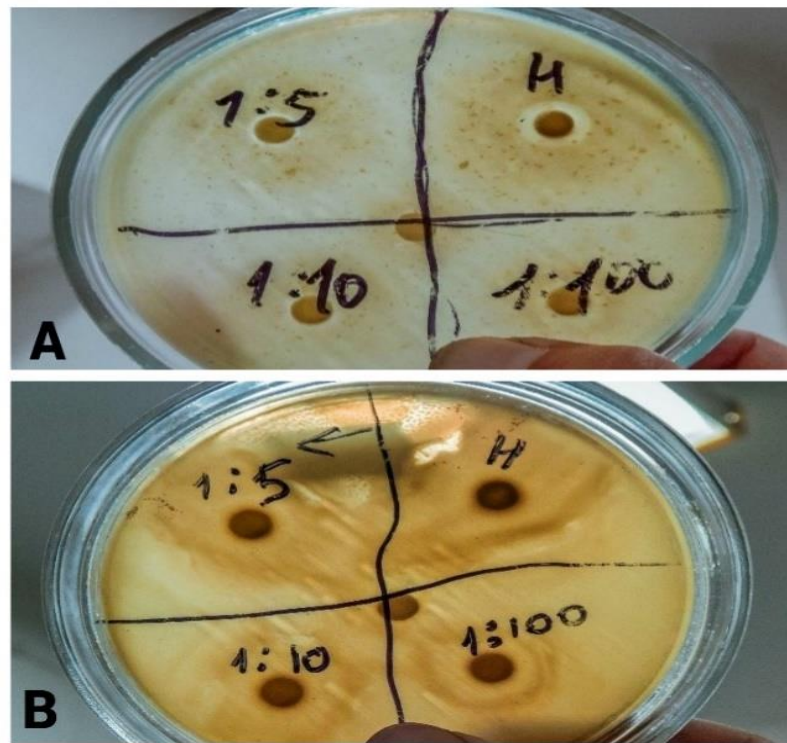


Рис. 3.12. Візуальні зміни при бактеріологічних дослідженнях активності дезінфектанту «Йодіс Дез №2» на дисках на культури *Klebsiella pneumoniae* (А) та *Enterobacter aerogenes* (В) на середовищі АМХ (повтор досліді через 14 діб)

Візуальні зміни при бактеріологічних дослідженнях активності препарату «Йодіс Дез №2» на середовищі АМХ на культуру *Enterobacter aerogenes* представлений на рисунку 3.12 – В. Як видно з рисунка 3.12 активність дезінфектанту «Йодіс Дез №2» на культуру *Enterobacter aerogenes* зменшилася. Бактерицидна та бактериостатична дії відсутні [108].

Отже, експериментальний дезінфектант «Йодіс Дез №2» має більш виражену бактериостатичну дію на мікроорганізми виду *Klebsiella pneumoniae*, ніж на мікроорганізми виду *Enterobacter aerogenes* та незначну

бактерицидну дію, діаметр зони лізису ентеробактерій 6 – 10 мм в розведенні від нативного до 1:10 тільки на *Klebsiella pneumoniae*; Встановлене достовірне зниження в 3 рази і більше антимікробної дії препарату «Йодіс Дез №2», в залежності від часу зберігання, а саме через 14 діб [108]. Таким чином, необхідно удосконалити склад дезінфектанту, так як дезінфекція передбачає повне знищення збудника захворювань, а не пригнічення його росту [108].

3.5.2 Визначення дії зразка розчину міді і цитрату срібла щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes in vitro*

Зразок зразка розчину міді і цитрату срібла наданий ТОВ «СГП» МБС м. Києва. Даний зразок містить у своєму складі сполуки срібла та міді, які використовуються як антимікробні засоби. Даний експеримент проводили диско-дифузійним методом [103] у нативному стані дезінфектанта та у концентраціях 1:2, 1:5, 1:10 розведеного стерильним 0,9% фізіологічним розчином на середовищі АМХ (Агар Мюллера-Хінтона). Тривалість культивування – 72 години. Вивчення тинкторіально-морфологічних ознак проводили мікроскопічними дослідженнями (збільшення мікроскопу $\times 1000$). Препарати фабували методом Грама [111].

При бактеріологічних дослідженнях активності зразка розчину цитрату міді і цитрату срібла на культури видів *Klebsiella pneumoniae* та *Enterobacter aerogenes* встановлена його бактеріостатична дія при нативному застосуванні [234]. Причому відмічали утворення біоплівки меншої щільності у зонах пригнічення росту *Klebsiella pneumoniae* діаметром $27,3 \pm 0,17$ мм (рис. 3.13 – а (в)) та *Enterobacter aerogenes* – $19,6 \pm 0,13$. (рис. 3.13 – б (в)) [234]. Найбільший діаметр зони просвітлення реєструвався на біоплівці з культурами бактерій виду *Klebsiella pneumoniae* при нативному

застосуванні препарату ($14,14 \pm 0,35$ мм). При інших розведеннях дезінфектанту прояв бактерицидної дії знаходився в межах від $9,85 \pm 0,45$ мм – при розведенні 1:5 до $11,14 \pm 0,45$ мм – при розведенні 1:2 (рис 3.13 – (г)) [234].

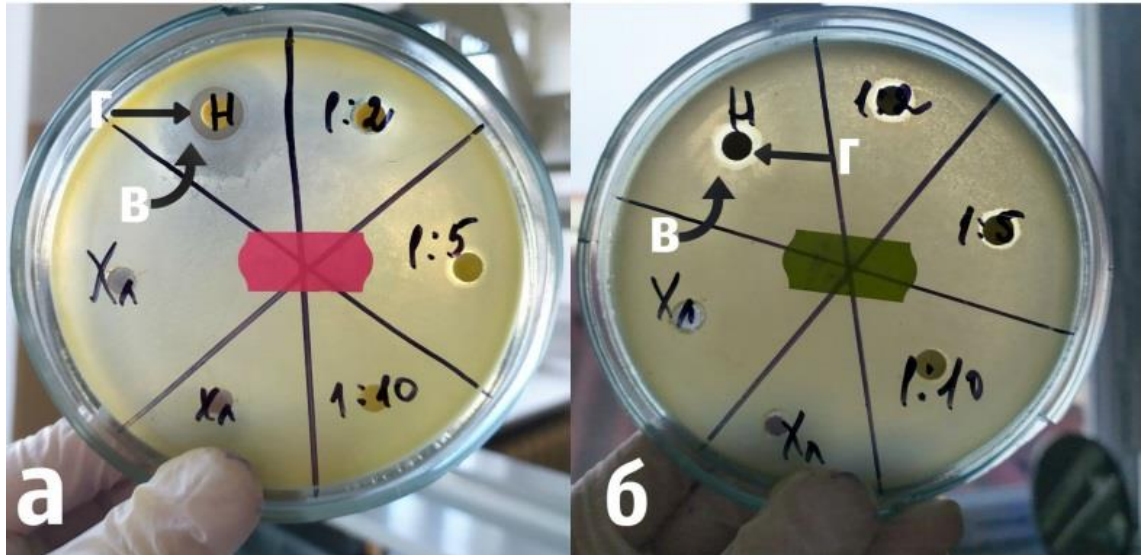


Рис. 3.13. Візуальні зміни на 1 добу при бактеріологічному дослідженні активності зразка розчину цитрату міді та цитрату срібла на культури *Klebsiella pneumoniae* (а) та *Enterobacter aerogenes* (б):
в – бактериостатична дія, г – бактерицидна дія

Ентеробактерії виду *Klebsiella pneumoniae* містять специфічні детермінанти вірулентності – капсульні гени асоційовані з мукополісахаридами (НМV-гіпермуковіскозний фенотип), які здатні поглинати позитивно заряджені іони Ag^+ і Cu^+ [165]. Мікроорганізми виду *Enterobacter aerogenes* були стійкішими до дезінфектанту при всіх застосованих розведеннях ($10,14 \pm 0,45$ – при розведенні 1:2 та $9,29 \pm 0,24$ – при розведенні 1:5) та за нативного застосування дезінфектанту ($11,14 \pm 0,35$), що пояснюємо наявністю у них генів асоціації віруленгенами, генів мультирезистентності до лікарських засобів і ймовірно до дезінфектантів (гени лактамази) [238] та високим адаптаційними властивостями [234].

При дослідженні впливу активності зразка розчину цитрату міді і цитрату срібла щодо накопичувальної культури реєстрували достовірно

більшу (на 28,8%) зону просвітлення, ніж у чистій культурі ентеробактерій виду *Klebsiella pneumoniae* [111]. Відмічена достовірна різниця між двома культурами мікроорганізмів (чистою *Klebsiella pneumoniae* та накопичувальною) при аналогічних розведеннях у концентраціях 1:2 і 1:10 (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Дія зразка розчину цитрату міді та цитрату срібла щодо чистої культури бактерій бджіл виду *Klebsiella pneumoniae* та накопичувальної культури *in vitro* (n = 7)

	Чиста культура виду <i>Klebsiella pneumoniae</i>				Накопичувальна культура			
	Нативний	1:2	1:5	1:10	Нативний	1:2	1:5	1:10
Зона затримки росту, мм, M±m	14,14±0,35	11,14±0,45	9,85±0,45	—	19,86±0,45**	13,86±0,35*	9,43±0,39	8,57±0,27**

Примітка : * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ порівняно з зонами просвітлення у біоплівці чистої культури виду *Klebsiella pneumoniae* при аналогічних розведеннях

При вивченні тинкторіально-морфологічних властивостей мікробного пейзажу на зоні бактеріостатичної дії дезінфектанту (рис. 3.14 – А) та з різних ділянок біоплівки накопичувальної культури (рис. 3.14 – Б) [111] у полі зору мікроскопа спостерігали наявність переважно грам негативних паличок різного розміру, розміщених поодинокі і у вигляді скупчень, які ймовірно належать до родини *Enterobacteriaceae* (рис. 3.14 – А). Мікробний пейзаж поверхні біоплівки без дифузного інгібування препарату відрізнявся наявністю грамнегативних та грампозитивних штамів бактерій (рис. 3.14 – Б), тому і різною сприйнятливістю мікроорганізмів до діючих речовин досліджуваного дезінфектанту [111].

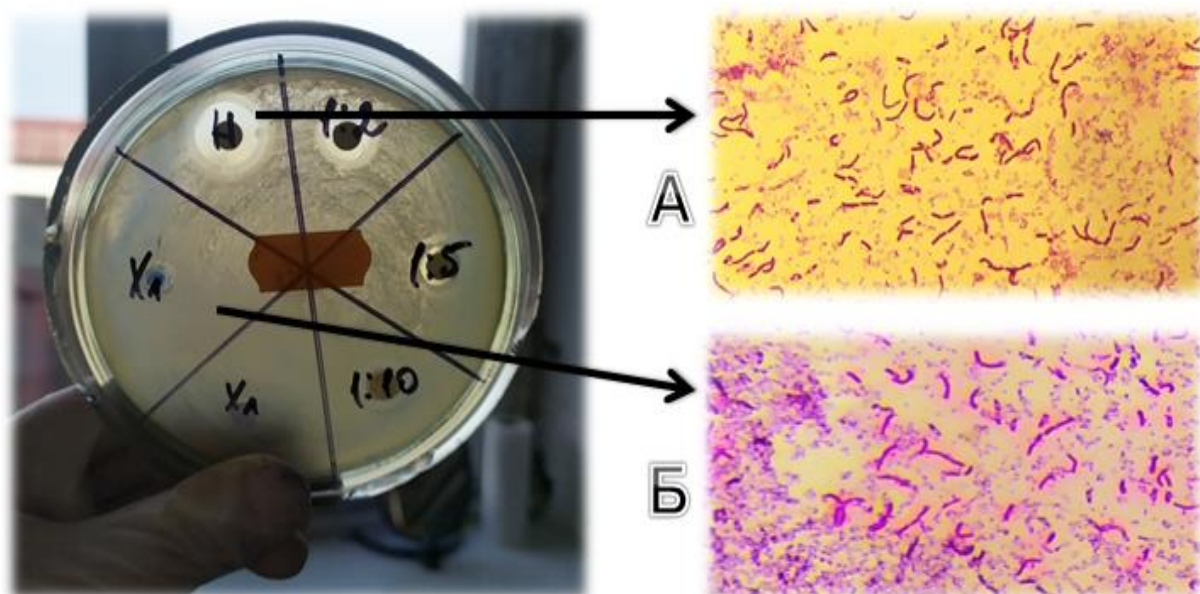


Рис. 3.14. Дія зразка розчину цитрату міді та цитрату срібла на накопичувальну культуру (24 год) мікроорганізмів уражених бджолосімей : А – мікроскопія колоній мікроорганізмів на зоні бактеріостатичної дії дезінфектанту (метод Грама (збільшення $\times 1000$)); Б – мікроскопія колоній мікроорганізмів біоплівки (метод Грама (збільшення $\times 1000$))

Ймовірно, ріст бактерій у досліджуваній накопичувальній культурі на межі бактеріостатичної та бактерицидних зон був пригнічений так як фосфорилування білка тирозином залучено в біосинтез і транспорт екзополісахариду і капсульного полісахариду у ряді грампозитивних і грамнегативних бактерій (рис. 3.14). AgNPs модулює клітинну сигналізацію, що дефосфорилується залишками тирозину на ключових бактеріальних пептидних субстратах і тим самим інгібується ріст мікроорганізмів [77, 111].

Так, досліджуваний нативний розчин цитрата срібла і міді у ролі дезінфектанту активніше проявив антибактеріальну дію щодо накопичувальної культури. Бактеріостатичний ефект зразка розчину міді і цитрату срібла краще виражений щодо чистої культури мікроорганізмів виду *Klebsiella pneumoniae* [111].

Отже, проблему профілактики та лікування ентеробактеріозів бджіл частково можливо вирішити завдяки застосуванню препаратів, до складу

яких входять срібло та мідь, так як вони, на відміну від антибіотиків, не викликають селекцію резистентних штамів мікроорганізмів [234].

3.5.3 Визначення дії «Ентеронормін з Йодіс + Se» щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes in vitro*

«Ентеронормін з Йодіс + Se» - комплекс, який містить водний розчин «Йодіс + Se», дія якого направлена на активацію корисних мікроорганізмів препарату «Ентеронормін» [26]. Важливим для застосування будь-якого терапевтичного та профілактичного засобу є розчинник і його взаємодія із складовими препарату та характером впливу на тест-культури. Метою даного етапу експерименту було визначення чутливості культур ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* [102] та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* [25] до «Ентеронормін з Йодіс + Se» розведеного медовими ситами різних видів *in vitro*. Лабораторне дослідження проводили модифікованим методом Кірбі-Бауера для галузі бджільництва [103] на середовищі АМХ. Як розчинник використовували розчини медових сит із акацієвого меду та меду з лісового різнотрав'я (1 частина меду: 1 частина теплої колодязної води). Препарат готували згідно інструкції. Тривалість досліду – 72 години.

Чутливість ентеробактерій видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* щодо до впливу «Ентеронормін з Йодіс + Se» розведеного медовими ситами з акацієвого меду [25], меду із лісового різнотрав'я [102] та нативного засобу (контроль) на середовищі АМХ наведені у таблиці 3.7.

Таблиця 3.7

Бактеріостатична дія препарату «Ентеронормін з Йодіс + Se» щодо культур видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* на середовищі АМХ (n = 15)

	<i>Klebsiella (Enterobacter) aerogenes</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
	Чистий диск	Е + сита ліс	Е + сита акація	«Ентеронормін з Йодіс + Se»	Чистий диск	Е + сита ліс	Е + сита акація	«Ентеронормін з Йодіс + Se»
Зона пригнічення росту, мм, M±m	Відсутня	24,7±0,47*	27,9±0,48**	21,9±0,49	Відсутня	28,50±0,57***	21,8±0,42*	19,40±0,37

Примітка: Е + сита ліс – «Ентеронормін з Йодіс + Se», розведений на 50% медовій ситі з лісового різнотрав'я, Е + сита акація – «Ентеронормін з Йодіс + Se», розведений на 50% медовій ситі з акацієвого меду. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ достовірність пораховано порівняно з дією нативного розчину «Ентеронормін з Йодіс + Se»

Цифрові дані інтерпретують бактеріостатичну дію препарату «Ентеронормін з Йодіс + Se» розведеного ситами з різних видів меду щодо ентробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*. Причому мікроорганізми виду *Klebsiella pneumoniae* найбільш чутливі до препарату розведеного медовою ситою з меду лісового різнотрав'я із зоною затримки росту 28,50±0,57 мм, що на 23,51% більше, ніж при розведенні даного засобу ситою з акацієвого меду та на 31,93%, ніж застосування нативного пробіотику *in vitro* (рис. 3.15 – А).

Найбільший бактеріостатичний ефект «Ентеронормін з Йодіс + Se» щодо бактерії виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* реєстрували при розведенні даного засобу ситою із акацієвого меду із зоною затримки росту бактерій $27,9 \pm 0,48$ мм (рис. 3.15 – Б), що на 21,9% більше, ніж дія даного препарату розведеного цією ж ситою на бактерії виду *Klebsiella pneumoniae*.

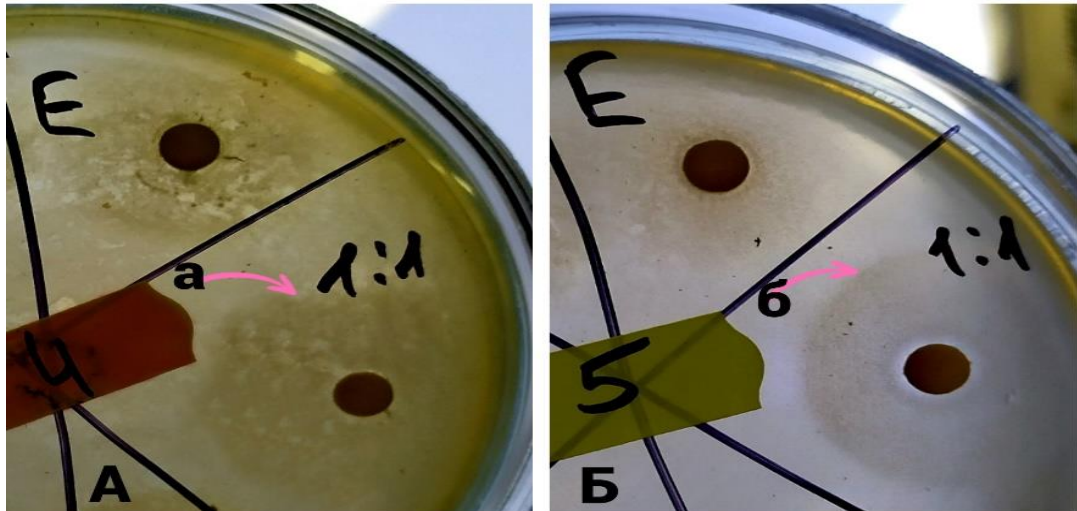


Рис. 3.15. Чутливість ентеробактерій видів *Klebsiella pneumoniae* (А) та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* (Б) щодо «Ентеронормін з Йодіс + Se» на середовищі АМХ на 1 добу експерименту: а – бактеріостатичний ефект «Ентеронормін з Йодіс + Se» розведеного медовою ситою з меду лісового різнотрав'я; б - бактеріостатичний ефект «Ентеронормін з Йодіс + Se» розведеного медовою ситою з акацієвого меду

Отже, встановлена бактеріостатична дія «Ентеронормін з Йодіс + Se» розведеного медовими ситами з акацієвого меду та меду із лісового різнотрав'я щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes in vitro*. Бактерії виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* мали яскраву затримку росту при застосуванні пробіотику розведеного ситою із акацієвого меду, а мікроорганізми виду *Klebsiella pneumoniae* виявили найбільшу чутливість до препарату розведеного ситою із меду лісового різнотрав'я [25, 102].

3.5.4 Визначення дії «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* та змішаної мікробної асоціації *in vitro*

Комерційно доступний «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» представлений корпорацією EMRO (Японія) разом з ТОВ «ЕМ Україна» (Україна) [88], являє собою пробіотичну формулу кількох видів молочнокислих бактерій, дріжджів та фотосинтезуючих мікроорганізмів [87, 258]. Напрямок дії вказаного пробіотичного засобу щодо досліджуваних штамів мікроорганізмів визначали в лабораторних умовах (*in vitro*) модифікованим методом Кірбі-Бауера [103] (далі – ДДМ) та методом дифузії в агарових лунках (далі – МЛ) [118]. Відповідні ефекти пробіотичного засобу визначали візуально та шляхом вимірювання діаметру відповідних зон навколо лунок та дисків. ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» застосовували у нативному стані і в таких концентраціях – 0,5%; 1%; 2,5%; 5%; 10%; 20%; 30%; 50%. Розведення здійснювали 50% розчином цукрового сиропу та водою. Дослідження проводили у п'яти повторюваностях для кожної культури на середовищі МПА. Облік результатів реєстрували через 24 та 72 години [144].

Результати експерименту свідчать про різний вплив складових «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» щодо змішаної мікробної асоціації та тест-культур видів *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*. Як видно з таблиць 3.8, 3.9 бактеріостатичний ефект (БС) зберігався на однаковому рівні при розведенні «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» 50% розчином цукрового сиропу у концентраціях від 0,5% до 30%. Діаметр зон пригнічення росту патогенних ентеробактерій виду *Klebsiella pneumoniae* становив $24,2 \pm 0,55$ – $28,6 \pm 0,27$ (МЛ) (табл. 3.8); $20,6 \pm 0,27$ мм – $25,6 \pm 0,57$ мм (ДДМ) (табл. 3.9). У свою чергу, антагоністична дія реєструвалася на 3 добу експерименту у концентраціях від 50% до нативного розчину препарату із діаметрами зон антагонізму – $5,2 \pm 0,42$ мм – $19,6 \pm 0,45$ мм відповідно.

Причому, результати прояву бактеріостатичного ефекту при ДДМ не мали високої достовірної різниці на першу і третю добу (рис. 3.16).

Таблиця 3.8

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	-	(БС) 25,2± 0,42	(БС) 26,4± 0,27	(БС) 30,2± 0,42	(БС) 23,2± 0,42	(БС) 21,8± 0,55	(БС) 22,6± 1,10	(БС) 26,8± 0,42
	72 год	(A) 19,6± 0,45	(A) 5,2± 0,42***	(БС) 25,2± 0,42	(БС) 26,6± 0,27	(БС) 28,6± 0,27*	(БС) 24,2± 0,55	(БС) 25,4± 0,27*	(БС) 28,4± 0,27*	(БС) 26,6± 0,27

Примітка: БС – бактеріостатична дія, мм; А– антагоністична дія, мм; * – $P < 0,05$, *** – $P < 0,001$ стосовно першої доби обліку результатів

Таблиця. 3.9

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	-	(БС) 24,6± 0,45	(БС) 21,2± 0,42	(БС) 23,6± 0,27	(БС) 25,2± 0,42	(БС) 24,6± 0,27	(БС) 24,2± 0,42	(БС) 25,2± 0,42	(БС) 24,4± 0,45
	72 год	(БС) 10,8± 0,42***	(БС) 25,6± 0,45	(БС) 20,6± 0,27	(БС) 24,8± 0,42	(БС) 24,6± 0,27	(БС) 23,6± 0,27	(БС) 24,2± 0,42	(БС) 25,6± 0,57	(БС) 24,8± 0,42

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

При розведенні «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 $11,6 \pm 0,27$ мм – $25,2 \pm 0,42$ мм на першу добу експерименту (табл. 3.10). Найбільший діаметр антагоністичного росту пробіотичних мікроорганізмів реєстрували на третю добу експерименту методом дифузії в агарових лунках – при концентраціях 0,5% – $75,4 \pm 1,04$ мм, 1% – $61,2 \pm 0,42$ мм (рис. 3.16 – С).

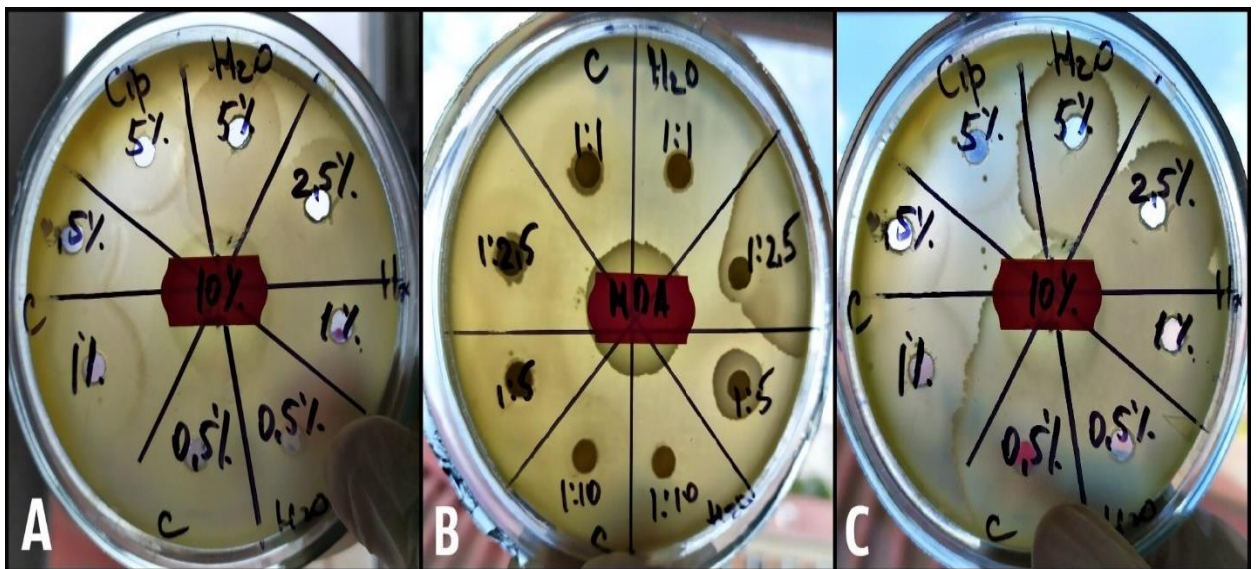


Рис. 3.16. Дія різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведеного 50% цукровим сиропом (С) та водою (H₂O) на культуру *Klebsiella pneumoniae*: А – Бактеріостатичний ефект на 24 години експерименту (метод лунок); В – Прояв антагоністичної дії на 24 години експерименту (диско-дифузійний метод); С – Прояв антагоністичної дії на 72 години експерименту (метод лунок).

Розведення препарату 50% цукровим сиропом викликало пригнічення росту патогенних ентеробактерій виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* (бактеріостатична дія) у концентраціях до 50% у межах: $16,4 \pm 0,27$ – $27,8 \pm 0,42$ мм (МЛ); $18,2 \pm 0,42$ мм – $25,4 \pm 0,45$ мм (ДДМ) (табл. 3.11).

Таблиця 3.10

**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 3.11

**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.

Мінімальна антагоністична дія препарату розведеного водою (рис. 3.17) характеризують стійкість ентеробактерій виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* до конкурентного росту щодо складових даного засобу.

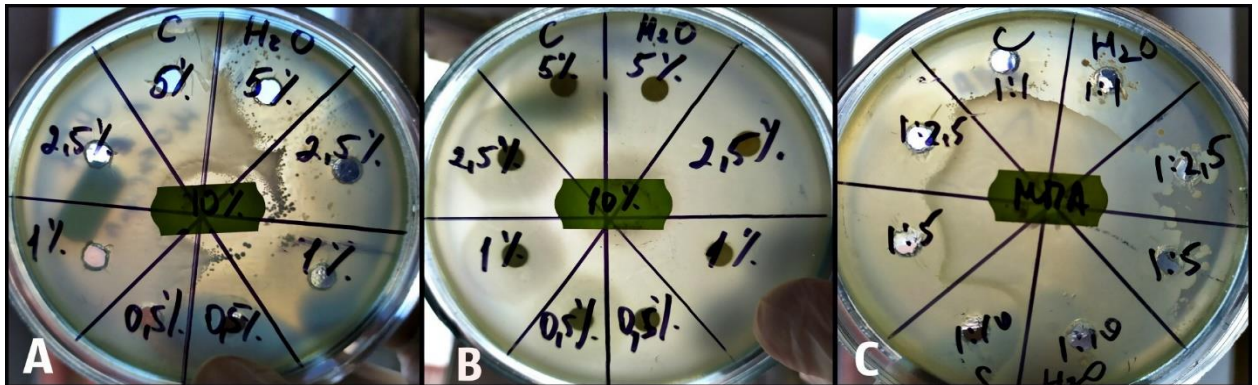


Рис. 3.17. Дія різних концентрацій «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведеного 50% цукровим сиропом (С) та водою (H₂O) на культуру *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*: А – Бактеріостатичний ефект на 72 годину експерименту (концентрація 0,1 – 5%) (метод лунок); В – Прояв антагоністичної дії на 24 годину експерименту (диско-дифузійний метод); С – Бактеріостатичний ефект на 72 годину експерименту (концентрація 10-50%) (метод лунок).

Вплив «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» щодо змішаної мікробної асоціації відрізнявся наявністю *бактерицидного ефекту* та незначної *бактеріостатичної дії* (рис. 3.18).

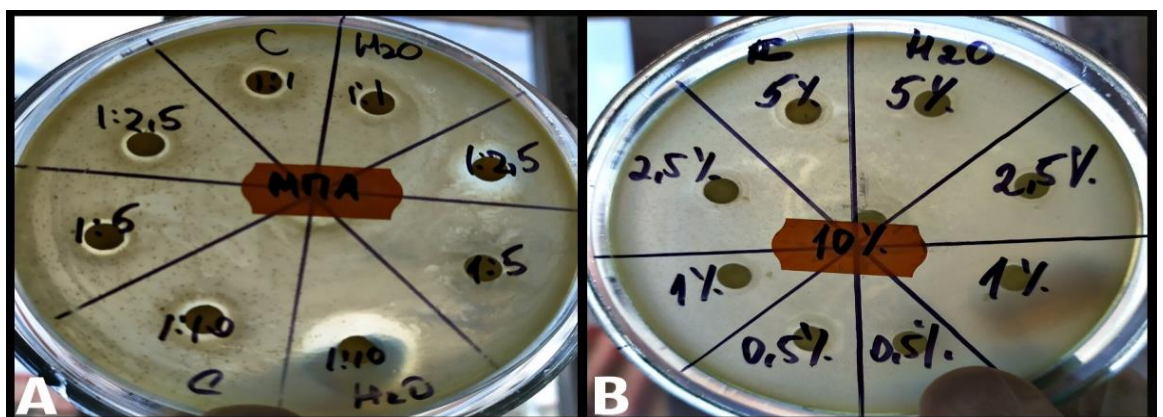


Рис. 3.18. Дія різних концентрацій «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведеного 50% цукровим сиропом (С) та водою (H₂O) на змішану мікробну асоціацію (диско-дифузійний метод): А – Бактеріостатичний та бактерицидний ефекти на 72 годину експерименту (концентрація 10 – 50%); В – Дія низьких концентрацій (0,5 – 5%).

Так, розведення пробіотика 50% розчином цукрового сиропу зумовив прояв *бактерицидного ефекту* за нативного застосування препарату – $7 \pm 0,35$ (МЛ) та $9,2 \pm 0,42$ мм – 12 мм (ДДМ). Водночас прояв найбільш активної *бактерицидної дії* реєструвався при використанні «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» у концентрації 10% розведеного водою, де діаметр зони просвітлення становив $18,6 \pm 0,57$ мм відповідно (ДДМ) (рис. 3.19) [144].

Так, характер дії пробіотичного засобу залежить від розчинника (50% цукровий сироп та вода), що у свою чергу визначає напрям та мету його застосування [144].

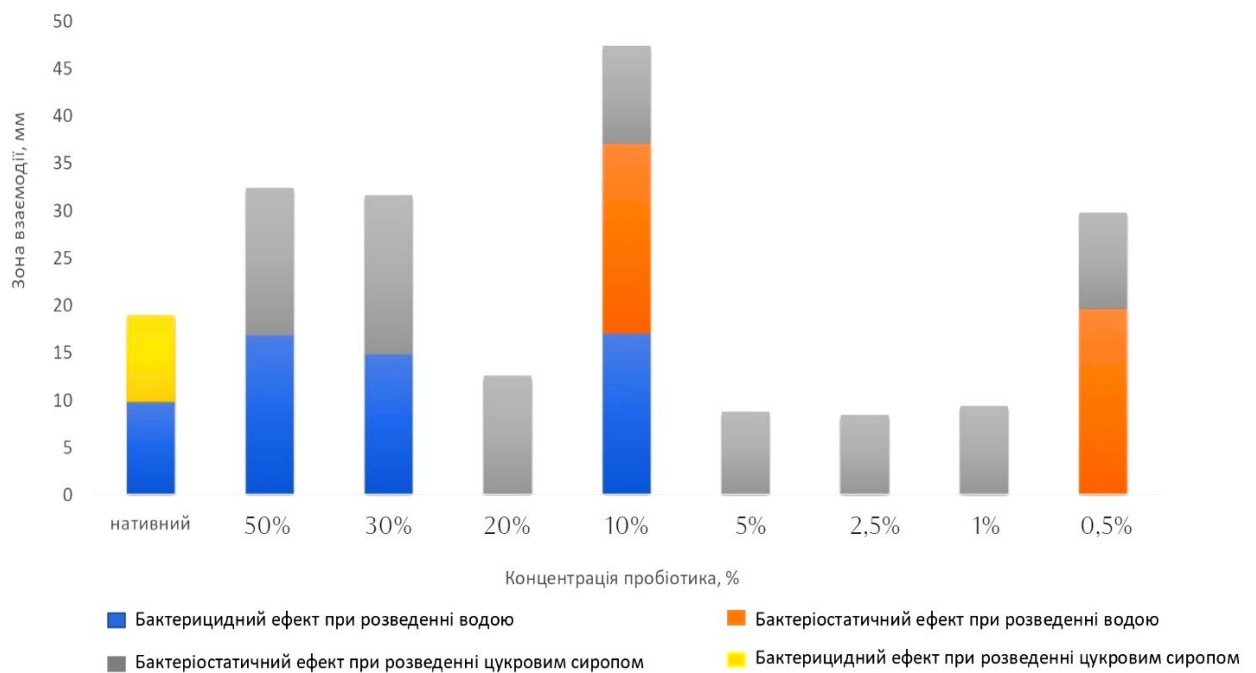


Рис. 3.19. Результати взаємодії «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ», розведеного 50% цукровим сиропом та водою на змішану мікробну асоціацію, виділену при бджолиних дисбіозах

Отже, найбільший антагонізм «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» зареєстрований щодо мікроорганізмів виду *Klebsiella pneumoniae* визначений методом лунок. При розведенні препарату водою бактеріостатична дія

спостерігалась у концентраціях 0,5–1%; при розведенні 50% цукровим сиропом у концентраціях від 0,5% до 30%. Встановлено, що «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» при розведенні від 0,5% до 50% цукровим сиропом проявляв найбільш виражений бактеріостатичний ефект щодо ентеробактерій бджіл виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* [144]. Найвищу бактерицидну дію щодо змішаної мікробної асоціації «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» проявив при розведенні водою у концентрації 1:10, де зона затримки росту становила $18,6 \pm 0,57$ мм [144].

3.6 Вивчення впливу різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», розведених цукровим сиропом та медовою гречаною ситою на морфологічні, деякі біохімічні параметри гемолімфи та тривалість життя бджіл

Відомим фактом є різні варіації дії певного засобу залежно від розчинника. Перспективний пробіотик «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» позиціонує різну дію щодо бджолиного організму залежно від концентрації робочого розчину та розчинника. Після проведення першого етапу дослідів *in vitro* щодо напрямку дії даного засобу відносно ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* був проведений 2 етап дослідів *in vivo*. Для даних експериментів було надано 480 бджіл української степової породи ФОП Застулкою М. В. (с. Вереси). Експериментальні комахи знаходились у 8 садках (рис. 2.2) при температурі +24–25°C (термостат) та відносній вологості повітря 50–70% [146, 149, 150]. Комахи № 1–3 садків отримували «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведений медовою гречаною ситою (перша серія експерименту), бджолам садків № 5–7 згодовували даний препарат розведений розчином 50% цукрового сиропу (2 серія експерименту) [146, 149, 150]. «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розводили даними розчинниками у концентраціях 5% (садки №

1 та 5); 2,5% (садки № 2 та 6); 1,25% (садки № 3 та 7) [146, 149, 150]. Бджоли садків № 4 та 8 – отримували нативні розчини медової гречаної сити та 50% цукрового сиропу (контроль) [146, 149, 150]. Годували бджіл три рази на добу (*підкормки готували щоденно*). Також з цієї ж пасіки було відібрано по 20 особин бджіл для порівняння результатів бджіл експериментальних груп (садки № 1–8) з комахами, які перебувають у природних умовах [146, 149, 150].

3.6.1 Вивчення динаміки тривалості життя бджіл української степової породи за впливу різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» з цукровим сиропом та медовою гречаною ситою в садковому досліді

Фізіологічний стан (кормову і рухову поведінку) бджіл при дослідженні динаміки тривалості життя бджіл української степової породи за впливу різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведеного різними розчинниками вивчали щоденно протягом усього періоду досліджень, мертвих комах видаляли з садків по мірі їх загибелі. Загальний експеримент тривав 18 діб (загибель останньої дослідної бджоли), певною мірою завершення експерименту для кожного садка мало конкретну добу; після чого було визначено динаміку загибелі бджіл. Тривалість життя бджіл аналізували шляхом визначення коефіцієнту середньої тривалості життя. Розрахунки проводили за формулою: $KСТЖ = (a_1 + a_2 + a_3 + \dots + a_{12}) / N$ [150].

