

## МІКРОБІОЛОГІЯ, ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

УДК 638.162.2:579.672

### Удосконалення методики виділення пробіотичних культур зі свіжовідкачаного меду

Постоєнко Г.В.<sup>1,2</sup> , Постоєнко В.О.<sup>1</sup> , Гордієнко О.І.<sup>2</sup> ,

Напненко О.О.<sup>2</sup> , Недосєков В.В.<sup>3</sup> 

<sup>1</sup> ННЦ «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича»

<sup>2</sup> Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

<sup>3</sup> Національний університет біоресурсів і природокористування України



E-mail: Постоєнко Г.В. vethannap@gmail.com; Постоєнко В.О. vpostoenko@ukr.net;

Гордієнко О.І. gordienko\_1952@i.ua; Напненко О.О., napnenko19@gmail.com;

Недосєков В.В. Nedosekov06@gmail.com



Постоєнко Г.В., Постоєнко В.О., Гордієнко О.І., Напненко О.О., Недосєков В.В. Удосконалення методики виділення пробіотичних культур зі свіжовідкачаного меду. Науковий вісник ветеринарної медицини, 2023. № 2. С. 101–110.

Postoienko H., Postoienko V., Hordienko O., Napnenko O., Nedosekov V. Improvement of the probiotic cultures method isolation from freshly extracted honey. *Nauk. visn. vet. med.*, 2023. № 2. PP. 101–110.

Рукопис отримано: 06.09.2023 р.

Прийнято: 18.09.2023 р.

Затверджено до друку: 23.11.2023 р.

Doi: 10.33245/2310-4902-2023-184-2-101-110

Дослідження пробіотичних мікроорганізмів, виділених з меду бджолиного, останнім часом набуло значного поширення в світі і становить значний інтерес як для профілактики та лікування захворювань бджіл, так і як джерело пробіотиків для конструювання препаратів, корисних для людини і тварин. Однак, не було проведено досліджень з вивчення тривалості зберігання пробіотичних бактерій в меді після його відкачування зі стільників. Проведено дослідження трьох видів меду (акацієвий, соняшниковий та різнотрав'я) з визначення інтенсивності росту пробіотичних бактерій на першу, другу, третю та четверту добу після відкачування, а також після зберігання меду впродовж 6 місяців у запечатаних стільниках. Проби меду готували у розведенні з МРС-бульйоном, висівали на тверде поживне середовище, облік результатів проводили через 48 годин за підрахунку колоній різних видів. Виділені культури характеризували за культурально-морфологічними та біохімічними властивостями. Встановлено, що бактерії виділяються впродовж перших 3-х діб після відкачування меду, натомість на 4-ту добу зберігання ріст пробіотичних бактерій відсутній, що свідчить про неможливість їх отримання. Доведено перспективу використання меду різного ботанічного походження для виділення пробіотичних бактерій. Дослідження меду, що зберігався в запечатаних стільниках впродовж 6-ти місяців, підтвердило гіпотезу про те, що бактерії нормофлори, які мають пробіотичні властивості, зберігаються в стільниках впродовж тривалого часу і такий мед можна застосовувати для їх виділення, ідентифікації та подальшого використання. У процесі дослідження вдосконалено та відпрацьовано методику виділення бактерій нормофлори кишківника бджіл, а саме *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum* та *Enterococcus faecium* зі свіжовідкачаного меду.

**Ключові слова:** нормофлора, пробіотичні бактерії, свіжовідкачаний мед, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*.

**Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень.** Пробиотичні культури або пробіотики – це штами мікроорганізмів, що є представниками нормальної мікрофлори кишківника макроорганізму (людини, тварин, комах, птиці тощо).

Дослідження збалансованої кишкової мікробіоти часто пов'язують з превентивними підходами до контролю та попередження зараження макроорганізму, зокрема бджіл, різними патогенами та/або паразитами [1, 2]. Наявність молочнокислих бактерій в шлунково-кишковому тракті бджіл доведена низкою досліджень [3, 4]. Показано, що саме задня кишка медоносних бджіл (*Apis mellifera* L.) колонізована великою спільнотою в межах роду *Lactobacillus* [5, 6].

На сьогодні близько 36 видів *Lactobacillus* були прийняті як харчові та внесені до списку QPS [7], тому вони широко використовуються в харчовій промисловості для виробництва ферментованих харчових продуктів і як захисні культури [8, 9]. На додаток до властивостей підкислення, *Lactobacillus spp.* може синтезувати широкий спектр антимікробних сполук (АС), що протидіють патогенним бактеріям, таким як *Staphylococcus aureus* [10].

Вибір пробиотичних засобів доцільно здійснювати за принципом специфічності дії для досягнення максимальної ефективності від їх застосування [11].

Першим етапом вивчення нормофлори кишківника бджіл була спроба виділяти мікроорганізми безпосередньо з їх кишківника [12], однак цей спосіб потребує знищення значної кількості корисних комах і спонукає науковців до пошуку альтернатив.

У зв'язку з цим, з'явилися відомості щодо використання меду як джерела пробиотичних мікроорганізмів кишківника бджіл [6, 12, 13, 14]. Низкою досліджень виділено пробиотичні культури з меду бджолиного [14–19]. Нами раніше також ізольовано зі свіжовідкачаного меду і охарактеризовано бактерії родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та *Enterococcus* [19].

Не зважаючи на це, донині не проведено жодних досліджень та не обґрунтовано параметри методики виділення бактеріальної нормофлори зі свіжовідкачаного меду. Також в літературі відсутні дані щодо дослідження тривалості зберігання корисних культур в запечатаних стільниках з медом. У зв'язку з цим, актуальним напрямом є удосконалення методики виділення пробиотичних культур зі свіжовідкачаного меду.

**Мета дослідження.** Встановити оптимальні параметри та удосконалити методику виділення пробиотичних бактерій зі свіжовідкачаного меду.

