



БИОМИКА/BIOMICS

ISSN 2221-6197 <http://biomicsj.ru>



ВЫДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ МЕДОВОГО ЗОБИКА ТЕМНОЙ ЛЕСНОЙ ПЧЕЛЫ (*APIS MELLIFERA MELLIFERA* L.)

Гайфуллина Л.Р., Салтыкова Е.С., Каскинова М.Д., Поскряков А.В., Николенко А.Г.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

Россия, Уфа, 450054, Проспект Октября, 71, e-mail: lurim78@mail.ru

В настоящее время известно, что в медовом зобике медоносной пчелы содержится большое количество пробиотических бактерий, обладающих широким спектром антимикробной активности против патогенных для пчел и человека микроорганизмов [Olofsson et al., 2014]. Численность и видовой состав микрофлоры медового зобика зависит от сезона, источника и количества нектара, здоровья пчел и наличия других микроорганизмов в собранном нектаре [Butler et al., 2013]. Проблема зимнего ослабления и гибели пчелиных семей во многих странах, в том числе и в России, по-прежнему крайне актуальна. Северные популяции подвида темная лесная пчела отличаются более высокой устойчивостью к патогенным микроорганизмам. Мы предполагаем, что важную роль в этом играет специфика микробиома у популяций темной лесной пчелы и тесно связанный с ней общественный иммунитет пчелиных семей. Нами получены изолированные колонии микроорганизмов из медового зобика рабочих пчел башкирской популяции *A. mellifera mellifera* L., определена подвижность, отношение к окраске по Граму, каталазная активность и ферментация углеводов микроорганизмов из данных колоний. Выделенные из медового зобика здоровых рабочих пчел чистые культуры бактерий по морфологическим, тинкториальным и биохимическим признакам являются представителями рода *Lactobacillus*, разделяющимися по избирательности ферментации углеводов на 4 группы. Общая обсемененность медового зобика пчел микроорганизмами значительно ниже, чем зрелого меда, что подтверждает антагонизм полезной микрофлоры зобика в отношении посторонней микробиоты.

Ключевые слова: пробиотики, молочнокислые бактерии, темная лесная пчела, медовый зобик

Цитирование: Гайфуллина Л.Р., Салтыкова Е.С., Каскинова М.Д., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Выделение молочнокислых бактерий из медового зобика темной лесной пчелы (*Apis mellifera mellifera* L.) // Биомика. 2019. Т.11(2). С. 190 - 197. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-17

ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM HONEY STOMACH OF DARK FOREST BEE (*APIS MELLIFERA MELLIFERA* L.)

Gaifullina L.R., Saltykova E.S., Kaskinova M.D., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G.

Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS,

Russia, Ufa, Prospekt Oktyabry, 71, e-mail: lurim78@mail.ru

Currently, it is known that the honey stomach of a honeybee contains a large number of probiotic bacteria with a broad spectrum of antimicrobial activity against pathogenic for bees and humans microorganisms [Olofsson et al., 2014]. The number and microflora species composition of the honey stomach depends on the season, the source and amount of nectar, the health of bees and the presence of other microorganisms in the collected nectar [Butler et al., 2013]. The problem of winter easing and death of bee colonies in many countries, including Russia, is still extremely relevant. The northern populations of the dark forest bee subspecies are more resistant to pathogenic microorganisms. We assume that the specificity of the microbiome in populations of the dark forest bee and the closely related social immunity of bee colonies play an important role in this. We have obtained isolated colonies of microorganisms from the worker bee honey stomachs of the Bashkir population of *A. mellifera mellifera* L., determined the motility, the ratio to the Gram stain, catalase activity and the fermentation of carbohydrates of microorganisms from these colonies. Pure bacterial cultures isolated from the honey stomach of healthy worker bees by morphological,

tinctorial and biochemical characteristics are representatives of the genus *Lactobacillus*, divided by the selectivity of carbohydrate fermentation into 4 groups. The general contamination of honey stomach with microorganisms is significantly lower than that of mature honey, which confirms the antagonism of the useful stomach microflora with respect to extraneous microbiota.