Результати добової динаміки смертності бджіл при застосуванні різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» *розведеного гречаною медовою ситою* та цукровим сиропом представлені у таблиці 3.12 [147].

Таблиця 3.12

**Динаміка загибелі бджіл у садках при розведенні розчину
«ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» на медовій ситі**

		Кількість загиблих бджіл, %							
		Дослідні групи (концентрації робочих розчинів «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ»)						Контрольні групи	
		5% розчин		2,5% розчин		1,25% розчин		Нативний розчин	
№ досл. групи	Доба досліджу	сита	сироп	сита	сироп	сита	сироп	сита	сироп
		1	5	2	6	3	7	4	8
1		0	0	0	0	0	0	0	0
2		0	0	10	7,14	3,33	15,63	17,14	10,34
3		3,33	0	0	7,14	3,33	3,13	2,86	0
4		6,67	11,11	0	3,57	0	0	11,43	0
5		0	18,52	3,33	14,29	10	3,13	8,57	0
6		10	0	23,33	0	0	0	2,86	0
7		30	14,81	40	10,71	50	25	22,86	27,59
8		0	3,7	0	0	20	3,13	34,29	0
9		0	0	6,67	10,71	3,33	0	-	13,79
10		30	14,81	6,67	0	3,33	6,25	-	0
11		0	11,11	0	0	3,33	0	-	48,28
12		20	7,41	3,33	7,14	0	0	-	-
13		-	0	6,67	10,71	0	6,25	-	-
14		-	3,70	-	14,29	3,33	3,13	-	-
15		-	7,41	-	0	-	6,25	-	-
16		-	7,41	-	10,71	-	6,25	-	-
17		-	-	-	3,57	-	9,38	-	-
18		-	-	-	-	-	12,5	-	-

Примітка: «-» - загинуло 100% бджіл у садку

Аналіз отриманих даних показав, що бджоли *контрольної групи*, яким згодовували *нативну гречану медову сити*, почали гинути на **2-у** добу (17,14 % від кількості бджіл на початок досліджу). У наступні терміни спостережень

кількість загиблих бджіл даної групи зростала з термінальною загибеллю (100% бджіл) на 8-у добу (34,29% від початкової кількості бджіл) [150]. У той же час динаміка загибелі бджіл у дослідних групах була неоднакова. Так, при концентрації препарату 2,5% і 1,25% реєстрували різкий відхід бджіл на 7-му добу – 40% і 50% відповідно, причому за фізіологічними показниками – комахи у цих садках були активні та агресивні, а тривалість життя цих бджіл варіювала у межах 13–14 доби. У першій дослідній групі (концентрація препарату 5 %) відмічалась інша тенденція: спостерігали ступеневу загибель бджіл – 7-а доба – 30%; 10-а доба – 30%; 12-а доба – 20%. Причому, високі концентрації (5%) в лабораторних умовах викликають інфекційний процес з ступеневою загибеллю бджіл, залежно від резистентності бджіл даної групи. Найкращі результати тривалості життя бджіл при згодовуванні препарату розведеного медовою гречаною ситою отримані при 1,25% концентрації [150]. При розведенні «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» цукровим сиропом, різку загибель бджіл (10,71–27,59%) усіх груп, в тому числі, і контрольної, спостерігали на 7-му добу зі збереженням активних фізіологічних показників комах (табл. 3.12) [150]. Тривалість життя бджіл контрольної (восьмої) групи, яким згодовували нативний цукровий сироп, становила 11 діб. Причому загибель комах відмічалась на 2-у добу – 10,34%; 7-у добу – 27,59% та 11-у добу – 48,28%. У бджіл п'ятої та шостої дослідних груп реєструвалась хвилеподібна тенденція загибелі: при концентрації 5% – на 5-ту добу – 18,52%; на 7-му добу – 14,81%; на 10-11 доби – 14,81-11,11%; при концентрації 2,5% – на 5-ту добу – 14,29%; на 7, 9, 13, 16-доби – 10,71%; на 14-ту добу – 14,29% [150]. Найкращі результати тривалості життя бджіл в садкових дослідях отримані при згодовуванні 1,25% (7 садок) розчину «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведеного цукровим сиропом (18 діб) при цьому загибель бджіл відмічалася поступово, починаючи з 8-ї доби і завершилася на 18-у добу (рис. 3.20).

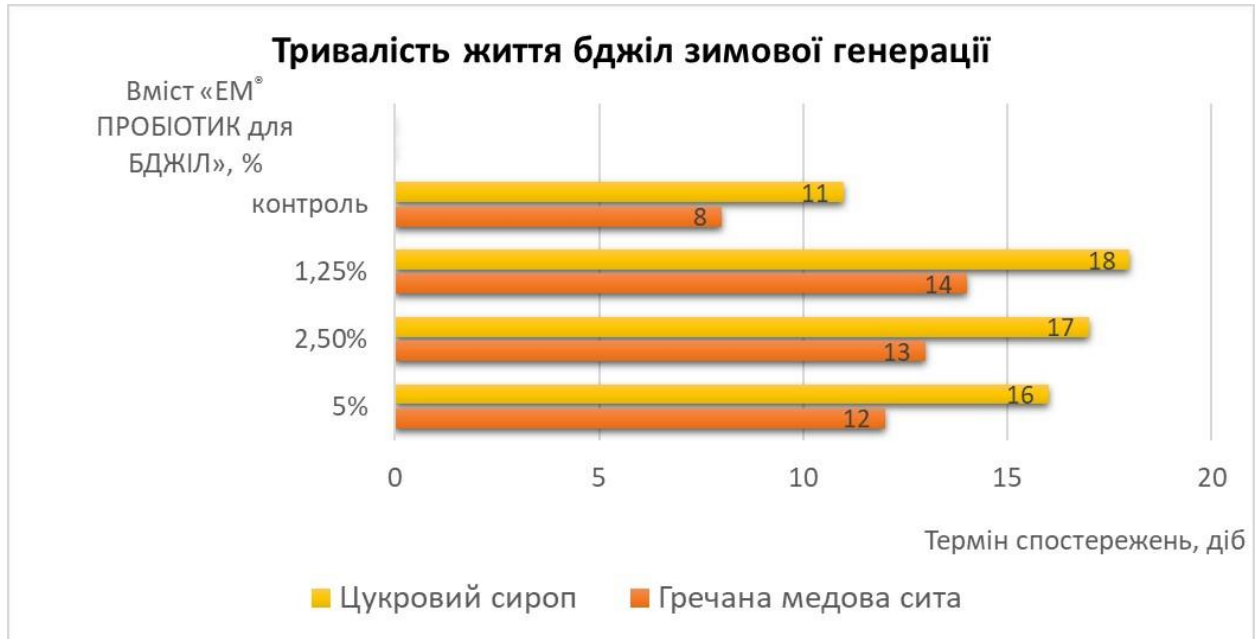


Рис. 3.20. Порівняння тривалості життя бджіл при впливі різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» розведеного цукровим сиропом та гречаною медовою ситою

Середня тривалість життя бджіл в лабораторних умовах при згодовуванні різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» розведеного цукровим сиропом – 17,33 діб, а розведеного медовою гречаною ситою – 13 діб після заселення бджіл у садки. Найбільш суттєва різниця відмічена при порівнянні тривалості життя комах: а) груп № 3 (1,25% розчин «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» розведеного медовою гречаною ситою) і групи № 4 (нативна медова гречана сита) – 42,86%; б) груп № 7 (1,25% розчин «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» розведений цукровим сиропом) і групи № 8 (нативний цукровий сироп) – 38,89%. Аналіз коефіцієнтів середньої тривалості життя бджіл (КСТЖБ), протягом усього експерименту довів позитивний вплив «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» на тривалість життя комах (рис. 3.21).

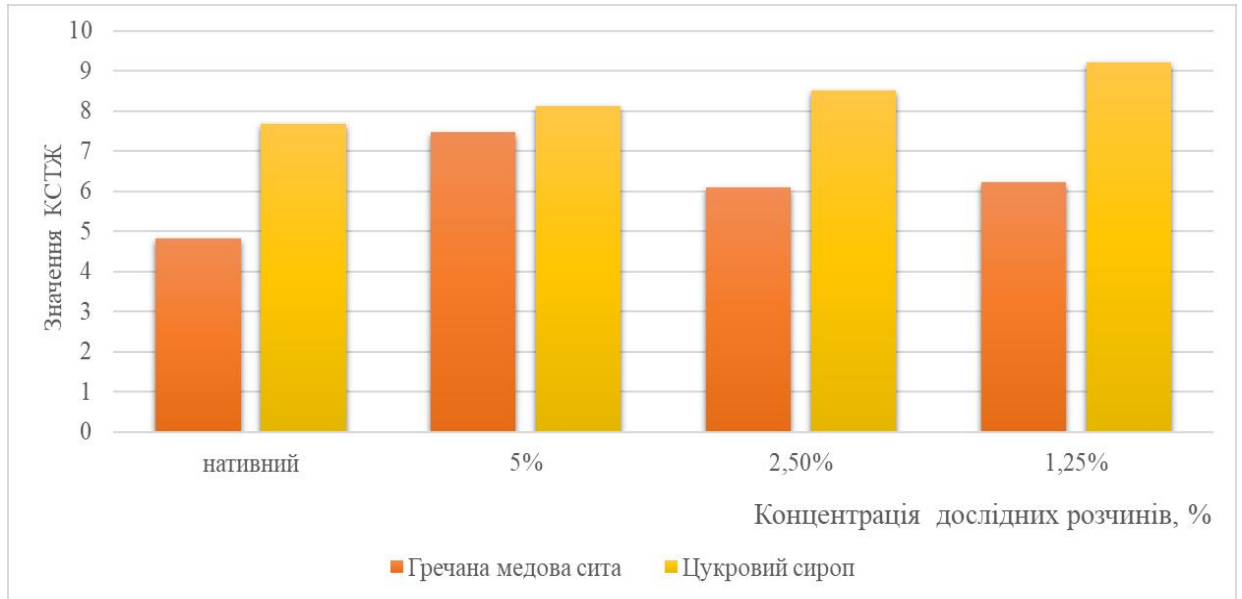


Рис. 3.21. Значення коефіцієнтів середньої тривалості життя бджіл при впливі різних концентрацій «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» розведеного цукровим сиропом та гречаною медовою ситою

Різниця коефіцієнтів, визначених у групах при застосуванні нативних розчинів без додавання препарату, свідчить про переваги цукрового сиропу як розчинника для «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ», порівняно з гречаною медовою ситою в лабораторних умовах. Найвище значення КСТЖБ визначене для 7 групи і становить 9,22 умовних одиниць (у.од.) при застосуванні розчину 1,25% концентрації розведеного цукровим сиропом. Визначена обернена залежність між показником КСТЖБ та концентрацією препарату у всіх дослідних групах бджіл, яким згодовували «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведений цукровим сиропом. «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» має позитивний вплив на динаміку тривалості життя робочих бджіл української степової породи зимової генерації у садкових дослідах. Концентрація 1,25% у лабораторних умовах виявилась надієвішою, однак необхідно зважати, що бджоли утримувалися у неприродних стресових для них умовах (в лабораторії), отримували лише дослідні підкормки, а не звичні для годівлі різноманітні поживні речовини (пилки та нектар), тому, можливо, в природних умовах концентрація

препарату може бути вищою без токсичного ефекту [150].

Отже, показник підвищення тривалості життя бджіл у всіх дослідних групах суттєво перевищує значення контрольних груп.

У лабораторних умовах найкращий ефект тривалості життя бджіл встановлений при згодовуванні 1,25% (18 діб) – 5% (16 діб) «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» розведеного цукровим сиропом (2 частини цукру: 1 частина джерельної води);

При розведенні препарату «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» гречаною медовою ситою найдовша тривалість життя бджіл становила 14 діб при 1,25% концентрації. Гречану медову сити не доцільно використовувати як розчинник для «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ», що аргументуємо швидшою загибеллю комах порівняно із групами бджіл, яким згодовано препарат розведений цукровим сиропом;

Різниця коефіцієнтів середньої тривалості життя бджіл (КСТЖБ), визначених у групах при застосуванні нативних розчинів без додавання препарату свідчить про доцільність застосування цукрового сиропу як розчинника для «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» [150].

3.6.2 Вивчення впливу різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», з цукровим сиропом та медовою гречаною ситою на морфологічні показники гемолімфи бджіл української степової породи

Для проведення досліджень морфологічних показників гемолімфи бджіл української степової породи здійснювали її відбір на 7 та 10 добу експерименту. З грудного відділу біологічний матеріал відбирали шляхом декапітації, де *гемолімфа* виступала у вигляді прозорої «горошини» [137]. З черевця гемолімфу відбирали шляхом препарування скальпелем черевця комах (прокол венозного синуса), не травмуючи жовте тіло та кишечник [146, 164]. Після повного приготування мазків здійснювали їх мікроскопію

при збільшенні «(x1000), використовуючи мікроскоп «Біолам» та цифрову камеру - насадку моделі «A59.4910 Input USB 5V 500 mA; 5.0m; OPTO-EDU A59.4910». Рекомендована комп'ютерна програма: Micro Capture Ver 6.21. Підрахунок проводили на 100 клітинах в одному мазку, при цьому, оцінюючи морфологічний склад гемолімфи бджіл [53, 146, 240].

Дія «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» в садковому експерименті щодо бджіл української степової породи зимової генерації оцінювалась шляхом мікроскопії мазків гемолімфи при застосуванні пробіотика у різних концентраціях, розведеного медовою гречаною ситою та цукровим сиропом. Диференціація гемоцитів базувалась на їх морфологічних властивостях [53, 227]. При розведенні «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» гречаною медовою ситою кількість гемоцитів всіх дослідних груп варіювала порівняно з показниками бджіл контрольної групи першої серії експерименту (комахи, які отримували нативну гречану сити). У гемограмі комах цього садка виявляли – пролейкоцити (прогемоцити) низько диференційовані, веретеноподібні фагоцити (рис. 3.22 – А) та секреторні клітини (табл. 3.13) [146]. Найбільшу кількість пролейкоцитів ($51,2 \pm 0,42$) у гемолімфі бджіл четвертого садка, порівняно з їх кількістю у бджіл усіх дослідних груп реєстрували на 7 добу експерименту (табл. 3.13) [146]. При 5% концентрації «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» (садок № 1) зросла кількість секреторних клітин ($89,40 \pm 0,67\%$), порівняно з бджолами четвертої групи, що свідчить про краще засвоєння поживних речовин макроорганізмом (рис. 3.22 – Б) [146]. На 10-ту добу у гемограмі бджіл цієї групи домінують еозинофільні фагоцити (рис. 3.22 – В, рис. 3.23) [146].

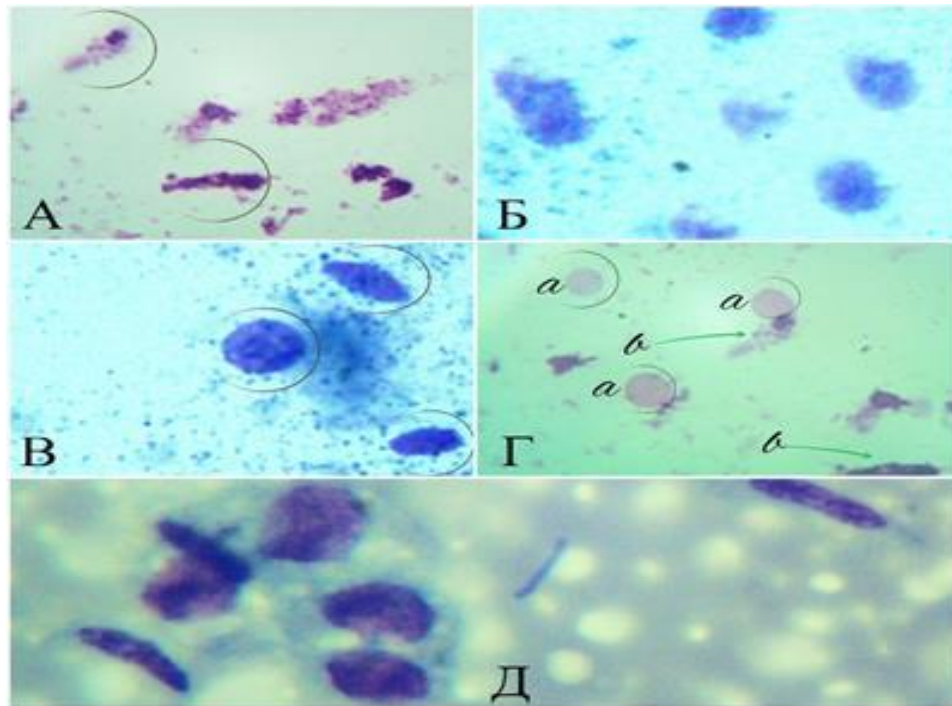


Рис. 3.22. Морфологічний склад гемолімфи бджіл при застосуванні «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» розведеного гречаною медовою ситою ($\times 1000$): А – веретенovidні фагоцити бджіл контрольної групи на 7-му добу експерименту; Б – секреторні клітини бджіл першої (5%) дослідної групи на 7-му добу експерименту; В – еозинофільні фагоцити бджіл першої (5%) дослідної групи на 10-ту добу експерименту; Г – імунокомпетентні гемоцити другої (2,5%) дослідної групи бджіл на 7-му добу експерименту: *a* – еозинофільний фагоцит, *b* – веретенovidний фагоцит; Д – фагоцитарні гемоцити бджіл третьої дослідної групи (1,25%) на 7-му добу експерименту

При згодовуванні бджолам 2,5% розчину «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» на сьому добу реєстрували синтез різних груп імунокомпетентних клітин (рис. 3.22 – Г, рис. 3.23). Збільшення клітин попередників фагоцитів пояснюємо реакцією макроорганізму на проникнення чужорідних агентів у кишечник бджоли в невеликій кількості[146]. Найвищі показники фагоцитарної здатності відмічали при дослідженні морфологічного складу гемолімфи комах третього садка (рис. 3.23) з концентрацією «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» 1,25% (рис. 3.22 – Д). На 10-ту добу досліду кількість фагоцитів бджіл третього садка залишалась стабільно високою ($79,4 \pm 0,76\%$), але змінилось співвідношення пролейкоцитів та секреторних

клітин (табл. 3.13), порівняно з сьомою добою, ймовірно, відбулась декомпенсація в організмі комах у вигляді диференціації гемоцитів на користь попередників імунокомпетентних клітин.

Таблиця 3.13

Динаміка кількості гемоцитів медоносних бджіл за використання препарату «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведеного гречаною медовою ситою

Дослідні групи	Кількість гемоцитів							
	Пролейкоцити (прогемоцити)		Фагоцити		Сереторні 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
1-та група 5% розчин «ЕМ [®] 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* **
2-га група 2,5% розчин «ЕМ [®] 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
3-а група 1,25% розчин «ЕМ [®] 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**	-	-
4-га (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.

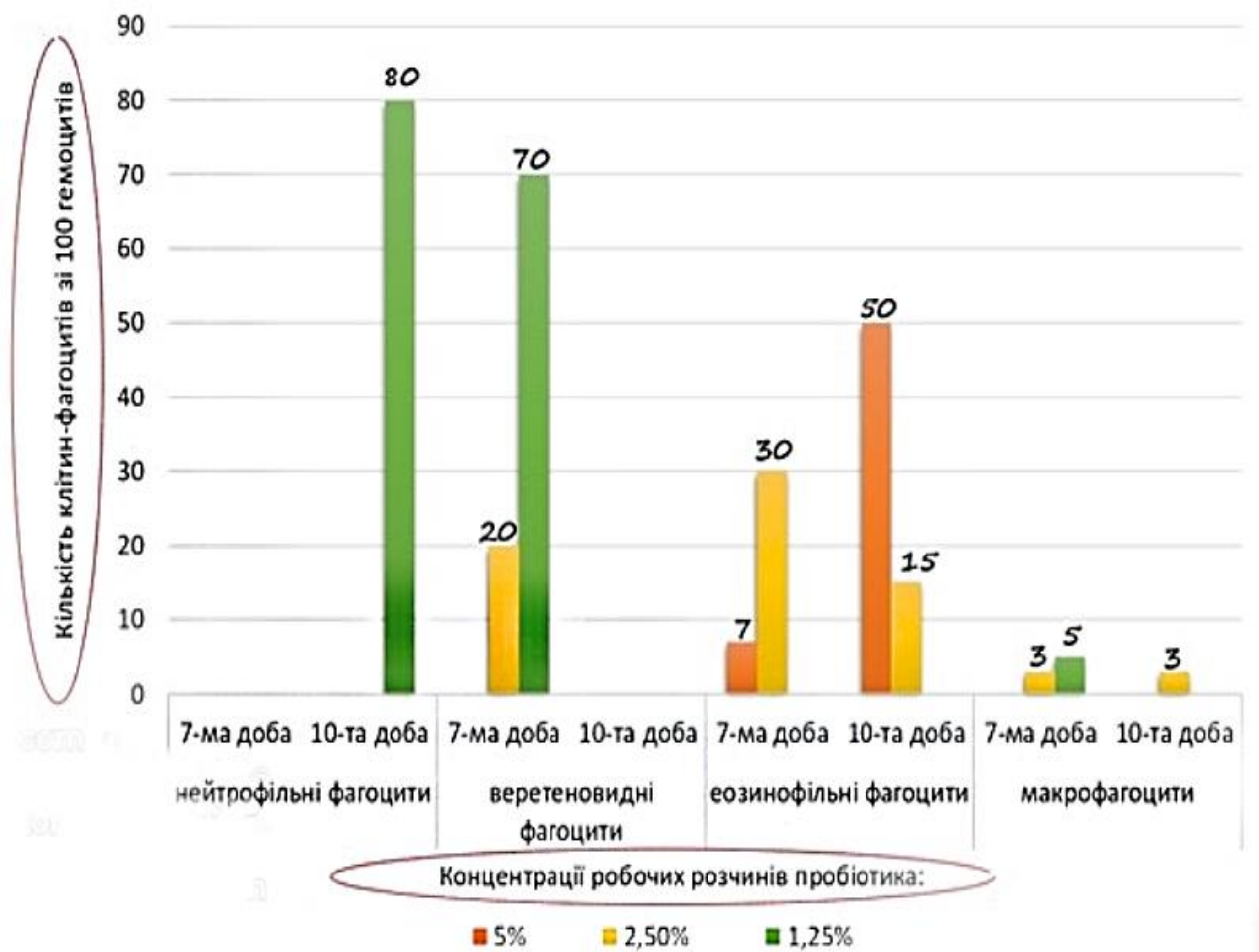


Рис. 3.23. Диференціація фагоцитарних клітин гемолімфи бджіл при згодовуванні різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведеного гречаною медовою ситою

Відмічено синтез гранулоцитів у вигляді нейтрофільних (молодих) та веретеновидних (зрілих) фагоцитів. Крім того, змінилось співвідношення різних видів фагоцитів (рис. 3.23). Саме 1,25% концентрація пробіотика слугує пусковим механізмом до синтезу гемоцитів різних груп [146].

Друга серія досліджень була спрямована на виявлення змін гемограми гемолімфи бджіл при застосуванні різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» розведеного цукровим сиропом (табл. 3.14).

Таблиця 3.14

Динаміка кількості гемоцитів медоносних бджіл за використання препарату «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведеного 50% цукровим сиропом

Дослідні групи	Кількість гемоцитів							
	Пролейкоцити (прогемоцити)		Фагоцити		Сереторні 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
5-та група 5% розчин «ЕМ® ПРОБІОТИК» 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	-	-
6-та група 2,5% розчин «ЕМ® ПРОБІОТИК» 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	-
7-ма група 1,25% розчин «ЕМ® ПРОБІОТИК» 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*
8-ма група (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.

Аналізуючи табличні дані, організм комах восьмої контрольної групи (отримували розчин цукрового сиропу) сприймає розчин сиропу, як звичну підкормку. Про що свідчить відсутність прогемоцитів (пролейкоцитів) та фагоцитарної активності у полі зору мікроскопу, як на 7-му, так і та 10-ту

добу експерименту. Фізіологічний стан бджіл п'ятого садка відрізнялась гарним апетитом та більшою дозою споживання корму, що корелює з високим вмістом секреторних клітин (рис. 3.24 – А (а)) як на 7-му, так і на 10-ту добу досліду [150]. Також відмічений поділ клітин гемолімфи комах на більш диференційовані щодо фагоцитозу види (рис. 3.24 – А (b, c), рис. 3.25) [146].

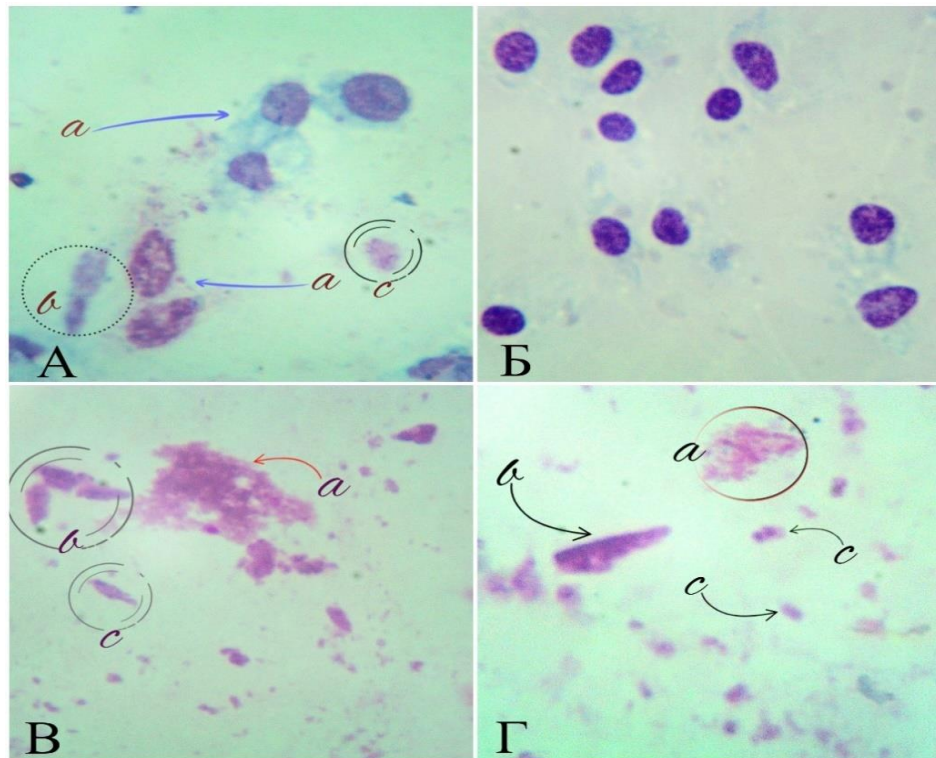


Рис. 3.24. Морфологічний склад гемолімфи бджіл при застосуванні «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» розведеного цукровим сиропом ($\times 1000$): А – гемоцити бджіл п'ятої дослідної групи (5%) на 10-ту добу експерименту: *a* – сферулоцит, *b* – веретеновидний фагоцит, *c* – нейтрофільний фагоцит; Б – секреторні гемоцити бджіл шостої дослідної групи (2,5%) на 10-ту добу експерименту; В – фагоцитарні клітини бджіл сьомої дослідної групи (1,25%) на 7-му добу експерименту: *a* – макрофагоцит, *b*, *c* – веретеновидні фагоцити; Г – фагоцитарні клітини бджіл сьомої дослідної групи (1,25%) на 10-му добу експерименту: *a* – макрофагоцит, *b* – веретеновидний фагоцит, *c* – нейтрофільні фагоцити

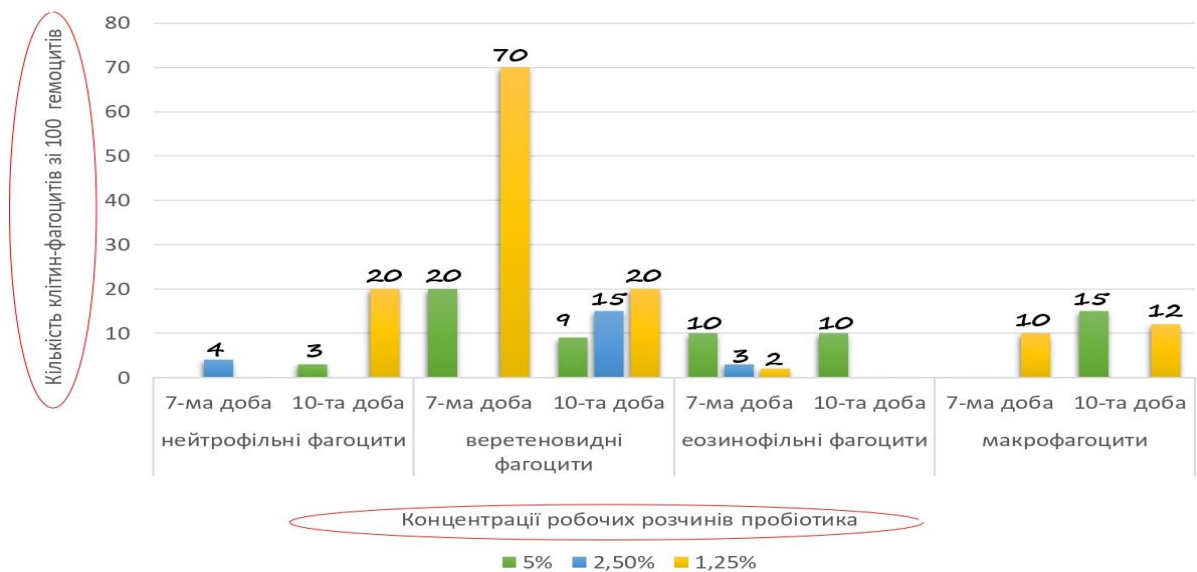


Рис. 3.25. Диференціація фагоцитарних клітин гемолімфи бджіл при згодовуванні різних концентрацій «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведеного цукровим сиропом

У складі гемолімфи бджіл шостого садка відмічали найвищу кількість пролейкоцитів ($39,2 \pm 0,42\%$) на 7-му добу досліду, концентрація яких знизилася до $5,8 \pm 0,82\%$ на 10-ту добу відповідно [146]. Також на 10 добу експерименту (табл. 3.14) спостерігаємо зростання секреторних гемоцитів (рис. 3.24 – Б) до $78,8 \pm 0,42$ [146]. Найвищу концентрацію фагоцитарних клітин реєстрували у бджіл сьомої групи на 7-му добу експерименту (рис. 3.24 – В) на рівні $72,4 \pm 0,45\%$ із помірним зниженням на $31,22\%$ на 10-ту добу (рис. 3.24 – Г), що є фізіологічним явищем функціонування організму (рис. 3.25) [146].

Також у гемолімфі бджіл, відібраних з пасіки як контрольної групи в природних умовах, спостерігали лише поодинокі клітини прогемоцитів, та 80% секреторних клітин, що свідчить про підготовку бджіл до зимівлі [146]. Досліджений характер впливу «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» на морфологічний склад гемолімфи бджіл української степової породи зимової генерації в садковому експерименті свідчить про стимулюючий та імуностимулюючий ефекти даного засобу [146].

Отже, використання пробіотика у концентрації 1,25%, розведеним цукровим сиропом, так і гречаною ситою, має імуностимулюючу дію на організм бджіл, так як активізуються імункомпетентні клітини, зокрема веретеновидні нейтрофільні гемоцити. Застосування 2,5% «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» розведеного цукровим сиропом сприяє синтезу сферулоцитів, що свідчить про стимулюючу дію препарату. Згодовувати пробіотик в період зимівлі необхідно розводити тільки цукровим сиропом [146].

3.6.3 Аналіз деяких біохімічних параметрів гемолімфи бджіл української степової породи за впливу різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» розведеного цукровим сиропом та медовою гречаною ситою

Для визначення деяких біохімічних параметрів гемолімфи бджіл української степової породи гемолімфу відбирали від 18–23 бджіл на «граничну» добу відносно терміну загибелі бджіл і формували збірну пробу (0,5–0,7 см³ гемолімфи). Методика відбору гемолімфи полягала у декапітації голови, проколі венозного синуса черевця [164] та методом запропонованого Кистерна О. С., Гаркава В. В., Мусієнко О. В. [19] та Vorsuk G. [63]. (рис. 3.26).



Рис. 3.26. Гемолімфа бджіл: А – крапля гемолімфи під час відбору; В – збірна проба у стерильному епіндорфі; С – ентомологічний садок з дослідними бджолами

Всі біохімічні параметри загальний білок (PRO, g/L, г/л); альбуміни (ALB, g/L, г/л); глюкоза (GLU, mmol/L, ммоль/л); α -амілаза (AMY, U/L, ОД/л); лужна фосфатаза (ЛФ) (ALP, U/L, ОД/л); Аспартатамінотрансфераза (ACT) (SGOT, U/L, ОД/л); Гамма-глутамілтранспептидаза (ГГТ) (GGT, U/L, ОД/л); креатинін (Cre, $\mu\text{mol/L}$, мкмоль/л) визначені напівавтоматичним біохімічним аналізатором Chem 7 (Erba, Чеська Республіка) [149].

Гіперпротеїнемію бджіл (1377 г/л) контрольної групи (рис. 3.27 – А) характеризуємо вільним доступом комах зимової генерації (в умовах відсутності стресу) до кормів природнього походження [195].

F VET M				A
008277	PRO	1377	g/L	B
F VET M				B
008253	PRO	772.5	g/L	B
008254	PRO	749.0	g/L	C B

Рис. 3.27. Вміст білка у гемолімфі бджіл (PRO, г/л): А – показник білка у контрольній групі бджіл; В - показник білка в ентомологічному садку № 1 (5% «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» + гречана медова сита); С - показник білка в ентомологічному садку № 5 (5% «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» + розчин цукрового сиропу)

У бджіл, які отримували нативний медовий гречаний сироп цей показник був найнижчий у серії досліду з розведенням препарату медовим сиропом [149]. Наявність «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» у медовій гречаній ситі зумовлює вищі параметри білка в гемолімфі (порівняно з бджолами, які отримували нативний медовий сироп), але протеїн такого складу може слугувати пусковим фактором розвитку кетозу [243]. У гемолімфі бджіл дослідних груп, які отримували 1,25–5% розчини «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ», розведені цукровим сиропом, відмічали гіпопротеїнемію, порівняно з бджолами садків 1–4 [149]. Спостерігаємо прямопропорційну залежність вмісту альбумінів щодо концентрації пробіотика і вмісту білка у гемолімфі всіх експериментальних груп. Однак, ці показники гемолімфи вищі у бджіл, які отримували медовий гречаний сироп. Відповідно рівень глобулінів у гемолімфі бджіл, яким згодовували препарат розведений цукровим сиропом обернено пропорційний щодо концентрації альбумінів [149]. Медовий гречаний сироп містить прості цукри (глюкоза, фруктоза), які легко засвоюються бактеріями пробіотика (ефективні

мікроорганізми) для синтезу власних структурних елементів. Тому, при годівлі бджіл підкормкою розведеною медовою гречаною ситою «вільної» глюкози у гемолімфі менше, ніж у бджіл садків 5–8 (рис. 3. 28).

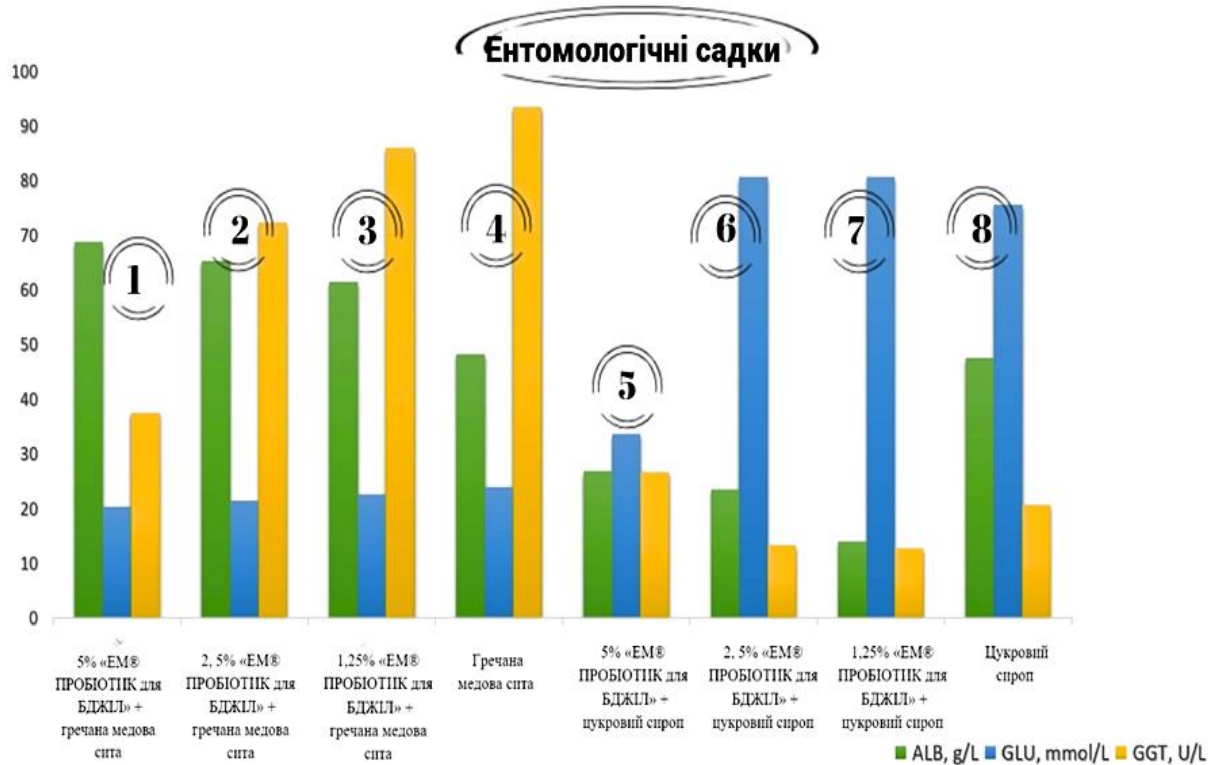


Рис. 3.28. Вміст альбумінів (ALB, g/l, г/л), глюкози (GLU, mmol/L, ммоль/л) та активність гамма-глутамілтранспептидази (GGT, U/L, ОД/л) у гемолімфі піддослідних бджіл при різних концентраціях «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ»

**Примітка: 1 – 5% «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» + гречана медова сита; 2 – 2,5% «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» + гречана медова сита; 3 – 1,25% «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» + гречана медова сита; 4 – розчин гречаного медового сиропу (гречана медова сита); 5 – 5% «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» + цукровий сироп; 6 – 2,5% «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» + цукровий сироп; 7 – 1,25% «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» + цукровий сироп; 8 – розчин цукрового сиропу*

У гемолімфі бджіл, які отримували нативну гречану медову ситу концентрація глюкози у гемолімфі наближена до показника цього параметру у бджіл контрольної групи (21,67 ммоль/л) та вища (23,9 ммоль/л), ніж у бджіл садків 1–3 [149]. Гіперглікемію аліментарного походження реєструємо у бджіл, які отримували «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведений розчином цукрового сиропу (рис. 3.28). Сахароза – як основна складова

підкормки, зумовлює дане явище [149]. Ферментація крохмалю та складних вуглеводів можлива за активності ферменту α – амілази. Активність даного ферменту у бджіл, які споживали препарат розведений гречаним медовим сиропом вища, ніж у комах садків 5–8. Також при споживанні бджолами нативного медового гречаного сиропу активність даного фермента була вищою (1714 ОД/л), ніж у комах контрольної групи (329,2 ОД/л) (рис. 3.29 – А) [149].