**Матеріал та методи досліджень.** Для дослідження використовували три види свіжовідкачаного меду, а саме акацієвий, різнотрав'я та соняшниковий, які відібрані на пасіках Київської області та надіслані до лабораторії. Кожен варіант містив запечатані соти з медом (№ 1), а саме фрагмент, вирізаний з рамки та ємність зі свіжим медом (№ 2), відкачаним за 12 годин до транспортування зразків у лабораторію (свіжовідкачаний мед). Для дослідження використовували поживні середовища MRS-агар та MRS-бульйон виробника Мерк, Німеччина (Merck, KGaA), як і були приготувані відповідно до інструкції виробника.

Підготовка проб: із зразків меду (№ 1 та № 2) готували розведення у пробірках з MRS-бульйоном у співвідношенні 1:10 (мед/MRS) одразу після отримання проб (день 1), на наступний день (день 2), через день (день 3) та на 4-й день після отримання зразків. Далі проводили висіви у чашки Петрі з MRS-агаром по 0,5 мл посівного матеріалу, висіяного «газоном» та у пробірки з MPC-бульйоном. Дослідні проби витримували в термостаті за 37 °C без інсоляції та штучного освітлення. Облік результатів проводили за підрахунку колоній одного виду через 48 годин [20].

Для дослідження культурально-морфологічних ознак бактеріальних клітин із середовищ із MPC агаром, де спостерігався ріст колоній, відбирали проби і виготовляли мазки, які, в подальшому, фарбували за Грамом та досліджували з використанням імерсійного об'єктива мікроскопа [20]. Для виявлення біохімічних властивостей отриманих бактерій проводили дослідження з визначення здатності культур до розщеплення ряду цукрів Гіса, газоутворення та зміни рН середовища [22].

**Результати досліджень.** Дослідження меду трьох видів проводили поступово у міру надходження їх до лабораторії. Першим досліджували зразок 1, маркований як мед з акації білої (табл. 1).

Проби, виготовлені з меду, що був відібраний із сот безпосередньо перед дослідженням, показали ріст асоціації бактерій на MPC-бульйоні, з появою характерної каламуті та інтенсивним виділенням газу вже з першої доби дослідження. На другу та третю добу ситуація була аналогічною. На четверту добу ріст бактерійної мікрофлори на MPC-бульйоні відсутній. На MPC-агарі на першу та другу добу дослідження ріст не спостерігався і проявився незначно лише на третю добу. На четверту добу росту на MPC-агарі та MPC-бульйоні не спостерігалось.

Таблиця 1 – Наявність бактерій нормофлори у свіжовідкачаному меду з акації білої

№ п/п	Назва зразка	Термін зберігання зразків меду, діб	Наявність росту (ознаки росту)
1	Мед сотовий	1	МРСб – каламуть, 1 млрд кл. /см <sup>3</sup> з інтенсивним виділенням газу МРСа – ріст відсутній
2		2	МРСб – каламуть, 1 млрд кл. /см <sup>3</sup> з інтенсивним виділенням газу МРСа – ріст відсутній
3		3	МРСб – каламуть, 1 млрд кл. /см <sup>3</sup> з інтенсивним виділенням газу МРСа – білі колонії 1,5 мм
4		4	МРСб – ріст відсутній МРСа – ріст відсутній
5	Мед відкачаний	1	МРСб – каламуть, 1 млрд кл. /см <sup>3</sup> з інтенсивним виділенням газу МРСа – шорсткі білі колонії 0,5 мм
6		2	МРСб – каламуть, 1 млрд кл. /см <sup>3</sup> з інтенсивним виділенням газу МРСа – гладкі білі колонії 1,5 мм, бежеві прозорі колонії 3 мм
7		3	МРСб – каламуть, 1 млрд кл. /см <sup>3</sup> з інтенсивним виділенням газу МРСа – білі колонії до 3 мм, бежеві прозорі колонії 3 мм
8		4	МРСб – каламуть «муаровий ріст», без виділення газу МРСа – ріст відсутній

Проби, виготовлені зі свіжовідкачаного меду показали інтенсивний ріст бактерійної мікрофлори на МРС-бульйоні вже з першої доби досліджень. На 2-гу та 3-тю добу було виявлено колонії двох типів. На 4-ту добу ріст на МРС-бульйоні був нехарактерним, а на МРС-агарі ріст не спостерігався.

Наступний зразок меду, який надійшов у лабораторію був маркований як мед з різнотрав'я (табл. 2).

Із даних таблиці 2 видно, що мед, відібраний із сот не показав росту на першу добу дослідження. Ріст на МРС бульйоні на 2-гу і 3-тю добу був інтенсивним, хоча і без виділення

газу. На 4-ту добу ріст на поживних середовищах не спостерігався.

Відкачаний мед, навпаки, показав ріст культур з 1-ї доби досліджень – на МРС бульйоні, аналогічно меду із сот, відмічали інтенсивний ріст бактерій без виділення газу, а на МРС агарі виявлено білі глянцевої колонії. На 2-ту добу дослідження кількість бактерій суттєво збільшилась, однак на 3-тю добу почала зменшуватись. На 4-ту добу ріст колоній не спостерігався.

Останній вид меду, який було досліджено в межах експерименту, надійшов у лабораторію третім і був маркований як мед із соняшнику.

Таблиця 2 – Наявність бактерій нормофлори у свіжовідкачаному меду з різнотрав'я

№ п/п	Назва зразка	Термін зберігання зразків меду, діб	Наявність росту (ознаки росту)
1	Мед сотовий	1	МРСб – ріст відсутній МРСа – ріст відсутній
2		2	МРСб – каламуть 1 млрд кл. /мл, без виділення газу МРСа – білі глянцевої колонії 0,5–1 мм
3		3	МРСб – каламуть 1 млрд кл. /мл, без виділення газу МРСа – білі глянцевої колонії 0,5–1 мм
4		4	МРСб – ріст відсутній МРСа – ріст відсутній
5	Мед відкачаний	1	МРСб – каламуть 1 млрд кл. /мл, без виділення газу МРСа – білі глянцевої колонії
6		2	МРСб – каламуть 1 млрд кл. /мл, без виділення газу МРСа – білі шорсткі колонії 0,5 мм, гладкі білі колонії
7		3	МРСб – каламуть 1 млрд кл. /мл, без виділення газу МРСа – гладкі білі колонії 1,5 мм, шорсткі білі колонії 0,5 мм
8		4	МРСб – ріст відсутній МРСа – ріст відсутній