Keywords: probiotics, lactic acid bacteria, dark forest bee, honey stomach

Citation: Gaifullina L.R., Saltykova E.S., Kaskinova M.D., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. Isolation of lactic acid bacteria from honey stomach of dark forest bee (*Apis mellifera mellifera* L.) *Biomics*. 2019. T.11(2). С. 190 - 197. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-17 (In Russian)

Введение

Впервые симбиотическая флора из медового зобика и свежего меда шведских пчел была исследована и связана со многими лечебными свойствами меда в 2008 году [Olofsson, Vásquez, 2008]. В настоящее время известно, что в медовом зобике медоносной пчелы содержится большое количество пробиотических бактерий, обладающих широким спектром антимикробной активности против различных микроорганизмов, патогенных для пчел и человека [Olofsson et al., 2014]. В составе микробиоты медового зобика сочетанием классических микробиологических методов и метода секвенирования генов 16S рРНК было идентифицировано приблизительно 40 штаммов молочнокислых бактерий из 9 видов *Lactobacillus* и 4 видов *Bifidobacterium*, большинство из которых является вновь описанными видами. Численность и видовой состав микрофлоры медового зобика зависит от сезона, источника и количества нектара, здоровья пчел и наличия других микроорганизмов в собранном нектаре [Vasquez et al., 2012; Butler et al., 2013]. Так, низкое ранней весной количество молочнокислых бактерий увеличивается в медовом зобике с фуражировочной активностью пчел. Транзиторные микробы, собранные с цветов, провоцируют рост молочнокислой флоры в медоносных пчелах и производство антимикробных белков [Butler et al., 2013]. Каждый член симбиотической микробиоты пчел ферментирует нектар, выделяет штамм-специфичный спектр метаболитов и, таким образом, участвует в процессе превращения нектара в мед [Olofsson et al., 2014]. Вещества, вырабатываемые молочнокислыми бактериями в процессе ферментации меда, присутствуют в свежем и сохраняются в зрелом меде. Кроме того, предполагается, что данные микроорганизмы играют ключевую роль в производстве перги [Vasquez, Olofsson, 2009].

Предполагается, что пчелы и молочнокислая микрофлора развивались во взаимной зависимости друг от друга: бактерии получили нишу, в которой были доступны питательные вещества, а пчелы были защищены от вредных микроорганизмов [Olofsson, Vasquez, 2008]. Так, отдельные виды молочнокислых бактерий производят соединения с бактериостатической или бактерицидной

активностью: органические кислоты, свободные жирные кислоты, этанол, бензоат, ферменты, перекись водорода, антимикробные пептиды и бактериоцины [De Vuyst, Leroy, 2008]. Антагонистическое действие молочнокислых бактерий, выделенных из медового зобика и меда, по отношению к широкому спектру микроорганизмов создает перспективу их применения в борьбе с патогенами человека и животных, в том числе устойчивых к современным антибиотикам [Butler et al., 2014; Olofsson et al., 2014; Piccart et al., 2016].

На сегодняшний день клинически и экспериментально доказаны иммунотропные и иммуностимулирующие механизмы действия пробиотиков на организм человека [De Vrese, Schrezenmeier, 2008]. Опосредованное действие молочнокислых бактерий на патогены путем активации иммунной системы показаны также в организме медоносной пчелы. Так, добавление в корм *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* вызывает у пчел повышение уровня экспрессии генов антимикробных пептидов абецина, дефенсина и гименоптецина [Evans, Lopez, 2004; Yoshiyama et al., 2013]. Данные результаты свидетельствуют о том, что молочнокислые бактерии стимулируют врожденный иммунный ответ у медоносных пчел, и могут быть полезны для профилактики бактериальных заболеваний пчел. Профилактические методы, которые усиливают молочнокислую микрофлору пчел, могут способствовать повышению устойчивости медоносной пчелы, что особо актуально в свете современной проблемы коллапса пчелиных семей. Стимулирующие подкормки, содержащие пробиотические препараты на основе молочнокислых бактерий, улучшают микробиоценоз кишечника пчел, повышают силу, зимостойкость, продуктивность пчелиных семей, репродуктивные показатели маток [Мишуковская (Mishukovskaja), 2015]. Вместе с тем, имеются данные, что неверно выбранные пробиотики могут, напротив, нарушать работу иммунной системы насекомых и значительно увеличивать пчелиную смертность [Patruica and Mot, 2012]. Так, широко применяемый коммерческий пробиотик на основе *Lactobacillus rhamnosus* увеличивал смертность фуражиров при нозематозе [Ptaszynska et al., 2016]. Предполагается, что интенсивное развитие