F VET M				A
008269	AMY	329.2	U/L	
F VET M				B
008228	AMY	4608	U/L	
				C
008230	AMY	244.1	U/L	

Рис. 3.29. Активність амілази в гемолімфі бджіл (AMY, U/L, ОД/л): А - активність амілази контрольної групи бджіл; В – активність амілази гемолімфи бджіл в ентомологічному садку № 3 (1,25% «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» + гречана медова сита); С – активність амілази гемолімфи бджіл в ентомологічному садку № 7 (1,25% «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» + розчин цукрового сиропу)

Високу активність α -амілази реєструємо у бджіл, які споживали пробіотик, розведений медовим гречаним сиропом (5% – 5577 ОД/л; 1,25% – 4608 ОД/л (рис. 3.29 – В) [149]. Подібне явище реєстрували при згодовуванні бджолам препарату розведеного цукровим сиропом (5% – 820 U/L; 2,5% – 427,9 ОД/л; 1,25% – 244,1 ОД/л (рис. 3.29 – С) [149]. Активність ензимів АСТ та ЛФ у гемолімфі бджіл, яким згодовували пробіотик розведений розчином цукрового сиропу, становила ≥ 838 (5–1,25%) ОД/л та 18,9 (1,25%) – 32,7 (5%) ОД/л, що відрізнялось від параметрів даних ферментів у контрольній групі

бджіл (АСТ – 222,2 ОД/л та 3 ОД/л). Активність ГГТ бджіл, яким згодовували «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведений цукровим сиропом (5% – 26,59 ОД/л; 2,5% – 13,29 ОД/л; 1,25% – 12,72 ОД/л) була наближена до параметрів цього ензиму у комах контрольної групи (20,58 ОД/л). Таку активність пояснюємо відсутністю токсичного впливу «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» щодо дослідних бджіл.

Кінцевим продуктом обміну білків та індикатором діяльності видільної системи в макроорганізмі тварин є креатинін. Високий вміст даного показника у бджіл контрольної групи (2529 мкмоль/л) (рис. 3.30 – А) характеризується активним фізичним навантаженням робочих бджіл української степової породи [90, 239].

F VET M				
008274	CRE	2529	umol/L	A
008252	CRE	780	umol/L	B
008251	CRE	700.8	umol/L	C
008250	CRE	623.4	umol/L	D

Рис. 3.30. Вміст креатиніну в гемолімфі бджіл (Cre, мкмоль/л; umol/L): А – показник креатиніну у контрольній групі бджіл; В - показник креатиніну в ентомологічному садку № 5 (5% «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» + цукровий сироп); С - показник креатиніну в ентомологічному садку № 6 (2,5% «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» + цукровий сироп); D – показник креатиніну в ентомологічному садку № 7 (1,25% «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» + цукровий сироп)

У гемолімфі експериментальних комах, які отримували пробіотик розведений розчином цукрового сиропу, реєстрували зниження вмісту даного

параметру (5% – 780 мкмоль/л; 2,5% – 700,8 мкмоль/л; 1,25% – 623,4 мкмоль/л (рис. 3.30). Такі результати характеризують задовільну роботу видільної системи дослідних комах («ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» не чинить згубний вплив щодо мальпігієвих судин) [149].

Отже, усі визначені біохімічні параметри гемолімфи бджіл з (окрім глюкози (GLU)) ентомологічних садків № 1–4 (з медовою гречаною ситою) були вищими, ніж у бджіл з ентомологічних садків № 5–8 (з цукровим сиропом); «ЕМ[®] ПРОБІОТИК ДЛЯ БДЖІЛ», розведений розчином цукрового сиропу у концентраціях 1,25–5%, стимулює синтез глобулінів, дія яких спрямована на взаємодію з антигенами (стимуляція імунної системи); «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» у досліджуваних концентраціях є перспективним засобом, який проявляє диференційний вплив на біохімічні параметри гемолімфи і не має токсичного впливу щодо бджіл української степової породи [149].

3.7 Перспективи лікування та профілактики дисбіозів бджіл за органічного бджільництва

Царство тварин налічує майже 45 000 видів хребетних тварин та близько 8 мільйонів видів безхребетних, серед яких основними запилювачами екосистем є бджоли. Основа органічного бджільництва – отримання екологічно чистої продукції [107]. Проблема пошуку ефективних органічних засобів для лікування та профілактики кишкових інфекційних хвороб бджіл є актуальною для країн Європи та Америки [99, 114].

Оздоровчі заходи ґрунтувались на застосуванні органічних препаратів – «Ентеронормін з Йодіс + Se» (ТОВ «СГП» МБС, м. Київ), «ЕМ[®] ПРОБІОТИК ДЛЯ БДЖІЛ» (Корпорація EMRO, Японія разом з ТОВ «ЕМ Україна», м. Кропивницький), які включають «корисні» мікроорганізми різних видів, та дезінфектанту «Біоконтакт-плюс» (ТОВ «Кронос-Агро» м.

Київ). Ефективність дії застосованої схеми визначали шляхом статистичної обробки результатів рандомної вибірки (*MS Excel та LPG*) за 2019 – 2021 рр на основі даних журналів пасічникаового обліку [107].

Стимулююча дія різних засобів на організм бджоли залежить від складу та механізму дії конкретного препарату. Експериментальними польовими дослідженнями встановлені стимулюючі і лікувальні дози використаних засобів [107].

З терапевтичною метою бджолам згодовували розведені на 50%-ному цукровому сиропі:

1. 0,15% розчин (1,5 см³ препарату на 1 літр 50% цукрового сиропу) «Біоконтакт-плюс» (300–350 см³ препарату на 1 бджосім'ю) – 5 обробок через 3–4 доби [107];

2. 2,5–5% розчин (25–50 см³ препарату на 1 літр 50% цукрового сиропу) «ЕМ[®] ПРОБІОТИК ДЛЯ БДЖІЛ» (в дозі 300–400 см³ препарату на 1 сім'ю) – 3–4 обробки через 3–4 доби [107]

Так, дезінфектант «Біоконтакт-плюс» у вказаній концентрації чинить слаботоксичну дію, що призводить до активації імунного захисту бджолиного організму. Специфічні мікроорганізми для бджіл, що містяться у складі «ЕМ[®] ПРОБІОТИК ДЛЯ БДЖІЛ» модулюють якісний та кількісний склад кишечника бджоли [107].

З профілактичною метою:

1. «Ентеронормін з Йодіс + Se» у дозі 20 см³ розведеного 200 см³ 50% –ного цукрового сиропу 3–5 разів з інтервалом 5 діб (*per os*) [107]. Цей пробіотик містить мікроорганізми, що викликають низьке антигенне навантаження, і відповідно, чинять специфічний вплив на імунокомпетентні клітини гемолімфи бджоли [264].

2. «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» – 12–15 см³ препарату на 1 літр води (в дозі 10 см³ робочого розчину на 1 вуличку бджолої сім'ї) – 2 обробки, з інтервалом 7–14 діб (обприскування рамок з бджолами);

3. Загальні профілактичні заходи на пасіках включають дезінфекцію вуликів, їх корпусів та рамок 1% розчином «Біоконтакт-плюс» розведеного водою (згідно настанови). Дезінфікуючий ефект 1% водного розчину «Біоконтакту-плюс» інтерпретуємо впливом формальдегіду глютарового, гліоксаленового альдегідів, які спричинюють лізис бактеріальних клітин, шляхом руйнування хімічних зв'язків між компонентами їх клітинної стінки [107, 233].

Протягом останніх трьох років препаратами «Ентеронормін з Йодіс + Se» та «Біоконтакт плюс» оброблено понад 70 тис бджолиних сімей. Після успішної зимівлі клінічних ознак дисбіозів не спостерігалось, що підтверджує можливість та високу ефективність застосування альтернативних до антибіотиків органічних засобів при ентеробактеріозах бджіл [107]. Впровадження у схему оздоровчих заходів на пасіках «EM[®] ПРОБІОТИК ДЛЯ БДЖІЛ» є перспективним напрямком розвитку органічного бджільництва.

Отже, вектор дії запропонованих біопрепаратів визначає його доза, розчинник (вода; 50%-ний цукровий сироп) та спосіб застосування (*per os*, оприскування); Комбіноване використання препаратів різних груп (пробіотиків та дезінфектантів) забезпечує комплексний вплив їх складових на різні системи організму бджоли, та взаємний синергізм, що дозволяє підвищити рентабельність пасік [107].

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА ЇХ АНАЛІЗ

Аналіз та вивчення епізоотичного стану конкретної галузі є першочерговою ланкою у діагностиці та зональності хвороб тієї чи іншої етіології. Перший етап дисертаційної роботи у вигляді систематизації даних звітності державних регіональних лабораторій Держпродспоживслужб Північно-Західного регіону України (Житомирська, Волинська та Рівненська області) за 2019 – 2021 показав недосконалість та недостатнє відображення епізоотичної ситуації щодо бактеріальних кишкових хвороб бджіл (ентеробактеріозів або дисбіозів). Вивченням епізоотологічного моніторингу хвороб бджіл в Україні займалися Фотіна Т. І. (2018) [136], Галатюк О. Є. та Тушак С. Ф. (2016) [99] та Кистерна О. С. (2014) [137]. В Європі епізоотичні дослідження проводили Buendia M., Hernández R. M., Gallego C. O., Barrios L., Husson C. B., Pascual M. H. [65] та Morawetz, L., Köglberger H., Griesbacher A., Derakhshifar I., Crailsheim K., Brodschneider R., Moosbeckhofer R. [188]., в Африці та Південній Європі Jamal Z. A., Abou-Shaara H. F., Qamer S., Alotaibi M. A., Khan K. A., Khan M. F., Ansari M. J. [128, 215], аналогічні проблеми вивчали науковці Північної Америки [261, 262], Канади [179], Японії, Китаю та Тайланду [148, 266].

Нозологічний профіль інфекційних хвороб бджіл в Україні, зокрема, наприклад, у Житомирській області свідчить, що найбільш поширені хвороби для даного регіону – вароатоз (58%) та нозематоз (33%) [99]. Хвороби, що викликаються найпростішими (амебіаз) та паразитами (браульоз) реєструються спорадично серед проб, які було досліджено [99]. Таким чином, удосконалення методів моніторингу та засобів профілактики інфекційних хвороб медоносних бджіл є важливою темою для інтенсифікації розвитку бджільництва в Україні [148]. Так як регіональні лабораторії Держпродспоживслужб здебільшого проводять планові дослідження, то

епізоотична картина певного регіону щодо інших хвороб бджіл, які не входять у вказані дослідження, є неточною. Відомо, що для лабораторної діагностики інших заразних захворювань бджіл проводять позапланові дослідження щодо сальмонельозу [46], гафніозу [136], колибактеріозу [46], гострого та хронічного паралічу [45, 275] та аскосферозу [256]. Напрямок дослідження залежить від первинного діагнозу, що базується на епізоотичних даних пасіки та клінічних ознаках хворих бджолиних колоній [127, 148]. Тому існує необхідність в удосконаленні системи діагностики та реєстрації кишкових захворювань бджолосімей, так як дана патологія є поширеною не лише в Україні, а і в країнах Європи та Америки [99, 114], адже саме медоносні бджоли грають важливу роль у запиленні природних та керованих екосистем, і розуміння біологічних причин втрат цих комах дозволить вдосконалити стратегії управління та розведення, спрямовані на поліпшення здоров'я бджіл [72].

Наразі важливою проблемою у світовому масштабі є масова загибель бджіл [99, 114, 128]. Єдиного фактору даного явища не існує, адже сукупна дія таких чинників як відсутність медодайної бази, вплив кліща *Varroa jacobsoni* на резистентність сімей, дія електромагнітних хвиль та радіоактивного випромінювання, низька генетична стійкість бджолиних колоній, негативний вплив пестицидів призводить до масової смертності комах [30, 61, 114, 147, 156], що зумовлює значні економічні збитки у даній галузі. Така полівекторна сукупна дія вищевказаних етіологічних чинників зумовлює зниження резистентності бджолиних колоній, що у свою чергу порушує роботу кишківника (середньої кишки) бджіл, де умовно-патогенні мікроорганізми, набуваючи патогенних факторів вірулентності, здатні викликати патологію усього макроорганізму *Apis mellifera* [147]. Встановленим фактом є наявність у кишечнику бджіл не менше 10 родів бактерій, що належать до родин *Enterobacteriaceae*, *rodів Klebsiella*,

Enterobacter, Providencia, Proteus, Citrobacter, Hafnia, Escherichia, Pantoea, Morganella, Serratia [105, 147]. Так, при недостатній роботі травного тракту різко знижується активність імунокомпетентних клітин організму [147]. Адже, мікробіота кишечника відіграє важливу роль у здоров'ї та харчуванні господарів, виявлено докази філогенетично згрупованого зрушення в бактеріальній асоціації медоносних бджіл, що спричиняє зниження біфідобактерій та альфа-протеобактерій [105, 112]. Знання та аналіз патогенетичних аспектів клебсієльозу дають можливість застосовувати лікувальні засоби на визначному етапі розвитку патологічного процесу. Так, при вразливій дії патогенних мікроорганізмів внаслідок їх кількісного дисбалансу організм бджоли стає сприйнятливим до інфекційних агентів навколишнього середовища, будучи ураженим «внутрішньо» раніше «нормальними» бактеріями власного організму. Ці умовно-патогенні збудники проникають у більш глибокі осередки травного тракту бджіл, викликаючи дисбактеріози, причому, у теперішній час патогенні бактерії розширили свій діапазон проживання, що включає гемолімфу, яєчники, слинні залози тощо [95, 99, 101]. Вперше в Східній Європі захворювання бджіл, викликані ентеробактеріями були зареєстровані в 2015 році, у Краснодарському краї. В літературних джерелах зустрічаються повідомлення щодо ураження верхніх дихальних шляхів та кишечника за захворювання великої рогатої худоби та свиней ентеробактеріозами [95].

Дуже важливо серед усіх причин порушення роботи травної системи бджіл виділити домінантну, яка є рушійною силою початку інфекційного процесу в організмі комахи. Це значно полегшить своєчасну та ефективну організацію лікування, зробить можливим профілактику та сприятиме оздоровленню пасік. Завдяки вдалій діагностиці і безпосередньому виділенню збудника можна суттєво зменшити витрати на терапію, а також, забезпечити благополучну зимівлю бджіл завдяки попередженню можливих

хвороб при зниженні резистентності [104]. Другим етапом дисертаційного дослідження стало виділення двох чистих культур ентеробактерій (попередньо виділених Тушак С. Ф. від бджолосімей, які мали ознаки дисбіозів) [264]. Проведення їх додаткової ідентифікація методами біохімічного типування гуманної медицини, що у свою чергу дало можливість удосконалити методи культивування. В процесі роботи удосконалена технологія зберігання даних збудників хвороби. Виділені нами чисті культури мікроорганізмів були віднесені до родини *Enterobacteriaceae*. Після проведення серії додаткових дослідів методами біохімічного типування було встановлено, що: культура № 1 належить до роду *Klebsiella* та виду *Klebsiella pneumoniae* [104]; культура № 2 належить до роду *Enterobacter* (перенесений в рід *Klebsiella*) та Виду *Enterobacter aerogenes* (перейменованій *Klebsiella aerogenes*) [105]. Аналіз досліджень зарубіжної літератури свідчить, що видова назва *Enterobacter aerogenes* та *Klebsiella aerogenes* є тотожними поняттями. Назва *Enterobacter aerogenes* була створена Нормасче та Edwards у 1960 році [125] для названня видів, яких раніше називали «*Aerobacter aerogenes*» [125]. Також до 1886 року штами виду «*Aerobacter aerogenes*» (не здатні до руху) входили до виду *Klebsiella pneumoniae*, то у 1887 році було виділено окремий рід «*Aerobacter*», який відрізняється від роду *Klebsiella*, таким чином зберегли вживання назви «*Aerobacter aerogenes*», як мікрофлори респіраторного тракту. Але, Нормасче Е. у 1971 році зробив альтернативну пропозицію – назвати таксономічну одиницю *Enterobacter aerogenes* [56]. Вони опублікували дослідження 177 штамів бактерій, дійшовши до висновку, що три види роду *Enterobacter*, які вони вивчали, не належать до одного роду. Vascomb S. (1971) запропонував віднести рід *Enterobacter aerogenes* до роду *Klebsiella* і назвав його *Klebsiella mobilis*, через здатність до руху, як гетеротипічний синонім [56]. У геномі *Klebsiella mobilis*, а саме, послідовність ДНК штаму, що міститься в Корейській колекції для типів

культур був подібний у такому відсотковому відношенні – 54,8% [246]. Послідовність геному цього штаму зберігається в базі даних GenBank під номером приєднання CP002824. Але потім назву *Klebsiella mobilis* замінили законним епітетом «*Enterobacter aerogenes*» [257]. Так, *Enterobacter aerogenes* був перейменований на *Klebsiella aerogenes* [257]. У теперішній час за дослідженнями Tindall В. J., у 2017 році *Enterobacter aerogenes* отримав біноміальну назву - *Klebsiella aerogenes* із збереженням синонімів *Klebsiella mobilis* [56, 257] та *Enterobacter aerogenes* [105, 257]. Тому ідентифікована нами культура № 2 має біноміальну назву *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*. Дані культури патогенних ентеробактерій бджіл здатні викликати дисбактеріози. Відомо, що *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* та *Klebsiella pneumoniae* здатні викликати патологічні стани не лише у тварин, а і у людини [70]. Зустрічається багато повідомлень щодо захворювання у людей кишкових проносів, зумовлених бактеріями роду *Klebsiella* [104, 180]. *Klebsiella pneumoniae* – факультативний пантропний патоген організму людей та тварин (у т.ч. і бджіл) [228]. Згідно з даними, наданими китайської системою спостереження за антимікробної резистентності (CARSS), *Klebsiella pneumoniae* займає друге місце за поширеністю (20,2%) серед ізольованих грамнегативних патогенів [279]. Більше число досліджень показує, що *Klebsiella pneumoniae* також викликає різні захворювання тварин, включаючи пневмонію, бактеріємію і септицемію [59, 71, 104, 120]. Грамнегативна бактерія виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* була описана під час кількох спалахів госпітальних інфекцій у Європі та, зокрема, у Франції [80, 105]. Chang М. Н. [70] у 2019 році встановлено, що крім свійських тварин та людей, собаки-компаньйони можуть служити резервуарами гену *mcr-1* *Enterobacter aerogenes*, додаючи ще один рівень складності, внаслідок чого швидко розвивається епізоотичний процес у популяціях [70, 105]. Мікроорганізми роду *Enterobacter* вражають головним

чином імунокомпрометованих пацієнтів [105, 181, 182]. Тобто вразливість макроорганізмів даними видами бактерій значною мірою визначаються станом реактивності організму, при зниженні резистентності та наявності сприятливих факторів дані ентеробактерії здатні викликати патологічний процес. Важливим питанням є лікування та профілактика даних інфекцій у зв'язку з появою штамів панхромії, гіпервірулентних ізолятів та штамів з множинною лікувальною стійкістю [69, 104, 203, 220, 249, 275]. Крім того, Mitali Mishra у 2017 році виявив фенотип мультирезистентності мікробів шляхом вивчення зв'язку між їх резистентністю та вірулентністю природніх грамнегативних бактеріальних ізолятів, включаючи ті, що належать до видів *Enterobacter* [105, 182]. Тому лабораторне виділення чистих культур патогенних ентеробактерій бджіл та їх біохімічна ідентифікація є важливим етапом у діагностиці дисбіозів, що у подальшому звузить пошук ефективних препаратів для боротьби з полірезистентними збудниками кишкових дисбіозів бджіл [104]. Ідентифіковані *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* зберігаються у навчальній лабораторії кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміологолії Поліського університету. Дані культури використовуються як тест-культури для вивчення напрямку дії засобів різних фармакологічних груп для профілактики та лікування клебсієльозів бджіл *in vitro*. Лікувально-профілактичні заходи на пасіці необхідно проводити ефективними економічно – вигідними препаратами. Тому головною метою третього етапу дисертаційного дослідження став пошук ефективних засобів, які мали б антагоністичну дію, бактерицидний або/та бактериостатичний вплив щодо виділених та ідентифікованих нами збудників клебсієльозу бджіл бактерій виду *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes in vitro*.

Як відомо раніше, задавання дезінфекційного засобу у певних концентраціях може чинити імуностимулюючу дію на організм бджоли [40,

233]. Так, деззасіб «Біоконтакт плюс» у 0,15% концентрації розведений 50% розчином цукрового сиропу слугує імуностимулятором для підвищення резистентності при бактеріальних захворюваннях травного тракту бджолосімей [233], а згодовування 0,1% концентрації даного засобу у розчині цукрового сиропу має активізуючу дію на організм бджоли, що підтверджувалися змінами клітин у гемолімфі дослідних комах [40]. Відомим фактом є використання йодовмісних засобів з метою отримання бактерицидного ефекту, наприклад, атомарний йод проникає в порожнини структур мікроорганізмів і закріплюється всередині, утворюючи клатрати – складні сполуки, чим і чинить антимікробну дію [108]. Деякі автори розглядають селен, йод та їх сполуки з точки зору відсутності токсичності для медоносних бджіл [121, 123, 124, 214]. Є також дані про використання селеновмісних препаратів в якості біостимуляторів, які впливають на показники продуктивності, розвитку і відтворення медоносних бджіл [108, 197]. Тому нами була досліджена стійкість патогенних ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* щодо експериментального дезінфектанту «Йодіс Дез №2». Аналіз отриманих результатів свідчить про наявність факторів вірулентності у виділених бактерій від уражених бджолосімей. Наприклад, бактерій виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* здатні до руху, тому при рості на середовищі АМХ дезінфектант майже не подіяв на нього [132, 229]. Також можливий контакт дезінфектанту з киснем при відкритті чашки Петрі, внаслідок чого активний йод окислився, та активність його знизилась, і засіяна глибинним способом культура проросла на неактивних дисках на поживному середовищі [108]. Результати дії даного йодовмісного засобу щодо бактерій виду *Klebsiella pneumoniae* свідчать, «що одним із основних факторів вірулентності (інфекційності, заразності) у бактерій є наявність товстої слизової капсули (захисної оболонки), яку і мають мікроорганізми даного виду [108, 262].

Таким чином наявність капсульних генів спричинює стійкість даної культури до «Йодіс Дез №2». Іншу картину спостерігали при дослідженні впливу зразку розчину міді і цитрату срібла щодо даних тест-культур та змішаної мікробної асоціації [111, 234]. Наявність бактерицидного та бактериостатичного ефектів при використанні даного зразка характеризуємо здатністю срібла мінімізувати ріст патогенних мікроорганізмів [260]. Адже, наночастинки срібла (AgNPs) володіють такими фізико-хімічними параметрами, які впливають на активність мікробного потенціалу: розмір, форму, поверхневий заряд, концентрацію і колоїдний стан. Адгезія AgNPs до мікробних клітин, проникнення всередину клітин, генерація вільних радикалів, а також модуляція шляхів трансдукції мікробного сигналу є найбільш вираженими способами прояву бактерицидної дії наночасток срібла [77, 111]. Мукозна капсула бактерій виду *Klebsiella pneumoniae* зумовила дані результати (капсульні бактерії виду *Klebsiella pneumoniae* містять капсульні гени, асоційовані з мукополісахаридами (HNV-гіпермуковіскозний фенотип) і здатні поглинати позитивно заряджені іони Ag^+ і Cu^+ - специфічні детермінанти вірулентності [111], так як, у даному випадку, вона слугує не так захисною оболонкою, як одним із факторів «притягування» катіонів металів аніонними залишками сіалової кислоти [111, 238]. У подальшому у мікроорганізмів інгібується ряд життєво – важливих функцій, виникають генетичні зміни – конденсація генетичного матеріалу, що в кінцевому результаті призводить до клітинного некрозу [111, 225]. Бактерії, які утворюють біоплівку поверхні на живильного середовища містять гени, кодуєчі адгезини. Тому, на нашу думку, при культивуванні досліджуваних мікроорганізмів, яскраво виражена бактериостатична дія нативного зразка розчину міді і цитрату срібла [111]. Такий вплив пояснюємо антимікробною дією AgNPs пов'язаною з механізмами адгезії AgNPs до поверхні клітинної стінки і мембрани, проникненням AgNPs всередину

клітини та пошкодженням внутрішньоклітинних структур (мітохондрій, вакуоль, рибосом) і біомолекул (білків, ліпідів і ДНК), індукуванням AgNPs клітинної токсичності і окислювального стресу, викликаного генерацією реактивних форм кисню (РФК) і вільних радикалів та модуляцією сигнальних шляхів трансдукції, що входить до складу експериментального зразка [77, 111]. Результати впливу даного зразка щодо змішаної мікробної асоціації (пригнічений ріст на межі бактеріостатичної та бактерицидних зон) інтерпретуємо тим, що у фосфорилування білка тирозином залучено в біосинтез і транспорт екзополісахариду і капсульного полісахариду у ряді грампозитивних і грамнегативних бактерій. AgNPs модулюють клітинну сигналізацію, що дефосфорилується залишками тирозину на ключових бактеріальних пептидних субстратах і тим самим інгібується ріст мікроорганізмів [77, 111]. На нашу думку, інгібування утворення біоплівки і мінімізація шансів патогенного зростання як грамнегативних, так і грампозитивних мікроорганізмів *in vitro* відбулось саме завдяки дії катіонів срібла, які маючи однакову площу поверхні, але різну форму, і тому проявляють диференціальну бактерицидну активність, що може бути пов'язано з варіаціями ефективних площ поверхні і активних граней AgNPs [260]. У порівнянні зі сферичними або стрижневими AgNPs, усічені AgNPs трикутної форми виявляють підвищену антибактеріальну дію [207] на відміну від катіонів міді, які через будову атомів (важкий метал) нездатні до широкого спектру модуляції її наночастинок, що в свою чергу перешкоджає проникненню їх у бактеріальні клітини, особливо багатих на пептидоглікан (грампозитивні мікроорганізми) [111]. Отже, вивчені нами дезінфекційні експериментальні засоби потребують удосконалення та доробки, так як дезінфекція передбачає повне знищення збудника у навколишньому середовищі, тому при дослідженнях вони мають чинити бактерицидний

вплив *in vitro* щодо тестованих нами культур ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*.

Відомим фактом за лікування хвороб бактеріальної етіології є використання антимікробних засобів, або антибіотиків. Останні негативно, впливаючи на геном або органели бактеріальних клітин, здатні викликати їх апоптоз та лізис. Але у галузі бджільництва використання антибіотиків заборонене, тому існує необхідність у пошуку інших альтернативних лікувально-профілактичних засобів. Здавна відомими профілактичними та, у деякій мірі, лікувальними засобами є пробіотики, причому не лише у ветеринарній, а і у гуманній медицині [62, 113, 144]. Пробиотики – біопрепарати, де основою є живі мікроорганізми, які у певній кількості здатні позитивно діяти на макроорганізм [122, 144]. Застосування пре- та пробіотиків відоме у галузі бджільництва країн Центральної Європи та Канади [62, 113, 144]. Такі властивості пробіотиків як: здатність до адгезії до епітеліальних клітин у кишечнику живих організмів, відносна стійкість до жовчі та панкреатичної рідини зумовлює широкий спектр їх застосування [111, 250]. 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 [122, 144]. Наприклад, застосування протексिनного концентрату одноштамового та багаторазові дози пробіотиків спричинює значне зменшення спор *Nosema ceranae*, а бджоли, які приймали *Vetafarm probiotic* мали довшу тривалість життя [62, 144]. Перспективним напрямком як у ветеринарній, так і гуманній медицині, є створення вищевказаних засобів шляхом додавання до їх складу спороутворюючих бактеріальних мікроорганізмів [145]. Пробиотичні засоби,

основою яких є такі бактерії, мають активний антагоністичний вплив щодо вірулентно-агресивної мікрофлори, яка провокує порушення роботи шлунково-кишкового тракту живих організмів. Причому, конкуруючий ріст спороутворюючих мікробів щодо деяких патогенних ентеробактерій, не впливає на зростання ефективних для макроорганізму лакто- і біфідобактерій [145]. Поширений вид бактерій, які є складовими вищевказаних засобів є мікроорганізми роду *Bacillus*. Різні штами бактерій виду *Bacillus subtilis* додають у вигляді пробіотичної добавки в раціон людини та тварин [141, 168]. Також до бактерій цього виду рідко виникає резистентність у живому організмі, так як *Bacillus subtilis* синтезує метаболіти, які є спорідненими до сполук синтезованих макроорганізмом (наприклад, лізоцим, лектин, гістамін, дефензин, тощо) (Manual for Laboratory Diagnosis of Anthrax, 2003). Вторинні метаболіти даної бацили: ферменти, ітурин, сурфактин, біоінсекициди є широко відомими антимікробними сполуками [131, 173, 183]. Механізм антимікробної дії *Bacillus subtilis* ґрунтується на провокуванні утворення мембранних пор бактеріальних клітин, що згодом призводить до їх смерті [186, 202]. На противагу *Bacillus subtilis* традиційний вплив антибіотиків спрямований на векторне порушення функціонування метаболічних ферментів бактерій, що і викликає їх «звикання» до таких засобів [212, 145]. Спорідненість антимікробних білків, які синтезуються макроорганізмом ссавців та метаболітів бацили, надають переваги *Bacillus subtilis*, як пробіотичного засобу [282]. Крім того, бацилярна бактерія є джерелом дефіцидину, поліміксину, субтіліну, які призводять до порушення синтезу білків грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів [186]. Групою вчених підтверджена антагоністична активність *Bacillus subtilis* щодо ентеробактерій деяких видів (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosae*, *Salmonella spp.*, *Citrobacter freundii*, *Shigella flexnerilla in vitro* [145, 171]. Ефективним виявились деякі штами *Bacillus* проти збудника *Paenibacillus*

larvae у *Apis mellifera* [76, 146]. Бактерії даного виду широко розповсюджені у навколишньому середовищі, зокрема, у складі продуктів бджільництва. Також виявлення видів *Bacillus* з різних медів підтверджує лікувальну та економічну цінність цього продукту [131, 145]. Нами також були виділені та ідентифіковані культури (*Bacillus subtilis*) з 5 різних видів медів виду, які мають значний антагоністичний ефект щодо бактерій виду *Klebsiella pneumoniae*. Причому штами з акацієвого меду та меду із лісового різнотрав'я проявляли найбільший конкурентний ріст *in vitro*. Аналізуючи отримані результати, прояв антагонізму ситою акацієвого меду зумовлений густиною (щільністю) та можливістю його дифузії в агар з чистою культурою ентеробактерій. Дію сити лісового меду інтерпретуємо різноманітням фітоінгредієнтів медоносних рослин – складом меду. Так як, під час медозбору зовнішні поверхні хоботка бджіл контактують з бактеріями пилка (в т.ч. з штамами *Bacillus subtilis*), то бджола слугує мобільним вектором потрапляння «корисних» бактерій з великої кількості рослин у мед [145]. Ідентифікацію даного виду бацил проводили модифікованим нами методом, де особливістю слугувало використання неспецифічних для бацил тестів (каталаза, оксидаза, сечовина) та характер росту на поживних середовищах різного призначення (розщеплення вуглеводного субстрату з використанням арабінози та ксилози як єдиного джерела вуглецю (таким чином арабіноза, вступаючи у пентозо-фосфатний цикл, проходить три етапи трансформації: з рибулози на першому етапі, до рибулозо-5-фосфату – на другому етапі та за допомогою рибулозо-5-фосфат-4-епімерази до ксилулозо-5-фосфат на третьому етапі [284]; використання систем індикаторних паперових для ідентифікації мікроорганізмів № 2 – реакція Фогеста-Проскауера; визначення гемолізу еритроцитів барана; ріст у аеробних умовах на м'ясо-пептонному агарі та бульйоні) [145, 232]. Тому біохімічне типування є одним із альтернативних методів ідентифікації бактерій видів *Bacillus subtilis*, який

поєднує результати ферментативних перетворень *in vitro* з фізіологічними властивостями бактерій [145]. Також метод дифузії в агарових лунках є ефективним для реєстрації результатів взаємодії мікроорганізмів-антагоністів (*Bacillus subtilis*) з досліджуваними тест-культурами та дозволяє реєструвати їх культуральні характеристики *in vitro* [145]. Виділені та визначені нами бацили виду *Bacillus subtilis* зберігаються у лабораторії кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології Поліського національного університету. Даний штам бактерій у подальшому може бути використаний у складі нових біологічних засобів за лікування та профілактики клебсієльозів бджіл. З вище вказаною метою можливе використання комерційно доступних пробіотичних засобів. Наприклад, був досліджений вплив комерційного пробіотика *Lactobacillus rhamnosus* і пребіотику інуліну щодо тривалості життя бджіл, здорових та інфікованих *Nosema ceranae* у 2016 році [222]. Цікавим фактом було виявлення негативного впливу дії пробіотика, та пребіотику з пробіотиком на тривалість життя бджіл, та сприятливості до *Nosema ceranae* [221]. На противагу цим авторам, дослідження Tushak S. F. у 2018 році свідчать про позитивні кількісні зміни у гемограмі бджіл за використання пробіотика «Ентеронормін» (активізація клітинного імунітету бджіл) [146, 264]. Нами було проведене лабораторне випробування пробіотика «Ентеронормін з Йодіс + Se» щодо тест-культур видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* [25]. Аналізуючи дані досліджень, антагоністичну дію «Ентеронормін з Йодіс + Se» інтерпретуємо стримуванням росту та розвитку умовно-патогенних ентеробактерій завдяки підвищенню концентрації лактобактерій у поживному середовищі, що аналогічно до кишечника бджіл. Активну дію даного препарату розведеного розчином медової сити з лісового різнотрав'я щодо ентеробактерій виду *Klebsiella pneumoniae* пояснюємо видом меду. Відомо, що мед з лісового різнотрав'я у

своєму складі містить компоненти, які чинять вище вказані ефекти [25]. Наприклад, лісовий мед містить вітамін С у підвищеній кількості, вітаміни групи В та йод, який володіє антибактеріальними властивостями. Можливо, взаємодія компонентів медової сити та складових пробіотика мають підсилювальний ефект щодо тест-культури виду *Klebsiella pneumoniae*. На противагу вищевказаним отриманим результатам, щодо бактерій виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* найкраща бактеріостична дія зареєстрована при розведенні «Ентеронормін з Йодіс + Se» ситою акацієвого меду. Таку активність пробіотика пояснюємо взаємодією мікробного складу меду зі складовими «Ентеронормін з Йодіс + Se». Ймовірно симбіотична взаємодія бактерій зумовила пригнічення росту ентеробактерій бджіл виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*. Також активні складові акацієвого меду можуть слугувати джерелом поживних речовин для мікроорганізмів, що входять до складу «Ентеронормін з Йодіс + Se». Відомим фактом є наявність у складі меду цукрів у вигляді моносахаридів, які легше споживати бактеріям, які містяться у пробіотику. Також саме акацієвий мед, порівняно із медом з лісового різнотрав'я, містить менше пилку у своєму складі, тому і густина його нижча. Таким чином, препарат розведений ситою з акацієвого меду має активнішу дію, так як легше дифундує у товщу агару та пригнічує ріст досліджуваних ентеробактерій [25]. Наступним досліджуваним препаратом став «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», так як даний пробіотик є достатньо новим для використання у галузі бджільництва. Вивчення даного фармакологічного засобу здійснювали у два етапи: *in vitro* та *in vivo*. Дослідження *in vitro* здійснювали з метою перевірки наявності прямої дії щодо специфічних збудників інфекційного захворювання, так як виробник будь-якого лікарського засобу зорієнтований на певний вид тварин [75, 144]. Адже пробіотикотерапія на теперішній час відносно доступна, ефективна та нетоксична у застосуванні для багатьох видів тварин, у тому числі бджіл

[144]. Характер дії пробіотиків залежить від його складу, симбіотичних властивостей прокаріотичних та еукаріотичних організмів та розчинника, що обумовлює здатність чинити антимікробний ефекти у різних напрямках (антагоністичний, бактерицидний чи бактериостатичний вплив) [144]. Визначення специфічності впливу штамів пробіотичних бактерій можливо при наявності бактеріальних клітинних ліній (в даному випадку *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* та *Klebsiella pneumoniae*) шляхом скринінгу *in vitro* [144, 154, 185, 263, 270]. Аналізуючи отримані результати, 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. У свою чергу мікроорганізми виду *Klebsiella pneumoniae* здатні до синтезу мукополісахаридної гіпермукозної капсули завдяки наявності капсульних генів, що тісно пов'язані із НМV-гіпермуковіскозним фенотипом [238], що сприяє активному утворенню біоплівки на поверхні поживного середовища. Але властивості у вигляді плівкоутворення та резистентності до різних видів лікарських засобів забезпечуються у бактерій різними генетичними детермінантами [223]. Бактеріостатична дія «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведеного у 50% сиропі щодо культур ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* зумовлена наявністю у складі пробіотика дріжджів, ріст яких зумовлений присутністю відповідних амінокислот та вуглеводів (сахароза, глюкоза). Останні можуть бути використані еукаріотами для власного розмноження, що у свою чергу блокує синтез органел та генетичних структур бактеріальних клітин тест-культур та власних складових пробіотика, тому антагонізм майже не проявляється [96]. Крім того, відома протигрибкова активність дріжджів, що пояснює їх високу стресостійкість і, тому є перспективними для створення

біологічно активних засобів у складі терапевтичних препаратів [67, 96]. Ентеробактерії виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* продукують карбапенемазу, що характеризує їх стійкість до ліків [238], а наявні джгутики, як домінуючі для цього виду мікроорганізму фактори вірулентності, сприяють активному руху у товщі та на поверхні агару, що у свою чергу забезпечує конкуруюче дифундування поживних складових субстрату швидше, ніж здатні поглинути мікроорганізми з «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» [75]. 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 викликають деструкцію та денатурацію структурних елементів бактеріальних клітин, а гази виступають в ролі окисників, 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. Так, 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, то 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. Таким чином, згідно результатів даного експерименту *in vitro*, «ЕМ[®]

ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» має здатність успішно проявляти антагоністичний, бактерицидний та бактериостатичний впливи і тому може бути застосований в якості альтернативної терапії при інфекціях, викликаних ентеробактеріями бджіл видів *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* [144].