Таблиця 3 – Наявність бактерій нормофлори у свіжовідкачаному меді з соняшнику

№ п/п	Назва зразка	Термін зберігання зразків меду, діб	Наявність росту (ознаки росту)
1	Мед сотовий	1	МРСб – ріст відсутній МРСа – ріст відсутній
2		2	МРСб – каламуть 1 млрд кл. /мл, без виділення газу МРСа – гладкі білі колонії 1,5 мм
3		3	МРСб – каламуть 1 млрд кл. /мл, без виділення газу МРСа – гладкі білі колонії 1,5 мм
4		4	МРСб – ріст відсутній МРСа – ріст відсутній
5	Мед відкачаний	1	МРСб – каламуть 1 млрд кл. /мл, без виділення газу МРСа – гладкі білі колонії 1,5 мм, шорсткі білі колонії 0,5 мм
6		2	МРСб – каламуть 1 млрд кл. /мл, без виділення газу МРСа – гладкі білі колонії 1,5 мм, шорсткі білі колонії 0,5 мм
7		3	МРСб – каламуть 1 млрд кл. /мл, без виділення газу МРСа – гладкі білі колонії 1,5 мм, гладкі бежеві колонії
8		4	МРСб – ріст відсутній МРСа – ріст відсутній

Дослідження 3-го зразка меду показали, що проби, відібрані із сот, не мали росту на МРС агарі та бульйоні на 1-шу добу. На 2-гу і 3-тю добу спостерігався інтенсивний ріст бактерій на МРБ бульйоні з утворенням газу та ріст гладких білих колоній на МРС агарі. На 4-ту добу ріст не спостерігався.

Проби, відібрані зі свіжовідкачаного меду, показали інтенсивний ріст на МРС бульйоні та агарі з першої доби, зокрема, на МРС агарі спостерігався ріст 2-х видів колоній білого кольору – гладких та шорстких. На 2-гу і 3-тю добу також спостерігався інтенсивний ріст бактерій

на МРС бульйоні. На МРС агарі відмічали ріст 3-х видів культур – бежевого кольору, а також гладких та шорстких білого кольору. На 4-ту добу ріст не спостерігався.

Дослідний зразок № 3, що надійшов до лабораторії, в подальшому зберігався у сотах за кімнатної температури впродовж 6-ти місяців. Після тривалого зберігання досліди було проведено повторно. Для підготовки проб було відібрано зразок безпосередньо із запечатаних сот, а з фрагменту рамки, що залишився, було відкачано мед і також відібрано пробу для дослідження.

Таблиця 4 – Наявність бактерій нормофлори у свіжовідкачаному меді з соняшнику після 6-ти місяців зберігання

№ п/п	Назва зразка	Термін зберігання зразків меду, діб	Наявність росту (ознаки росту)
1	Мед сотовий	1	МРСб – каламуть 1 млрд кл. /мл, без виділення газу МРСа – гладкі білі колонії 1,5 мм, шорсткі білі колонії 0,5 мм
2		2	МРСб – каламуть 1 млрд кл. /мл, без виділення газу МРСа – гладкі білі колонії 1,5 мм, шорсткі білі колонії 0,5 мм
3		3	МРСб – незначна каламуть 1 млрд кл. /мл, без виділення газу МРСа – гладкі білі колонії 1,5 мм, гладкі бежеві колонії
4		4	МРСб – ріст відсутній МРСа – ріст відсутній
5	Мед відкачаний	1	МРСб – незначна каламуть до 1 млрд кл. /мл, без виділення газу МРСа – гладкі білі колонії 1,5 мм
6		2	МРСб – незначна каламуть до 1 млрд кл. /мл, без виділення газу МРСа – гладкі білі колонії 1,5 мм
7		3	МРСб – ріст відсутній МРСа – ріст відсутній
8		4	МРСб – ріст відсутній МРСа – ріст відсутній



Результати дослідження, вказані в таблиці 4 показують, що після тривалого зберігання зразків меду проби, відібрані з сот, демонстрували ріст бактеріальних культур як на МРС агарі, так і на МРС бульйоні з першої доби. Динаміка росту бактерій зберігалася до 3-ї доби. Показники інтенсивності росту бактерій відрізнялися від аналогічних, у випадку дослідження свіжого меду, і були нижчими. На 4-ту добу ріст був відсутній.

Проби, відібрані з відкачаного меду, показали інтенсивний ріст як на МРС агарі, так і на МРС бульйоні на першу і другу добу дослідження, однак на 3-тю добу ріст був відсутній. Для контролю дослід провели і на 4-ту добу, але, як і очікувалось, ріст не спостерігався.

Ідентифікація культурально-морфологічних та біохімічних властивостей дослідних культур показали наявність бактерій 3-х видів. Бактерії першого виду на твердому поживному середовищі утворювали бежувато-білуваті колонії з нерівними краями або щільні білуватого кольору. На рідкому поживному середовищі утворюють каламуть та леткі кислоти, тому рН середовища культивування змінюється в бік підвищення кислотності. Біохімічні властивості характеризуються здатністю ферментувати глюкозу, мальтозу, сахарозу, інулін, декстрин, крохмаль. Мікроскопічно ці бактерії є грам-позитивними, середнього розміру, округлої форми та розміщені поодинокі або у вигляді коротких ланцюжків різної форми. Бактерії належать до виду *Bifidobacterium bifidum* [23].

Бактерії другого виду на твердому поживному середовищі утворювали гладкі колонії білого кольору з рівними краями. На рідкому поживному середовищі також утворюють каламуть та леткі кислоти, тому рН середовища культивування змінюється в бік підвищення кислотності. Серед біохімічних властивостей щодо виду бактерій спостерігається здатність ферментувати глюкозу, сахарозу та слабше мальтозу. Мікроскопічно ці бактерії є грам-позитивними довгими паличками середнього розміру або дрібними дуже короткими із заокругленими краями, розміщених поодинокі або у вигляді ланцюжків. Бактерії належать до виду *Lactobacillus plantarum* [24].