микроорганизмов, не являющихся естественными для пчел, может привести к вырождению перитрофической мембраны пчелиного кишечника, который вместе с кутикулой экзоскелета является первой линией обороны насекомых против различных патогенов. Исследования последних лет показывают, что наиболее эффективными пробиотиками для медоносной пчелы являются аборигенные для ее пищеварительного тракта микроорганизмы [Olofsson et al. 2014; Audisio et al. 2015; Ptaszynska et al., 2016].

Показано, что пищеварительный тракт пчел разных видов и подвидов населен как универсальными, так и специфическими штаммами пробиотических бактерий с уникальными свойствами, что обуславливает перспективность и актуальность поиска новых штаммов пробиотиков среди неисследованных групп пчел [Olofsson, Vásquez, 2008; Tajabadi et al., 2013]. Аборигенная для Башкортостана темная лесная пчела - эволюционно наиболее приспособленный к северным условиям подвид медоносной пчелы. Его устойчивость к климатическим факторам северной части видового ареала обусловлена такими особенностями защитных реакций, как низкий уровень окислительно-восстановительных процессов в норме, высокая реактивность ферментов антиоксидантной системы, пентозофосфатного цикла и фенолоксидазного каскада, высокий и стабильный уровень содержания гликозаминогликанов, способность к быстрой активации фагоцитов [Салтыкова и др. (Saltykova et al.), 2016]. Мы предполагаем, что важную роль в этом играет специфика микробиома у популяций темной лесной пчелы и тесно связанный с ней общественный иммунитет пчелиных семей. Целью работы является изучение симбиотической молочнокислой микрофлоры медового зобика здоровых особей башкирской популяции *Apis mellifera mellifera* L. как одного из механизмов природной устойчивости темной лесной пчелы.

Материалы и методы

В качестве источника биоматериала служили здоровые рабочие пчелы, изъятые из пчелиной семьи непосредственно перед взятием проб, состояние кишечника которых оценивалось по 4-бальной шкале [Сердюченко и др. (Serdjuchenko et al.), 2009] от 3 до 4 баллов.

Биоматериал (содержимое медового зобика) выделяли в стерильных условиях. Насекомых усыпляли хлороформом, обрабатывали в 70%-ном этаноле и промывали в стерильном физиологическом растворе. Препарировали зобик и с помощью инсулинового шприца переносили его содержимое в пробирку с 2 мл физиологического раствора, получая, таким образом, исходную суспензию. Для получения

суспензии меда 2 г образца растворяли в 4 мл физиологического раствора.

Для выявления обсемененности зобиков и меда использовали универсальную среду АГВ. Для выделения и культивирования штаммов молочнокислых бактерий – селективную среду Лактобакагар. Образцы инкубировали в термостате при 37°C.

Для выделения изолированных колоний применяли метод секторального посева по Голду.

Бактериоскопическое исследование проводили с использованием светового микроскопа-монокуляра Minimed 501.

Отношение бактерий к окраске по Граму определяли по ГОСТ 30425 с применением генцианового фиолетового в качестве основного красителя, раствора Люголя - протравливающего раствора, этилового спирта – обесцвечивающего раствора и фуксина – дополнительного красителя.

Для изучения подвижности микроорганизмов из колоний приготавливали препараты методом раздавленной капли и микроскопировали с помощью оптического микроскопа Minimed 501.