Так як «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» мав позитивні результати у лабораторних умовах, що підтверджуються *трьома напрямками дії* щодо досліджуваних тест-культур, то четвертим етапом дисертаційного дослідження стало вивчення впливу різних концентрацій даного засобу розведеного розчинами медової гречаної сити та цукрового сиропу на тривалість життя бджіл української степової породи, їх морфологічні та біохімічні показники гемолімфи. Визначення ефективності препарату по відношенню до збільшення тривалості життя медоносних бджіл досліджено нами у садових експериментах *in vivo* [150]. Бджоли контрольної групи, які вживали нативну гречану медову сити почали гинути через 2 доби від початку досліду, ймовірно, загибель комах цієї групи є результатом адаптивних механізмів організму до неприродних (лабораторних) умов існування [150]. Хоча відомо, що мед містить унікальні антибактеріальні компоненти, які інгібують синтез факторів вірулентності патогенних мікроорганізмів [126]. Пре-, пробіотики та цинк, які входять до складу медової сити, посилюють розвиток бактерій організму бджоли [126, 242]. У свою чергу, умовно-патогенна мікрофлора середньої кишки комах, за сприятливих для них умов, набуває вірулентності, що спричиняє антигенне навантаження на макроорганізм господарів. Крім того, гречаний мед багатий на білок [42]. при годівлі бджіл такою підкормкою спостерігалось явище алкалозу, так як аміак є кінцевим продуктом розпаду білка. У ході спостереження бджоли контрольної групи мали різкий запах аміаку, така особливість характерна при зміні співвідношення катіонів основ та аніонів кислот в бік зсуву катіонів [150]. Динаміку загибелі бджіл у дослідних групах

пояснюємо нейротоксичною дією аміаку, який утворився внаслідок дезамінування амідів і амінів сити гречаного меду адезинодезаміназою [159, 245] та пусковими механізмами імунокомпетентних гемоцитів і синтезом їх метаболітів через тиждень після початку досліду [78]. Відповідно, низько резистентні бджоли – загинули, а в організмі інших особин відбулися позитивні компенсаторні зміни, що підтверджується фізіологічними проявами (активністю, гарним апетитом) [150]. Найкращі результати (1,25% розведення препарату медовою гречаною ситою – 14 діб) пояснюємо взаємодією активних складових «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» з компонентами медової сити, що впливає на фізіологічні показники макроорганізму бджоли [150]. За розведення пробіотика 50% розчином цукрового сиропу різку загибель бджіл на 7 добу інтерпретуємо дією стресового фактору (утримання в лабораторних умовах) на комах та декомпенсаторними процесами систем організму [150]. Показники загибелі бджіл *контрольної (восьмої), п'ятої (5%) та шостої (2,5%) дослідних груп* свідчать про підвищене антигенне навантаження «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» на імунокомпетентні клітини організму бджіл. Імунітет комах являє собою декілька рівнів опору щодо зовнішніх патогенів. Він формується на основі фізичних бар'єрів, активації клітинного та гуморального імунітетів. Ключовими компонентами гуморального імунітету бджіл є антимікробні пептиди (апідаєцини, абаєцини, гіменоптаєцини та дефенсин), що забезпечують генерацію проникнення до прокаріотичних мембран та інгібування згортання бактеріальних білків [68, 78]. У свою чергу, клітинний імунітет ґрунтується на сукупності реакцій у вигляді фагоцитозу, що забезпечується специфічними гемоцитами, інкапсуляції патогенів та їх елімінації [208]. Специфічні клітини крові бджіл є первинними медіаторами клітинного імунітету, так як вони змушені швидко розпізнавати та знешкоджувати патогенні мікроорганізми, які потрапляють у гемолімфу

комах. Зазвичай клітинна та гуморальна імунна відповідь формується одночасно. Наприклад, гемоцити та система фенолоксидази провокують негайну імунну відповідь комах за дії різних негативних факторів [150, 196]. Найвища тривалість життя (18 діб) відмічена у бджіл 7 садка, які отримували цукровий сироп з 1,25% пробіотика, таким чином, додавання «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ», що містять у своєму складі 86 штамів Ефективних Мікроорганізмів[®] [87], до цукрового сиропу, ймовірно, супроводжує зміну рН розчинів-підкормок, внаслідок чого вони стають тотожні водневому показнику меду (природньому корму), що у свою чергу покращує засвоювання пробіотичного препарату бджолиним організмом. Таким чином, заселення Ефективних Мікроорганізмів[®] та їх позитивна засвоюваність продовжує тривалість життя бджіл у лабораторних умовах [150]. Коефіцієнти середньої тривалості життя бджіл (КСТЖБ) свідчать про позитивну дію досліджуваного засобу щодо тривалості життя бджіл, причому цукровий сироп значно переважає у ролі розчинника для «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ», порівняно із медовою гречаною ситою, у лабораторних умовах [150].

Надалі вивчали морфологічні показники та біохімічні параметри гемолімфи досліджуваних бджіл у садковому експерименті. Гемолімфа бджіл – рідка сполучна тканина, яка є прототипом крові теплокровних тварин та людини. Гемолімфа складається з міжклітинної рідкої речовини – плазми та клітин – гемоцитів [142, 149]. Попередньо, групою вчених Хорватії та Словенії встановлений позитивний вплив харчової добавки ЕМ[®] for bees у вигляді зменшення спор *ноземозу* у вуликах після застосування препарату [258]. Клітинний імунітет комах вивчала низка вчених різних країн світу [21, 54, 66, 98, 189, 258, 264] виявили еталонні маркери для визначення класів гемоцитів медоносної бджоли (*Apis mellifera*) [98, 146].

Отже, клітини гемолімфи бджіл відносять до груп, які представлені на

рисунку 4.1. [53, 227, 267].

У даний час відомо, що активність декількох популяцій гемоцитів, які визначається за морфологічними ознаками і характеристиками формують клітинний імунітет медоносної бджоли (*Apis mellifera*) [98, 146].



Рис. 4.1. Гемограма *Apis mellifera*

Годівля комах **нативною** гречаною медовою ситою спричинила появу у гемолімфі комах різних типів клітин, зокрема гранулоцитів, що, ймовірно, свідчить про відповідь організму бджоли на мікробні складові гречаної медової сити [78, 245]. Антигенне навантаження на макроорганізм може чинити гречана медова сита, так як бактерії з меду за сприятливих для них умов, набуваючи вірулентності, порушують мікробний склад середньої кишки бджіл [126, 242], та проникають у гемолімфу, що і спричиняє імунну відповідь на 7 добу експерименту [146]. Ріст секреторних клітин у бджіл, які споживали 5 % пробіотик розведений гречаною медовою ситою пояснюємо накопиченням поживних речовин з підкормки, до складу якої входить найбільша кількість Ефективних Мікроорганізмів® пробіотика. Подальшу появу еозинофільних фагоцитів у гемолімфі комах даної групи інтерпретуємо даним розчинником. Відомим маркером алергії у гуманній та ветеринарній медицині є еозинофіли [94], зазвичай суттєвими розчинними алергенами є білки різної природи та походження. Гречаний мед багатий щодо білкового

складу [42], так, його білкові антигени спричиняють сенсibilізацію бджолиного організму в лабораторних умовах. Корпускулярні антигени у вигляді мікроорганізмів меду і пробіотика та їх метаболів, що визначаються як антигени розчинної природи, у своїй сукупності чинять токсичний вплив на організм бджоли [146, 201]. При згодовуванні **2,5%** «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» розведеного ситою з гречаного меду діяльність імунної системи спрямована на створення гемоцитів імунного ряду різного віку, роль яких полягає переважно у фагоцитозі, інкапсуляції та меланізації антигенів [146, 153]. Але найбільшу активність клітинного імунітету дослідних бджіл відмічали при застосуванні **1,25%** препарату розведеного вищевказаним розчинником [146]. Що свідчить про активне розмноження корисних бактерій в організмі бджіл, які, в свою чергу, стимулюють наростання захисної функції для підтримання гомеостазу організму [146].

Відомо, що підгодівля комах цукровим сиропом поширене явище, яке розповсюджене у періоди, коли бджолам не вистачає власного корму для проживання. Крім того, цукровий сироп є відомим розчинником для засобів, що використовуються з профілактичною та лікувальною ціллю [97, 146, 221, 241]. При годівлі дослідних комах 50% розчином цукрового сиропу суттєвих змін у гемолімфі не було відмічено, так як, ймовірно, бджоли сприймають даний корм як звичну для себе харчову суміш [146]. На відміну від комах, які споживали **5%** розчин «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» розведений даним розчинником. Високий вміст секреторних клітин та клітин фагоцитарного ряду спричинений накопиченням енергетичних складових після ферментування сахарози інвертазою бджолиного організму до глюкози та фруктози [170, 204]. Окрім того, цукор є поживним середовищем для складових Ефективних Мікроорганізмів[®] «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ», тому бактерії з препарату також засвоюють необхідні енергетичні матеріали, але меншою мірою, ніж макроорганізм бджоли, так антигенне навантаження

щодо організму бджіл у вигляді мікробів засобу нижче, тому у гемолімфі комах даної групи відмічена імунна відповідь у вигляді різновиду фагоцитарних клітин [146]. Збільшення кількості прогемоцитів у комах, яким згодовували 2,5% концентрацію препарату, розведеного цукровим сиропом, інтерпретуємо вірогідним антигенним навантаження на організм комах. Можливо, складові «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» є антигенами для бджолиного організму, тому на 7-му добу експерименту спостерігалось збільшення інтенсивності синтезу прогемоцитів або пролейкоцитів, які є попередниками імунокomпетентних клітин [17, 146, 153]. Нетоксичність препарату при 2,5% концентрації пояснюємо його складом. «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» є кормовою добавкою (EM-Ukraine (Effective microorganisms)), що активізує синтез сферулоцитів, які накопичують поживні речовини для їх подальшого енергетичного використання [146]. Найвищу кількість клітин фагоцитарного ряду (що помірно знижувалися) спостерігали у комах, які споживали 1,25% розчин досліджуваного засобу, розведеним 50% розчином цукрового сиропу [146]. Таку активність пояснюємо нормальним функціонуванням макроорганізму [55]. Імунна система комах не агресивно реагує щодо складових «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ», які є антигенами для імунітету бджіл. Таке систематичне надходження низьких концентрацій пробіотика викликає так званий ефект вакцинації [50, 89], або явище імунізуючої субінфекції [146, 153, 194]. Підтримка імунітету бджіл – важлива ланка до профілактики низки інфекційних захворювань. Зокрема, клітинні механізми імунного захисту *Apis mellifera* відповідають за низку захисних бар'єрів, що полягає у сприянні до знищення чужорідних агентів, здатністю фагоцитарних клітин відповідати реакціями лізису або фагоцитозом у відповідь на проникнення інфекційних збудників бактеріальних хвороб, або їх поглинанням для нейтралізації [153]. Але необхідно відмітити, що активність фагоцитарних нейтрофілів гемолімфи у

лабораторних умовах дещо нижча, ніж в умовах природнього існування [146]. Причому, у бджолосімей, які мешкають у вуликах наявне явище так званого соціального імунітету, за якого бджоли певної колонії здатні перорально переносити імунологічні з'єднання між членами вулика [119]. Такий вид імунного обміну, ймовірно, активізується при підвищенні резистентності кожної з комах колонії (синтезу певних антитіл) [146].

Важливе профілактичне значення має дослідження метаболічного стану бджіл, так як вони виявляють ряд змін, які виникають до появи клінічних ознак [149]. Такі зміни можливо визначити, знаючи зміни біохімічного складу «крові» при застосуванні того чи іншого фармакологічного засобу. Біохімічний склад гемолімфи варіює та містить амінокислоти, білки, ферменти, вуглеводи та інші складові. Дослідження біохімічних параметрів гемолімфи бджіл проводили ряд науковців, щодо впливу *Amphotericin B* на організм бджіл [52], дії електричного поля на біохімічні маркери гемолімфи бджіл [178], визначення біохімічних маркерів у гемолімфи бджіл зимової та літньої генерації [142], вивчення біохімічних і цитологічних показників «крові» бджіл у стресових умовах [101, 239, 240, 252]. Тому нами вивчені зміни біохімічних параметрів гемолімфи бджіл української степової породи зимової генерації при застосуванні різних концентрацій (5%, 2,5%, 1,25%) «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведеного медовим гречаним (ситою) та цукровим сиропами [149]. Найнижчу гіперпротеїнемію бджіл, які отримували нативну гречану медову ситю (у серії досліду з розведенням препарату медовим сиропом (ситою) пояснюємо гіршим засвоєнням даної підкормки, так як вона багата на протеїни, а продуктом розпаду білка є аміак - ефектор нейротоксичної дії на бджолиний організм [42] (при препаруванні, бджоли даної серії досліду відчували запах аміаку). Таким чином, наявність надмірної концентрації цієї неорганічної сполуки слугує пусковим чинником гіперферментемії АСТ, ЛФ та ГГТ у

комах, які отримували препарат розведений гречаною медовою ситою. Ймовірно, клітини жирового тіла комах, яке є прототипом печінки теплокровних тварин [90], не в змозі метаболізувати цю токсичну сполуку. У свою чергу аміак призводить до пошкодження клітин жирового тіла, що інтерпретуємо гіперферментемією даних індикаторних ензимів [149]. «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведений медовою гречаною ситою спричинює вищі показники протеїну (у порівнянні з комахами, яким згодовували нативну медову гречану ситу), ймовірно, такий білок слугувати етіологічним чинником, що зумовлює розвиток кетозу [149, 243]. Гіпопротеїнемію у бджіл, які отримували дослідні розчини «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» у концентраціях 1,25 – 5% розведені цукровим сиропом, порівняно з комахами, яким згодовували препарат, розведений медовою гречаною ситою, пояснюємо відсутністю білка у цукровому сиропі і появі його в гемолімфі у вигляді амінокислот – продуктів синтезу ефективних мікроорганізмів пробіотика [149, 250]. Обернено пропорційну залежність рівня глобулінів у «крові» комах, яким згодовували пробіотик, розведений цукровим сиропом, щодо концентрації альбумінів, інтерпретуємо синтезом імунокомпетентних гемоцитів - імунна відповідь щодо антигенних складових «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» [149]. Наближеність вмісту глюкози у гемолімфі комах, яким згодовано нативну гречану медову ситу, до параметрів бджіл контрольної групи пояснюємо відсутністю конкуренції між мікроорганізмами пробіотика та нормальною мікрофлорою середньої кишки бджіл [149]. На противагу попереднім даним, аліментарну гіперглікемію у комах, які вживали «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведений цукровим сиропом, роз'яснюємо наявністю сахарози, яка міститься у складі підкормки [149]. Адже, після ферментування даного дисахариду до фруктози та глюкози дані моносахариди всмоктуються у гемолімфу для подальшого використання або накопичуються у сферулоцитах «крові» комах [149, 153]. Наступним

визначеним параметром гемолімфи бджіл української степової породи була α -амілаза. Активність даного ферменту вища у комах, які споживали препарат розведений гречаною медовою ситою, та у бджіл, які отримували нативну гречану медову ситу [149]. Ймовірно, дане явище відмічається внаслідок вмісту у меді ферменту діастази або амілази [144, 149]. Також, можливо, активність зумовлена здатністю молочнокислих бактерій зі складу препарату продукувати комплекс травних ферментів, зокрема амілазу [86]. Використовуючи прості цукри меду, дані бактерії ферментують їх до молочної кислоти, яка зумовлює зниження активності іонів водню (pH) у середній кишці комах. У надмірній кількості такий прояв негативно впливає на організм бджоли, що зумовлює порушення цілісності перитрофічної мембрани та гомеостазу [147, 149]. Схоже явище (вища концентрація пробіотика зумовлює вищу активність α -амілази) відмічене і у бджіл, яких годували препаратом, розведеним розчином цукрового сиропу, що «пояснюємо наявністю у складі «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» патоки цукрової тростини, яка містить крохмаль у своєму складі [87, 149]. Стресові фактори зумовлюють збільшення активності ферментів ЛФ та АСТ, що пояснюємо гіперферментемією даних ензимів у дослідних комах [47, 149]. На противагу вищезазначеним ферментам, активність ензиму ГГТ наближена до значень показників контрольної групи. Як відомо, такі параметри можливі за нетоксичного впливу певного фармакологічного засобу [240]. Тому, «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» у досліджуваних концентраціях не має токсичної дії щодо дослідних бджіл [149]. Нами зазначено також зниження вмісту креатиніну у гемолімфі комах, які отримували препарат розведений цукровим сиропом, що пояснюємо активною роботою видільної системи дослідних бджіл у фізіологічних межах [149, 240]. Тому, згідно аналізу результатів гематологічних досліджень, «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» у досліджуваних концентраціях, чинить позитивний вплив на організм бджіл

української степової породи осінньої генерації, причому, найкращі результати реєструються при розведенні даного пробіотика 50% розчином цукрового сиропу.

Для ведення органічного бджільництва необхідним є впровадження у лікувально-профілактичні заходи препаратів певних фармакологічних груп, що не «забруднюють» продукти цієї галузі. Нами запропоновані схеми застосування певних засобів, які можна використовувати з профілактичною та терапевтичною метою за ентеробактеріозів бджіл [107]. Вплив засобу конкретної групи зумовлений його механізмом дії. Наприклад, застосування «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» групою вчених зі Словенії та Хорватії призвело до зменшення спор збудника нозематозу у вуликах бджіл [258]. При випробуванні даного пробіотику у лабораторних умовах встановлений його полівекторний характер впливу, як на збудники клебсієльозу бджіл (*Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*) *in vitro* так і на клітини та її біохімічні параметри гемолімфи бджіл української степової породи *in vivo*. Випробування даного препарату на пасіках членів «Клубу професійних пасічників Житомирщини» також дало позитивні результати, що підтверджено актами впровадження (Додаток 3 – Й). Прямий характер впливу пов'язаний із здатністю Ефективних Мікроорганізмів[®], які містяться у складі «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» пригнічувати патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми, встановлюючи баланс [13]. Непряма дія полягає у підвищенні резистентності бджолиних колоній, що стимулює імунну систему комах [13]. Наступними засобами, що включені у зазначені нами схеми лікування та профілактики кишкових дисбіозів бджіл є «Ентеронормін з Йодіс + Se» та «Біоконтакт-плюс». «Ентеронормін з Йодіс + Se» – ветеринарний препарат, якій містить у своєму складі корисні бактерії родів *Lactobacillus spp.*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus spp* [36], чинить значний антагоністичний ефект щодо бактерій виду *Serratia marcescens*, *Bacillus*

larvae, Escherichia coli, Salmonella enteritidis, Corynebacterium xerosis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus epidermidis, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenes [26]. Також нами встановлена бактеріостатична дія даного препарату щодо ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* розведеного розчинами медових сит із лісового різнотрав'я [102] та акцієвого меду [25]. Тушак С. Ф. був досліджений позитивний вплив даного засобу на показники гемолімфи бджіл весняної генерації у садковому експериментів [264]. Механізм дії даного засобу зумовлений чітким підбором мікроорганізмів, що входять до складу засобу. Таким чином, фахівцями підібрані такі бактерії, що максимально здатні до синтезу молочної кислоти, ферментів та інших БАР [36]. «Біоконтакт-плюс» – дезінфекційний засіб, який має широкий спектр дії щодо грамнегативної та грампозитивної мікрофлори, вірусів за різних інфекційних патологій тварин і фунгіцидну дію [24]. Окрім того, даний деззасіб у концентраціях 0,15% та 0,1% при розведенні 50% розчином цукрового сиропу має стимулювальну дію [40]. При розведенні водою «Біоконтакт-плюс» до 1% концентрації відбувається лізування бактерій внаслідок руйнування хімічних зв'язків складових клітинної стінки [233]. Таким чином, завдяки вищевказаним механізмам впливу щодо збудників інфекційних захворювань бджіл, зокрема до бактерій видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, та позитивною дією застосованих нами засобів різних фармакологічних груп, як на організм бджоли *in vivo*, так і в експериментах *in vitro*, запропоновано комплексну лікувальну та профілактичну схеми обробок пасік [107].

Висновок до Розділу 4

Аналіз проведених досліджень свідчить про необхідність в удосконалення системи моніторингу інфекційних патологій бджіл. Однією з причин їх масової загибелі в Україні є нові кишкові хвороби *Apis mellifera* – «клебсієльози» або дисбіози. Для профілактики бджолиних дисбіозів доцільно використовувати фармакологічні засоби на основі атомарного йоду. Перспективним напрямком є розроблення препаратів, які містять іони Ag^+ і Cu^+ . Застосування препаратів «Ентеронормін з Йодіс + Se», «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» в комплексі профілактичних та терапевтичних заходів за ентеробактеріозів (клебсієльозів) бджіл є актуальним напрямком ліквідації дисбіозів на пасіках.

ВИСНОВКИ

У дисертації отримані нові дані, узагальнені теоретичні знання та практичні підходи щодо ідентифікації, лікування та профілактики клебсієльозів (ентеробактеріозів) бджіл. Обґрунтована необхідність удосконалення системи моніторингових досліджень контагіозних хвороб бджіл різної етіології. Методом біохімічного типування ідентифіковані збудники клебсієльозу бджіл – ентробактерії видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*. Удосконалені методи виділення, культивування та зберігання даних ентробактерій. Виділені та ідентифіковані бактерії виду *Bacillus subtilis* із медів різних видів. Модифікований диско-дифузійний метод (Кірбі-Бауера) з метою визначення напрямку дії певного фармакологічного засобу *in vitro*. Експериментально обґрунтовано (*in vitro, in vivo*) доцільність застосування «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» з терапевтичною та профілактичною ціллю за ентробактеріозів бджіл. Визначений найбільш ефективний розчинник та концентрації для «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ».

1. Результати епізоотичного моніторингу щодо контагіозних хвороб бджіл за 2019 – 2022 роки у Північно-Західному регіоні України свідчать про стаціонарність заразних захворювань бджіл. Максимальні показники інфікованості щодо вароатозу – 30,24% (2021 рік) відмічені у Волинській області, нозематозу – 7,45% (2019 рік) у Рівненській області та американського гнильця – 0,81% (2019 рік) у Житомирській області відповідно.

2. Розроблена схема ідентифікації патогенних ентробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* із застосуванням біохімічного типування може бути використана при виявленні інших збудників хвороб бджіл викликаних бактеріями родини *Enterobacteriaceae*.

3. Виділені та ідентифіковані нами бактеріальні культури виду *Bacillus subtilis* із 5 видів меду (акацієвого, гречаного, липового, квіткового та меду із лісового різнотрав'я) володіють антагоністичною активністю щодо тест-культури виду *Klebsiella pneumoniae*. Найбільш виражений антагонізм проявили бацили виду *Bacillus subtilis* з лісового та акацієвого медів – більше 30 мм (по відношенню до чистої культури ентеробактерій бджіл *Klebsiella pneumoniae*).

4. Дезінфектант «Йодіс Дез №2» зумовлює пригнічення росту мікроорганізмів виду *Klebsiella pneumoniae in vitro* із діаметром зони 6–10 мм (розведений від нативного до 1:10). Даний фармакологічний засіб потребує удосконалення, так як такого прояву бактеріостатичної дії не достатньо для проведення дезінфекції на пасіках.

5. Розчин цитрата срібла і міді у нативному стані (100%) проявляє бактерицидний вплив щодо змішаної мікробної асоціації із зоною затримки росту $19,86 \pm 0,45$ мм. Бактеріостатична дія даного дезінфектанта щодо тест-культур ентеробактерій видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* низька – $14,14 \pm 0,35$ мм та $11,14 \pm 0,35$ мм, відповідно.

6. «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведений водою та 50% цукровим сиропом проявляє бактеріостатичну, бактерицидну та антагоністичну дії щодо тест-культур ентеробактерій бджіл *in vitro*. Найбільш виражений антагонізм щодо мікроорганізмів виду *Klebsiella pneumoniae* проявляється при розведенні препарату водою у концентраціях 0,5% на рівні $75,4 \pm 1,04$ мм, 1% – $61,2 \pm 0,42$ мм відповідно. Бактеріостатична дія з найбільшим діаметром пригнічення росту мікроорганізмів виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* встановлена при дії 0,5–50% пробіотика розведеного цукровим сиропом – $16,4 \pm 0,27$ – $27,8 \pm 0,42$ мм відповідно. Бактерицидний ефект «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» щодо змішаної

асоціації мікроорганізмів зареєстрований при розведенні його водою у концентрації 10% ($18,6 \pm 0,57$ мм).

7. Встановлено, що 1,25–5% концентрація «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведеного цукровим сиропом (2 частини цукру: 1 частина джерельної води) подовжує тривалість життя бджолам української степової породи зимової генерації в лабораторних умовах. При цьому комахи дослідних груп прожили на 5 та 4 діб довше в порівнянні із контрольною групою бджіл, яка пробіотик не отримувала.

8. «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», розведений розчином цукрового сиропу, або гречаною медовою ситою у концентрації 1,25% має імуностимулюючу дію на організм бджіл української степової породи зимової генерації, про що свідчить зростання рівня імунокомпетентних фагоцитарних гемоцитів на 10 добу експерименту до $49,8 \pm 0,74\%$ (цукровий сироп) та $72,4 \pm 0,45\%$ (гречана медова сита).

9. «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» розведений 50% розчином цукрового сиропу у концентрації 2,5% стимулює синтез сферулоцитів гемолімфи у комах до $78,8 \pm 0,42$ на 7 добу експерименту.

10. Встановлено, що 1,25–5% розчини «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» спричиняють диференційний вплив на біохімічні параметри гемолімфи і не володіють токсичним ефектом щодо бджіл української степової породи, так як активність гамма-глутамілтранспептидази у комах, які отримували даний засіб розведений цукровим сиропом (5% – 26,59 ОД/л; 2,5% – 13,29 ОД/л; 1,25% – 12,72 ОД/л) наближена до параметрів цього ензиму у комах контрольної групи (20,58 ОД/л).

11. Комбіноване застосування препаратів різних фармакологічних груп («ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ», «Ентеронормін з Йодіс + Se», та «Біоконтакт-плюс») забезпечує комплексний вплив їх складових на різні

системи організму бджіл, що дозволяє підвищити рівень їх резистентності та санації бджолиних сімей і вуликів від патогенних збудників.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Спосіб ідентифікації бджолиних ентеробактерій видів *Klebsiella Pneumoniae* та *Enterobacter Aerogenes* (*Klebsiella Aerogenes*) (патент на корисну модель № u202001272, 2020 р.).

2. Спосіб приготування препарату «Ентеронормін з ЙОДІС + SE» на медовій ситі з лісового різнотрав'я для застосування у бджільництві (патент на корисну модель № u202001273, 2020 р.).

3. Спосіб визначення чутливості ентеробактерій бджіл до пробіотиків та дезінфектантів методом Кірбі-Бауера (патент на корисну модель № u202001274, 2020 р.).

4. Науково-методичні рекомендації «Використання метода Кірбі-Бауера (модифікованого) для випробування пробіотиків та дезінфектантів за ентеробактерозів бджіл *in vitro*».

5. Наукові звіти виконані згідно госпдоговірної тематики на теми: «Вплив різних концентрацій «ЕМ[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ», розведених цукровим сиропом та медовою ситою на морфологічні показники гемолімфи бджіл» (Договір № 05-02 від 14.05.2020 з ТОВ «ЕМ-Україна», м. Кропивницький); «Вивчення антагонізму препарату «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» щодо патогенних ентеробактерій бджіл» (Договір № 19-04 від 19.04.2021 з ТОВ «ЕМ-Україна», м. Кропивницький).

6. Отримані результати враховані у навчальному процесі при викладанні дисциплін: «Епізоотологія та інфекційний хвороби тварин», «Спеціальна епізоотологія», «Хвороби бджіл», «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактики заразних хвороб тварин», «Ветеринарна мікробіологія», «Лабораторна діагностика заразних хвороб», «Дослід у ветеринарній медицині» для підготовки фахівців ОС «Магістр» за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» у БНАУ, СНАУ, ПДАУ, ОДАУ, ЛНУВМБ ІМЕНІ С. З. ГЖИЦЬКОГО та НУБіП.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Арнаута, О. В., & Калачнюк, Л. Г. (2017). Перспективи вивчення причин і наслідків масової загибелі медоносних бджіл. *Біологія тварин, 19 (1)*, 9–15. Режим доступу: <https://aminbiol.com.ua/20171pdf/1.pdf>
2. Віннікова, О. І., Раєвська, І. М. (2016). Практикум з мікробіології : методичні рекомендації для студентів 2 курсу денного відділення біологічного факультету. Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 66 с. Режим доступу: http://plantphysiol-bio.univer.kharkov.ua/materials/Praktikum_po_microbiologii.pdf
3. Галатюк, О. Є. (2006). Хвороби бджіл та основи бджільництва. *Житомир, Полісся*, 287 с.
4. Галатюк, О. Є. (2010). Хвороби бджіл та основи бджільництва: навчальний посібник для студентів факультетів ветеринарної медицини, технології виробництва та переробки тваринницької продукції, ветеринарних лікарів, пасічників, Житомир: Полісся, 344 с. Режим доступу: <http://eurowine.com.ua/minisites/fermerhouse/node/354/> Отримано 15.02.2020.
5. Галатюк, О. Є. (2015). Забезпечення здоров'я бджолиних сімей-основа високої рентабельності пасіки. *Бджільництво України, (1)*, 23–26. Режим доступу: https://www.journalbeekeeping.com.ua/index.php/1_4/article/view/55
6. Галатюк, О. Є., Кистерна, О. С., Мусієнко, О. В. (2014). Значення оцінки епізоотологічного профілю медоносних бджіл Північно-Східної України. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, 3 (60)*, 79–85. Режим доступу: <https://repo.snau.edu.ua/handle/123456789/2105>
7. Гаркавенко, Т. О., Горбатюк, О. І., Козицька, Т. Г., Андріяшук, В. О., Гаркавенко, В. М., Дибкова, С. М., Азиркіна І. В. (2021). Методичні рекомендації з визначення чутливості мікроорганізмів до антимікробних

препаратів: *методичні рекомендації*. Київ: ДНДІЛДВСЕ, 101 с. Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0167282-07#Text>

8. Головецький, І. І., Лосєв, О. М. (2013). Патологія бджіл. *Навчально-методичний посібник*. Київ, 172 с. Режим доступу: <https://nubip.edu.ua/sites/default/files/u104/Навчально-методичний%20посібник%20Патологія%20бджіл2013.pdf>

9. Гудзь, С. П., Гнатуш, С. О., Яворська Г. В., Білінська, І. С., Борсукевич, В. М. (2014). Практикум з мікробіології. Львівський національний університет ім. Івана Франка, 456 с. Режим доступу: https://bioweb.lnu.edu.ua/wpcontent/uploads/2017/12/manual_sciseminar.pdf

10. Гуцол, А. В., Ковальський, Ю. В., Ковальська, Л. Н., Гуцол, Н. В. (2017). Вплив пробіотиків на ріст, розвиток і господарсько-корисні ознаки медоносних бджіл. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького*, 19 (74), 235–238. Режим доступу: <http://socrates.vsau.org/repository/getfile.php/16422.pdf>

11. Двилюк, І. В. (2014). Санітарно-гігієнічні основи превентивних заходів у бджільництві. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 16 (3), 286–294. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvlnu_2014_16_3%283%29_41

12. Директива 2010/63/ЄС «Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях». Режим доступу: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/LSU/?uri=celex:32010L0063>. / Отримано 16.03.2021.

13. ЕМ-Україна. (2021). *ЕМ-технологія в бджільництві*. Режим доступу: <https://embio.in.ua>

14. Ентеронормін–пробіотики для бджільництва. (2015). Режим доступу: <https://bee.enteronormin.com/> Отримано 10.01.2019.

15. Єфіменко, Т. М., Односум, Г. В., & Воробій, О. А. (2021). Перебіг мішечкуватого розплоду за створення в бджолиних сім'ях безрозплідного періоду порівняно з обробленням сімей витяжками з евкالیпту і деревію та засобами-аналогами. *Бджільництво України*, 1 (6). <https://doi.org/10.46913/beekeepingjournal.2021.6.03>

16. Каталог НД on-line. ДСТУ ISO\TS 11133-1:2000 IDT «Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. *Настанови щодо готування і виробництва поживних середовищ*» частина 1; частина 2. (2000). Режим доступу: <http://csm.kiev.ua/nd/nd.php?b=1&l=15485/> Отримано 20.01.2019.

17. Караван, В. В., Язловицька, Л. С., Череватов, В. Ф., & Панчук, І. І. (2022). Біомаркери оксидативного стресу у *Apis mellifera* за різних вуглеводних дієт. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 14 (2), 129–136. <https://doi.org/10.31861/biosystems2022.02.129>

18. Кирик, Д. Л. (2017). Використання maldi-tof мас-спектрометрії у клінічній мікробіологічній практиці. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика. Київ, 2017. 484 с.* Режим доступу: <https://www.nuozu.edu.ua/zagruzka2/zbornikNMAPO27.pdf#page=60>

19. Кистерна, О. С., Гаркава, В. В., Мусієнко, О. В. (2014). Особливості підготовки мазків гемолімфи бджоли-імаго. *Біологія тварин*, 16 (4), 188–188. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/bitv_2014_16_4_34

20. Кистерна, О. С., Гаркава, В. В., Мусієнко, О. В., Мусієнко, В. М. (2012). Оцінка гемолімфи медоносних бджіл при використанні біологічних стимуляторів у лабораторних умовах. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія Ветеринарна медицина*, 7 (31), 34–40. Режим доступу: <https://repo.snau.edu.ua/bitstream/123456789/628/3/10.pdf>

21. Кистерна, О. С., Мусієнко, О. В., Гаркава, В. В., Мусієнко, В. М. (2017). Цитологічні зміни в гемолімфі бджіл за використання імунних

препаратів. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія Ветеринарна медицина*, 1 (40), 42–49. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vsna_vet_2017_1_10

22. Ковальський, Ю. В., Кирилів, Я. І. (2013). Морфологічні особливості будови середньої кишки у медоносних робочих бджіл. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького*, 15 (3-2), 114-119. Режим доступу: <https://nvlvet.com.ua/index.php/journal/issue/download/32/32>

23. Кот, С. П., Кириченко, В. А., Лумадзе, І. Х., Бондар, А. О., Мельник, В. О. (2020). Ветеринарна мікробіологія: методичні рекомендації до лабораторно-практичних занять та самостійної роботи для здобувачів вищої освіти СВО «Магістр» спеціальності 212. Миколаївський національний аграрний університет, 144 с. Режим доступу: http://dspace.mnau.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/8584/1/Veterynarna_mikrob_iolohiia.pdf

24. Кронос-агро. (2020). *Біоконтакт плюс* Режим доступу: <http://kronos-agro.com/product/biokontakt-plus/> Отримано 15.02.2020

25. **Лахман, А. Р.**, Галатюк, О. Є., Романишина, Т. О., Бегас, В. Л. (2022, лютий). Чутливість бактеріальної культури бджіл виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* до дії «Ентеронормін з Йодіс + Se» розведеного медовими ситами *in vitro*. *Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Winter Debates: тези доп. III Міжн. наук.-практ. інтернет-конф. Дніпро*, (сс. 319–320). Режим доступу: <http://www.wayscience.com/wp-content/uploads/2022/03/Proceedings-February-3-4-2022.pdf>

26. Мізерницький О. О., Переста М. М. Біологія бджіл та ефективність препарату «Ентеронормін» з «Йодіс+Se». Ексклюзивні технології. Режим доступу: <http://agrotimeteh.com.ua> / Отримано 17.04.2019.