Бактерії третього виду на твердому поживному середовищі утворювали дрібні прозорі колонії з рівними краями. На рідкому поживному середовищі утворювали каламуть з подальною появою ослизлого осаду. Серед біохімічних властивостей спостерігається здатність ферментувати глюкозу без утворення газу. Мікроскопічно ці бактерії є грам-позитивними коками, розміщених попарно або корот-

кими ланцюжками. Бактерії належать до виду *Enterococcus faecium* [25].

**Обговорення.** На сьогодні в галузі бджільництва прослідковується підвищення інтересу до пошуку та дослідження нових, ефективних і безпечних методів контролю інфекційних та інвазивних захворювань бджіл. У цьому контексті використання пробіотичних бактерій у профілактиці та біоконтролі патогенних мікроорганізмів бджіл має значні перспективи [26].

Використання препаратів на основі пробіотичних культур розповсюджене по всьому світу як для людини, так і тварин. На сьогодні, літературні дані свідчать про використання бактерій родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* [27].

Італійськими вченими було проведено дослідження антагоністичних властивостей окремих штамів *Lactobacillus* щодо збудника американського гнильцю – *Paenibacillus larvae*. Результати досліджень показали, що деякі штами *L. plantarum* здатні інгібувати *P. larvae*, а також вони мають певні фізіологічні та функціональні властивості, які дозволяють відносити ці штами до класу пробіотиків для медоносних бджіл [28].

Використання пробіотичних бактерій, на відміну від синтетичних або природних хімічних сполук, не впливає негативно на баланс кишкової мікробіоти та здоров'я бджіл [29]. Було показано, що корисні бактерії, що належать до *LAB*, зміцнюють здоров'я медоносних бджіл, активуючи імунний захист і виробляючи антимікробні сполуки, які пригнічують патогенні мікроорганізми [30–37]. Олофсон та Кіллер виділили 8 видів бактерій роду *Lactobacillus* із кишківника медоносної бджоли [5, 6]. У процесі досліджень ці види були детально охарактеризовані, що дало можливість показати, що вони мають кілька штамів із досить різноманітним генетичним вмістом [13], що вказує на наявність надзвичайно спеціалізованої мікробіоти в кишківнику корисних комах. З поживного погляду, адаптовані до комах *Lactobacillus* можуть зберігати трегалозу, цукор, що функціонує як сполука для накопичення енергії в комах [13], здатні ферментувати токсичні для бджіл цукри, такі як маноза [13, 38], допомагаючи у такий спосіб кишківнику бджіл переробляти неперетравлені цукри, отримані з кормом. *Lactobacillus spp.* разом з іншими ацидофільними бактеріями (*Acetobacteriaceae* і *Bifidobacteriaceae*) відіграють важливу роль у виробництві коротколанцюгових жирних кислот (SCFA), таких як оцтова кислота, або інших кислотних сполук, таких як молочна кислота, які засвоюються задньою кишкою комах,

доповнюючи харчування медоносних бджіл, особливо взимку [38].

Фармацевтичне та нутрицевтичне застосування *Lactobacillus spp.* також представляє інтерес: їх здатність стимулювати імунну систему господаря та конкурувати з кишковими патогенними мікроорганізмами може сприяти їх застосуванню як пробіотиків для відновлення незбалансованої кишкової мікробіоти у людей і тварин.

Нами раніше проведено дослідження з вивчення впливу пробіотиків різного видового призначення на організм бджіл. Ефективність використаних препаратів оцінювали відповідно до показника природного відмирання бджіл на фоні згодовування досліджуваних засобів. Отримані дані свідчать про достовірне ( $p \leq 0,05$ ) сповільнення природного відмирання бджіл у варіанті, де згодовували специфічний пробіотик для бджіл Апі-нормін, порівняно з контролем. Результати щодо дослідження можуть бути пов'язані з адаптацією мікроорганізмів, що належать до нормофлори бджіл, тобто пристосувалися до умов існування, які характерні для кишківника корисних комах [11].

Іранськими вченими було проведено дослідження з виділення пробіотичних бактерій з меду, які містять детальну інформацію про генетичне типування виділених бактерій для встановлення їх виду. В результаті цього експерименту було виявлено 13 видів лактобактерій і детально описано їх властивості [15]. Подібне дослідження було проведено з вивчення виділених з меду лактобацил, зокрема їх пробіотичних властивостей та протимікробної дії щодо патогенів харчового походження [16].

Також проведено дослідження з виділення бактерій з меду, що зберігався впродовж 1-го року. Пробиотичні культури виділяли за допомогою посівів на селективні середовища, далі проводили виділення чистих культур і типування їх за допомогою ПЛР з виявленням послідовностей 16S-pPHK. В результаті дослідження було виявлено наявність бактерій родів *Enterococcus* та *Lactobacillus* [18]. Тривале зберігання пробіотичних бактерій може свідчити про наявність досить сильних природних консервантів у меді, що мають пригнічуючі властивості стосовно патогенної мікрофлори.

Малазійські вчені також виділили бактерії роду *Lactobacillus* зі стільників медоносною бджолою виду *Apis dorsata*. В результаті дослідження було виділено молочнокислі бактерії, проведено генетичні дослідження 16S-pPHK методом ПЛР і встановлено їх належність до роду *Lactobacillus spp.* Це дослідження свід-

чить про зберігання бактерій в запечатаних стільниках [17].

Нами раніше було проведено дослідження з виділення, ідентифікації та характеристики бактеріальних культур, отриманих зі свіжовідкачаного меду. Для відпрацювання методів та підходів до виділення пробіотичних мікроорганізмів зі свіжовідкачаного меду проведено серію висівань на поживні середовища, специфічні для різних видів пробіотичних мікроорганізмів. Водночас проведено дослідження їх біохімічних та культуральних властивостей, а також антагоністичних властивостей щодо збудників бактеріальних хвороб бджіл. В результаті дослідження показано, що зі свіжовідкачаного меду можна виділити бактерії родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та *Enterococcus*, що характерні для нормофлори кишківника бджіл і доведено їх можливість пригнічувати ріст патогенних мікроорганізмів *in vitro* [19].