Каталазную активность культур определяли по ГОСТ 30425. 2 мл 0,03%-ного раствора перекиси водорода добавляли 0,1 мл суспензии бактерий. Пробы оставляли на 10 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 4%-ного молибдата аммония. В холостую пробу молибдат аммония добавляли сразу без инкубации. Интенсивность окраски измеряли при длине волны 410 нм против контроля на реактивы: 2,1 мл дистиллированной воды, 1 мл молибдата аммония. Активность рассчитывали по формуле:

$A \text{ миккатал/мг белка в мл суспензии} = (E_{\text{контр.}} - E_{\text{опыт}}) \times 1000 / 22,2 \times 600 \text{ белок (мг/мл)}$.

Определение ферментации углеводов проводили с использованием дисков с углеводами и бульона с бромкрезоловым пурпурным производства «HiMedia Laboratories Pvt. Limited», Индия. Готовили суспензию из чистых культур микроорганизмов и 0,1-0,15 мл высевали на жидкую среду Лактобакагар. Инкубацию проводили в течение 2-х суток при 37°C. Затем выполняли разведения от 10^{-1} до 10^{-8} в стерильном физиологическом растворе и высевали на чашки Петри с плотной средой Лактобакагар. Рассев выполняли с каждого разведения. Инкубировали в течение 3-х суток при 37°C. Изолированные колонии, типичные для лактобацилл пересевали на полужидкую среду Лактобакагар. Через 2-е суток инкубации из всех пробирок выполняли контрольные мазки, после чего культуры использовали для постановки пестрого ряда. В состав пестрого ряда входили 5 субстратов: глюкоза, фруктоза, манноза, лактоза, манит. Бульон с бромкрезоловым пурпурным засеивали 2 каплями 48-часовой культуры со среды Лактобакагар с

последующим встряхиванием пробирки для лучшего размешивания. После посева испытуемого микроорганизма в каждую пробирку асептически помещали по 1 диску с соответствующим углеводом. Посевы инкубировали в течение 1-48 часов при 37°C. Результаты учитывали через 18 и 48 часов: при выращивании на среде с бромкрезоловым пурпурным образующаяся кислота способствовала окрашиванию среды в желтый цвет, а газ скапливался в поплавке.

Результаты и обсуждение

Бактериологический посев содержимого медовых зобиков и нативного меда на среду АГВ. Трехсуточные наблюдения за ростом микроорганизмов показали, что обсемененность нативного меда выше, чем микробиота содержимого медового зобика.

Таблица 1.

Динамика роста микроорганизмов, содержащихся в меде и медовом зобике, на среде АГВ

Биоматериал	Время инкубации, сутки		
	1	2	3
Медовые зобики	Нет роста	Незначительный рост, единичные колонии	Неравномерный рост, 10-15 колоний
Мёд	Нет роста	Неравномерный рост, 20-25 колоний	Сплошной рост

Table 1 - Growth dynamics of microorganisms contained in honey and honey stomach on the AGV medium

Biomaterial	Incubation time, days		
	1	2	3
Honey stomach	No growth	Slight growth, single colonies	Uneven growth, 10-15 colonies
Мёд Honey	No growth	Uneven growth. 20-25 colonies	Full lawn

Содержимое медового зобика представляет собой собранный пчелами цветочный нектар, 8-10% раствор сахаров в воде, претерпевающий процесс ферментации энзимами медоносной пчелы и естественной микробиоты, населяющей зобик [Olofsson et al., 2014]. В дополнении к последней, в содержимом зобика обнаруживаются микроорганизмы, собранные с растений, пади и воды [Madras-Majewska, 2016]. В сотах нектар дополнительно ферментируется, обезвоживается до содержания воды менее 20% и созревает в мед. Микрофлора меда изменяется в зависимости от созревания в сотах [Madras-Majewska, 2016]. В незрелом меде преобладают аэробные бактерии, но грибы встречаются в небольших количествах. В незрелом меде обычно встречается бактерии рода *Glucanobacter* и *Lactobacillus*, а также дрожжи. В зрелом меде количество данных бактерий снижается и по мере хранения сводится к 0. Антимикробные свойства меда, обусловленные высокой осмолярностью, низким pH, содержанием перекиси водорода и антимикробных веществ, препятствуют развитию вегетативных форм микроорганизмов. Таким образом, обсемененность