27. Наказ № 167 Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» від 05.04.2007 м. Київ. (2007). Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0167282-07#Text/>

28. Науменко, В. В., Дячинський, А. С., Демченко, В. Ю., Дерев'янка, І. Д. (2019). Фізіологія сільськогосподарських тварин. К.: Центр навчальної літератури, 832 с. Режим доступу: <https://uchebnik-online.net/book/828-fiziologiya-silskogospodarskix-tvarin-navchalnij-posibnik-naumenko-v-v-dyachinskij-a-s-demchenko-v-yu-derevyanko-i-d.html>

29. Орябінська, Л. Б., Дзигун, Л. П., Поліщук, В. Ю. (2020). Біотехнологія антибіотиків: *лабораторний практикум*. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 40 с. Режим доступу: <https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/36720/1/Antybiotyky.pdf>

30. Переста, М. М., Бойко, Н. В., Броварський, В. Д., Віщур, О. І., Галатюк, О. Є., Мельниченко, В. М., Дідовець, А. О., Дідовець, М. В., Мізерницький, О. О. (2020). Окремі аспекти патогенетичних особливостей бджолиного мору. *Наука. Іновації. Технології*, 32–36. Режим доступу: <http://agrotimeteh.com.ua/organicheskoe-agroproizvodstvo/okremi-aspekti-patogenetichnix-osoblivostej-bdzholinogo-moru.html>

31. Правила відбору зразків патологічного матеріалу, крові, кормів, води та пересилання їх для дослідження. (1997). Режим доступу: <http://vetlabkr.pp.ua/Content/files/Правила%20відбору%20зразків%20патологічного%20матеріалу.pdf>

32. Пришляк, Р. І., & Голубіцька, В. О. (2016). Вплив перфторорганічних сполук на процес культивування ентеробактерій. *Проблеми екологічної біотехнології*, 1. <http://dx.doi.org/10.18372/2306-6407.1.10532>

33. Разанова, О. П. (2019). Використання пробіотики біосевен для підвищення життєздатності бджіл. *Аграрна наука та харчові технології: зб. наук. праць ВНАУ*, 2 (105), 115–121. Режим доступу: <http://socrates.vsau.org/repository/getfile.php/21992.pdf>

34. Разанова, О. П., Шульга, Ю. І., & Салюк, О. О. (2022). Продуктивність бджолиних сімей у період підготовки до головного медозбору за впливу пробіотики. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Тваринництво*, (2), 61-67. <https://doi.org/10.32845/bsnau.lvst.2022.2.9>

35. Розанцев, С. В. Радіо, О. Ю. Пойманова, Н. І. Гумерова, Г. М. (2016). Концентрації розчинів: *навчальний посібник із загальної хімії*. Вінниця: ДонНУ, 61 с. Режим доступу: <https://r.donnu.edu.ua/bitstream/123456789/1094/1/Концентрації%20розчинів.pdf>

36. СГП «МБС» (2020) Сільськогосподарське підприємство, мікробіологічні системи. Режим доступу: <https://sgpmb.com/main-ru/>
Отримано 16.03.2021.

37. Ситник, І. Д, Климюк, С. І., Тварко, М. С. (2017). Мікробіологія, вірусологія імунологія : *підручник*. Тернопіль : ТДМУ, 392 с. Режим доступу: <https://studfile.net/preview/5281335/>

38. Сіренко, О. С., Десятникова, О. В., & Гур'єва, В. Б. (2019) Ефективність дезінфікуючого засобу «Гуаніdez» на збудників інфекційних хвороб бджіл у лабораторних умовах. *Veterinary Medicine: inter-departmental subject scientific collection*, 105, 59–62. <https://doi.org/10.36016/VM-2019-105-11>

39. Тимчук, К. Ю., Баглей, О. В., Жук, А. В., Филипчук, Т. В., & Федоряк, М. М. (2021). Епізоотична ситуація щодо вароозу медоносних бджіл (*Apis mellifera*) окремих районів Чернівецької області. *Вісник*

Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія *Екологія*, (24), 133–140. <https://doi.org/10.26565/1992-4259-2021-24-12>

40. Тушак, С. Ф., Романишина, Т. О., Рибачук, Ж. В., & Лемешинська, Л. Ф. (2018). Зміни кількісного складу гемолімфи у бджіл за використання препарату «Біоконтакт плюс». *Біологія тварин*, 20 (2), 82–88. <https://doi.org/10.15407/animbiol20.02.082>

41. Янковський, Д. С., Широбоков, В. П., & Димент, Г. С. (2018). Мікробіом у фізіології людини. *Інфекційні хвороби*, 3, 5–17. <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2018.3.9407>

42. 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. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1295257>

43. Ali, A. M., & Kunugi, H. (2020). Apitherapy for Parkinson's disease: A focus on the effects of propolis and royal jelly. *Oxidative medicine and cellular longevity* (pp. 1–17). <https://doi.org/10.1155/2020/1727142>

44. Amanati, L, Winarno, J. (December, 2020). *Measurement of diastase enzymes on honey which is circular in East Java*. In Seminar Nasional 1 Baristand Industri Padang (pp. 39-43). https://doi.org/10.32698/GCS-SNIIBIP_D3432
Retrieved from <https://series.gci.or.id/assets/papers/snbip-2020-432.pdf>

45. Amiri, E., Seddon, G., Zuluaga Smith, W., Strand, M. K., Tarpy, D. R., & Rueppell, O. (2019). Israeli acute paralysis virus: Honey bee queen–worker interaction and potential virus transmission pathways. *Insects*, 10 (1), 9. <https://doi.org/10.3390/insects10010009>

46. Anjum, S. I., Aldakheel, F., Shah, A. H., Khan, S., Ullah, A., Hussain, R., Khan, H., Ansari, J. M., Mahmoud A. H. & Mohammed, O. B. (2021). Honey bee gut an unexpected niche of human pathogen. *Journal of King Saud University-Science*, 33 (1), 101247. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101247>

47. Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual review of entomology*, 55, 207–225. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
48. Atlas, R., & Snyder, J. (2015). Reagents, stains, and media: bacteriology. In *Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition* (pp. 316–349). <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch19>
49. Azevedo, P. A. A., Furlan, J. P. R., Oliveira-Silva, M., Nakamura-Silva, R., Gomes, C. N., Costa, K. R. C., Stehling E. G., Pitondo-Silva A. (2018). Detection of virulence and β -lactamase encoding genes in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates from Brazil. *Brazilian journal of microbiology*, 49, 224–228. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.04.009>
50. 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. <https://doi.org/10.1016/j.joad.2016.08.019>
51. Bachman, M. A., Breen, P., Deornellas, V., Mu, Q., Zhao, L., Wu, W., Cavalcoli, J. D, Mobley, H. L. T. (2015). Genome-wide identification of *Klebsiella pneumoniae* fitness genes during lung infection. *MBio*, 6 (3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00775-15>
52. Bajda, M., Łoś, A., Merska, M. (2014). Effect of amphotericin B on the biochemical markers in the hemolymph of honey bees. *Med. Weter*, 70 (12), 766. Retrieved from <http://www.medycynawet.edu.pl/images/stories/pdf/pdf2014/122014/201412766769.pdf>
53. 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>

54. 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. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0628-y>

55. Barroso-Arévalo, S., Vicente-Rubiano, M., Puerta, F., Molero, F., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2019). Immune related genes as markers for monitoring health status of honey bee colonies. *BMC veterinary research*, 15 (1), 1-15. <http://doi.org/10.1186/s12917-019-1823-y>

56. Bascomb, S., Lapage, S. P., Curtis, M. A., Wilcox, W. R. (1971). Numerical classification of the tribe *Klebsielleae*. *J Gen Microbiol*, 66, 279–295. <https://doi.org/10.1099/00221287-66-3-279>

57. Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., Turck M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Tech Bull Regist Med Technol.*, 36 (3), 49–52. PMID: [5908210](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5908210/)

58. Benkova, M., Soukup, O., & Marek, J. (2020). Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *Journal of applied microbiology*, 129 (4), 806–822. <https://doi.org/10.1111/jam.14704>

59. Bidewell, C. A., Williamson, S. M., Rogers, J., Tang, Y., Ellis, R. J., Petrovska, L., & Abuoun, M. (2018). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* subspecies *pneumoniae* as a cause of septicemia in pigs in England. *PloS one*, 13 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191958>

60. Biswas, S., & Rolain, J. M. (2013). Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *Journal of microbiological methods*, 92 (1), 14–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.10.014>

61. Bommuraj, V., Chen, Y., Birenboim, M., Barel, S., & Shimshoni, J. A. (2021). Concentration-and time-dependent toxicity of commonly encountered pesticides and pesticide mixtures to honeybees (*Apis mellifera* L.). *Chemosphere*, 266, 128974. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128974>
62. Borges, D, Guzman-Novoa, E, Goodwin, PH. (2021). Effects of Prebiotics and Probiotics on Honey Bees (*Apis mellifera*) Infected with the Microsporidian Parasite *Nosema ceranae*. *Microorganisms*, 9 (3), 481. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030481>
63. Borsuk, G., Ptaszyńska, A. A., Olszewski, K., Domaciuk, M., Krutmuang, P., & Paleolog, J. (2017). A new method for quick and easy hemolymph collection from apidae adults. *PloS one*, 12 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170487>
64. Bron, P. A., Kleerebezem, M., Brummer, R. J., Cani, P. D., Mercenier, A., MacDonald, T. T., Garcia-Ródenas, C. L., Wells, J. M. (2017). Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *British Journal of Nutrition*, 117 (1), 93–107. <https://doi.org/10.1017/S0007114516004037>
65. Buendia, M., Hernández, R. M., Gallego, C. O., Barrios, L., Husson, C. B., & Pascual, M. H. (2018). Epidemiological study of honeybee pathogens in Europe: The results of Castilla-La Mancha (Spain). *Spanish journal of agricultural research*, 16 (2), 12. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018162-11474>
66. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167752>
67. Callaway, E. (2018). Synthetic species made to shun sex with wild organisms. *Nature*, 553, 259–260. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-00625-1>
68. Cappa, F., Petrocelli, I., Cini, A., Pepiciello, I., Giovannini, M., Lazzeri, A., Perito, B, Turillazzi, S. & Cervo, R. (2020). Immunity of honeybee

guards reflects their transition from house bees to foragers. *Ethology Ecology & Evolution*, 32 (3), 289–295. <https://doi.org/10.1080/03949370.2019.1695228>

69. Catalán-Nájera, J. C., Garza-Ramos, U., & Barrios-Camacho, H. (2017). Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? *Virulence*, 8 (7), 1111–1123. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1317412>

70. Chang, M. H., Chen, G. J., & Lo, D. Y. (2019). Chromosomal locations of *mcr-1* in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* from dogs. *Taiwan Veterinary Journal*, 45 (3), 79-84. <https://doi.org/10.1142/S168264851972003X>

71. Chong, Y., Shimoda, S., & Shimono, N. (2018). Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution*, 61, 185-188. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.04.005>

72. Cornman, R. S., Tarpy, D. R., Chen, Y., Jeffreys, L., Lopez, D., Pettis, J. S., Evans, J. D. (2012). Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS one*, 7 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043562>

73. Cuzon, G., Naas, T., Bogaerts, P., Glupczynski, Y., Nordmann, P. (2012). Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(8), 1865–1869. <https://doi.org/10.1093/jac/dks156>

74. Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food chemistry*, 196, 309-323. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>

75. 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*, 8 (9), 1339–1345. <https://doi.org/10.3390/jcm8091339>

76. Daisley, B. A., Pitek, A. P., Chmiel, J. A., Al, K. F., Chernyshova, A. M., Faragalla, K. M., Burton, J. P., Thompson, G. J., Reid, G. (2020). Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. *The ISME journal*, 14 (2), 476–491. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0541-6>

77. Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., & Yadav, V. (2016). Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Frontiers in microbiology*, 7, 1831. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>

78. 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. <https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919>

79. Darling, K. T. and Jones, B. (2011). Microbiology Review. In L. Caveney, B. Jones and K. Ellis (Eds.), *Veterinary Infection Prevention and Control* (pp. 21–39). <https://doi.org/10.1002/9781119266037.ch2>

80. Davin-Regli, A. (2015). *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in microbiology*, 6, 392. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00392>

81. Davis, G. S., & Price, L. B. (2016). Recent research examining links among *Klebsiella pneumoniae* from food, food animals, and human extraintestinal infections. *Current environmental health reports*, 3 (2), 128–135. <https://doi.org/10.1007/s40572-016-0089-9>

82. Davis, G. S., Waits, K., Nordstrom, L., Weaver, B., Aziz, M., Gauld, L., Grande, H., Bigler, R., Horwinski, J., Porter, S., Stegger, M., Johnson, J., Liu, C. M., Price, L. B. (2015). Intermingled *Klebsiella pneumoniae* populations between retail meats and human urinary tract infections. *Clinical Infectious Diseases*, 61 (6), 892–899. <https://doi.org/10.1093/cid/civ428>

83. 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. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000750>

84. Deng, X., Tian, H., Yang, R., Han, Y., Wei, K., Zheng, C., Liu, Z., Chen, T. (2020). Oral probiotics alleviate intestinal dysbacteriosis for people receiving bowel preparation. *Frontiers in medicine*, 7, 73. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00073>

85. Dorsey, J., & Gonska, T. (2017). Bacterial overgrowth, dysbiosis, inflammation, and dysmotility in the cystic fibrosis intestine. *Journal of Cystic Fibrosis*, 16, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.07.014>

86. Elzeini, H. M., Ali, A. R., Nasr, N. F., Hassan, M., Hassan, A. A. M., & Elenany, Y. E. (2021). Probiotic capability of novel lactic acid bacteria isolated from worker honey bees gut microbiota. *FEMS Microbiology Letters*, 368 (6). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab030>

87. EMRO, Japan. Effective Microorganisms Research Organization, 1478-Kishaba, Kitanakagusuku-Sun, Nakagami-Gun, Okinawa 1901–2311. Japan. Retrieved from <https://emrojapan.com> / Retrieved from 16.03.2020.

88. EM-Ukraine (Effective microorganisms). Retrieved from http://shop.embio.in.ua/index.php?route=product/product&product_id=72

89. Entrican, G., Lunney, J. K., Wattegedera, S. R., Mwangi, W., Hope, J. C., & Hammond, J. A. (2020). The Veterinary Immunological Toolbox: Past, Present, and Future. *Frontiers in Immunology*, 11, 1651. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01651>

90. Escalera-Valente, F., Alonso, M. E., Lomillos-Pérez, J. M., Gaudioso-Lacasa, V. R., Alonso, A. J., & González-Montaña, J. R. (2021). Blood Biochemical Variables Found in Lidia Cattle after Intense Exercise. *Animals*, 11 (10), 2866. <https://doi.org/10.3390/ani11102866>

91. European Parliament (2010). *European Parliament Resolution of 25 November 2010 on the situation in the beekeeping sector*. Off. J. Eur. Union, 99, 60–64. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2012:099E:0060:0064:EN:PDF>. Accessed December 11, 2018.

92. Ewers, C., Stamm, I., Pfeifer, Y., Wieler, L. H., Kopp, P. A., Schønning, K., Prenger-Berninghoff, E., Scheufen, S., Stolle, I., Günther, S., Bethe, A. (2014). Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 *Klebsiella pneumoniae* in companion animals and horses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69 (10), 2676-2680. <https://doi.org/10.1093/jac/dku217>

93. 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*, 15 (7), 1539. <https://doi.org/10.3390/ijerph15071539>

94. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.11.002>

95. Forsgren, E., Locke, B., Sircoulomb, F., & Schäfer, M. O. (2018). Bacterial diseases in honeybees. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5 (1), 18–25. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0083-0>

96. Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35 (10), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>

97. 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. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00745-6>

98. 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. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103701>

99. Galatiuk, O. E. & Tushak, S. F. (2016). Epizootological monitoring of infectious diseases of honey bees in the north-western region of Ukraine. *Scientific Bulletin of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine*, 237, 372–379. Retrieved from <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Veterenarna/article/view/7474>

100. Galatiuk, O. E., Romanishina, T. O. & Tushak, S. F. (2018). New enterobacteriosis of bees in Ukraine: characteristic of pathogens, diagnostics, therapeutic and prophylactic treatments. *Beekeeper*, 12, 4–7.

101. Galatiuk, O. Ye., **Lakhman, A. R.**, Romanishina, T. O. (2020a). Sposib identyfikatsiyi bdzholynykh enterobakteriy vydiv *Klebsiella pneumoniae* ta Enterobacter aerogenes (*Klebsiella aerogenes*) [Method for identification of bee enterobacteria of *Klebsiella pneumoniae* and Enterobacter aerogenes species (*Klebsiella aerogenes*)]. Patent UA, no 143401. https://sis.ukrpatent.org/media/UTILITY_MOD/2020/u202001272/published_description.pdf

102. Galatiuk, O. Ye., **Lakhman, A. R.**, Romanishina, T. O. (2020b). Sposib pryhotuvannya preparatu ENTERONORMIN Z YODIS+Se na medoviy syti z lisovoho riznotrav'ya dlya zastosuvannya u bdzhil'nytstv [Method of preparation of ENTERONORMIN WITH IODIS + Se on honey on honey solution

of forest herbs for application in]. Patent UA, no 143400. https://sis.ukrpatent.org/media/UTILITY_MOD/2020/u202001273/published_description.pdf

103. Galatiuk, O. Ye., **Lakhman, A. R.**, Romanishina, T. O., Zastulka, O.O. (2020c). 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. https://sis.ukrpatent.org/media/UTILITY_MOD/2020/u202001274/published_description.pdf

104. Galatiuk, O., Romanishina, T., **Lakhman, A.**, Behas, V., Andriichuk, A., & Solodka, L. (2020d). 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*, 22 (99), 101-106. <https://doi.org/10.32718/nvlvet9916>

105. Galatiuk, O., Romanishina, T., **Lakhman, A.**, Zastulka, O., & Balkanska, R. (2020e). Isolation and identification of *Klebsiella aerogenes* from bee colonies in bee dysbiosis. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 50 (3), 353-361. Retrieved from <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/tjvm/article/view/245844>

106. Galatiuk, O., **Lakhman, A.**, Romanishina, T., & Behas, V. (2021a). Prospects for the creation and use of paired and multiple correlation and regression models in beekeeping *Naukovij visnik veterinarnoi medicini*, 1, 58–63. <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-165-1-58-63>

107. Galatiuk, O., **Lakhman, A.**, Romanishina, T., Zastulka, O., Kurtyak, B., Kovalchuk, I., & Pundyak, T. (2021b). Bioperspectives in the treatment and prevention of enterobacteriosis of bees in organic production of beekeeping products *The Animal Biology*, 23 (3), 41. <https://doi.org/10.15407/animbiol23.03>

108. Galatyuk, O., Romanyshyna, T., **Lakhman, A.**, Lysenko, O., & Shimanska, V. (2020). The pathogenic bee enterobacteria resistance to the experimental iodine-containing disinfectant jodis des no. 2. *Scientific Horizonsthis*, 1 (86), 71–78. <https://doi.org/10.33249/2663-2144-2020-86-1-71-78>
109. Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., Martínez-Romero, E. Perla Tinoco, Pina-Gonzales, M., Barrios, H., Martínez-Barnetche, J., Gómez-Barreto, R. E., Tellez-Sosa, J. (2015). Development of a Multiplex-PCR probe system for the proper identification of *Klebsiella variicola*. *BMC Microbiology*, 15, 64. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0396-6>
110. Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics history. *Journal of clinical gastroenterology*, 50 (2), 116–119. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000697>
111. Geletiuik, O., Romanishina, T., & **Lakhman, A.** (2020). Sensitivity of bees' pathogenic bacteria to a sample of copper solution and silver citrate. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 22 (97), 106–111. <https://doi.org/10.32718/nvlvet9717>
112. Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS microbiology letters*, 155 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12678.x>
113. Glavinic, U., Stankovic, B., Draskovic, V., Stevanovic, J., Petrovic, T., Lakic, N., & Stanimirovic, Z. (2017). Dietary amino acid and vitamin complex protects honey bee from immunosuppression caused by *Nosema ceranae*. *PloS one*, 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187726>
114. 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182814>

115. Goossens, D., Jonkers, D., Russel, M., Stobberingh, E. E., Stockbrugger, R.W. (2006). The effect of a probiotic drink with *Lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition in faeces and mucosal biopsies of rectum and ascending colon. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 23, 255–263. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.02749.x>

116. Gram, H. C. (1884). Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medizin*, 2, 185–189. Retrieved from <https://www.scirp.org/%28S%28351jmbntvnsjt1aadkposzje%29%29/reference/referencespapers.aspx?referenceid=3042874>

117. Grundy, D. (2015). Principles and standards for reporting animal experiments in The Journal of Physiology and Experimental Physiology. *Experimental Physiology*, 100 (7), 755–758. <https://doi.org/10.1113/EP085299>

118. 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 In vitro Study. *Brazilian Dental Science*, 22 (3), 365–370. <https://doi.org/10.14295/bds.2019.v22i3.1731>

119. Harwood, G., Salmela, H., Freitag, 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). <https://doi.org/10.1242/jeb.231076>

120. He, T., Wang, Y., Sun, L., Pang, M., Zhang, L., & Wang, R. (2016). Occurrence and characterization of bla NDM-5-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates from dairy cows in Jiangsu, China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72 (1), 90–94. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw357>

121. Hendriksma, H. P., Härtel, S., & Steffan-Dewenter, I. (2011). Honey bee risk assessment: new approaches for in vitro larvae rearing and data analyses.

Methods in Ecology and Evolution, 2 (5), 509–517. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00099.x>

122. 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*, 6 (3-4), 23–30. Retrieved from <https://jmb.tums.ac.ir/index.php/jmb/article/view/332>

123. Hladun, K. R., Kaftanoglu, O., Parker, D. R., Tran, K. D., & Trumble, J. T. (2013). Effects of selenium on development, survival, and accumulation in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32 (11), 2584–2592. <https://doi.org/10.1002/etc.2357>

124. Hladun, K. R., Smith, B. H., Mustard, J. A., Morton, R. R., & Trumble, J. T. (2012). Selenium toxicity to honey bee (*Apis mellifera* L.) pollinators: effects on behaviors and survival. *PloS one*, 7 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034137>

125. Hormaeche, E., & Edwards, P. R. (1960). A proposed genus *Enterobacter*. *International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy*, 10 (2), 71–74. <https://doi.org/10.1099/0096266X-10-2-71>

126. Hussain, M. B. (2018). Role of honey in topical and systemic bacterial infections. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 24 (1), 15-24. <https://doi.org/10.1089/acm.2017.0017>

127. Jacques, A., Laurent, M., Epilobee Consortium, Ribière-Chabert, M., Saussac, M., Bougeard, S., Saussac, M., Bougeard, S., Budge, G. E., Hendrikx, P. & Chauzat, M. P. (2017). A pan-European epidemiological study reveals honey bee colony survival depends on beekeeper education and disease control. *PLoS one*, 12 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172591>

128. Jamal, Z. A., Abou-Shaara, H. F., Qamer, S., Alotaibi, M. A., Khan, K. A., Khan, M. F., Ansari, M. J. (2021). Future expansion of small hive beetles, *Aethina tumida*, towards North Africa and South Europe based on temperature

factors using maximum entropy algorithm. *Journal of King Saud University-Science*, 33 (1). <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101242>

129. James, R. R. (2011). Potential of ozone as a fumigant to control pests in honey bee (Hymenoptera: Apidae) hives. *Journal of Economic Entomology*, 104 (2), 353–359. <https://doi.org/10.1603/EC10385>

130. James, R. R., Ellis, J., & Duehl, A. J. (2013). The potential for using ozone to decrease pesticide residues in honey bee comb. *Agricultural Science*, 1 (1), 1–16. Retrieved from <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=69e47b4979204fdd34137f6090f182cf8130ca1f>

131. Jeon, H. L., Yang, S. J., Son, S. H., Kim, W. S., Lee, N. K., & Paik, H. D. (2018). Evaluation of probiotic *Bacillus subtilis* P229 isolated from cheonggukjang and its application in soybean fermentation. *LWT*, 97, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.054>

132. 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). Retrieved from <http://www.spasb.ro/index.php/spasb/article/view/2496>

133. Kešnerová, L., Emery, O., Troilo, M., Liberti, J., Erkosar, B., & Engel, P. (2020). Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer. *The ISME journal*, 14(3), 801-814. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0568-8>

134. Khalifehgholi, M., Shamsipour, F., Ajhdarkosh, H., Ebrahimi Daryani, N., Pourmand, M. R., Hosseini, M., Ghasemi, A., & Shirazi, M. H. (2013). Comparison of five diagnostic methods for *Helicobacter pylori*. *Iranian journal of microbiology*, 5 (4), 396–401. PMID: [25848511](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25848511/)

135. Kim, E., Seo, J., Yang, S. H., Kim, I. S., & Koo, Y. (2018). Intestine bacterial microbiota of Asian hornet (*Vespa velutina nigrithorax*) and honey bee. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 37 (2), 135-140. <https://doi.org/10.5338/KJEA.2018.37.2.18>
136. Kisil, D., & Fotina, T. (2018). Monitoring the epizootic situation on mixed infectious diseases in bees in Northern Eastern region of Ukraine. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 20 (83), 381–384. <https://doi.org/10.15421/nvlvet8375>
137. Kisterna, O. S., Galatiuk, O. Ye., Musiyenko, O. V. (2014). Significance of the assessment of the epizootological profile of honey bees of North-Eastern Ukraine. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 3 (60), 79–85
138. Koch, R. (2018). Die Ätiologie der Tuberkulose (1884). In *Robert Koch* (pp. 133–137). Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg. Retrieved from <https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/5163/428-445.pdf>
139. Korkmaz, H., Kesli, R., Karabagli, P., & Terzi, Y. (2013). Comparison of the diagnostic accuracy of five different stool antigen tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 18 (5), 384–391. <https://doi.org/10.1111/hel.12053>
140. Korzeniewska, E., & Harnisz, M. (2013). Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *Enterobacteriaceae* in municipal sewage and their emission to the environment. *Journal of environmental management*, 128, 904–911. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.06.051>
141. Kumar, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2012). *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological research*, 167 (8), 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.05.002>

142. Kunc, M., Dobeš, P., Hurychová, J., Vojtek, L., Poiani, S. B., Danihlík, J., Havlík, J., Titěra, D., Hyršl, P. (2019). The year of the honey bee (*Apis mellifera* L.) with respect to its physiology and immunity: a search for biochemical markers of longevity. *Insects*, 10 (8), 244. <https://doi.org/10.3390/insects10080244>

143. Lagier, J. C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., & Raoult, D. (2015). Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*, 28 (1), 208–236. <https://doi.org/10.1128/CMR.00110-14>

144. **Lakhman, A. (2021)**. Determination of the direction of action of «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES» against bee dysbacteriosis pathogens *in vitro*. *Naukovij visnik veterinarної medicini*, 2, 72-81. <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-168-2-72-81>

145. **Lakhman, A.**, Galatiuk, O., Romanishina, T., Behas, V. (2021a). Antagonistic effect of *Bacillus subtilis* isolated and identified from different honey species against *Klebsiella pneumoniae* bee pathogens. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*, 4 (3), 11-15. <https://doi.org/10.32718/ujvas4-3.08>

146. **Lakhman, A.**, Galatiuk, O., Romanishina, T., Behas, V. (2021b). 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. *Bulletin of Sumy National Agrarian University. The Series: Veterinary Medicine*, 3 (54), 39-47. <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.3.6>

147. **Lakhman, A.**, Galatiuk, O., Romanishina, T., Behas, V., & Zastulka, O. (2021c). Bees klebsiellosis: key aspects of pathogenesis. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 9 (8), 1190-1193. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.8.1190.1193>

148. **Lakhman, A.**, Galatiuk, O., Romanishina, T., & Behas, V. (2022a). Epizootic situation with contagious diseases of bees in the North-West regions of

Ukraine. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 24(106), 49-53. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10608>

149. **Lakhman, A.**, Galatiuk, O., Romanishina, T., & Behas, V. (2022b). Effect of «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES» on the biochemical parameters of bee haemolymph in an entomological cage experiment. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 24(107), 125-130. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10720>

150. **Lakhman, A.**, Galatiuk, O., Romanishina, T., Chirta-Sinelnyk, K., Behas, V., & Zilko, O. (2021d). Effect of «EM[®] PROBIOTIC FOR BEES» on the dynamics viability of bee in an entomological cage experiment. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 23 (103), 27-34. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10305>

151. Lam, M. M., Wick, R. R., Wyres, K. L., Gorrie, C. L., Judd, L. M., Jenney, A. W., Brisse, S., & Holt, K. E. (2018). Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. *Microbial genomics*, 4 (9). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000196>

152. Lan, H. C., Chen, T. S., Li, A. F. Y., Chang, F. Y., & Lin, H. C. (2012). Additional corpus biopsy enhances the detection of *Helicobacter pylori* infection in a background of gastritis with atrophy. *BMC gastroenterology*, 12 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-12-182>

153. Larsen, A., Reynaldi, F. J., & Guzmán-Novoa, E. (2019). Fundamentals 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>

154. Lau, L. Y. J., & Chye, F. Y. (2018). Antagonistic effects of *Lactobacillus plantarum* 0612 on the adhesion of selected foodborne

enteropathogens in various colonic environments. *Food Control*, 91, 237–247.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.001>

155. Leclercq, L., & Nardello-Rataj, V. (2020). How to improve the chemical disinfection of contaminated surfaces by viruses, bacteria and fungus?. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 155.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105559>

156. Lee, K. V., Steinhauer, N., Rennich, K., Wilson, M. E., Tarpy, D. R., Caron, D. M., Rose R, Delaplane, K. S., Baylis, K., Lengerich, E. J., Pettis, J., Skinner, J. A., Wilkes, J. T., Sagili, R., van Engelsdorp, D. (2015). A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA. *Apidologie*, 46, 292–305. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0356-z>

157. Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., & Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future microbiology*, 9 (9), 1071–1081.
<https://doi.org/10.2217/fmb.14.48>

158. Li, Y. S., & Church, J. S. (2014). Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials. *Journal of food and drug analysis*, 22 (1), 29–48. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.003>

159. Li, Z., Hou, M., Qiu, Y., Zhao, B., Nie, H., & Su, S. (2020). Changes in antioxidant enzymes activity and metabolomic profiles in the guts of honey bee (*Apis mellifera*) larvae infected with *ascosphaera apis*. *Insects*, 11 (7), 419.
<https://doi.org/10.3390/insects11070419>

160. Licón Luna, R. M. (2019). Heat and Ozone Use in Beekeeping Practices. *Bee World*, 96 (1), 19-23.
<https://doi.org/10.1080/0005772X.2018.1552492>

161. Lin, Q., Lim, J. Y., Xue, K., Yew, P. Y. M., Owh, C., Chee, P. L., & Loh, X. J. (2020). Sanitizing agents for virus inactivation and disinfection. *View*, 1 (2). <https://doi.org/10.1002/viw2.16>

162. Lindsay, D. S. J., Brown, A. W., Brown, D. J., Pravinkumar, S. J., Anderson, E., & Edwards, G. F. S. (2012). Legionella longbeachae serogroup 1 infections linked to potting compost. *Journal of medical microbiology*, 61 (2), 218–222. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.035857-0>

163. Łopieńska-Biernat, E., Sokół, R., Michalczyk, M., Żółtowska, K., & Stryński, R. (2017). Biochemical status of feral honey bees (*Apis mellifera*) infested with various pathogens. *Journal of Apicultural Research*, 56 (5), 606–615. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1343020>

164. 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. <https://doi.org/10.3390/s18051494>. PMID: 29747455. PMCID: PMC5981391.