**Висновки.** Проведено дослідження з виділення та ідентифікації пробіотичних бактерій зі свіжовідкачаного меду різного ботанічного походження. Прослідковано динаміку та інтенсивність росту бактерій залежно від терміну зберігання меду. Встановлено, що виділення бактерій можливе з першої доби дослідження, досягає свого піку на 2-гу та 3-тю добу після відкачування меду. Ріст бактерій припиняється на 4-ту добу зберігання меду. Доведено, що пробіотичні бактерії виділяються зі стільників з медом після 6 місяців зберігання без втрати пробіотичних властивостей. Виправдано використання свіжовідкачаного меду як джерела отримання бактерій нормофлори кишківника бджіл. Вдосконалено та відпрацьовано методику виділення бактерій нормофлори кишківника бджіл, а саме родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та *Enterococcus* із меду, яка полягає у використанні меду впродовж перших трьох діб після відкачування. Запропонована нами вдосконалена методика виділення пробіотичних бактерій і культур в подальшому може бути використана для конструювання специфічних пробіотиків для бджіл.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Wu M., Sugimura Yu., Taylor D. M., Yoshizawa M. Honeybee Gastrointestinal Bacteria for Novel and Sustainable Disease Control Strategies. *Journal of Developments in Sustainable Agriculture*. 2013. Vol. 8. Issue 2. P. 85–90. DOI:10.11178/jdsa.8.85
2. Fowler A. E., Irwin R.E., Adler L.S. Parasite defense mechanisms in bees: behavior, immunity, antimicrobials, and symbionts. *Emerging Topics in Life Sciences*. 2020. Vol. 4. Issue 1. P. 59–76. DOI:10.1042/ETLS20190069

3. Kwong W.K., Moran A.N. Gut microbial communities of social bees. *Nature reviews. Microbiology*. 2016. Vol. 14. P. 374–384. DOI:10.1038/nrmi-cro.2016.43.
4. Endo A., Salminen S. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Systematic and applied microbiology*. 2013. Vol. 36. Issue 6. P. 444–448. DOI:10.1016/j.syapm.2013.06.002
5. *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera* / T. C. Olofsson et al. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2014. Vol. 64. Part 9. P. 3109–3119. DOI:10.1099/ijs.0.059600-0
6. Killer J., Dubná S., Sedláček I., Švec P. *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2014. Vol. 64. Issue 1. P. 152–157. DOI:10.1099/ijs.0.053033-0
7. Updated list of QPS-recommended microorganisms for safety risk assessments carried out by Efsa / E. B. Panel et al. *Zenodo*, 2023. DOI:10.5281/zenodo.7554079
8. Adedokun S. A., Jaynes P., Payne R. L., Todd J. Applegate. Standardized Ileal Amino Acid Digestibility of Corn, Corn Distillers' Dried Grains with Solubles, Wheat Middlings, and Bakery By-Products in Broilers and Laying Hens. *Poultry science*. 2014. Vol. 94. Issue 10. P. 2480–2487. DOI:10.3382/ps/pev226
9. Strategies to increase the hygienic and economic value of fresh fish: Biopreservation using lactic acid bacteria of marine origin / B. Gómez-Sala et al. *International journal of food microbiology*. 2016. Vol. 223. P. 41–49. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.005
10. Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention / S. A. Ibrahim et al. *Foods*. Vol. 10. Issue 12. 3131 p. DOI:10.3390/foods10123131
11. Видоспецифічність пробіотичних засобів для бджіл / Г. В. Постоєнко та ін. *Науково-виробничий журнал "Бджільництво України"*. Вип. 1. № 10. С.40–45. DOI:10.46913/beekeepingjournal.2022.10.06
12. Isolation and identification of lactic acid bacteria from the intestinal tracts of honey bees, *Apis mellifera* L., in Egypt / H. M. Elzeini et al. *Journal of Apicultural Research*. 2021. Vol. 60. Issue 2. P. 349–357. DOI: 10.1080/00218839.2020.1746019
13. Extensive intra-phylogroup diversity in lactobacilli and bifidobacteria from the honeybee gut / K. M. Ellegaard et al. *BMC genomics*, 2015. Vol. 16. Issue 1. 284 p. DOI:10.1186/s12864-015-1476-6
14. Evaluation of different bacterial honey isolates as probiotics and their efficient roles in cholesterol reduction/ N. O. Abdelsamad et al. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022. Vol. 38. 106 p. DOI:10.1007/s11274-022-03259-8
15. Isolation and characterization of the lactobacillus strain from honey and its probiotic properties / M. E. Goli Mehdi Abadi et al. *Iranian journal of microbiology*. 2023. Vol. 15. No 3. P. 439–447. DOI:10.18502/ijm.v15i3.12905
16. Lashani E., Davoodabadi A., Soltan Dallal M. M. Some probiotic properties of *Lactobacillus* species isolated from honey and their antimicrobial activity against foodborne pathogens. *Veterinary research forum: an international quarterly journal*. Vol. 11. Issue 2. P. 121–126. DOI:10.30466/vrf.2018.90418.2188
17. Tajabadi N., Mardan M., Abdul Manap M. Y., Mustafa S. Molecular identification of *Lactobacillus* spp. isolated from the honey comb of the honey bee (*Apis dorsata*) by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Apicultural Research*. Vol. 52. Issue 5. P. 235–241. DOI:10.3896/IBRA.1.52.5.10
18. Feizabadi F., Sharifan A., Tajabadi N. Isolation and identification of lactic acid bacteria from stored *Apis mellifera* honey. *Journal of Apicultural Research*. 2021. Vol. 60. Issue 3. P. 421–426. DOI:10.1080/00218839.2020.1765490
19. Виділення, ідентифікація та характеристика пробіотичних культур з меду бджолиного / О.І. Гордієнко та ін. *Науково-виробничий журнал "Бджільництво України"*. 2022. Вип. 1. № 6. DOI:10.46913/beekeepingjournal.2021.6.01
20. ДСТУ 8684:2016 Мед і продукти бджільництва. Готування проб і розведень для мікробіологічного дослідження. Чинний від 1.10.2017. Київ: Держстандарт України, 2017. 13 с.
21. Strain-level diversity of commercial probiotic isolates of *Bacillus*, *Lactobacillus*, and *Saccharomyces* species illustrated by molecular identification and phenotypic profiling / J. M. Ansari et al. *PloS one*, 2019. Vol. 14. Issue 3. e0213841. DOI:10.1371/journal.pone.0213841
22. Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms-From Past to Present / R. Franco-Duarte et al. *Microorganisms*, 2019. Vol. 7. Issue 5. 130 p. DOI:10.3390/microorganisms7050130
23. Shigwedha N., Ji L. Bifidobacterium in Human GI Tract: Screening, Isolation, Survival and Growth Kinetics in Simulated Gastrointestinal Conditions [Internet]. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. InTech. 2013. DOI:10.5772/50457
24. Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee / N. Tajabadi et al. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013. Vol. 44. Issue 3. P. 717–722. DOI:10.1590/S1517-83822013000300008
25. *Enterococcus faecium* isolated from healthy dogs for potential use as probiotics / K. A. Abd El-Razik et al. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2020. Vol. 23. No 2. P. 197–205. DOI:10.15547/bjvm.2213
26. Alberoni D., Gaggia F., Baffoni L., Di Gioia D. Beneficial microorganisms for honey bees: Problems and progresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016. Vol. 100. P. 9469–9482. DOI:10.1007/s00253-016-7870-4