зрелого меда ограничена спорообразующими микроорганизмами, среди которых могут быть как полезные и нейтральные, так и патогенные для растений, пчел и человека. Согласно полученным в данной работе результатам, содержимое медового зобика значительно обсеменено микроорганизмами, несмотря на то, что оно, на первый взгляд, в силу обводненности, представляет собой более благоприятную среду для роста и развития микроорганизмов. Данное обстоятельство подтверждает антагонизм полезной микрофлоры зобика в отношении посторонней микробиоты. Известно, что универсальные или штамм-специфичные внеклеточные метаболиты лакто- и бифидобактерий проявляют бактериостатическую и бактерицидную активность посредством различных механизмов, таких как нарушение проницаемости клеточных мембран и синтез ДНК или изменение условий роста, например, путем снижения pH [Butler et al., 2014]. Так ингибирующий спектр микрофлоры медового зобика пчел европейских популяций охватывает 55 видов бактерий и 5 видов дрожжей, обнаруженных в цветах [Forsgren et al., 2010; Vasquez et al., 2012].

Бактериологический посев содержимого медовых зобиков на Лактобакагаре. Молочнокислые бактерии – за исключением бифидобактерий группа микроаэрофильных грамположительных микроорганизмов, функционально связанных по их способности сбраживать углеводы в гомо- или гетеро- ферментативном метаболизме с образованием молочной кислоты, представляющие собой неподвижные, каталазоотрицательные неспорообразующие кокки или палочки. Следовательно, выделение микроорганизмов с данными характеристиками и являлось целью нашей работы.

Таблица 2.

Характеристика изолированных колоний

№№ колонии	Окраска по Граму	Подвижность	Активность каталазы
1	+	отсутствует	-
2	+	отсутствует	-
3	+	отсутствует	-
4	+	отсутствует	-
5	+	отсутствует	-
6	+	отсутствует	-
7	+	отсутствует	-

Table 2 - Characteristics of isolated colonies

Nos of colony	Gram stain	Motility	Catalase activity
1	+	no	-
2	+	no	-
3	+	no	-
4	+	no	-
5	+	no	-
6	+	no	-
7	+	no	-

В результате посева содержимого медовых зобиков на селективную среду Лактобакагар была получена биомасса, содержащая грамположительные палочки. В результате пересева полученной биомассы на лактобакагар методом секторных посевов по Голду были получены изолированные колонии грамположительных палочек (всего 7), и далее высеяны на скошенный агар в пробирках для наработки массы чистых культур (Таблица 2).

Во всех 7-ми образцах подвижных микроорганизмов обнаружено не было, и каталазная активность не регистрировалась (Таблица 2).

Определение ферментации углеводов. Одним из таксономических признаков микроорганизмов является ферментативный спектр. Он характеризует семейства, рода и даже в ряде случаев виды микроорганизмов. Наличие экзоферментов определяется с применением дифференциально-диагностических сред. Для многих микроорганизмов, в том числе интересующих нас бактерий рода *Lactobacillus*, таксономическим признаком служит способность разлагать определенные углеводы с образованием кислот и газообразных продуктов. Данную способность микроорганизмов выявляют с помощью сред Гисса, содержащих различные углеводы (глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу и др.).

По истечении 48-часовой инкубации испытуемые образцы по соответствующим ферментируемым углеводам можно было разделить на группы: образцы чистых культур 4 и 7 и образцы 1 и 6 (Таблица 3). Чистые культуры 3 и 5 можно выделялись как отдельные таксономические группы.

Таблица 3.