165. Luna, V. A., Hall, T. J., King, D. S., & Cannons, A. C. (2010). Susceptibility of 169 USA300 methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates to two copper-based biocides, CuAL42 and CuWB50. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65 (5), 939-941. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq092>

166. Maeyama, Y., Taniguchi, Y., Hayashi, W., Ohsaki, Y., Osaka, S., Koide, S., Tamai, K., Nagano, Yu., Arakawa, Yo., Nagano, N. (2018). Prevalence of ESBL/AmpC genes and specific clones among the third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* from canine and feline clinical specimens in Japan. *Veterinary microbiology*, 216, 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.02.020>

167. Mainil, J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary immunology and immunopathology*, 152 (1-2), 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.032>

168. Malek, A., McGlynn, K., Taffner, S., Fine, L., Tesini, B., Wang, J., Mostafa, H., Petry, Sh., Perkins, A., Graman, P., Hardy, D., & Pecora, N. (2019). Next-generation-sequencing-based hospital outbreak investigation yields insight

into *Klebsiella aerogenes* population structure and determinants of carbapenem resistance and pathogenicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63 (6). <https://doi.org/10.1128/AAC.02577-18>

169. Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. A., Atherton, J., Axon, A. T., Bazzoli, F., Gensini, G. F., Gisbert, J. P., Graham, D. Y., Rokkas, T., El-Omar, E. M., Kuipers, E. J. European Helicobacter Study Group. (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/Florence consensus report. *Gut*, 61 (5), 646–664. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302084>

170. 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. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101599>

171. Manual for Laboratory Diagnosis of Anthrax. (2003). *World Health Organization. New Delhi: Regional Office for South-East Asia*, 58. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010125>

172. Mardaneh, J., & Dallal, M. M. (2013). Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Pantoea (Enterobacter)* agglomerans isolated from consumed powdered infant formula milk (PIF) in NICU ward: First report from Iran. *Iranian journal of microbiology*, 5 (3), 263–267. PMID: [24475334](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24475334/)

173. Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., & Maguire, D. (2013). Clinical veterinary microbiology e-book. *Elsevier Health Sciences*, 195–204. Retrieved from https://books.google.com.ua/books?hl=uk&lr=&id=FUJYAQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Clinical+veterinary+microbiology+e-book&ots=2fp_3nodTV&sig=kr5JL4TndoMUtsML8_YEePzX6sA&redir_esc=y#v=onepage&q=Clinical%20veterinary%20microbiology%20e-book&f=false

174. Marques, C., Belas, A., Aboim, C., Cavaco-Silva, P., Trigueiro, G., Gama, L. T., & Pomba, C. (2019). Evidence of sharing of *Klebsiella pneumoniae*

strains between healthy companion animals and cohabiting humans. *Journal of clinical microbiology*, 57 (6). <https://doi.org/10.1128/JCM.01537-18>

175. Marques, C., Menezes, J., Belas, A., Aboim, C., Cavaco-Silva, P., Trigueiro, G., Gama, L. T., Pomba, C. (2019). *Klebsiella pneumoniae* causing urinary tract infections in companion animals and humans: population structure, antimicrobial resistance and virulence genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74 (3), 594–602. <https://doi.org/10.1093/jac/dky499>

176. McAfee, A. (2020). Beekeeping With Bacteria. *American Bee Journal*, 16 (3), 1–3. Retrieved from https://www.uwo.ca/biology/faculty/thompson/McAfee-article_March2020_Jan23-810AM.pdf

177. Meng, X., Zhang, G., Cao, H., Yu, D., Fang, X., de Vos, W. M., & Wu, H. (2020). Gut dysbacteriosis and intestinal disease: mechanism and treatment. *Journal of applied microbiology*, 129 (4), 787–805. <https://doi.org/10.1111/jam.14661>

178. Migdał, P., Murawska, A., Bieńkowski, P., Strachecka, A., Roman, A. (2021). Effect of the electric field at 50 Hz and variable intensities on biochemical markers in the honey bee's hemolymph. *Plos one*, 16 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252858>

179. Milbrath, M. (2021). Honey Bee Bacterial Diseases. *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*, 277–293. <https://doi.org/10.1002/9781119583417.ch22>

180. Miró, E., Grünbaum, F., Gómez, L., Rivera, A., Mirelis, B., Coll, P., & Navarro, F. (2013). Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in *enterobacteriaceae* clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb. Drug Resist*, 19 (2), 94–99. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0125>

181. Mishra, M., Panda, S., Barik, S., Sarkar, A., Singh, D. V., & Mohapatra, H. (2020). Antibiotic resistance profile, outer membrane proteins, virulence factors and genome sequence analysis reveal clinical isolates of *Enterobacter* are potential pathogens compared to environmental isolates. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 54. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00054>

182. Mishra, M., Patole, S., Mohapatra, H. (2017). Draft genome sequences of nonclinical and clinical *Enterobacter cloacae* isolates exhibiting multiple antibiotic resistance and virulence factors. *Genome Announc*, 5 (45), 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01218-17>

183. Mnif, I., Hammami, I., Triki, M. A., Azabou, M. C., Ellouze-Chaabouni, S., & Ghribi, D. (2015). Antifungal efficiency of a lipopeptide biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* SPB1 versus the phytopathogenic fungus, *Fusarium solani*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 18137–18147. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5005-6>

184. Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., DeBoeck, G. and Mohanta, K.N. (2013). Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97, 405-430. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x>

185. Monteagudo-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*, 103 (16), 6463–6472. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09978-7>

186. Moore, T., Globa, L., Barbaree, J., Vodyanoy, V., & Sorokulova, I. (2013). Antagonistic activity of *Bacillus bacteria* against food-borne pathogens. *J. Prob. Health*, 1 (3), 110. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000110>

187. Moran, N. A. (2015). Genomics of the honey bee microbiome. *Current opinion in insect science*, 10, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.003>
188. Morawetz, L., Köglberger, H., Griesbacher, A., Derakhshifar, I., Crailsheim, K., Brodschneider, R., & Moosbeckhofer, R. (2019). Health status of honey bee colonies (*Apis mellifera*) and disease-related risk factors for colony losses in Austria. *PloS one*, 14 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219293>
189. 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. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060858>
190. Motta, E. V., Powell, J. E., Leonard, S. P., & Moran, N. A. (2022). Prospects for probiotics in social bees. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 377 (1853), 20210156. <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0156>
191. Motta, E., Moran, N. (2020). Impact of glyphosate on the honey bee gut microbiota: effects of intensity, duration, and timing of exposure. *mSystems* 5:e00268-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00268-20>
192. Munoz-Price, L. S., Poirel, L., Bonomo, R. A., Schwaber, M. J., Daikos, G. L., Cormican, M., Cornaglia, G., Garau, J., Gniadkowski, M., Hayden, M. K., Kumarasamy, K., Livermore, D. M., Maya, J. J., Nordmann, P., Patel, J. B., Paterson, D. L., Pitout, J., Villegas, M. V., Wang, H., Woodford, N., Quinn, J. P. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet. Infectious diseases*, 13 (9), 785–796. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7)
193. Murphy, C. N., Mortensen, M. S., Krogfelt, K. A., & Clegg, S. (2013). Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary

tract infections. *Infection and immunity*, 81 (8), 3009–3017.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00348-13>

194. 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*, 1819 (1) (pp. 012–062). IOP Publishing.
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1819/1/012062>

195. Nedashkivskiy, V., Hutsol, H. (2020). The effectiveness of using protein mixed feed in feeding honey bees. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*, 3 (1), 34-37. <https://doi.org/10.32718/ujvas3-1.06>

196. Negri, P., Maggi, M., Ramirez, L., Szawarski, N., De Feudis, L., Lamattina, L., & Eguaras, M. (2016). Cellular immunity in *Apis mellifera*: studying hemocytes brings light about bees skills to confront threats. *Apidologie*, 47 (3), 379–388. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0418-2>

197. Nevitov, M., Ostapchuk, A., Poluboyarinov, P., Gamayunov, A., Anipchenko, P., Stekolnikov, A., Plemyashov, K., Baymishev, K., Nikitin, G., Nechaev, A., Melekhova, I., Rybin, E., Nikitina, A. (2019). PSVI-33 Queen bees' artificial breeding using selenium compounds. *J Anim Sci. Suppl*, (3) 205, 6. <https://doi.org/10.1093/jas/skz258.423>

198. Nordmann, P., & Poirel, L. (2013). Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68 (3), 487–489. <https://doi.org/10.1093/jac/dks426>

199. Nordmann, P., Poirel, L., & Dortet, L. (2012). Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging infectious diseases*, 18 (9), 1503–1507. <https://doi.org/10.3201/eid1809.120355>

200. Nowak, A., Szczuka, D., Górczyńska, A., Motyl, I., & Kręgiel, D. (2021). Characterization of *Apis mellifera* gastrointestinal microbiota and lactic acid bacteria for honeybee protection — a review. *Cells*, 10(3), 701. <https://doi.org/10.3390/cells10030701>

201. Ogrodowczyk, 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>

202. Olaitan, P. B., Adeleke, O. E., & Iyabo, O. O. (2007). Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African health sciences*, 7 (3), 159–165. Retrieved from <https://www.ajol.info/index.php/ahs/article/view/7009>

203. Oliva, A., Mascellino, M. T., Cipolla, A., D'Abramo, A., De Rosa, A., Savinelli, S., RosaCiardi, M., Mastroianni, M. C. Vullo, V. (2015). Therapeutic strategy for pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* severe infections: short-course treatment with colistin increases the in vivo and in vitro activity of double carbapenem regimen. *International Journal of Infectious Diseases*, 33, 132–134. doi.org/10.1016/j.ijid.2015.01.011

204. Orčić, S., Nikolić, T., Purać, J., Šikoparija, B., Blagojević, D. P., Vukašinović, E., Plavša, N., Stevanović, J. & 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. <https://doi.org/10.1111/eea.12633>

205. Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80 (3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>

206. Pahlow, S., Meisel, S., Cialla-May, D., Weber, K., Rösch, P., & Popp, J. (2015). Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy. *Advanced drug delivery reviews*, 89, 105–120. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.04.006>

207. Pal, S., Tak, Y. K., Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the

gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 27, 1712–1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>

208. Palmer-Young, E. C., Tozkar, C. Ö., Schwarz, R. S., Chen, Y., Irwin, R. E., Adler, L. S., & Evans, J. D. (2017). Nectar and pollen phytochemicals stimulate honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) immunity to viral infection. *Journal of economic entomology*, 110 (5), 1959–1972. <https://doi.org/10.1093/jee/tox193>

209. Parichehreh, S., Tahmasbi, G., Sarafrazi, A., Imani, S., & Tajabadi, N. (2018). Isolation and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the gastrointestinal tract of the dwarf honey bee, *Apis florea Fabricius*, 1973 (*Hymenoptera: Apidae*). *Apidologie*, 49 (3), 430–438. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0569-z>

210. Passarelli-Araujo, H., Palmeiro, J. K., Moharana, K. C., Pedrosa-Silva, F., Dalla-Costa, L. M., & Venancio, T. M. (2019). Genomic analysis unveils important aspects of population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella aerogenes*. *The FEBS journal*, 286 (19), 3797–3810. <https://doi.org/10.1111/febs.15005>

211. Pătruică, S., Dumitrescu, G., Stancu, A., Bura, M., & Dunea, I. B. (2012). The effect of prebiotic and probiotic feed supplementation on the wax glands of worker bees (*Apis mellifera*). *Animal Sciences and Biotechnologies*, 45 (2), 267-271. Retrieved from https://www.usab-tm.ro/utilizatori/ZOOTEHNIE/file/simpozion%202012/Vol%201/FZB_vol2_2012_Editura/Tehnologies%20applied%20in%20animal%20husbandry/Apiculture/Patruica1.pdf

212. 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. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0022>

213. Pham, T. A. N., & Lawley, T. D. (2014). Emerging insights on intestinal dysbiosis during bacterial infections. *Current opinion in microbiology*, 17, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.12.002>

214. Pittalwala, I. (2012, April) *Selenium impacts honey bee behavior and survival*. ScienceDaily (p. 25). University of California. Riverside. Retrieved from <https://www.sciencedaily.com/releases/2012/04/120425140450.htm>

215. Piva, S., Giacometti, F., Marti, E., Massella, E., Cabbri, R., Galuppi, R., & Serraino, A. (2020). Could honey bees signal the spread of antimicrobial resistance in the environment? *Letters in applied microbiology*, 70 (5), 349–355. <https://doi.org/10.1111/lam.13288>

216. Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*, 11 (4), 589–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589>

217. Poon, C., & Patel, A. A. (2020). Organic and inorganic nanoparticle vaccines for prevention of infectious diseases. *Nano Express*, 1 (1), 1–12. <http://doi.org/10.1088/2632-959X/ab8075>

218. Porrini, C., Mutinelli, F., Bortolotti, L., Granato, A., Laurenson, L., Roberts, K., Gallina, A., Silvester, N., Medrzycki, P., Renzi, T., Sgolastra, F. & Lodesani, M. (2016). The status of honey bee health in Italy: Results from the nationwide bee monitoring network. *PloS one*, 11 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155411>

219. Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O. & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.*, 25 (6), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>

220. Prokesch, B. C., Tekippe, M., Kim, J., Raj, P., TeKippe, E. M., & Greenberg, D. E. (2016). Primary osteomyelitis caused by hypervirulent *Klebsiella*

pneumoniae. *The Lancet Infectious Diseases*, 16 (9), 190–195.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30021-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30021-4)

221. Ptaszyńska, A. A., Borsuk, G., Mułenko, W. & Wilk, J. (2016). Impact of vertebrate probiotics on honeybee yeast microbiota and on the course of nosemosis. *Med Weter*, 72 (7), 430–434. <https://doi.org/10.21521/mw.5534>

222. Ptaszyńska, A. A., Borsuk, G., Zdybicka-Barabas, A., Cytryńska, M., & Małek, W. (2016). Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee nosemosis C? *Parasitology research*, 115 (1), 397–406. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4761-z>

223. Qi, L., Li, H., Zhang, C., Liang, B., Li, J., Wang, L., Du Xi., Liu Xu., Qiu Sh., Song H. (2016). Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in acinetobacter baumannii. *Front. Microbiol*, 7, 483. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00483>

224. Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Hartigan, P., Fanning, S., & Fitzpatrick, E. (2011). Veterinary microbiology and microbial disease. *John Wiley & Sons*, 911 p. Retrieved from <https://books.google.com.ua/books?hl=uk&lr=&id=L3tQmr5YGXQC&oi=fnd&pg=PR10&dq=Veterinary+microbiology+and+microb>

225. Rai, M., Kon, K., Ingle, A., Duran, N., Galdiero, S., Galdiero, M. (2014). Broad spectrum bioactivities of silver nanoparticles: the emerging trends and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 1951–1961. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5473-x>

226. Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., De Smet, L., Wenseleers, T., Smaghe, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072443>

227. 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.
<https://doi.org/10.1007/s13592-018-0566-2>

228. Ripabelli, G., Tamburro, M., Guerrizio, G., Fanelli, I., Flocco, R., Scutellà, M., & Sammarco, M. L. (2018). Tracking multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from an Italian hospital: molecular epidemiology and surveillance by PFGE, RAPD and PCR-based resistance genes prevalence. *Current microbiology*, 75 (8), 977–987. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1475-3>

229. 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*, 6 (3): 900-902. Retrieved from <https://www.entomoljournal.com/archives/2018/vol6issue3/PartM/6-3-52-819.pdf>

230. Rivera-Gomis, J., Bubnic, J., Ribarits, A., Moosbeckhofer, R., Alber, O., Kozmus, P., Jannoni-Sebastianini, R., Haefeker, W., Köglberger, H., Smodis Skerl, M.I., Tiozzo, B., Pietropaoli, M., Lubroth, J., Raizman, E., Lietaer, C., Zilli, R., Eggenhoffner, R., Higes, M., Muz, M. N., D'Ascenzi, C., Riviere, M. P., Gregorc, A., Cazier, J., Hassler, E., Wilkes, J., Formato, G. (2020). Good farming practices in apiculture. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 38 (3), 879–890. <https://doi.org/10.20506/rst.38.3.3032>

231. Rodionova, K. O., & Paliy, A. P. (2016). The effectiveness of application ultraviolet radiation for the sanitation of production premises of meat processing enterprises. *Journal for veterinary medicine, biotechnology and biosafety*, 2 (4), 20–24. Retrieved from http://lib.osau.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/2764/1/Rodionova_JVMBBS_2016_issue%204%20%28Print%29.pdf

232. 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. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.03.057>

233. Romanishina, T., Guralaska, S., Kot, T., Furman, S., Pinsky, O., Feshchenko, D., Rybachuk, Z., Tkachenko, O., Zastulka, O., & Tushak, S. (2021). Immunostimulatory effect of disinfectant on bees. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 51 (3), 601-604. Retrieved from <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/tjvm/article/view/251369>

234. Romanishina, T., Lakhman, A., Galatyuk O. (2020). Investigation of antimicrobial action of copper citrate and silver citrate solution at enterobacteriosis in bees. *Science and Education a New Dimension. Natural and Technical Sciences*, VIII (28), 70–72. <https://doi.org/10.31174/SEND-NT2020-233VIII28-17>

235. Saffouri, G. B., Shields-Cutler, R. R., Chen, J., Yang, Y., Lekatz, H. R., Hale, V. L., Cho, M. J., Battaglioli, E. J., Bhattarai, Yo., Thompson, K. J., Kalari, K. K., Behera, G., Berry, J. C., Peters, S. A., Patel, R., Schuetz, A. N., Faith, J. J., Camilleri, M., Sonnenburg, J. L., Farrugia, G., Swann, J. R., Grover, M., Knights, D., Kashyap, P. C. (2019). Small intestinal microbial dysbiosis underlies symptoms associated with functional gastrointestinal disorders. *Nature communications*, 10 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09964-7>

236. Saleem, A., Dandigi, M. N., Kumar, K. V. (2012). Correlation-regression model for physico-chemical quality of groundwater in the South Indian city of Gulbarga. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 6 (9), 353–364. <https://doi.org/10.5897/AJEST12.047>

237. Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed research international*, 2314–6133. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>

238. Santo Pereira, 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*, 10 (6), 592-599. <https://doi.org/10.3855/jidc.6821>

239. Şapcaliu, A., Pavel, C., Savu, V., Căuia, E., Matei, M., & Rădoi, I. (2010). Biochemical and Cytological Investigations on Haemolymph of *Apis Mellifera* Carpathica Bee in Stressful Conditions. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies*, 67, 313-320 Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/228752294_Biochemical_and_Cytological_Investigations_on_Haemolymph_of_Apis_Mellifera_Carpathica_Bee_in_Stressful_Conditions/citations

240. 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. Retrieved from https://www.usab-tm.ro/vol9MV/135_vol9.pdf

241. 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. https://doi.org/10.15421/2021_51 Retrieved from <https://www.ujecology.com/articles/effect-of-various-amounts-of-sunflower-oil-in-feed-additives-on-breast-tissues-functional-condition-reproductivity-and-p.pdf>

242. Saranraj, P., Sivasakthi, S., & Feliciano, G. D. (2016). Pharmacology of Honey: A Review. *Advances in Biological Research*, 10 (4), 271-289. <https://doi.org/10.5829/idosi.abr.2016.10.4.104104> Retrieved from [https://www.idosi.org/abr/10\(4\)16/9.pdf](https://www.idosi.org/abr/10(4)16/9.pdf)

243. Selvaraj, S., Kelly, D. P., & Margulies, K. B. (2020). Implications of altered ketone metabolism and therapeutic ketosis in heart failure. *Circulation*, 141

(22), 1800–1812. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.045033>

Retrieved from [https://www.idosi.org/abr/10\(4\)16/9.pdf](https://www.idosi.org/abr/10(4)16/9.pdf)

244. Shanahan, F. (2013). The colonic microbiota in health and disease. *Current opinion in gastroenterology*, 29 (1), 49–54. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32835a3493>

245. 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139924>

246. Shin, S. H., Kim, S., Kim, J. Y., Lee, S., Um, Y., Oh, M. K., Kim, Y. R., Lee J. & Yang, K. S. (2012). Complete genome sequence of *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190. *Journal of Bacteriology*, 2373–2374 <https://doi.org/10.1128/JB.00028-12>

247. Shkromada, O., Dudchenko, Y., Necherya, T., & Abubakari Kavla, I. (2019). The research of disinfective properties of kontravir for disinfection of veterinary objects. *Bulletin of Sumy National Agrarian University. The Series: Veterinary Medicine*, 3 (46), 29-34. <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2019.3.4>

248. Šlapeta, J., Dowd, S. E., Alanazi, A. D., Westman, M. E., & Brown, G. K. (2015). Differences in the faecal microbiome of non-diarrhoeic clinically healthy dogs and cats associated with *Giardia duodenalis* infection: impact of hookworms and coccidia. *International journal for parasitology*, 45 (9–10), 585–594. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.04.001>

249. Sonnevend, Á., Ghazawi, A., Hashmey, R., Haidermota, A., Girgis, S., Alfaresi, M., Omar, M., Paterson, D., Zowawi H. M., Pál, T. (2017). Multihospital occurrence of pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 147 with an ISEcp1-directed blaOXA-181 insertion in the mgrB gene in the United Arab Emirates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61 (7). <https://doi.org/10.1128/AAC.00418-17>

250. Stavropoulou, E., Bezirtzoglou, E. (2020). Probiotics in medicine: a long debate. *Frontiers in Immunology*, 11 (2192), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02192>

251. Stecher, B., Maier, L., Hardt, W.-D. (2013). Blooming'in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 11 (4), 277-284. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2989>

252. Strachecka, A., Krauze, M., Olszewski, K., Borsuk, G., Paleolog, J., Merska, M., Chobotow, J., Bajda, M., Grzywnowicz, K. (2014) Unexpectedly strong effect of caffeine on the vitality of western honeybees (*Apis mellifera*). *Biochemistry*, 2, 79. DOI <https://doi.org/10.1134/S0006297914110066>

253. Strachecka, A., Olszewski, K., Krauze, M., Paleolog, J., Borsuk, G., Merska, M., Bajda, M., Chobotow, J. (2014). Coenzyme Q10 treatments influence the lifespan and key biochemical resistance systems in the honeybee, *Apis mellifera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 86, 165–179. <https://doi.org/10.1002/arch.21159>

254. Subramanyam, B., Sivaramakrishnan, G. N., Dusthacker, A., Nagamiah, S., & Kumar, V. (2012). Phage lysin as a substitute for antibiotics to detect *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples with the BACTEC MGIT 960 system. *Clinical microbiology and infection*, 18 (5), 497–501. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03601.x>

255. Suchodolski, J. S. (2016). Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *The Veterinary Journal*, 215, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.011>

256. Tapia-González, J. M., Alcazar-Oceguera, G., Macías-Macías, J. O., Contreras-Escareño, F., Tapia-Rivera, J. C., Petukhova, T., & Guzmán-Novoa, E. (2020). Ascospores in honey bees and its relationship to environmental factors in Jalisco, Mexico. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11 (2), 468–478. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i2.4926>

257. Tindall, B. J., Sutton, G. N., Garrity, G. M. (2017). *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67 (2), 502–504. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001572>

258. Tlak Gajger, 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*, 11 (9), 638. <https://doi.org/10.3390/insects11090638>

259. Toba Odeyemi, A., Oluyemi Adefemi, S., & Alaba Adebayo, A. (2013). Antimicrobial and proximate properties of some processed honey in Ado-Ekiti. *Int. J. of Aquatic Science*, 4 (1), 36–43. http://www.journal-aquaticscience.com/article_73514_55089fb1117273c86a8302fd575df81c.pdf

260. Tran, Q. H., Nguyenm, V. Q., Le, A. T. (2013). Silvernanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, 4, 1–13. <https://doi.org/10.1088/2043-6262/4/3/033001>

261. Traynor, K. S., Rennich, K., Forsgren, E., Rose, R., Pettis, J., Kunkel, G. (2016) Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. *Apidologie*, 47, 325–347. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0431-0>

262. Traynor, K. S., Tosi, S., Rennich, K., Steinhauer, N., Forsgren, E., Rose, R., Evans, J. D. (2021). Pesticides in honey bee colonies: Establishing a baseline for real world exposure over seven years in the USA. *Environmental Pollution*, 279. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116566>

263. Tuo, Y., Yu, H., Ai, L., Wu, Z., Guo, B., & Chen, W. (2013). Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of dairy science*, 96, 4252–4257. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6547>
264. 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. <https://doi.org/10.15421/nvlvet8312>
265. Tyl, J., Vinšová, H., Mestek, O., Kaňa, A., Tittl, K., Titěra, D., & Kamler, M. (2015). Use of iodophor disinfection in honeybee practice. *Veterinářství*, 65 (6), 458–462. Retrieved from <https://docplayer.cz/36954341-Laboratorni-a-klinicka-diagnostika.html>
266. Ullah, A., Gajger, I. T., Majoros, A., Dar, S. A., & Khan, S. (2021). Viral impacts on honey bee populations: a review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28 (1), 523. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.037>
267. Van Steenkiste, D. (1988). De hemocyten van de honingbij (*Apis mellifera* L.): typologie, bloedbeeld en cellulaire verdedigingsreacties (Doctoral dissertation, Ghent University).
268. Velayos, B., Fernández-Salazar, L., Pons-Renedo, F., Muñoz, M. F., Almaraz, A., Aller, R., Ruíz, L., Olmo, D. L., Gisbert, J. P. & González-Hernández, J. M. (2012). Accuracy of urea breath test performed immediately after emergency endoscopy in peptic ulcer bleeding. *Digestive diseases and sciences*, 57 (7), 1880–1886. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2096-5>
269. Walker, K. A., Treat, L. P., Sepúlveda, V. E., & Miller, V. L. (2020). The small protein RmpD drives hypermucoviscosity in *Klebsiella pneumoniae*. *Mbio*, 11 (5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01750-20>
270. 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. *Frontiers in microbiology* 7, 244. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00244>

271. Wang, Y. K., Kuo, F. C., Liu, C. J., Wu, M. C., Shih, H. Y., Wang, S. S., Wu, J.-Yi., Kuo, Ch.-H., Huang, Ya.-K., Wu, D. C. (2015). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21 (40), 11221–11235. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11221>

272. Ward, L. J., Brown, J. C., & Davey, G. P. (1994). Application of the ligase chain reaction to the detection of nisin A and nisin Z genes in *Lactococcus lactis ssp. lactis*. *FEMS Microbiol. letters*, 117 (1), 29–33. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06738.x>

273. Wu, M., Sugimura, Y., Iwata, K., Takaya, N., Takamatsu, D., Kobayashi, M., Taylor, D., Kimura, K., Yoshiyama, M. (2014). Inhibitory effect of gut bacteria from the Japanese honey bee, *Apis cerana japonica*, against *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood disease. *Journal of Insect Science*, 14 (1), 129. <https://doi.org/10.1093/jis/14.1.129>

274. Wyres, K. L., Wick, R. R., Gorrie, C., Jenney, A., Follador, R., Thomson, N. R., & Holt, K. E. (2016). Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microbial genomics*, 2 (12). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000102>

275. Xu, M., Li, A., Kong, H., Zhang, W., Chen, H., Fu, Y., & Fu, Y. (2018). Endogenous endophthalmitis caused by a multidrug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain belonging to a novel single locus variant of ST23: first case report in China. *BMC infectious diseases*, 18 (1), 669. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3109-6>

276. Yang, T., Santisteban, M. M., Rodriguez, V., Li, E., Ahmari, N., Carvajal, J.M., Zadeh, M., Gong, M., Qi, Y., Zubcevic, J., Sahay, B., Pepine, C. J., Raizada, M. K., Mohamadzadeh, M. (2015). Gut dysbiosis is linked to

hypertension. *Hypertension*, 65 (6), 1331-1340.

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05315>

277. Yang, S., Zhao, H., Deng, Y., Deng, S., Wang, X., Diao, Q., & Hou, C. (2020). A reverse genetics system for the Israeli acute paralysis virus and chronic bee paralysis virus. *International journal of molecular sciences*, 21 (5), 1742. <https://doi.org/10.3390/ijms21051742>

278. Yang, T., Santisteban, M. M., Rodriguez, V., Li, E., Ahmari, N., Carvajal, J. M., Zadeh, M., Gong, M., Qi, Y., Zubcevic, J., Sahay, B., Pepine, C. J., Raizada, M. K, & Mohamadzadeh, M. (2015). Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension*, 65 (6), 1331-1340.

<https://doi.org/10.1161/Hypertensionaha.115.05315>

279. Yang, X., Wai-Chi Chan, E., Zhang, R., & Chen, S. (2019). A conjugative plasmid that augments virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Microbiology*, 4 (12), 2039–2043. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0566-7>

280. Yevropeyska konventsija 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

281. Youngster, I., Russell, G. H., Pindar, C., Ziv-Baran, T., Sauk, J., & Hohmann, E. L. (2014). Oral, capsulized, frozen fecal microbiota transplantation for relapsing *Clostridium difficile* infection. *Jama*, 312 (17), 1772–1778. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.13875>

282. Zahoor, A., Lindner, S. N., Wendisch, V. F. (2012). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* aimed at alternative carbon sources and new products. *Computational and structural biotechnology journal*, 3 (4). <https://doi.org/10.5936/csbj.201210004>

283. Zakon Ukrainy: 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>

284. Zasada, A. A. (2020). Detection and identification of *Bacillus anthracis*: From conventional to molecular microbiology methods. *Microorganisms*, 8 (1), 125. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010125>

285. Zhao, Li. B., Liu, Y., Chen, Z., & Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future microbiology*, 9 (9), 1071–1081. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.48>

286. Zhou, S., Song, D., Zhou, X., Mao, X., Zhou, X., Wang, S., Weia, J., Huang, Y., Wang, W., Xiao, S.M., Qin, Q. (2019). Characterization of *Bacillus subtilis* from gastrointestinal tract of hybrid *Hulong grouper* (*Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*) and its effects as probiotic additives. *Fish & shellfish immunology*, 84, 1115–1124. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.058>

287. Zhu, X., Xu, T., Lin, Q., & Duan, Y. (2014). Technical development of Raman spectroscopy: from instrumental to advanced combined technologies. *Applied Spectroscopy Reviews*, 49 (1), 64–82. <https://doi.org/10.1080/05704928.2013.798801>

288. Zulkhairi Amin, F. A., Sabri, S., Ismail, M., Chan, K. W., Ismail, N., Mohd Esa, N., Mohd Lila, M. A., Zawawi, N. (2020). Probiotic Properties of *Bacillus* Strains Isolated from Stingless Bee (*Heterotrigona itama*) Honey Collected across Malaysia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17 (1), 278. <https://doi.org/10.3390/ijerph17010278>

ДОДАТКИ

Додаток А



(11) 143401

(19) UA

(51) МПК (2020.01)
С12N 1/00

(21) Номер заявки: **u 2020 01274**

(22) Дата подання заявки: **28.02.2020**

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **27.07.2020**

(46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: **27.07.2020, Бюл. № 14**

(72) Винахідники:
Галатюк Олександр Євстафійович, UA,
Лахман Анастасія Русланівна, UA,
Романишина Тетяна Олександрівна, UA,
Застулка Ольга Олександрівна, UA

(73) Власники:
Галатюк Олександр Євстафійович,
вул. Домбровського, 58-а, кв. 4, м. Житомир, 10029, UA,
Лахман Анастасія Русланівна,
вул. Шевченка, 37, кв. 31, м. Житомир, 10008, UA,
Романишина Тетяна Олександрівна,
вул. Вітрука, 12, кв. 23, м. Житомир, 10024, UA,
Застулка Ольга Олександрівна,
вул. Домбровського, 58-а, кв. 4, м. Житомир, 10029, UA

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ЕНТЕРОБАКТЕРІЙ БДЖІЛ ДО ПРОБІОТИКІВ ТА ДЕЗІНФЕКТАНТІВ МЕТОДОМ КІРБІ-БАУЕРА

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб визначення чутливості ентеробактерій бджіл до пробіотиків та дезінфектантів для адресованого діагностики та профілактики кворум бджіл, при якому застосовують диско-дифузійний метод Кірбі-Бауера для визначення напрямку та активності дії препарату.

Додаток Б



(11) 143166

(19) UA

(51) МПК (2020.01)
C12N 1/00

(21) Номер заявки: u 2020 01272
 (22) Дата подання заявки: 26.02.2020
 (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.07.2020
 (46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: 10.07.2020, Бюл. № 13

(72) Винахідники:
 Галатюк Олександр Євстафійович, UA,
 Лахман Анастасія Русланівна, UA,
 Романишина Тетяна Олександрівна, UA

(73) Власники:
 Галатюк Олександр Євстафійович,
 вул. Домбровського, 58-а, кв. 4, м. Житомир, 10029, UA,
 Лахман Анастасія Русланівна,
 вул. Шевченка, 37, кв. 31, м. Житомир, 10008, UA,
 Романишина Тетяна Олександрівна,
 вул. Вітрука, 12, кв. 23, м. Житомир, 10024, UA

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ БІДЖОЛІННИХ ЕНТЕРОБАКТЕРІЙ ВІДВІВ KLEBSIELLA PNEUMONIAE ТА ENTEROBACTER AEROGENES (KLEBSIELLA AEROGENES)

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб визначення штамів ентеробактерій видів Klebsiella pneumoniae та Enterobacter aerogenes (Klebsiella aerogenes), які викликають розлади шлунково-кишкового тракту у бджіл, що включає виділення ентеробактерій, їх ідентифікацію, валідацію їх властивостей - культурально-морфологічно-тиктаріальних, біохімічних, який відрізняється тим, що дані штами визначають шляхом біохімічного титрування гумової медицини, виділені у чисті культури.

Додаток В



(11) 143400

(19) UA

(51) МПК (2020.01)
A01K 49/00
A61K 35741 (2015.01)

(21) Номер заявки: u 2020 01273
 (22) Дата подання заявки: 26.02.2020
 (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.07.2020
 (46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: 27.07.2020, Бюл. № 14

(72) Винахідники:
 Галатюк Олександр Євстафійович, UA,
 Лахман Анастасія Русланівна, UA,
 Романишина Тетяна Олександрівна, UA
 (73) Власники:
 Галатюк Олександр Євстафійович,
 вул. Домбровського, 58-а, кв. 4, м. Житомир, 10029, UA,
 Лахман Анастасія Русланівна,
 вул. Шевченка, 37, кв. 31, м. Житомир, 10008, UA,
 Романишина Тетяна Олександрівна,
 вул. Вітрука, 12, кв. 23, м. Житомир, 10024, UA

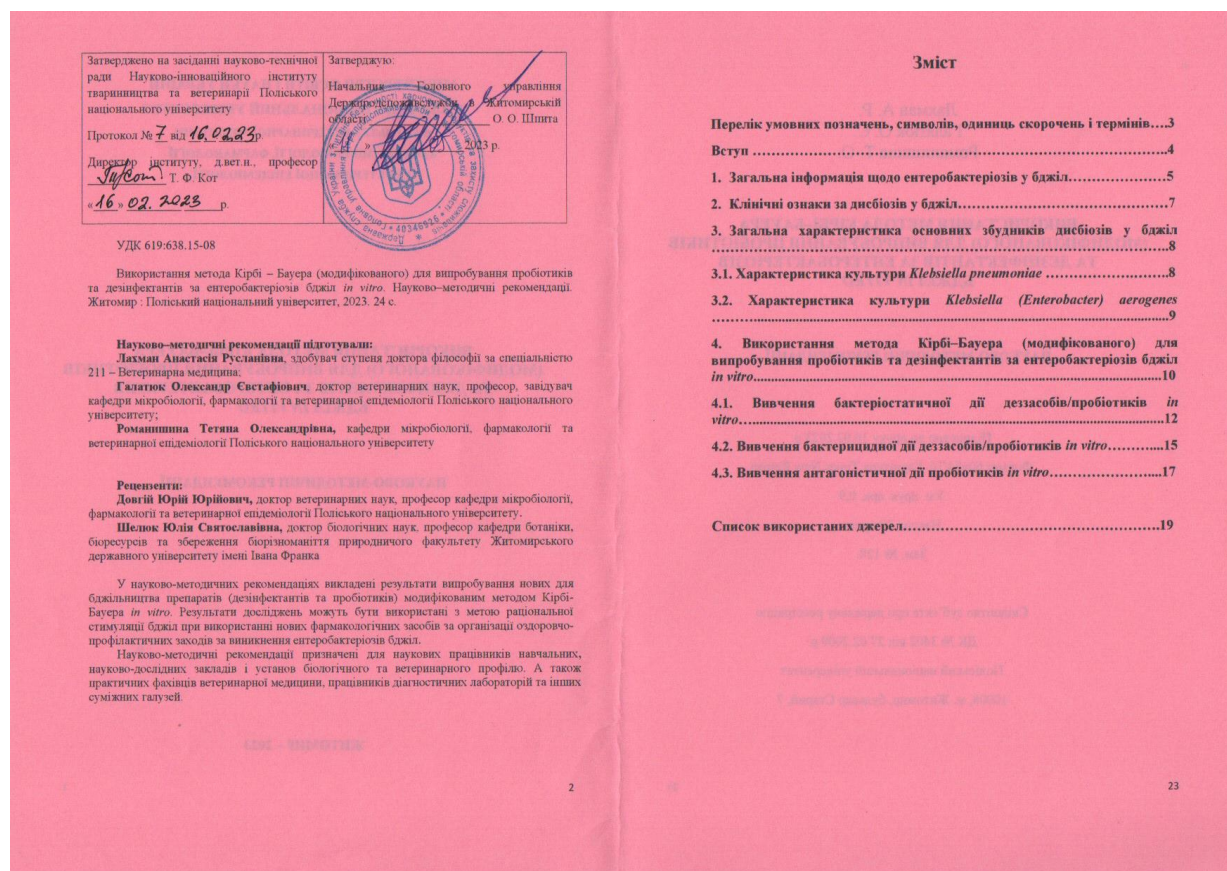
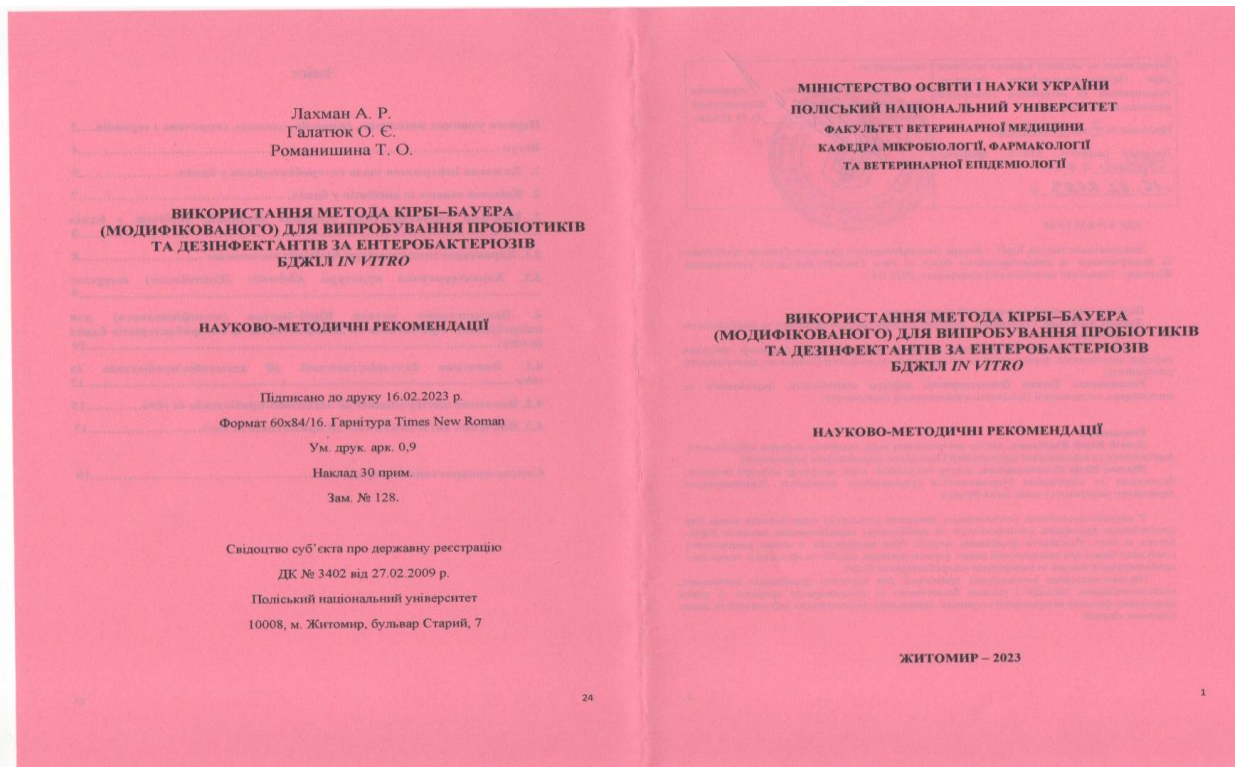
(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ ПРЕПАРАТУ ЕНТЕРОНОРМІН З ЙОДС+Se НА МЕДОВІЙ СИТІ З ЛІСОВОГО РІЗНОТРАВ'Я ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ У БДЖІЛЬНИЦТВІ

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб приготування препарату для застосування у бджільництві, що включає розведення пробіотику з цукрами, який відрізняється тим, що як цукри використовують розчин медової ситі з лісового різнотрав'я, а як пробіотик використовують Ентеронормін з Йодс+Se, який розводять з 50 %-ним розчином медової ситі.

Додаток Г



Додаток Д

ДОГОВІР № 19-04
про розробку і передачу науково-технічної продукції

м. Кропивницький «19» квітня 2021 р.

Товариство з обмеженою відповідальністю «ЕМ-УКРАЇНА», що є платником податку на прибуток на загальних підставах згідно ПКУ, в особі директора **Чирти-Сивелик Катерини Олександрівни**, що діє на підставі Статуту, іменований надалі "Замовник", з однієї сторони і **Поліський національний університет**, що є неприбутковою установою, в особі ректора **Скидана Олега Васильовича**, що діє на підставі Статуту, іменований надалі "Виконавець" з іншої сторони, уклали даний Договір про нижче наведене:

1. Предмет договору

1.1. "Замовник" доручає, а "Виконавець" приймає на себе зобов'язання по розробці (передачі) науково-технічної продукції (НТП) на тему: «**Вплив різних концентрацій «ЕМ» ПРОБІОТИКА для БДЖЛ, розведених цукровим сиропом та медовою ситюю на морфологічні показники гемолімфи бджіл»**».