27. Mustar S., Nurliayana I. A Sweeter Pill to Swallow: A Review of Honey Bees and Honey as a Source of Probiotic and Prebiotic Products. *Foods*, 2022. Vol. 11. Issue 14. 2102 p. DOI:10.3390/foods11142102
28. Antimicrobial Activity against *Paenibacillus* larvae and Functional Properties of *Lactiplantibacillus plantarum* Strains: Potential Benefits for Honeybee Health / M. Iorizzo et al. *Antibiotics*. 2020. Vol. 9. Issue 8. 442 p. DOI:10.3390/antibiotics9080442
29. Raymann K., Moran N. A. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current opinion in insect science*. 2018. Vol. 26. P. 97–104. DOI:10.1016/j.cois.2018.02.012
30. Fructose-rich niches traced the evolution of lactic acid bacteria toward fructophilic species / P. Filannino et al. *Critical reviews in microbiology*. 2019. Vol. 45. Issue 1. P. 65–81. DOI:10.1080/1040841X.2018.1543649
31. Royan M. Mechanisms of Probiotic Action in the Honeybee. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. 2019. Vol. 29. Issue 2. P. 95–103. DOI:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2019025358
32. Ramos O. Y., Marina Basualdo M., Libonatti C., Vega M. F. Current status and application of lactic acid bacteria in animal production systems with a focus on bacteria from honey bee colonies. *Journal of applied microbiology*. 2020. Vol. 128. Issue 5. P. 1248–1260. DOI:10.1111/jam.14469
33. Kwong W. K., Mancenido A. L., Moran N. A. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *Royal Society open science*. 2017. Vol. 4. Issue 2. 170003. DOI:10.1098/rsos.170003
34. Janashia I., Rabesona H., Hwanhelm N., Choiset Y. Protection of honeybee *Apis mellifera* by its endogenous and exogenous lactic flora against bacterial infections. *Annals of Agrarian Science*. 2016. Vol. 14. Issue 3. P. 1–5. DOI:10.1016/j.aasci.2016.07.002
35. Rokop Z. P., Horton M.A., Newton I. L. Interactions between Cooccurring Lactic Acid Bacteria in Honey Bee Hives. *Applied and environmental microbiology*. 2015. Vol. 81. Issue 20. P. 7261–7270. DOI:10.1128/AEM.01259-15
36. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees - an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities / T. C. Olofsson et al. *International wound journal*. 2016. Vol. 13. Issue 5. P. 668–679. DOI:10.1111/iwj.12345
37. Antagonistic Activity against *Ascosphaera apis* and Functional Properties of *Lactobacillus kunkeei* Strains / M. Iorizzo et al. *Antibiotics*. 2020. Vol. 9. Issue 5. 262 p. DOI:10.3390/antibiotics9050262
38. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome / F. J. Lee et al. *Environmental microbiology*. 2015. Vol. 17. Issue 3. P. 796–815. DOI:10.1111/1462-2920.12526
2. Fowler, A. E., Irwin, R. E., Adler, L. S. (2020). Parasite defense mechanisms in bees: behavior, immunity, antimicrobials, and symbionts. *Emerging topics in life sciences*, 4 (1), pp. 59–76. DOI:10.1042/ETLS20190069
3. Kwong, W. K., Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature reviews. Microbiology*, 14 (6), pp. 374–384. DOI:10.1038/nrmicro.2016.43
4. Endo, A., Salminen, S. (2013). Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Systematic and applied microbiology*, 36 (6), pp. 444–448. DOI:10.1016/j.syapm.2013.06.002
5. Olofsson, T. C., Alsterfjord, M., Nilson, B., Butler, È., Vásquez, A. (2014). *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64, Part 9, pp. 3109–3119. DOI:10.1099/ijs.0.059600-0
6. Killer, J., Dubná, S., Sedláček, I., Švec, P. (2014). *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64, Part 1, pp. 152–157. DOI:10.1099/ijs.0.053033-0
7. Panel, E. B., Allende, K. K., Alvarez-Ordóñez, A., Declan, A. B., Bover-Cid, S., Lieve, H. (2023). Updated list of QPS-recommended microorganisms for safety risk assessments carried out by Efsa. *Zenodo*. DOI:10.5281/zenodo.7554079
8. Adedokun, S. A., Jaynes, P., Payne, R. L., Applegate, T. J. (2015). Standardized Ileal Amino Acid Digestibility of Corn, Corn Distillers' Dried Grains with Solubles, Wheat Middlings, and Bakery By-Products in Broilers and Laying Hens. *Poultry science*, 94 (10), pp. 2480–2487. DOI:10.3382/ps/pev226
9. Gómez-Sala, B., Herranz, C., Díaz-Freitas, B., Hernández, P. E., Sala, A., Cintas, L. M. (2016). Strategies to increase the hygienic and economic value of fresh fish: Biopreservation using lactic acid bacteria of marine origin. *International journal of food microbiology*, 223, pp. 41–49. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.005
10. Ibrahim, S. A., Ayivi, R. D., Zimmerman, T., Siddiqui, S. A., Altemimi, A. B., Fidan, H., Esatbeyoglu, T., Bakhshayesh, R. V. (2021). Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10 (12), 3131 p. DOI:10.3390/foods10123131
11. Postoienko, H. V., Postoienko, V. O., Yefimenko, T. M., Odnosum, H. V., Nedosiekov, V. V. (2023). *Vydospetsyfychnist probiotychnykh zasobiv dlia bdzhil [Species specificity of probiotics for bees]. Naukovo-vyrobnychi zhurnal "Bdzhilnytstvo Ukrainy" [Scientific and production journal "Beekeeping of Ukraine"]*, Vol. 1, Issue 10, pp. 40–45. DOI:10.46913/beekeepingjournal.2022.10.06 (in Ukrainian)