Ферментация углеводов выделенными чистыми культурами после 48 часов инкубации

Углеводы	No 1	No 2	No 3	No 4	No 5	No 6	No 7
Глюкоза (кислота)	+	+	+	+	+	+	+
Глюкоза (газ)	-	-	-	-	+	-	-
Фруктоза	+	+	+	+	+	+	+
Лактоза	+	+	+	+	+	+	+
Манноза	+	+	-	+	+	+	+
Маннит	+	-	-	-	-	+	-

Table 3 - Fermentation of carbohydrates with isolated pure cultures after 48 hours of incubation

Carbohydrates	No 1	No 2	No 3	No 4	No 5	No 6	No 7
Glucose (acid)	+	+	+	+	+	+	+
Glucose (gas)	-	-	-	-	+	-	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	-	+	+	+	+
Mannit	+	-	-	-	-	+	-

Кроме того, исследуемые чистые культуры разделялись на гомоферментативные, образующие в результате ферментации глюкозы только кислоту (образцы № 1, 2, 3, 4, 6 и 7), и гетероферментативные, сбраживающие сахара по окислительному пентозофосфатному пути с образованием молочной кислоты, CO₂, этанола и/или уксусной кислоты (образец № 5). Чистая культура №5 может являться штаммом одного из следующих видов: *Lactobacillus fermentum*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*.

Исходя из полученных данных, выделенные из содержимого медового зобика рабочих особей *A. mellifera mellifera* чистые культуры микроорганизмов, являются грамположительными неподвижными палочковидными бактериями, растущими на питательной среде для выделения и культивирования молочнокислых бактерий Лактобакагар. Образцы под номерами 1, 2, 3, 5, 6 не обладают каталазной активностью, что дает основания полагать об их принадлежности роду *Lactobacillus*. Образцы 1 и 6 разлагают наиболее широкий спектр углеводов, образец 3 – наименьший. Особый интерес вызывает образец 5, являющийся гетероферментативным штаммом. Гетероферментативные молочнокислые бактерии обладают более широким набором ферментов в сравнении с гомоферментативными, а значит и большей способностью к синтезу различных биологически активных веществ. Данные микроорганизмы при ферментации глюкозы образуют кроме молочной кислоты большое количество летучих кислот, углекислоту, перекись водорода, этанол, диацетил, антибиотики [Lavermicocca et al., 2003; Strom et al., 2005], а, следовательно, отличаются более выраженной пробиотической активностью. Таким образом, выделение бактерий непосредственно из медового зобика позволяет получить пробиотическую составляющую микробиоты переднего отдела кишечника медоносной пчелы и использовать в дальнейших исследованиях по созданию нового пробиотика для повышения иммунитета пчёл.

Литература

1. Мишуковская Г.С. Применение пробиотиков для повышения продуктивности темной лесной пчелы башкирской популяции // Темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* L. Республики Башкортостан / Ред. Ильясов Р.А., Николенко А.Г., Сайфуллина Р.М. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2016. С. 185-187.
2. Салтыкова Е.С., Гайфуллина Л.Р., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Реализация защитного ответа на действие бактериального препарата у темной лесной пчелы башкирской популяции // Темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* L. Республики Башкортостан / Ред. Ильясов Р.А., Николенко А.Г., Сайфуллина Р.М. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2016. С. 172-176.
3. Сердюченко И.В., Терехов В.И., Овсянников Д.А. Количественная оценка микрофлоры пищеварительного тракта пчел // Труды КубГАУ. Серия: Ветеринарные науки. 2009. № 1 (ч.1). С. 96-98.
4. Audisio, M.C., Torres, M.J., Sabate, D.C., Ibarguren, C., Apella, M.C. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut // Microbiol. Res. 2011. V. 166. P. 1-13. DOI 10.1007/s12602-016-9231-0
5. Butler, E., Oien, R.F., Lindholm, C., Olofsson, T.C., Nilson, B., Vasquez, A. A pilot study investigating lactic acid bacterial symbionts from the honeybee in inhibiting human chronic wound pathogens // Int. Wound. 2014. P. 7-9. DOI: 10.1111/IWJ.12360
6. De Vrese, M., Schrezenmeir, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2008. V. 111. P. 1–66. DOI 10.1007/s13197-015-1921-1
7. De Vuyst, L., Leroy, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 13. P. 194-199. DOI: 10.1159/000104752
8. Evans, J.D., Lopez, D.L. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae) // J. Econ. Entomol. 2004. V. 97. P. 752-756.
9. Forsgren, E., Tobia, C.O., Vasquez, A., Fries, I. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae // Apidologie. 2010. V. 41. P. 99-108. DOI: 10.1051/apido/2009065
10. Lavermicocca P., Valerio F., Visconti A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69(1). P. 634-640. DOI: 10.1128/AEM.69.1.634-640.2003
11. Madras-Majewska, B., Halko, N.V., Rosiak, E., Ochnio, L., Ochnio, M., Halko, A., Kuczyńska, B. Assessment of microbiological quality of belarusian nectar honeys // Biomics. 2016. V. 8. P. 40-47.
12. Olofsson, T.C., Vásquez, A. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera* // Curr. Microbiol. 2008. V. 57. P. 356-363. DOI 10.1007/s00284-008-9202-0
13. Olofsson T.C., Butler E., Markowicz P., Lindholm C., Larsson L., Vasquez A. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees – an unknown key to honey’s antimicrobial and therapeutic activities // International Wound Journal. 2014. V. 13(5). P.668-679. DOI: 10.1111/IWJ.12345