1.2. Наукові, технічні й інші вимоги до НТП викладені в "Замовленні-замованні" (додаток № 3) на загальну суму з урахуванням ПДВ 20 000,00 (**двадцять тисяч**) грн. згідно калькуляції кошторисної вартості (додаток № 4).

2. Порядок розрахунків і вартість робіт

2.1. "Замовник" здійснює оплату робіт "Виконавцю", шляхом перерахування коштів на рекстраційний рахунок "Виконавця".

2.2. Загальна вартість даного Договору з урахуванням ПДВ становить **20000,00 (двадцять тисяч) грн.**

2.3. Розрахунок здійснюється "Замовником" протягом 10 днів з моменту підписання акту прийому-передачі виконаних робіт (етапу).

3. Зобов'язання сторін

3.1. "Замовник" надає "Виконавцю" інформацію, необхідну для виконання визначених етапів теми.

3.2. "Виконавець" зобов'язується провести дослідження протягом наступного терміну: **19 квітня 2021 р. - 17 травня 2021 р.**

3.3. "Виконавець" по завершенню робіт представляє "Замовникові" звіт про проведені дослідження з підписаним актом прийому-передачі виконаних робіт.

3.4. Після підписання договору протягом 5 днів "Замовник" перераховує "Виконавцю" 20% від суми договору.

3.5. "Замовник" зобов'язаний оплатити роботу "Виконавцю" відповідно до розділу 2 даного Договору.

3.6. Результати досліджень звіту мають бути конфіденційними та не розголошуватись, але можуть бути висвітлені в наукових публікаціях та дисертаційних роботах кафедри мікробіології, фармакології та епізоотології Поліського національного університету після узгодження із "Замовником" та "Виконавцем".

4. Відповідальність сторін

4.1. За невиконання або неналежне виконання умов даного Договору сторони несуть відповідальність, передбачену чинним законодавством України.

4.2. За порушення строків оплати "Замовник" сплачує на користь "Виконавця" пеню 0,1% від невичасно сплаченої суми за кожний день прострочення, а за прострочення понад 30 днів додатково стягується штраф у розмірі семи відсотків від невичасно сплаченої суми.

4.3. Сторони звільняються від відповідальності за невиконання зобов'язань за цим Договором у випадку обставин, які прямо або косвенно викликають неможливість сторони здійснити умови даного Договору. Такими обставинами визнаються: стихійні лиха, введення надзвичайного стану, закону або іншого нормативного акту законодавчої або виконавчої влади й інших органів, а також судових рішень, які в сутності обмежують або забороняють однієї зі сторін даного Договору здійснити дії, спрямовані на виконання або припинення цивільно-правових, фінансово-правових, господарських й інших прав й обов'язків.

5.1. Усі спори сторони регулюються шляхом переговорів. Якщо сторони не прийшли до згоди, спір вирішується відповідно до діючого законодавства України в Господарському суді.

6. Інші умови

6.1. Даний Договір може бути змінений, доповнений за письмовою згодою сторін.

6.2. Даний Договір набуває чинності з моменту його підписання й діє до **31 грудня 2021 р.**, а в частині оплати робіт – до повного здійснення розрахунків.

6.3. Даний Договір складений у двох екземплярах, що мають рівну юридичну чинність, по одному для "Замовника" й "Виконавця".

6.4. До цього договору додаються:
- протокол узгодження ціни (додаток №1)
- замовлення-замовання (додаток №3)
- калькуляція кошторисної вартості НТП (додаток №4)

6.5. "Замовник" та "Виконавець" повністю розуміють, що вся надана інформація в процесі виконання умов даного Договору про представників Сторін, є персональними даними, які використовуються для ідентифікації таких представників та/або зв'язку з ними/ними, та погоджуються з тим, що такі дані зберігаються у Сторін для подальшого використання відповідно до низки статей Господарського та Цивільного кодексів України та для реалізації ділових відносин між сторонами. Персональні дані представників захищаються Конституцією України та Законом України «Про захист персональних даних» № 2297-VI від 01.06.2010 р. Права представників регламентуються ст.8 ЗУ «Про захист персональних даних». Підписи Сторін на цьому документі означають однозначну згоду з вищевикладеним і підтвердженням того, що представники ознайомлені зі змістом ст.8 ЗУ «Про захист персональних даних».

7. Юридичні адреси та реквізити сторін

ЗАМОВНИК	Виконавець
ТОВ «ЕМ-УКРАЇНА»	Поліський національний університет
25015, м. Кропивницький, Студентський Бульвар, 7 оф.3	10008, м. Житомир, бульвар Старий, 7
Код ЄДРПОУ 43062903 UA 283235830000026001052924378 Кропиворядське РУ КБ «ПРИВАТБАНК»	тел. (0412) 22-14-02, бух.(0412) 22-15-04 Код ЄДРПОУ 00493681 UA558201720313261003202000272
+38 (0522) 322-773 +38 (067) 010-59-59 +38 (050) 056-04-76	в ДКСУ у м. Києві МФЄ 820172 E-mail: znau.dilovod@i.ua
E-mail: ukraincem@gmail.com embio.in.ua for-embio.ua	
Директор ТОВ «ЕМ-УКРАЇНА» Чирта-Сивелик К.О.	Ректор Поліського національного університету Скидана О.В.

УДК: 619.638.15-08

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ПОЛІСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
10007, м. Житомир, Старий бульвар, 7

«ПОГОДЖЕНО» «ЗАТВЕРДЖЕНО»
Проректор з наукової роботи та
науково-технічного розвитку
Поліського національного університету
Д. Романчук

Звіт про науково-дослідну роботу
«**Вплив різних концентрацій «ЕМ» ПРОБІОТИКА для БДЖЛ, розведених цукровим сиропом та медовою ситюю на морфологічні показники гемолімфи бджіл»**»

Керівник науково-дослідної роботи
Доктор вет. наук, професор
О. С. Галатюк

Результати роботи розглянуто на засіданні вченої ради факультету ветеринарної медицини Поліського національного університету, протокол № 6 від 13 квітня 2021 року.

Житомир 2021

СПИСОК ВИКОНАВЦІВ

Керівник:
доктор ветеринарних наук, професор
О. С. Галатюк

Виконавці:
кандидат ветеринарних наук, доцент
Т. О. Романишина

аспірантка кафедри мікробіології, фармакології та епізоотології
А. Р. Лахман

Додаток Е

Погоджено	Затверджую:
Проректор з наукової роботи та інноваційного розвитку Поліського національного університету	Директор ТОВ «ЕМ-Україна»
Романчук Л.Д.	Чирта-Сісельник К.О.
7 вересня 2020 року	

-Акт
випробування/впровадження результатів застосування
препарату «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖЛ» (виробника
ТОВ «ЕМ-Україна», м. Кропивницький, с. Соколівське)

Ми, завідувач кафедри мікробіології, фармакології та епізоотології Поліського національного університету доктор ветеринарних наук, професор, голова ГО «Клуб професійних пасічників Житомирщини» Галатюк О.Є., кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри Романишина Т.О., аспірант кафедри Лахман А.Р., пасічник та приватний підприємець Застулка М.В. (ФОП Застулка, м.Житомир, с. Вереси, вул. Гоголя 4В), представник ТОВ «ЕМ-Україна», Проданова Анна Федорівна - технолог, склали даний акт про те, що з 15 травня 2020 року по 11 серпня 2020 року на пасіці з 30 бджолиних сімей був проведений експеримент по випробуванню «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖЛ», дата виробництва препарату - 13 травня 2020 року. Для вивчення ефективності даного пробіотика було відібрано для контролю 6 сильніших сімей, які станом на 15.05. 2020 року займали по 12±2 вуличок бджіл (№ 6, 9, 15, 16, 17, 20). Решту – 24 бджолині сім'ї, які займали по 8±1 вуличок бджіл розділили на три дослідні групи по 8 сімей у кожній.

Для першої дослідної групи застосовували для підгодовів цукровий сироп у співвідношенні 2 частини цукру і 1 частина води. На 1 літру такого сиропу добавляли 50 мл пробіотика, розмішували і по 330 мл розливали у целофанові пакети та розмішували зверху на рамки в центрі розплідного гнізда. Препарат згодували бджолам 4 рази з інтервалом 3 доби.

Для другої дослідної групи застосовували для підгодовів цукровий сироп у співвідношенні 1 частина цукру і 1 частина води. На 1 літру такого сиропу добавляли 100 грам (10%) натурального меду і 50 мл пробіотика, розмішували і по 330 мл розливали у целофанові пакети та розмішували зверху на рамки в центрі розплідного гнізда. Препарат згодували бджолам 4 рази з інтервалом 3 доби.

Для третьої – 8 бджолиних сімей та четвертої – 6 бджолиних сімей дослідних (контрольних груп) вивчасний препарат не застосовували.

Станом на 16 червня 2020 року четверта контрольна група сімей займала 16±2 вуличок бджіл і принесла в середньому на кожну сім'ю по 4,5±0,5 кг меду. Третя контрольна група сімей займала 10±1 і вуличок бджіл і не принесла меду

взагалі. В першій дослідній групі сила сімей становила 14,5±1,5 вуличок бджіл і вони принесли в середньому на кожну сім'ю по 3,5±0,5 кг меду. В другій дослідній групі сила сімей становила 15,5±1,5 вуличок бджіл і принесла в середньому на кожну сім'ю по 4,5±0,5 кг меду.

Станом на 18 липня 2020 року четверта контрольна група сімей займала 16±2 вуличок бджіл і принесла в середньому на кожну сім'ю по 11,5±0,5 кг меду. Третя контрольна група сімей займала 12±1,5 і вуличок бджіл і принесла меду в середньому на кожну сім'ю по 3,5±0,5 кг меду. В першій дослідній групі сила сімей становила 17,5±2,0 вуличок бджіл і вони принесли в середньому на кожну сім'ю по 12,5±0,5 кг меду. В другій дослідній групі сила сімей становила 17,7±1,5 вуличок бджіл і принесла в середньому на кожну сім'ю по 13,3±0,5 кг меду.



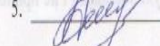
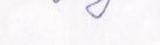
Станом на 10 серпня 2020 року четверта контрольна група сімей займала 15±2 вуличок бджіл і принесла в середньому на кожну сім'ю по 12,5±0,5 кг меду. Третя контрольна група сімей займала 12±3 і вуличок бджіл і принесла меду в середньому на кожну сім'ю по 8,5±0,5 кг меду. В першій дослідній групі сила сімей становила 19,5±2,5 вуличок бджіл і вони принесли в середньому на кожну сім'ю по 14,5±0,5 кг меду. В другій дослідній групі сила сімей становила 19,5±1,5 вуличок бджіл і принесла в середньому на кожну сім'ю по 15,8±0,5 кг меду.

Вивчення ефективності застосування «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖЛ», засвідчило, що згодовування даного препарату не зумовлювало негативного впливу на стан бджолиних сімей. Навпаки, краще починають працювати матки і препарат сприяє зростанню сили бджолиної сім'ї, внаслідок чого збільшуються мездозбір. Через 45 днів після застосування препарату сила сімей в першій та другій дослідних групах зросла на 1,5 вулички в порівнянні із сильними сім'ями та на 5,5 вуличок перевершувала слабкі бджолині сім'ї, які препарату не отримали. Відповідно дослідні бджолині сім'ї принесли на 1-1,8 кг меду більше ніж сильні сім'ї та на 9-9,8 кг меду ніж слабкі сім'ї. Аналогічна тенденція встановлена і через 70 днів після застосування препарату. Продуктивність дослідних сімей була на 2-3,3 кг вищою в порівнянні із сильними сім'ями та 6-7,3 кг в порівнянні із слабкими сім'ями.


Таким чином препарат «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖЛ» у весняний та осінній періоди доцільно застосовувати із цукровим сиропом 2:1, а в літній період із цукровим сиропом 1:1 із вмістом 10% натурального меду, щоб не знижувати якість товарного меду. У дані цукрові сиропи доцільно добавляти 5% препарату «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖЛ» і згодовувати 3-4 рази з інтервалом 3 доби.

Акт складено у 4-х примірниках.

Підписи:

1.  Галатюк О.С.
2.  Романишина Т.О.
3.  Лахман А.Р.
4.  Застулка М.В.
5.  Проданова А.Ф.

Додаток Є



Затверджую:
 Приклад з наукової роботи та
 впровадження розвитку Поліського
 національного університету

 А. Д. Романчук
 23 06 2021

Акт

**випробування/впровадження результатів застосування
 препарату «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖЛ» (виробника ТОВ «ЕМ
 Україна», м. Кропивницький, с. Соколівське)**

Ми, завідувач кафедрою мікробіології, фармакології та епізоотології Поліського національного університету доктор ветеринарних наук, професор, голова ГО «Клуб професійних пасічників Житомирщини» Галатюк О.Є., кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри Романишина Т.О., аспірант кафедри Лахман А.Р., пасічник Матвієнко Станіслав Євгенійович (ОП Коростишівського району Житомирської області, с. Продубіївка, вул. Весняна, 53), склали даний акт про те, що з 10 квітня 2021 року по 30 квітня 2021 року на пасіці на 20 слабких бджолиних сім'ях, з ознаками дисбіозів (ентеробактеріозів), був поставлений експеримент по випробуванню «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖЛ», виготовленого 13 травня 2020 року.

Дослідним бджолам застосовували для підгодівлі цукровий сироп у співвідношенні 2 частини цукру і 1 частина води. На 1 літр такого сиропу додавали 25 мл «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖЛ», розмішували, розливали у пакети для харчових продуктів по 350 мл, розміщали зверху на рамки в центрі розплідного гнізда. Препарат згодували бджолам 3 рази з інтервалом 7 діб.

Через 30 днів після застосування препарату різко збільшилась кількість бджолосімей, вони догнали у рості основні сім'ї, продуктивність їх зросла на 20-30%.

Результат дії препарату проявлявся на покращенні роботи маток, розплід був без пропусків, що сприяло підвищенню продуктивності меду.

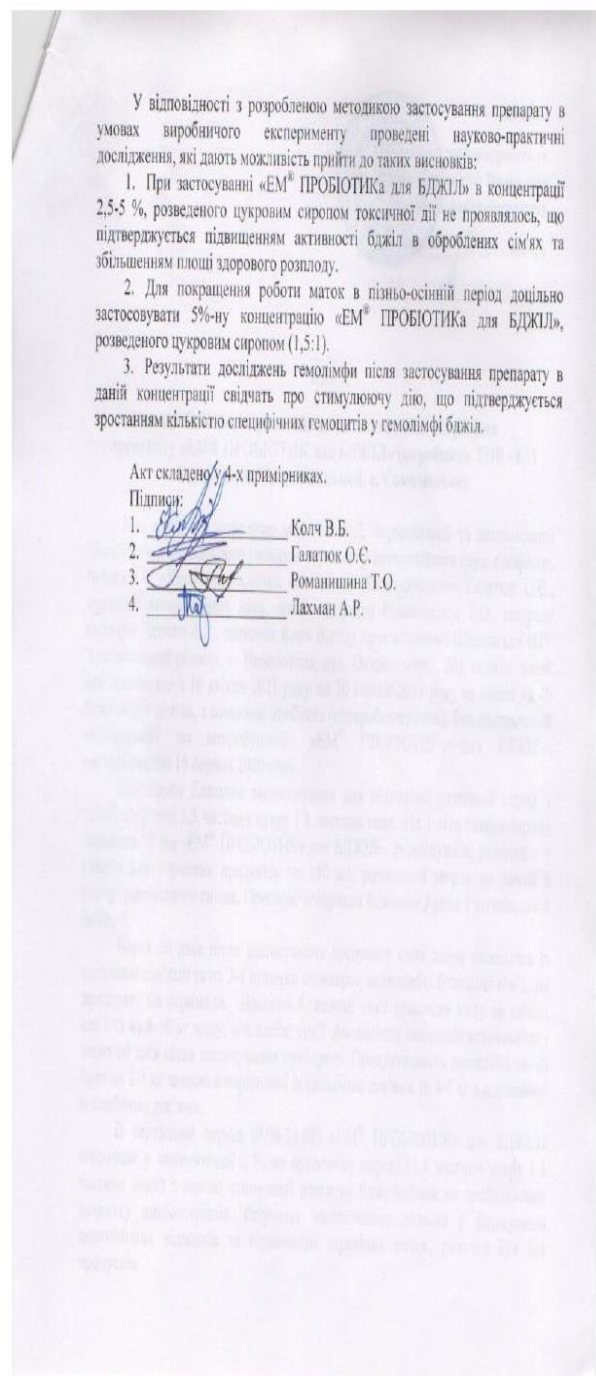
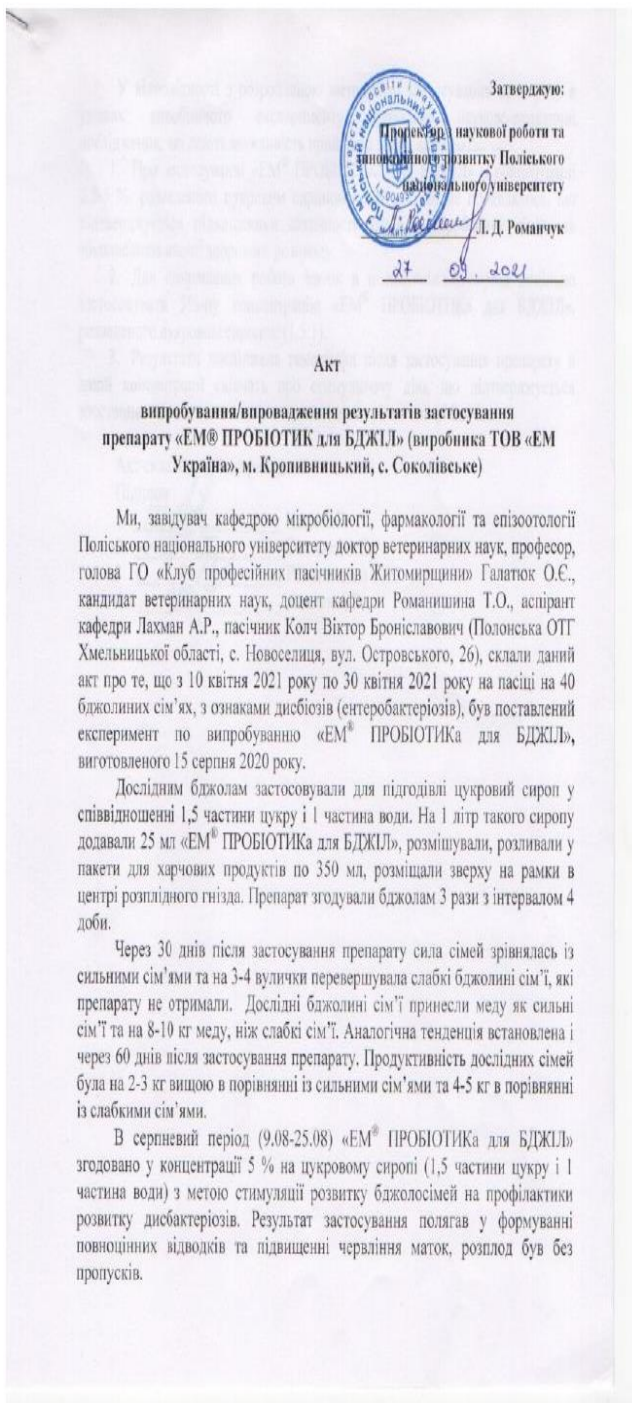
У відповідності з розробленою методикою застосування препарату в умовах виробничого експерименту проведені науково-практичні дослідження, які дають можливість прийти до таких висновків:

1. При застосуванні «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖЛ» в концентрації 2,5%, розведеного цукровим сиропом токсичної дії не проявлялось, що підтверджується підвищенням активності бджіл в оброблених сім'ях та збільшенням площі здорового розплоду.

2. Результати досліджень гемоліфи після застосування препарату в даній концентрації свідчать про стимулюючу дію, що підтверджується зростанням кількості специфічних гемоцитів у гемоліфі бджіл.


Акт складено у 4-х примірниках.
 Підписи:
 1. _____ Матвієнко С.Є.
 2. _____ Галатюк О.Є.
 3. _____ Романишина Т.О.
 4. _____ Лахман А.Р.

Додаток Ж



Додаток 3

Затверджую:


 Директор з наукової роботи та інтелектуального розвитку Поліського національного університету
 Л. Д. Романчук
 7 липня 2021

Акт

випробування/впровадження результатів застосування препарату «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖЛ» (виробника ТОВ «ЕМ Україна», м. Кропивницький, с. Соколівське)

Ми, завідувач кафедри мікробіології, фармакології та епізоотології Поліського національного університету доктор ветеринарних наук, професор, голова ГО «Клуб професійних пасічників Житомирщини» Галаток О.Є., кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри Романишина Т.О., аспірант кафедри Лахман А.Р., пасічник Гунько Микола Григорович (Смілянська ОТГ Житомирської області, с. Горбове, вул. Шевченка, 3), склали даний акт про те, що з 5 квітня 2021 року по 23 квітня 2021 року на пасіці на 26 бджолиних сім'ях, з ознаками дисбіозів (ентеробактеріозів), був поставлений експеримент по випробуванню «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖЛ», виготовленого 13.08.2020 року.

Дослідним бджолам застосовували для підгодівлі цукровий сироп у співвідношенні 2 частини цукру і 1 частина води. На 1 літр такого сиропу додавали 25 мл «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖЛ», розміщували, розливали у пакети для харчових продуктів по 350 мл, розміщали зверху на рамки в центрі розплідного гнізда. Препарат згодували бджолам 4 рази з інтервалом 4 доби.

Через 60 днів після застосування препарату сила сімей зрівнялась в порівнянні із сильними сім'ями та на 4-5 вуличок перевершувала слабкі бджолині сім'ї, які препарату не отримали. Дослідні бджолині сім'ї принесли на 1-1,5 кг меду більше, ніж сильні сім'ї та на 9-10 кг меду, ніж слабкі сім'ї. Аналогічна тенденція встановлена і через 80 днів після застосування препарату. Продуктивність дослідних сімей була на 2-3 кг вищою в порівнянні із сильними сім'ями та 5-6 кг в порівнянні із слабкими сім'ями.

У відповідності з розробленою методикою застосування препарату в умовах виробничого експерименту проведені науково-практичні дослідження, які дають можливість прийти до таких висновків:

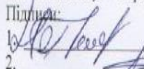
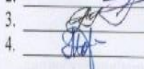
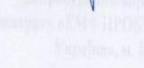
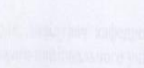
1. При застосуванні «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖЛ» в концентрації 2,5%, розведеного цукровим сиропом токсичної дії не проявлялось, що

підтверджується підвищенням активності бджіл в оброблених сім'ях та збільшенням площі здорового розплоду.

2. Результати досліджень гемолімфи після застосування препарату в даній концентрації свідчать про стимулюючу дію, що підтверджується зростанням кількістю специфічних гемодитів у гемолімфі бджіл.

Акт складено у 4-х примірниках.


Підписи:

1.  Гунько М.Г.
2.  Галаток О.Є.
3.  Романишина Т.О.
4.  Лахман А.Р.

Директор з наукової роботи та інтелектуального розвитку Поліського національного університету
Л. Д. Романчук

Додаток И

Затверджую:


 Інститут наукової роботи та
 інноваційного розвитку Поліського
 національного університету

Л. Д. Романчук
16 07 2021

Акт

**випробування/виробадження результатів застосування
препарату «ЕМ® ПРОБІОТИК для БДЖЛ» (виробника ТОВ «ЕМ
Україна», м. Кропивницький, с. Соколівське)**

Ми, завідувач кафедри мікробіології, фармакології та епізоотології Поліського національного університету доктор ветеринарних наук, професор, голова ГО «Клуб професійних пасічників Житомирщини» Галатюк О.Є., кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри Романишина Т.О., аспірант кафедри Лахман А.Р., пасічник Мельник Віктор Петрович (Бердичівський район Житомирської області, с. Краснопіль, вул. Поліщука, 14), склали даний акт про те, що з 5 квітня 2021 року по 23 квітня 2021 року на пасіці на 10 бджолиних сім'ях, з ознаками дисбіозів (ентеробактеріозів), був поставлений експеримент по випробуванню «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖЛ», виготовленого 15.08.2020 року.





Дослідним бджолам застосовували для підгодівлі цукровий сироп у співвідношенні 2 частини цукру і 1 частина води. На 1 літр такого сиропу додавали 25 мл «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖЛ», розмішували, розливали у пакети для харчових продуктів по 350 мл, розміщали зверху на рамки в центрі розплідного гнізда. Препарат згодували бджолам 4 рази з інтервалом 3 доби.

Через 45 днів після застосування препарату сила сімей зрівнялась із сильними сім'ями та на 5,5 вуликочок перевершувала слабкі бджолині сім'ї, які препарату не отримали. Дослідні бджолині сім'ї принесли на 1-1,8 кг меду більше, ніж сильні сім'ї та на 9-10 кг меду, ніж слабкі сім'ї. Аналогічна тенденція встановлена і через 70 днів після застосування препарату. Продуктивність дослідних сімей була на 2-3,3 кг вищою в порівнянні із сильними сім'ями та 6-7,3 кг в порівнянні із слабкими сім'ями.

У відповідності з розробленою методикою застосування препарату в умовах виробничого експерименту проведені науково-практичні дослідження, які дають можливість прийти до таких висновків:

1. При застосуванні «ЕМ® ПРОБІОТИКА для БДЖЛ» в концентрації 2,5%, розведеного цукровим сиропом (2:1) токсичної дії не проявлялось, що підтверджується підвищенням активності бджіл в оброблених сім'ях та збільшенням площі здорового розплоду.
2. Результати досліджень гемолімфи після застосування препарату в даній концентрації свідчать про стимулюючу дію, що підтверджується зростанням кількості специфічних гемоцитів у гемолімфі бджіл.

Акт складено у 4-х примірниках.
Підписи:

1.  Мельник В.П.
2.  Галатюк О.Є.
3.  Романишина Т.О.
4.  Лахман А.Р.

Додаток І

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової та міжнародної діяльності, доктор економічних наук, професор Сумського національного аграрного університету



Данько Ю.І.

2023 р.

КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

Матеріали дисертаційної роботи Ляхман Анастасії Русланівни «Удосконалення методів профілактики ентеробактеріозів бджіл» використовуються в навчальному процесі при викладанні дисциплін «Ветеринарна мікробіологія», «Дослід у ветеринарній медицині», а також, при проведенні курсів підвищення кваліфікації та наукових дослідженнях на кафедрі ветсанекспертизи, мікробіології, зоогігієни та безпеки і якості продуктів тваринництва Сумського національного аграрного університету

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри ветсанекспертизи, мікробіології, зоогігієни та безпеки і якості продуктів тваринництва Сумського національного аграрного університету (протокол № 9 від «1» травня 2023 р.).

Завідувач кафедри
ветсанекспертизи, мікробіології, зоогігієни
та безпеки і якості продуктів
тваринництва Сумського національного
аграрного університету,
доктор вет. наук, професор

Тетяна ФОТІНА

«ЗАТВЕРДЖЕНО»

Проректор з науково-педагогічної та навчальної роботи Сумського національного аграрного університету



Коваленко І. М.

2023 р.

АКТ

про провадження результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Удосконалення методів профілактики ентеробактеріозів бджіл», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – ветеринарна медицина, виконана Ляхман Анастасією Русланівною впроваджені у навчальний процес при викладанні дисциплін «Ветеринарна мікробіологія», «Дослід у ветеринарній медицині» у підготовці фахівців ОС «Магістр» за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» та використовуються в наукових дослідженнях кафедри ветсанекспертизи, мікробіології, зоогігієни та безпеки і якості продуктів тваринництва Сумського національного аграрного університету.

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри ветсанекспертизи, мікробіології, зоогігієни та безпеки і якості продуктів тваринництва Сумського національного аграрного університету, протокол № 9 від «1» травня 2023 р.

Завідувач кафедри
ветсанекспертизи, мікробіології, зоогігієни
та безпеки і якості продуктів
тваринництва Сумського національного
аграрного університету,
доктор вет. наук, професор

Тетяна ФОТІНА

Додаток І

Затверджено

Директор з наукової роботи
та навчальної діяльності
НУБіП України
Кондратюк В.М.
_____ 2023 р.



КАРТКА ЗВОРотноГО зв'язку

Матеріали дисертаційної роботи Лахман Анастасії Русланівни «Удосконалення методів профілактики ентеробактеріозів бджіл» використовуються в навчальному процесі при викладанні дисциплін «Епізоотологія та інфекційні хвороби», «Хвороби бджіл», «Ветеринарна мікробіологія», «Лабораторна діагностика заразних хвороб», а також, при проведенні курсів підвищення кваліфікації та наукових дослідженнях кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології НУБіП України.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології НУБіП України (протокол № 5 від 1.05.2023 року).

Професор кафедри епізоотології,
мікробіології і вірусології НУБіП України
д-р. вет. наук, професор
академік НААН України



Валерій УШКАЛОВ

Завідувач кафедри епізоотології,
мікробіології і вірусології НУБіП України
канд. вет. наук, доцент



Володимир МЕЛЬНИК

Затверджено

Директор з наукової роботи
та навчальної діяльності
НУБіП України
Кондратюк В.М.
_____ 2023 р.



АКТ

Про провадження результатів дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Удосконалення методів профілактики ентеробактеріозів бджіл», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – ветеринарна медицина, виконана **Лахман Анастасією Русланівною** впроваджені у навчальний процес при викладанні дисциплін «Епізоотологія та інфекційні хвороби», «Хвороби бджіл», «Ветеринарна мікробіологія», «Ветеринарно-санітарна мікробіологія», «Лабораторна діагностика заразних хвороб» у підготовці фахівців ОС «Магістр» за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» та використовуються в наукових дослідженнях кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології факультету ветеринарної медицини, Національного університету біоресурсів і природокористування України, м. Київ.

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології НУБіП України протокол № 5 від 1.05.2023 року.

Декан факультету ветеринарної
медицини НУБіП України
д-р. біол. наук, професор,
академік НААН України



Микола ЦВІЛХОВСЬКИЙ

Професор кафедри епізоотології,
мікробіології і вірусології НУБіП України
д-р. вет. наук, професор
академік НААН України



Валерій УШКАЛОВ

Завідувач кафедри епізоотології,
мікробіології і вірусології НУБіП України
канд. вет. наук, доцент



Володимир МЕЛЬНИК

166

166

Додаток Й

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Ректор
 Білоцерківського національного
 аграрного університету,
 д-р економ. наук, професор

 Олена ШУСТ
 «14» 05 2023 р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з наукової та
 інноваційної діяльності,
 Білоцерківського національного
 аграрного університету,
 д-р економ. наук, професор

 Ольга ВАРЧЕНКО
 «14» 05 2023 р.

КАРТКА ЗВОРотНОГО ЗВ'ЯЗКУ

Матеріали дисертаційної роботи Лахман Анастасії Русланівни «Удосконалення методів профілактики ентеробактеріозів бджіл» використовуються в навчальному процесі при викладанні дисципліни «Хвороби бджіл» та при проведенні курсів підвищення кваліфікації та наукових дослідженнях на кафедрі ветеринарно-санітарної експертизи, гігієни продуктів тваринництва та патологічної анатомії імені Й.С. Загаєвського Білоцерківського національного аграрного університету.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри ветеринарно-санітарної експертизи, гігієни продуктів тваринництва та патологічної анатомії імені Й.С. Загаєвського Білоцерківського національного аграрного університету (протокол № 6 від «17» травня 2023 р.).

Завідувач кафедри ветеринарно-санітарної
 експертизи, гігієни продуктів тваринництва
 та патологічної анатомії імені Й.С. Загаєвського,
 д-р. вет. наук, професор

 Василь ЛЯСОТА

Декан
 факультету ветеринарної медицини,
 д-р вет. наук

 Світлана ВЛАСЕНКО

АКТ

про впровадження результатів дисертаційної роботи у навчальний процес

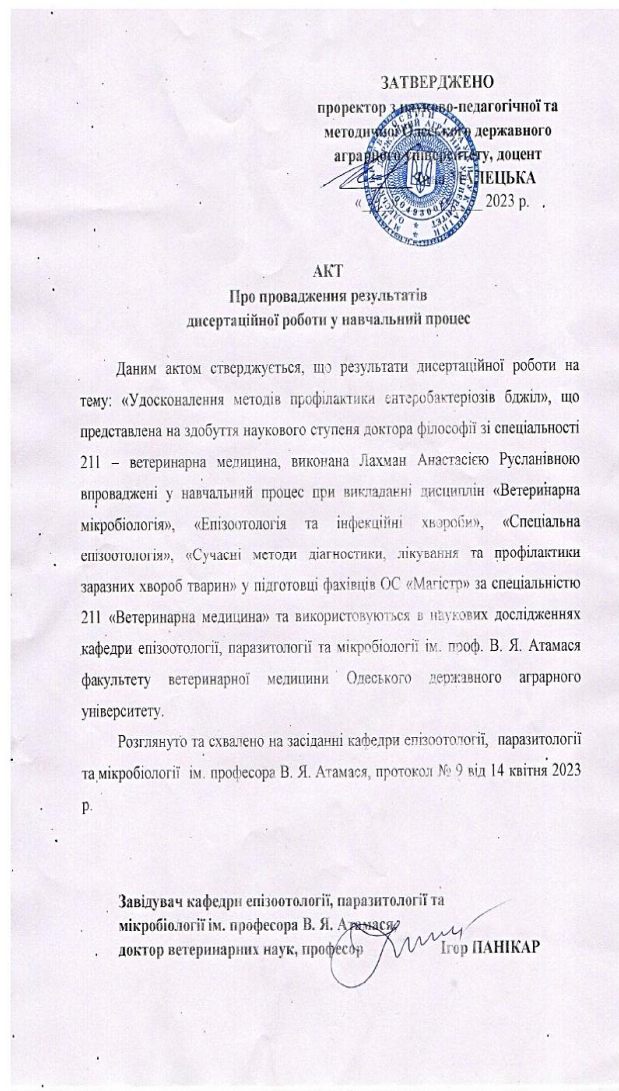
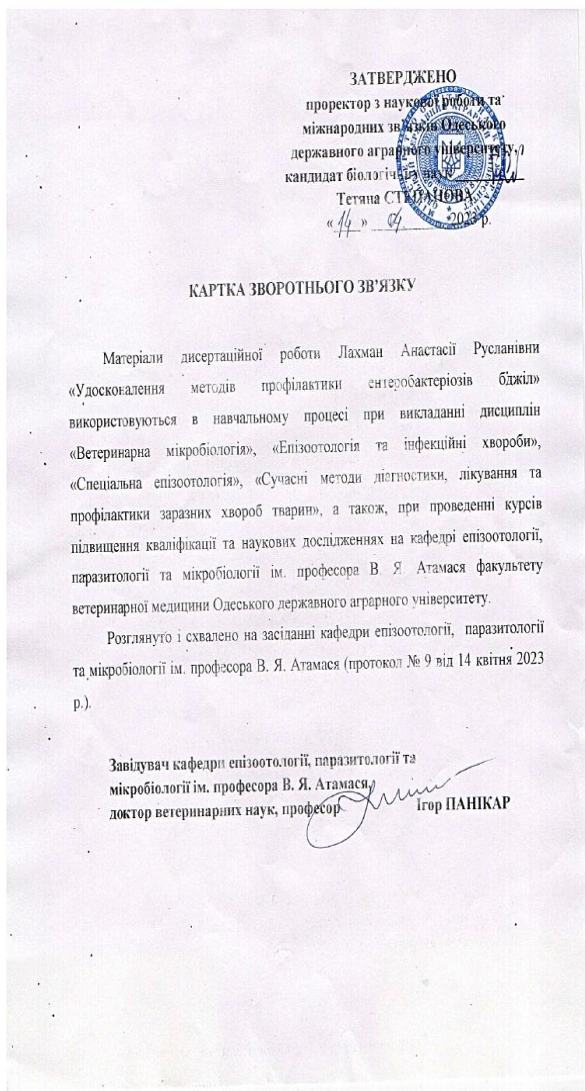
Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Удосконалення методів профілактики ентеробактеріозів бджіл», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – ветеринарна медицина, виконана Лахман Анастасією Русланівною впроваджені у навчальний процес при викладанні дисципліни «Хвороби бджіл» у підготовці фахівців ОС «Магістр» за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» та використовуються в наукових дослідженнях кафедри ветеринарно-санітарної експертизи, гігієни продуктів тваринництва та патологічної анатомії імені Й.С. Загаєвського Білоцерківського національного аграрного університету

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри ветеринарно-санітарної експертизи, гігієни продуктів тваринництва та патологічної анатомії імені Й.С. Загаєвського Білоцерківського національного аграрного університету протокол № 6 від 17 травня 2023 року.

Завідувач кафедри ветеринарно-санітарної
 експертизи, гігієни продуктів тваринництва
 та патологічної анатомії імені Й.С. Загаєвського,
 д-р. вет. наук, професор

 Василь ЛЯСОТА

Додаток К



Додаток Л

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Ректор Львівського

національного університету

ветеринарної медицини та

біотехнологій імені С.З. Гжицького

Володимир СТИБЕЛЬ

2023 р.



«Затверджено»

Ректор Львівського національного

університету ветеринарної медицини

та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Володимир СТИБЕЛЬ

2023р.