## REFERENCES

1. Wu, M., Sugimura, Y., Taylor, D., Yoshiyama, M. (2013). Honeybee Gastrointestinal Bacteria for Novel and Sustainable Disease Control Strategies. *J. Dev. Sustain. Agric.*, 8, pp. 85–90. DOI:10.11178/jdsa.8.85



12. Elzeini, H. M., Abdel-atti Ali, A., Nasr, N. F., Elenany, Y. E., Moneim Hassan, A. A. (2021). Isolation and identification of lactic acid bacteria from the intestinal tracts of honey bees, *Apis mellifera* L., in Egypt. *Journal of Apicultural Research*, 60, 2, pp. 349–357. DOI:10.1080/00218839.2020.1746019
13. Ellegaard, K. M., Tamarit, D., Javelind, E., Olofsson, T. C., Andersson, S. G., Vásquez, A. (2015). Extensive intra-phylotype diversity in lactobacilli and bifidobacteria from the honeybee gut. *BMC genomics*, 16 (1), 284 p. DOI:10.1186/s12864-015-1476-6
14. Abdelsamad, N.O., Esawy, M.A., Mahmoud, Z.E. (2022). Evaluation of different bacterial honey isolates as probiotics and their efficient roles in cholesterol reduction. *World J Microbiol Biotechnol*, 38, 106 p. DOI:10.1007/s11274-022-03259-8
15. Goli Mehdi Abadi, M. E., Hosseini-Safa, A., Habibi, S., Dehghan, M., Forouzani-Moghaddam, M. J., Oshaghi, M. (2023). Isolation and characterization of the lactobacillus strain from honey and its probiotic properties. *Iranian journal of microbiology*, 15 (3), pp. 439–447. DOI:10.18502/ijm.v15i3.12905
16. Lashani, E., Davoodabadi, A., Soltan Dallal, M. M. (2020). Some probiotic properties of *Lactobacillus* species isolated from honey and their antimicrobial activity against foodborne pathogens. *Veterinary research forum: an international quarterly journal*, 11 (2), pp. 121–126. DOI:10.30466/vrf.2018.90418.2188
17. Tajabadi, N., Mardan, M., Yazid, M., Manap, A., Shuhaimi, M. (2013). Molecular identification of *Lactobacillus* spp. isolated from the honey comb of the honey bee (*Apis dorsata*) by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Apicultural Research*, 52, 5, pp. 235–241. DOI:10.3896/IBRA.1.52.5.10
18. Feizabadi, F., Sharifan, A., Tajabadi, N. (2021). Isolation and identification of lactic acid bacteria from stored *Apis mellifera* honey. *Journal of Apicultural Research*, 60, 3, pp. 421–426. DOI:10.1080/00218839.2020.1765490
19. Hordiienko, O. I., Postoienko, H. V., Postoienko, V. O., Napnenko, O. O., Artemenko, V. Yu., Tynydyk, V. S. (2022). Vydilennia, identyfikatsiia ta kharakterystyka probiotychnykh kultur z medu bdzholynoho [Isolation, identification and characterization of probiotic cultures from bee honey]. *Naukovo-vyrobnychi zhurnal "Bdzhilnyctvo Ukrainy"* [Scientific and production journal "Beekeeping of Ukraine"], 1 (6). DOI:10.46913/beekeepingjournal.2021.6.01 (in Ukrainian)
20. DSTU 8684:2016 Honey and beekeeping products. Preparation of samples and dilutions for microbiological research. Valid from 1.10.2017. [DSTU 8684:2016 Med i produkty bdzhil'nyctva. Gotuvannja prob i rozveden' dlja mikrobiologichnogo doslidzhuvannja. Chynnyj vid 1.10.2017.]. Kyiv: State Standard of Ukraine, 2017, 13 p.
21. Ansari, J. M., Colasacco, C., Emmanouil, E., Kohlhepp, S., Harriott, O. (2019). Strain-level diversity of commercial probiotic isolates of *Bacillus*, *Lactobacillus*, and *Saccharomyces* species illustrated by molecular identification and phenotypic profiling. *PLoS one*, 14 (3), e0213841. DOI:10.1371/journal.pone.0213841
22. Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Stępień, K., Leszczewicz, M., Relison Tintino, S., Alexandrino de Souza, V. C., Sharifi-Rad, J., Coutinho, H. D. M., Martins, N., Rodrigues, C. F. (2019). Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms-From Past to Present. *Microorganisms*, 7 (5), 130 p. DOI:10.3390/microorganisms7050130
23. Shigwedha, N., Ji, L. (2013). Bifidobacterium in Human GI Tract: Screening, Isolation, Survival and Growth Kinetics in Simulated Gastrointestinal Conditions. *InTech*. DOI:10.5772/50457
24. Tajabadi, N., Mardan, M., Saari, N., Mustafa, S., Bahreini, R., Manap, M. Y. A. (2013). Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 (3), pp. 717–722. DOI:10.1590/S1517-83822013000300008
25. Abd El-Razik, K. A., Ibrahim, E. S., Younes, A. M., Arafa, A. A., Abuelnaga, A. S. M., Hedia, R. H. (2020). *Enterococcus faecium* isolated from healthy dogs for potential use as probiotics. *Bulg. J. Vet. Med.*, 23, no. 2, pp. 197–205. DOI:10.15547/bjvm.2213
26. Alberoni, D., Gaggia, F., Baffoni, L., Di Gioia, D. (2016). Beneficial microorganisms for honey bees: Problems and progresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, pp. 9469–9482. DOI:10.1007/s00253-016-7870-4
27. Suraiami, M., Nurliayana, I. (2022). A Sweeter Pill to Swallow: A Review of Honey Bees and Honey as a Source of Probiotic and Prebiotic Products. *Foods*, 11, no. 14. 2102 p. DOI:10.3390/foods11142102
28. Iorizzo, M., Testa, B., Lombardi, S. J., Ganassi, S., Ianiro, M., Letizia, F., Succi, M., Tremonte, P., Vergalito, F., Cozzolino, A., Sorrentino, E., Coppola, R., Petrarca, S., Mancini, M., De Cristofaro, A. (2020). Antimicrobial Activity against *Paenibacillus* larvae and Functional Properties of *Lactiplantibacillus plantarum* Strains: Potential Benefits for Honeybee Health. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9 (8), 442 p. DOI:10.3390/antibiotics9080442
29. Raymann, K., Moran, N. A. (2018). The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current opinion in insect science*, 26, pp. 97–104. DOI:10.1016/j.cois.2018.02.012
30. Filannino, P., Di Cagno, R., Tlais, A. Z. A., Cantatore, V., Gobbetti, M. (2019). Fructose-rich niches traced the evolution of lactic acid bacteria toward fructophilic species. *Critical reviews in microbiology*, 45 (1), pp. 65–81. DOI:10.1080/1040841X.2018.1543649
31. Royan, M. (2019). Mechanisms of Probiotic Action in the Honeybee. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. 29 (2), pp. 95–103. DOI:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2019025358
32. Ramos, O. Y., Basualdo, M., Libonatti, C., Vega, M. F. (2020). Current status and application of lactic acid bacteria in animal production systems with a focus on bacteria from honey bee colonies. *Journal of applied microbiology*, 128 (5), pp. 1248–1260. DOI:10.1111/jam.14469
33. Kwong, W. K., Mancenido, A. L., Moran, N. A. (2017). Immune system stimulation by the native gut