14. Pătruică S., Mot D. The effect of using prebiotic and probiotic products on intestinal micro-flora of the honeybee (*Apis mellifera carpatica*) // *Bull. Entomol. Res.* 2012. V. 102. P. 619–623.
 15. Piccart, K., Vásquez, A., Piepers, S., De Vliegheer, S., Olofsson, T.C. Lactic acid bacteria from the honeybee inhibit the *in vitro* growth of mastitis pathogens // *American Dairy Sci. Assoc.* 2016. V. 99(4). P. 2940-2944. DOI: 10.3168/jds.2015-10208
 16. Ptaszyńska A. A., Borsuk G., Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M., Małek W. Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee nosemosis C? // *Parasitol. Res.* 2016. V. 115. P. 397-406. DOI 10.1007/s00436-015-4761-z
 17. Strom K., Schnurer J., Melin P. Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. V. 246. P. 119-124. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.03.047
 18. Tajabadi, N., Mardan, M., Abdul Manap, M.Y., Shuhaimi, M., Meimandipour, A., Nateghi, L. Detection and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee // *Apis dorsata*. *Apidologie.* 2011. V. 42. P. 642-649. DOI 10.1007/s11356-017-0071-6
 19. Vasquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R.J., Flaberg, E., Szekely L., Olofsson, T.C., Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees // *PLoS ONE.* 2012. V. 7. P. 1-9. DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0033188
 20. Yoshiyama, M., Wua, M., Sugimura, Y., Takaya, N., Kimoto-Nira, H., Suzuki, C. Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials // *J. Invert. Pathol.* 2013. V. 112. P. 62-67. DOI: 10.1016/j.jip.2012.09.002
- References**
1. Audisio, M.C., Torres, M.J., Sabate, D.C., Ibarguren, C., Apella, M.C. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiol. Res.* 2011. V. 166. P. 1-13. DOI 10.1007/s12602-016-9231-0
 2. Butler, E., Oien, R.F., Lindholm, C., Olofsson, T.C., Nilson, B., Vasquez, A. A pilot study investigating lactic acid bacterial symbionts from the honeybee in inhibiting human chronic wound pathogens. *Int. Wound.* 2014. P. 7-9. DOI: 10.1111/IWJ.12360
 3. De Vrese, M., Schrezenmeir, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2008. V. 111. P. 1–66. DOI 10.1007/s13197-015-1921-1
 4. De Vuyst, L, Leroy, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 13. P. 194-199. DOI: 10.1159/000104752
 5. Evans, J.D., Lopez, D.L. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 2004. V. 97. P. 752-756.
 6. Forsgren, E., Tobia, C.O., Vasquez, A., Fries, I. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie.* 2010. V. 41. P. 99-108. DOI: 10.1051/apido/2009065
 7. Lavermicocca P., Valerio F., Visconti A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69(1). P. 634-640. DOI: 10.1128/AEM.69.1.634-640.2003
 8. Madras-Majewska, B., Halko, N.V., Rosiak, E., Ochnio, L., Ochnio, M., Halko, A., Kuczyńska, B. Assessment of microbiological quality of belarusian nectar honeys. *Biomics.* 2016. V. 8. P. 40-47.
 9. Mishukovskaja G.S. Primenenie probiotikov dlja povysheniya produktivnosti temnoj lesnoj pchely bashkirskoj populjacji. *Temnaja lesnaja pchela Apis mellifera mellifera L. Respubliki Bashkortostan.* Red. Il'jasov R.A., Nikolenko A.G., Sajfullina R.M. M.: Tovarishhestvo nauchnyh izdanij KMK. 2016. S. 193-197. [The use of probiotics to improve beekeeping productivity in the native population of dark forest bees] (In Russian).
 10. Olofsson, T.C., Vásquez, A. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr. Microbiol.* 2008. V. 57. P. 356-363. DOI 10.1007/s00284-008-9202-0
 11. Olofsson T.C., Butler E., Markowicz P., Lindholm C., Larsson L., Vasquez A. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees – an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *International Wound Journal.* 2014. V. 13(5). P.668-679. DOI: 10.1111/IWJ.12345
 12. Pătruică S., Mot D. The effect of using prebiotic and probiotic products on intestinal micro-flora of the honeybee (*Apis mellifera carpatica*). *Bull. Entomol. Res.* 2012. V. 102. P. :619–623.
 13. Piccart, K., Vásquez, A., Piepers, S., De Vliegheer, S., Olofsson, T.C. Lactic acid bacteria from the honeybee inhibit the *in vitro* growth of mastitis pathogens. *American Dairy Sci. Assoc.* (2016). V. 99. № 4. P. 2940-2944. DOI: 10.3168/jds.2015-10208
 14. Ptaszyńska A. A., Borsuk G., Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M., Małek W. Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee nosemosis C? // *Parasitol. Res.* 2016. V. 115. P. 397-406. DOI 10.1007/s00436-015-4761-z
 15. Saltykova E.S., Gajfullina L.R., Poskrjakov A.V., Nikolenko A.G. Realizacija zashhitnogo otveta na