АКТ

Про провадження результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес

КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

Матеріали дисертаційної роботи Лахман Анастасії Русланівни «Удосконалення методів профілактики ентеробактеріозів бджіл» використовуються в навчальному процесі при викладанні дисциплін «Епізоотологія та інфекційні хвороби», «Спеціальна епізоотологія», «Загальна і спеціальна профілактика», а також, при проведенні курсів підвищення кваліфікації та наукових дослідженнях на кафедрі епізоотології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри епізоотології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького (протокол № 10 від « 22 » березня 2023 р.).

Завідувач кафедри епізоотології,

д-р, вет. наук, професор

КУРТЯК Б. М.



Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Удосконалення методів профілактики ентеробактеріозів бджіл», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – ветеринарна медицина, виконана Лахман Анастасією Русланівною впроваджені у навчальний процес при викладанні дисциплін «Епізоотологія та інфекційні хвороби», «Спеціальна епізоотологія», «Загальна і спеціальна профілактика» у підготовці фахівців ОС «Магістр» за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» та використовуються в наукових дослідженнях кафедри епізоотології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри епізоотології, протокол № ___ від « 22 » березня 2023 року.


Завідувач кафедри епізоотології,

д-р, вет. наук, професор

КУРТЯК Б. М.

Юлія О. Теніш

Додаток М




ЗАТВЕРДЖУЮ
 В.о. ректора Полтавського державного аграрного університету
 Валентина АРАНЧІЙ
 « 30 » червня 2023 р.


КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

Матеріали дисертаційної роботи Ляхман Анастасії Русланівни «Удосконалення методів профілактики ентеробактеріозів бджіл» використовуються в навчальному процесі при викладанні дисциплін «Ветеринарна мікробіологія», «Спеціальна епізоотологія», а також, при проведенні курсів підвищення кваліфікації та наукових дослідженнях на кафедрі інфекційної патології, гігієни, санітарії та біобезпеки Полтавського державного аграрного університету.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри інфекційної патології, гігієни, санітарії та біобезпеки Полтавського державного аграрного університету (протокол № 17 від «01» червня 2023 р.).

Завідувач кафедри інфекційної патології, гігієни, санітарії та біобезпеки,
д. вет. н., професор


 Олег КРУЧИНЕНКО



Затверджую
 Професор з науково-педагогічної, наукової роботи, асистент
 Олег ГОРБ
 « 30 » червня 2023 р.

А К Т
про впровадження/використання результатів дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Удосконалення методів профілактики ентеробактеріозів бджіл», що представлена на здобуття наукового ступеня доктор філософії за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина»

виконаної Ляхман Анастасією Русланівною
ПІБ здобувача

впроваджено у навчальну програму при викладанні дисциплін: «Ветеринарна мікробіологія», «Спеціальна епізоотологія»,
назва дисципліни


Дані щодо епізоотологічних особливостей ентеробактеріозів бджіл в Україні; методи профілактики, що можуть бути використані у ефективній боротьбі та профілактиці ентеробактеріозів бджіл

на кафедрі інфекційної патології, гігієни, санітарії та біобезпеки
назва кафедри

у підготовці фахівців за ступенем вищої освіти «Магістр», «Доктор філософії» за спеціальністю «Ветеринарна медицина»
назва спеціальності

у Полтавському державному аграрному університеті

Завідувач кафедри інфекційної патології, гігієни, санітарії та біобезпеки,
д. вет. н., професор


 Олег КРУЧИНЕНКО

Додаток Н

ЗВІТ ПРО РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ № 002075 п.м./19



УКРАЇНА
ЖИТОМИРСЬКА РЕГІОНАЛЬНА ДЕРЖАВНА ЛАБОРАТОРІЯ ДЕРЖАВНОЇ СЛУЖБИ
УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ

Україна, 10007, м. Житомир, вул. Коростишівська, 54
 Тел.: (0412) 42-70-03, 42-70-04; ztlabvet@ukr.net

Атестат про акредитацію зареєстрований у Реєстрі 03 вересня 2019 року
 за № 2Н731 дійсний до 02 січня 2023 року.
 відповідно до вимог ДСТУ ISO / ІЕС 17025:2017

Звіт про результати дослідження
патологічного (біологічного) матеріалу

№ 002075 п.м./19

від «15» жовтня 2019 р.

Кому:

ЖНАУ, факультет ветеринарної медицини. Навчально-дослідна лабораторія кафедри мікробіології, фармакології та епізоотології м. Житомир, вул. Корольова, 39

Адреса:

№ б/н від 10.10.2019 р.

Супровідна:

10.10.2019 р. об 10 год. 14 хв.

Дата отримання матеріалу:

Перелік матеріалу, що надіслано на випробування (стан, опис зразку):

2 проби патологічного матеріалу від бджіл, що надійшов для діагностичного дослідження пасіка ЖНАЕУ м. Житомир, пасіка с. Прутівка Романівського району
 Мікробіологічні випробування
 10.10.2019 р. - 15.10.2019 р.

Належать:

Проведено випробування:

Дата проведення випробувань:

Результати випробувань:

002075п.м./1/19-патологічний матеріал від бджіл (власник пасіка ЖНАЕУ, м. Житомир)

Мікробіологічні дослідження

Назва показника/захворювання	МДР за нормативними Документами	Результати випробувань	Метод/позначення НД на метод випробувань
Патогенні ентеробактерії	Не допускається	Виявлено	ДСТУ 21528-2:2004

002075п.м./2/19-патологічний матеріал від бджіл (власник пасіка с. Прутівка Романівського району)

Мікробіологічні дослідження

Назва показника/захворювання	МДР за нормативними Документами	Результати випробувань	Метод/позначення НД на метод випробувань
Патогенні ентеробактерії	Не допускається	Виявлено	ДСТУ 21528-2:2004

Примітки*:**

* - знак акредитації застосовується лише до акредитованих методик дослідження

** - за допомогою яких методів та приладів проведено дослідження

*** - рекомендації, пропозиції, зауваження

Результати стосуються тільки зразків, що пройшли випробування

/ Директор ЖРДЛДПСС

Виконавці:

Завідувач патоморфологічного відділу відбору та

реєстрації зразків

Завідувач бактеріологічного відділу



А.Б. Галайба

Р.Д. Шлапак

Р.С. Зубович

Додаток О



**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
 ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ЖИТОМИРСЬКИЙ ОБЛАСНИЙ
 ЛАБОРАТОРНИЙ ЦЕНТР МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
 УКРАЇНИ»**

вул. В. Бердичівська, 64, м. Житомир, 10002, тел./факс 43-18-09
 E-mail: olc-zhitomir@ukr.net Код ЄДРПОУ 38499986

07.11.2019 р. № 03/04-1981

На № _____ від _____

Доктору ветеринарних наук,
 професору, завідувачу кафедри
 мікробіології, фармакології та
 епізоотології Житомирського
 національного агроекологічного
 університету
 Галатюку О.Є.

Надіслані Вами на ідентифікацію культури:
 перша № 81 – пасіка ЖНАЕУ, м.Житомир ідентифікована, як *Klebsiella pneumoniae*;
 друга № 82 – пасіка с.Прутівка, Романівського району, Житомирської області ідентифікована, як *Enterobacter aerogenes*.

Заступник директора



В.В.Печенюк

Лисенко О.М.
 Шиманська В.В.
 43-17-81

Додаток П



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ЖИТОМИРСЬКИЙ ОБЛАСНИЙ
ЛАБОРАТОРНИЙ ЦЕНТР МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
УКРАЇНИ»

вул. В. Бердичівська, 64, м. Житомир, 10002, тел./факс 43-18-09
E-mail: olc-zhitomir@ukr.net Код ЄДРПОУ 38499986

18.11.2019 р. № 04/04-6460

На № _____ від _____

Доктору ветеринарних наук,
професору, завідувачу кафедри
мікробіології, фармакології та
епізоотології Житомирського
національного агроєкологічного
університету
Галатюку О.Є.

Надіслані Вами на ідентифікацію культури:
перша № Л4 – мед з лісового різнотрав'я, ідентифікована, як *Bacillus subtilis*;
друга № Л5 – мед з акації, ідентифікована, як *Bacillus subtilis*.

Заступник директора

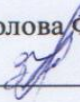
О.В.Васильков

Лисенко О.М.
Шиманська В.В.
43-17-81

Додаток Р

Затверджую:

Голова ФОП «Застулка М. В.»

 Застулка М. В.

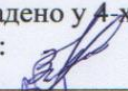


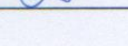
« 2 » лютого 2020р.

Акт про надання тварин для проведення експерименту

Даним актом стверджується, що ФОП «Застулка М. В.» в особі голови ФОП «Застулка М. В.» – Застулка М. В. надав аспірантці Поліського національного університету (Старий бульвар, 7, Житомир, Житомирська область, 10002) Лахман Анастасії Русланівні **500 особин** робочих бджіл української степової породи зимової генерації для проведення експериментальних досліджень за темою дисертації «Удосконалення методів профілактики ентеробактеріозів бджіл», що буде представлена для здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина». Відбір бджіл з вуликів здійснювався Лахман А. Р., в присутності Застулки М. В., Галатюка О. Є та Романишиної Т. О. на пасіці, яка розташована у с. Вереси, вул. Гоголя 4в, Житомирський район, Житомирської області, згідно «Правилами відбору зразків патологічного матеріалу, крові, кормів, води та пересилання їх для дослідження». Аспірантка Лахман Анастасія Русланівна зобов'язується проводити експериментальні дослідження згідно сучасним вимогам біоетики.

Акт складено у 4-х примірниках.

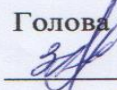
Підписи:

1.  Застулка М. В.
2.  Лахман А. Р.
3.  Галатюк О. Є.
4.  Романишина Т. О.

Додаток С

Затверджую:

Голова ФОП «Застулка М. В.»

 Застулка М. В.

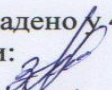
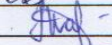

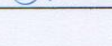
« 15 » жовтня 2020р.

Акт про надання тварин для проведення експерименту

Даним актом стверджується, що ФОП «Застулка М. В.» в особі голови ФОП «Застулка М. В.» – Застулка М. В. надав аспірантці Поліського національного університету (Старий бульвар, 7, Житомир, Житомирська область, 10002) Лахман Анастасії Русланівні **25 особин** робочих бджіл української степової породи зимової генерації для проведення експериментальних досліджень за темою дисертації «Удосконалення методів профілактики ентеробактеріозів бджіл», що буде представлена для здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина». Відбір бджіл з вуликів здійснювався Лахман А. Р., в присутності Застулки М. В., Галатюка О. Є та Романишиної Т. О. на пасіці, яка розташована у с. Вереси, вул. Гоголя 4в, Житомирський район, Житомирської області, згідно «Правилами відбору зразків патологічного матеріалу, крові, кормів, води та пересилання їх для дослідження». Аспірантка Лахман Анастасія Русланівна зобов'язується проводити експериментальні дослідження згідно сучасним вимогам біоетики.

Акт складено у 4-х примірниках.

Підписи:

1.  Застулка М. В.
2.  Лахман А. Р.
3.  Галатюк О. Є.
4.  Романишина Т. О.

Додаток Т

ЗАТВЕРДЖУЮ

Ректор Поліського національного
університету

Олег СКИДАН
« 16 » 2023 р.

ВИСНОВОК БІОЕТИЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ
про експериментальні дослідження з тваринами дисертаційної роботи
на тему «Удосконалення методів профілактики ентеробактеріозів бджіл»
здобувача ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 «Ветеринарна
медицина»
(галузь знань 21 «Ветеринарна медицина»)
Лахман Анастасії Русланівни

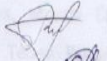
Комісія з біоетики Поліського національного університету у складі:
голови – доктора ветеринарних наук, професора Олександра Галатюка,
членів комісії – кандидата ветеринарних наук, доцента Оксани Дубової,
кандидата ветеринарних наук, доцента Геннадія Грищука, кандидата
ветеринарних наук, доцента Тетяни Романишиної, секретаря комісії –
Світлани Заїки, вивчила матеріали експериментальних досліджень з
тваринами, проведених здобувачем і встановила таке:


1. Експериментальне дослідження проводилось упродовж жовтня 2020 року у навчальній лабораторії кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології (тоді – кафедри мікробіології, фармакології та епізоотології) Поліського національного університету на бджолах української степової породи зимової генерації у кількості 525 особин. Бджоли української степової породи були надані ФОП «Застулка М. В.». Пасіка, ФОП «Застулка М. В.» розташована у с. Вереси, вул. Гоголя 4в, Житомирського району, Житомирської області. Під час проведення експерименту бджоли перебували в ентомологічних садочках у термостаті за температури +24 – +25 °С та вологості повітря 50 - 70 % (480 особин). Бджоли, які слугували контролем (природні умови) містилися в умовах темної шафи за температури повітря +25 °С та вологості повітря 65 % протягом доби (45 особин).


2. Проведені дослідження не включали експериментів зі штучного моделювання захворювань на тваринах.


3. Седация бджіл (стан анабіозу) проводилася 40% етиловим спиртом аерозольним способом, шляхом аплікації на тіла бджоли, що призвело до зупинки функцій життєво важливих центрів організму.

Висновок: Експерименти, виконані здобувачем Лахман Анастасією Русланівною на бджолах української степової породи, проведені відповідно до «3R-концепції» згідно із принципами експериментів на тваринах, які ухвалені на Першому національному конгресі з біоетики (2001 р.), узгоджено із Положенням Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (1998 р.) і відповідають Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006 р.).

Голова комісії:  Тетяна РОМАНИШИНА

Члени комісії:  Оксана ДУБОВА

 Геннадій ГРИЩУК

Секретар комісії:  Світлана ЗАЙКА

Додаток У

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати
дисертації

Статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних науково метричних баз (список «А»):

1. Стійкість патогенних ентеробактерій бджіл до експериментального йодовмісного дезінфектанту «Йодіс Дез №2» / Галатюк О. Є., Романишина Т. О., **Лахман А. Р.**, Лисенко О. М., Шиманська В. В. *Наукові горизонти*. 2020. Вип. 1, № 86. С. 71–78. DOI: [10.33249/2663-2144-2020-86-1-71-78](https://doi.org/10.33249/2663-2144-2020-86-1-71-78). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,42/0,08 д. а.).

Статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних науково метричних баз (список «Б»):

1. Галатюк О. Є., Романишина Т. О., **Лахман А. Р.** Чутливість хвороботворних бактерій бджіл до зразка розчину міді і цитрату срібла. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки*. 2020. Т. 22, № 97. С. 106–111. DOI: [10.32718/nvlvet9717](https://doi.org/10.32718/nvlvet9717). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,73/0,24 д. а.).

2. Застосування біохімічного типування у ветеринарній медицині при ентеробактеріозах бджіл для визначення *Klebsiella Pneumoniae* / Галатюк О. Є., Романишина Т. О., **Лахман А. Р.**, Бегас В. Л., Андрійчук А. М., Солодка Л. О. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки*. 2020. Т. 22, № 99. С. 101–106. DOI: [10.32718/nvlvet9916](https://doi.org/10.32718/nvlvet9916). (Здобувач

провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,67/0,11 д. а.).

3. Вплив «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» на динаміку тривалості життя бджіл в садковому досліді / **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О., Чирта-Синельник К. О., Бегас В. Л., Зілько О. Ю. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки.* 2020. Т. 23, № 103. С. 27–34. DOI: [10.32718/nvlvet10305](https://doi.org/10.32718/nvlvet10305). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,92/0,15 д. а.).

4. **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О., Бегас В. Л. Зміни морфологічного складу гемолімфи бджіл української степової породи під час застосування «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» у садковому експерименті. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина.* 2021. Т. 3, № 54. С. 39–47. DOI: [10.32845/bsnau.vet.2021.3.6](https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.3.6). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,37/0,09 д. а.).

5. Галатюк О. Є., **Лахман А. Р.**, Романишина Т. О., Бегас В. Л. Перспективи створення і застосування парних та множинних кореляційно-регресійних моделей для ветеринарного забезпечення бджільництва. *Науковий вісник ветеринарної медицини.* 2021. № 1. С. 58–63. DOI: [10.33245/2310-4902-2021-165-1-58-63](https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-165-1-58-63). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,25/0,06 д. а.).

6. **Лахман А. Р.** Визначення напрямку дії «EM[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» щодо збудників бджолиних дисбіозів *in vitro*. *Науковий вісник*

ветеринарної медицини. 2021. № 2. С. 72–81. DOI: [10.33245/2310-4902-2021-168-2-72-81](https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-168-2-72-81). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,29/0,29 д. а.).

7. Bioperspectives in the treatment and prevention of enterobacteriosis of bees in organic production of beekeeping products / Galatiuk O., **Lakhman A.**, Romanishina T., Zastulka O., Kurtyak B., Kovalchuk I., Pundyak T. *The Animal Biology*. 2021. V. 23, № 3. P. 41. DOI: [10.15407/animbio123.03](https://doi.org/10.15407/animbio123.03). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,09/0,01 д. а.).

8. **Lakhman A. R.**, Galatiuk O. Ye., Romanishina T. A., Behas V. L. Antagonistic effect of *Bacillus subtilis* isolated and identified from different honey species against *Klebsiella pneumoniae* bee pathogens. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*. 2021. V. 4, № 3. P. 48–53. DOI: [10.32718/ujva-s4-3.08](https://doi.org/10.32718/ujva-s4-3.08). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,76/0,19 д. а.).

9. **Ляхман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О., Бегас В. Л. Епізоотична ситуація щодо контагіозних хвороб бджіл у Північно-Західному регіоні України. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки*. 2022. Т. 24, № 106. С. 49–53. DOI: [10.32718/nvlvet10608](https://doi.org/10.32718/nvlvet10608). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,53/0,13 д. а.).

10. **Ляхман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О., Бегас В. Л. Вплив «ЕМ[®] ПРОБІОТИК для БДЖІЛ» на біохімічні параметри гемолімфи бджіл в садковому досліді. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія:*

Ветеринарні науки. 2022. Т. 24, № 107. С. 125–130. DOI: [10.32718/nvlvet10720](https://doi.org/10.32718/nvlvet10720). (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,65/0,16 д. а.).

Фахові статті у міжнародних наукових журналах, які індексуються в міжнародних наукометричних базах Scopus та Web of Science Core

Collection:

1. Стійкість патогенних ентеробактерій бджіл до експериментального йодовмісного дезінфектанту «Йодіс Дез №2» / Галатюк О. Є., Романишина Т. О., **Лакман А. Р.**, Лисенко О. М., Шиманська В. В. *Наукові горизонти*. 2020. Вип. 1, № 86. С. 71–78. DOI: [10.33249/2663-2144-2020-86-1-71-78](https://doi.org/10.33249/2663-2144-2020-86-1-71-78). (*Scopus*) (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,42/0,08 д. а.).

2. Isolation and identification of *Klebsiella aerogenes* from bee colonies in bee dysbiosis / Galatiuk O., Romanishina T., **Lakhman A.**, Zastulka O., Ralitsa B. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 2020. V. 50, № 3. P. 353–361. URL: <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/tjvm/article/view/245844>. (*Scopus, Web of Science Core Collection*) (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,9/0,18 д. а.).

3. Bees klebsiellosis: key aspects of pathogenesis / **Lakhman A.**, Galatiuk O., Romanishina T., Behas V., Zastulka O. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 2021. V. 9, № 8. P. 1190–1193. DOI: [10.17582/journal.aavs/2021/9.8.1190.1193](https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.8.1190.1193). (*Scopus*) (Здобувач провела збір і обробку теоретичних даних, інтерпретувала їх й оформила статтю; 0,48/0,09 д. а.).

Статті, що опубліковані у науковому періодичному виданні іншої держави:

1. Isolation and identification of *Klebsiella aerogenes* from bee colonies in bee dysbiosis / Galatiuk O., Romanishina T., **Lakhman A.**, Zastulka O., Ralitsa B. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 2020. V. 50, № 3. P. 353–361. URL: <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/tjvm/article/view/245844>. (*Scopus та Web of Science Core Collection*) (Здобувач провела експериментальні дослідження, збір і статистичну обробку даних, проаналізувала та інтерпретувала отримані результати й оформила статтю; 0,9/0,18 д. а.).

2. Bees klebsiellosis: key aspects of pathogenesis / **Lakhman A.**, Galatiuk O., Romanishina T., Behas V., Zastulka O. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 2021. V. 9, № 8. P. 1190–1193. DOI: [10.17582/journal.aavs/2021/9.8.1190.1193](https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.8.1190.1193). (*Scopus*) (Здобувач провела збір і обробку теоретичних даних, інтерпретувала їх й оформила статтю; 0,48/0,09 д. а.).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Матеріали наукових конференцій

1. Галатюк О. Є., Романишина Т. О., Лемешинська Л. Ф., **Лакхман А. Р.** Вивчення антагонізму «Ентеронорміну» щодо патогенних ентеробактерій медоносних бджіл. *Актуальні проблеми епізоотології та заразних хвороб* : матеріали Міжн. наук.-практ. конф., 24–26 жовтня 2019 р. Одеса : Одеський державний аграрний університет, 2019. С. 159–166. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,18/0,05 д. а.)

2. **Лакхман А. Р.**, Лемешинська Л. Ф., Галатюк О. Є., Романишина Т. О. Перспективи застосування пробіотиків за ентеробактеріозів бджіл. *Освітньо-*

наукові аспекти контролю інфекційних хвороб тварин в Україні : зб. тез мат. учасн. Міжнар. наук.-практ. конф., 28 листопада 2019 р. Київ : Науково-методичний центр ВФПО, 2019. С. 123–127. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,21/0,05 д. а.)

3. Галатюк О. Є., Романишина Т. О., **Лахман А. Р.** Визначення активності зразка розчину цитрату міді і цитрату срібла у профілактиці ентеробактеріозів бджіл. *Сучасний рух науки* : тези доп. X Міжн. наук. -практ. інтернет-конф., 2-3 квітня 2020 р. Дніпро, 2020. С. 269–272. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,14/0,05 д. а.)

4. Галатюк О. Є., **Лахман А. Р.**, Романишина Т. О. Особливості лабораторної діагностики за ентеробактеріозів бджіл. *Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи* : мат. V Міжн. наук. -практ. конф. викладачів і студентів., 6-7 травня 2020 р. Дніпро, 2020. С. 142–143. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,14/0,05 д. а.)

5. **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О. Перспективи використання органічних дезінфектантів для виробництва продукції бджільництва. *Органічне виробництво і продовольча безпека* : мат. доп. учасн. VIII Міжн. наук. -практ. конф., 21-22 травня 2020 р. Житомир : Поліський університет, 2020. С. 343–348. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,26/0,09 д. а.)

6. Галатюк О. Є., Романишина Т. О., **Лахман А. Р.** Лабораторно – експериментальне дослідження впливу різних рецептів Канді щодо патогенних ентеробактерій бджіл. *Шляхи розвитку науки в сучасних кризових*

умовах : тези доп. I Міжн. наук. -практ. інтернет-конф., 28-29 травня 2020 р. Дніпро, 2020. С. 229–232. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,1/0,03 д. а.)

7. Романишина Т. О., **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є. Дослідження антимікробної дії розчину міді і цитрату срібла за ентеробактеріозів бджіл. *Advances in the Natural Sciences and Engineering* : мат. Міжн. наук. -практ. конф., 28 червня 2020 р. Будапешт : Science and Education a New Dimension, 2020. С. 70–72. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,3/0,1 д. а.)

8. **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О. Визначення властивостей дезінфектанту «ЙОДІСДЕЗ» щодо ентеробактерій бджіл. *Наукові читання 2020. Сучасні підходи забезпечення здоров'я тварин та якості кормів і харчових продуктів* : матеріали шостої Всеукр. наук.-практ. конф., листопад-січень 2019 р. Житомир : ЖНАЕУ, 2020. С. 143–146. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,09/0,03 д. а.)

9. **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О. Чутливість змішаної мікробної асоціації, виділеної з вулика при опоношенні бджіл до дії підкормок різних рецептів *in vitro*. *Сучасний рух науки* : тези доп. XI Міжн. наук. -практ. інтернет-конф., 8-9 жовтня 2020 р. Дніпро, С. 379–380. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,12/0,04 д. а.)

10. **Лахман А. Р.**, Шевчук С. Ф. Любов до Бога та бджіл. *Водні і наземні екосистеми та збереження їх біорізноманіття – 2020* : матеріали третьої Всеукр. наук.-практ. конф., 3-5 червня 2020 р. Житомир : Поліський нац. ун-т, 2020. С. 110–112. (Здобувач виконала аналіз інформаційних даних та підготувала тезу до друку; 0,18/0,09 д. а.)

11. **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О. Вивчення напрямку дії «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ» щодо змішаної асоціації бактерій виділених при бджолиних дисбактеріозах. *Наукові читання 2020. Еколого-регіональні проблеми сучасного тваринництва та ветеринарної медицини* : матеріали сьомої Всеукр. наук.-практ конф., 10 грудня 2020 р. Житомир : Полісся, 2020. С. 124–127. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,13/0,04 д. а.)

12. Галатюк О. Є., **Лахман А. Р.**, Романишина Т. О. Модифікований метод Кірбі-Баурера-як початкова ланка у діагностиці ентеробактеріозів бджіл та вивченні напрямку дії «EM[®] ПРОБІОТИКА для БДЖІЛ». *Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин* : матеріали наук.-практ. Міжнародної дистанційної конф., 17 березня 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. С. 17–19. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,17/0,06 д. а.)

13. Галатюк О. Є., **Лахман А. Р.**, Романишина Т. О. Застосування мікробіологічних методів дослідження у виборі розчинника для пробіотика «Ентеронормін з Йодіс + Se» *in vitro* Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині : матеріали наук.-практ. Міжнародної дистанційної конф., 26 березня 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. С. 178–179. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,13/0,04 д. а.)

14. **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О., Бегас В. Л. Лабораторна ідентифікація та перспективи застосування *Bacillus Subtilis*, виділеної з весняного меду, за ентеробактеріозів бджіл. *Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи* : матеріали VI Міжн. наук.-практ. конф. викл. і студ., 6-7 травня 2021 р. Дніпро : ДДАЕУ, 2021. С. 97. (Здобувач провела дослідження,

виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,08/0,02 д. а.)

15. Галатюк О. Є., Бегас В. Л., Романишина Т. О., **Лахман А. Р.** Організація профілактики хвороб в органічному тваринництві та її законодавчі передумови. *Органічне виробництво і продовольча безпека* : мат. доп. учасн. ІХ Міжн. наук. -практ. конф., 27-28 травня 2021 р. Житомир: Поліський нац. ун-т, 2021. С. 28–36. (Здобувач виконала аналіз інформаційних даних та підготувала тезу до друку; 0,29/0,07 д. а.)

16. Galatiuk O. Ye., **Lakhman A. R.**, Romanishina T. O., Zastulka O. O., Kurtyak V. M., Kovalchuk I. I., Pundyak T. O. Bioperspectives in the treatment and prevention of enterobacteriosis of bees in organic production of beekeeping products. *Науковий журнал «Біологія тварин»* : тези доп. І українсько-польського наукового форуму «АГРОБІОПЕРСПЕКТИВИ», 29–30 вересня 2021 р., Львів : Інститут біології тварин НААН, 2021, С. 41. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,09/0,01 д. а.)

17. **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О., Бегас В. Л. Чутливість бактеріальної культури бджіл виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* до дії «Ентероонормін з йодіс + Se» *in vitro*. *In Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Winter Debates* : Proceedings of the 3rd International Scientific and Practical Internet Conference., February 3-4 2022 year. Dnipro, 2022. P. 319–321. (Здобувач виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,15/0,04 д. а.)

18. Галатюк О. Є., Бегас В. Л., Романишина Т. О., **Лахман А. Р.** Значення досягнень Прокоповича П. І. і Вітвицького М. М. для розвитку промислового бджільництва. *Наукові читання 2022. Еколого-регіональні проблеми сучасного тваринництва та ветеринарної медицини* : матеріали дев'ятої Всеукр. наук.-практ конф., 17 листопада 2022 р. Житомир : Полісся,

2022. С. 28–32. (Здобувач виконала аналіз інформаційних даних та підготувала тезу до друку; 0,13/0,03 д. а.)

19. Галатюк О. Є., **Лахман А. Р.**, Романишина Т. О., Свиридюк К. П., Балканська Р. Вивчення дії Натрію гіпохлориду щодо патогенних ентеробактерій бджіл виду *Klebsiella pneumoniae*. Сучасний стан розвитку ветеринарної медицини, науки і освіти : матеріали Міжн. наук.-практ. конф., присв. 35-річчю заснування факультету вет. медицини., м. Житомир, 12-13 жовтня 2022 р. Житомир : Поліський нац. ун-т, 2022. С. 179–181. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,18/0,02 д. а.)

20. Галатюк О. Є., **Лахман А. Р.**, Романишина Т. О., Бегас В. Л. Забезпечення епізоотичного благополуччя бджільництва України. «Єдине здоров'я – 2022»: збірник праць учасників Міжн. наук.-практ. конф., м. Київ, 22-24 вересня 2022 р. Київ : НУБіП, 2022. С. 261–262. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,08/0,02 д. а.)

21. Галатюк О. Є., **Лахман А. Р.**, Романишина Т. О., Бегас В. Л. Чутливість змішаної мікробної асоціації, виділеної за ентеробактеріозів бджіл до Натрію гіпохлориту (3%) в лабораторних умовах. Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту : зб. тез мат. учасн. Міжнар. наук.-практ. конф., м. Біла Церква, 20 жовтня 2022 р. Біла Церква : БНАУ, 2022. С. 34–36. (Здобувач провела дослідження, виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,19/0,05 д. а.)

22. Галатюк О. Є., Романишина Т. О., **Лахман А. Р.**, Бегас В. Л. Дослідження чутливості *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* до дії Натрію гіпохлориду *in vitro*. Біобезпека, захист та благополуччя тварин : зб. тез мат. учасн. Міжнар. наук.-практ. конф., 21 листопада 2022 р. Київ : Науково-методичний центр ВФПО, 2022. С. 162–164. (Здобувач провела дослідження,

виконала аналіз отриманих результатів та підготувала тезу до друку; 0,1/0,03 д. а.)

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації

Патенти на корисну модель:

1. Спосіб ідентифікації бджолиних ентеробактерій видів *Klebsiella Pneumoniae* та *Enterobacter Aerogenes* (*Klebsiella Aerogenes*): пат. 143166 Україна. № u202001272; заявл. 26.02.2020; опубл. 10.07.2020, Бюл. № 13. 62 с. (Здобувач підготувала матеріали для оформлення патенту та приймала участь в ідентифікації бджолиних ентеробактерій видів *Klebsiella Pneumoniae* та *Enterobacter Aerogenes* (*Klebsiella Aerogenes*))

2. Спосіб приготування препарату «Ентеронормін з ЙОДІС + SE» на медовій ситі з лісового різнотрав'я для застосування у бджільництві: пат. 143400 Україна. № u202001273; заявл. 26.02.2020; опубл. 27.07.2020, Бюл. № 14. 5 с. (Здобувач підготувала матеріали для оформлення патенту та приймала участь в експериментальних дослідженнях)

3. Спосіб визначення чутливості ентеробактерій бджіл до пробіотиків та дезінфектантів методом Кірбі-Бауера. пат. 143401 Україна. № u202001274; заявл. 26.02.2020; опубл. 27.07.2020, Бюл. № 14. 67 с. (Здобувач підготувала матеріали для оформлення патенту та приймала участь в експериментальних дослідженнях)

Науково-методичні рекомендації

1. **Лахман А. Р.**, Галатюк О. Є., Романишина Т. О. Використання метода Кірбі-Бауера (модифікованого) для випробування пробіотиків та дезінфектантів за ентеробактерозів бджіл *in vitro*. Науково-методичні рекомендації. Житомир : Поліський національний університет, 2023. 23 с.

(Здобувач провела провела практичну частину дослідів, сформувала та оформила науково-методичні рекомендації; 0,84/0,28 д. а.)

Відомості про апробацію результатів дисертації

Міжнародні конференції, які передбачали публікування тез:

Міжнародна науково-практична конференція присвячена 80-річчю від дня народження професора Атамася В. Я. «Актуальні проблеми епізоотології та заразних хвороб», м. Одеса, 24 – 26 жовтня 2019 р.;

Міжнародна науково-практична конференція «Освітньо-наукові аспекти контролю інфекційних хвороб тварин в Україні», м Київ, 28 листопада 2019 р.;

X Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Сучасний рух науки», м. Дніпро, 2 – 3 квітня 2020 р.;

V Міжнародна науково-практична конференція викладачів і студентів «Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи», м. Дніпро, 6 – 7 травня 2020 р.;

VIII Міжнародна науково – практична конференція «Органічне виробництво і продовольча безпека», м. Житомир, 21 – 22 травня 2020 р.;

I Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Шляхи розвитку науки в сучасних кризових умовах», м. Дніпро, 28 – 29 травня 2020р.;

Міжнародна науково-практична конференція «Advances in the Natural Sciences and Engineering», м. Будапешт, 28 червня 2020 р.;

XI Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Сучасний рух науки», м. Дніпро, 8 – 9 жовтня 2020 р.;

Науково-практична міжнародна дистанційна конференція «Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин», м. Харків, 17 березня, 2021 р.;

Науково-практична міжнародна дистанційна конференція

«Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині», м. Харків, 26 березня, 2021 р.;

VI Міжнародна науково-практична конференція викладачів і студентів «Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи», м. Дніпро, 6 – 7 травня 2021 р.;

IX Міжнародна науково-практична конференція «Органічне виробництво і продовольча безпека», м. Житомир, 27 – 28 травня 2021 р.;

I українсько-польський науковий форум «АГРОБІОПЕРСПЕКТИВИ», м. Львів, 29 – 30 вересня 2021 р.;

III Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «In Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Winter Debates: Proceedings of the 3rd International Scientific and Practical Internet Conference», м. Дніпро, 3 – 4 лютого, 2022 р.;

Міжнародна науково-практична конференція присвячена 35-річчю заснування факультету ветеринарної медицини, 12-13 жовтня 2022 р.;

Міжнародна науково-практична конференція «Єдине здоров'я – 2022», м. Київ, 22 – 24 вересня 2022 р.;

Міжнародна науково-практична конференція «Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту», м. Біла Церква, 20 жовтня 2022 р.

Міжнародна науково-практична конференція «Біобезпека, захист та благополуччя тварин», м. Київ, 21 листопада 2022 р.

Всеукраїнські конференції, які передбачали публікування тез:

Шоста науково-практична конференція «Наукові читання 2020. Сучасні підходи забезпечення здоров'я тварин та якості кормів і харчових продуктів», м. Житомир, листопад – січень 2019 р.;

Третя Всеукраїнська науково-практична конференція «Водні і наземні екосистеми та збереження їх біорізноманіття», м. Житомир, 3 – 5 червня, 2020 р.;

Сьома науково-практична конференція «Наукові читання 2020. Еколого-регіональні проблеми сучасного тваринництва та ветеринарної медицини», м. Житомир, 10 грудня, 2020 р.;

Дев'ята всеукраїнська науково-практична конференція «Наукові читання 2022. Еколого-регіональні проблеми сучасного тваринництва та ветеринарної медицини», 17 листопада 2022.

Всеукраїнські конференції, семінари та виставки, які передбачали апробації у вигляді усної доповіді:

Третя Всеукраїнська науково-практична конференція на тему: «Підготовка бджіл до зимівлі та профілактика захворювань у осінній період», м. Житомир, 19 жовтня 2019 р.;

Четверта Всеукраїнська науково-практична конференція на тему: «Успішний розвиток бджолиних сімей у весняний період», м. Житомир, 8 лютого 2020 р.;

XII Міжнародна виставка INTERNATIONAL EXHIBITION «Антибіотикорезистентні мікроорганізми в об'єктах харчового ланцюга», присвячений 100-річчю заснування факультету ветеринарної медицини, м. Київ. 25 – 27 вересня 2019 р.;

Другий науково–практичний семінар на тему: «Моніторинг зимівлі та органічне виробництво продукції бджільництва», м. Житомир, 16 листопада 2019 р.;

Третій науково–практичний семінар на тему: «Мед, медотерапія, медові масажі, медові укутування», м. Житомир, 14 грудня 2019 р.;

Шоста всеукраїнська науково–практична конференція «Нарощування сили бджолиної сім'ї, спеціалізація у бджільництві», м. Житомир, 19 вересня 2020 р.;

Сьома всеукраїнська науково–практична конференція «Продуктивні резистентні матки та їх вплив на рентабельність пасіки», м. Житомир, 17

жовтня 2020 р.;

Восьма всеукраїнська науково-практична конференція «Весняні роботи на пасіці, особливості запилення ентомофільних культур», м. Житомир, 27 лютого, 2021 р.;

Дев'ята всеукраїнська науково-практична конференція «Осінні роботи на пасіці, особливості чистопородного розведення бджіл української степової породи», м. Житомир, 3 жовтня 2021 р.;

Одинадцята всеукраїнська науково-практична конференція «Осінні роботи на пасіці, методологічні основи створення житомирського типу чистопородних бджіл української степової породи», 24 вересня 2022 р.;

Дванадцята всеукраїнська науково-практична конференція «Медоваріння – один з шляхів підвищення рентабельності пасік, уміння керувати бджолиними сім'ями», 26 листопада 2022 р.

Міжнародні конференції, які передбачали апробації у вигляді усної доповіді:

Міжнародна науково-практична конференція «Проблеми сучасного бджільництва (Problems of modern beekeeping)», м. Київ, 19 листопада 2020 р.;

Міжнародна науково-практична конференція присвячена бджільництву «Сучасні аспекти селекції бджіл» м. Київ, 16 березня, 2021 р.