microbiota of honey bees. Royal Society open science, 4 (2), 170003. DOI:10.1098/rsos.170003

34. Janashia, I. (2016). Protection of honeybee *Apis mellifera* by its endogenous and exogenous lactic flora against bacterial infections. Annals of Agrarian Science. DOI:10.1016/j.aasci.2016.07.002

35. Rokop, Z. P., Horton, M. A., Newton, I. L. (2015). Interactions between Cooccurring Lactic Acid Bacteria in Honey Bee Hives. Applied and environmental microbiology, 81 (20), pp. 7261–7270. DOI:10.1128/AEM.01259-15

36. Olofsson, T. C., Butler, È., Markowicz, P., Lindholm, C., Larsson, L., Vásquez, A. (2016). Lactic acid bacterial symbionts in honeybees - an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. International wound journal, 13 (5), pp. 668–679. DOI:10.1111/iwj.12345

37. Iorizzo, M., Lombardi, S.J., Ganassi, S., Testa, B., Ianiro, M., Letizia, F., Succi, M., Tremonte, P., Vergalito, F., Cozzolino, A., Sorrentino, E., Coppola, R., Petrarca, S., Mancini, M., Cristofaro, A. (2020). Antagonistic Activity against *Ascosphaera apis* and Functional Properties of *Lactobacillus kunkeei* Strains. Antibiotics (Basel, Switzerland), 9 (5), 262 p. DOI:10.3390/antibiotics9050262

38. Lee, F. J., Rusch, D. B., Stewart, F. J., Mattila, H. R., Newton, I. L. (2015). Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. Environmental microbiology, 17 (3), pp. 796–815. DOI:10.1111/1462-2920.12526

#### Improvement of the probiotic cultures method isolation from freshly extracted honey

Postoienko H., Postoienko V., Hordienko O., Napnenko O., Nedosekov V.

The study of probiotic microorganisms isolated from bee honey has recently become widespread

in the world and is of great interest both for the prevention and treatment of bee diseases, and as a source of probiotics for the design of drugs useful for humans and animals. However, no studies have been conducted to study the duration of probiotic bacteria storage in honey after it has been pumped out of the combs. Three types of honey (acacia, sunflower and multi-herb) were studied to determine the intensity of growth of probiotic bacteria on the first, second, third and fourth day after pumping, as well as after storing honey for 6 months in sealed honeycombs. Honey samples were prepared in dilution with MRS broth, sown on a solid nutrient medium, the results were recorded after 48 hours by counting colonies of different species. Selected cultures were characterized by cultural, morphological and biochemical properties. It was established that bacteria are released during the first 3 days after honey is pumped out, on the other hand, on the 4th day of storage, there is no growth of probiotic bacteria, which indicates the impossibility of obtaining them. The prospect of using honey of any different botanical origin for the isolation of probiotic bacteria has been proven. A study of honey stored in sealed honeycombs for 6 months confirmed the hypothesis that normal flora bacteria with probiotic properties are stored in honeycombs for a long time and can be used for their isolation, identification and further use. In the course of the study, the method of isolating bacteria of the normal flora of the intestine of bees, namely *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum* and *Enterococcus faecium* from freshly extracted honey, was improved and developed.

**Key words:** normal flora, probiotic bacteria, freshly squeezed honey, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*.



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



#### ORCID iD:

Постоєнко Г.В.  
Постоєнко В.О.  
Гордієнко О.І.  
Напненко О.О.  
Недосєков В.В.

<https://orcid.org/0000-0002-9889-8028>  
<https://orcid.org/0000-0002-6515-7004>  
<https://orcid.org/0009-0007-2133-8114>  
<https://orcid.org/0000-0003-1763-8564>  
<https://orcid.org/0000-0001-7581-7478>