- dejstvie bakterial'nogo preparata u temnoj lesnoj pchely bashkirskoj populjacji. *Temnaja lesnaja pchela Apis mellifera mellifera L. Respubliki Bashkortostan*. Red. Il'jasov R.A., Nikolenko A.G., Sajfullina R.M. M.: Tovarishestvo nauchnyh izdanij KMK. 2016. S. 172-176. [Implementation of protective response to a bacterial drug in a Bashkir population of dark forest bees] (In Russian).
16. Serdjuchenko I.V., Terehov V.I., Ovsjannikov D.A. Kolichestvennaja otsenka mikroflory pishhevaritel'nogo trakta pchel. *Trudy KubGAU. Serija: Veterinarnye nauki*. 2009. № 1 (ch.1). S. 96-98. [Quantitative assessment of the microflora of the digestive tract of bees] (In Russian).
17. Strom K., Schnurer J., Melin P. Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. V. 246. P. 119-124. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.03.047
18. Tajabadi, N., Mardan, M., Abdul Manap, M.Y., Shuhaimi, M., Meimandipour, A., Nateghi, L. Detection and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee *Apis dorsata*. *Apidologie*. 2011. V. 42. P. 642-649. DOI 10.1007/s11356-017-0071-6
19. Vasquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R.J., Flaberg, E., Szekely L., Olofsson, T.C., Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE*. 2012. V. 7. P. 1-9. DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0033188
20. Yoshiyama, M., Wua, M., Sugimura, Y., Takaya, N., Kimoto-Nira, H., Suzuki, C. Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. *J. Invert. Pathol.* 2013. V. 112. P. 62-67. DOI: 10.1016/j.jip.2012.09.002