

Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С. З. Гжицького

Факультет харчових технологій та біотехнологій
Кафедра біотехнологій та радіології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня «Бакалавр»

на тему: «Аналіз мікробіому кишківника *Apis mellifera* за послідовністю
нуклеотидів гена 16S рРНК»

Виконав: студент 4 курсу

Групи 1, спеціальності

162 «Біотехнології та біоінженерія»



Маковей Р.З.

Керівник: к. б. н.,

доцентка кафедри біотехнологій та радіології


 Шемедюк Н. П.

Рецензент: к. б. н.,

доцентка кафедри фармації та біології

 Грицина М. Р.

Робота заслухана на засіданні кафедри біотехнологій та радіології і
рекомендована до захисту на засіданні ЕК, протокол № 25 від 01.06.2023р.

Завідувач кафедри біотехнологій та радіології, професор, доктор с.-г. наук
Буцяк В. І. 

Львів – 2023

Затверджено
Наказ Міністерства освіти і науки,
молоді та спорту України
29 березня 2012 року №384
Форма № Н – 9.01

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С. З. Гжицького

Інститут, факультет, відділення факультет харчових технологій та біотехнології
Кафедра, циклова комісія кафедра біотехнології та радіології
Освітньо – кваліфікаційний рівень бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри, голова циклової
комісії Буцьк В.І.
«02» 02 2023 року

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧУ
Маковою Роману Зеновісвичу

1. Тема кваліфікаційної роботи: «Аналіз мікробіому кишківника *Apis Mellifera*

за послідовністю нуклеотидів гена 16S рРНК»

Керівник кваліфікаційної роботи: Шемедюк Наталія Петрівна к. б. н., доцент
затверджені наказом вищого навчального закладу від 06.01.2023 р., №31-4

2. Строк подання кваліфікаційної роботи 10.05.2023 року

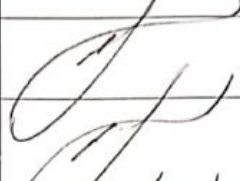
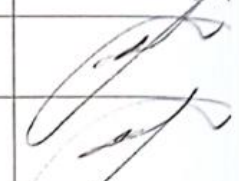



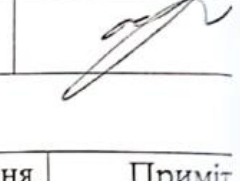
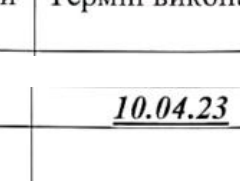
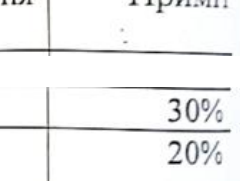
3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: *Apis mellifera*, аналіз мікробіому кишківника, ген 16S рРНК, родова різноманітність, мікробіота.

4. Зміст кваліфікаційної роботи (перелік питань, які потрібно розробити) вступ, огляд літератури, методи і матеріали, результати досліджень та їх обговорення, висновки.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним значенням креслень), технологічні схеми; рисунки: Взірці кишківників робочих особин *Apis mellifera* в ізотонічному розчині натрій хлориду, Консенсусна послідовність нуклеотидів створена для ізоляту АМСr1 в програмі Geneious, Чисті культури бактерій, ізольованих з середньої кишки *A. m. buckfast*, Чисті культури бактерій, ізольованих з середньої кишки *A. m. carpatica*, Чисті культури бактерій, ізольованих з середньої кишки *A. m. carnica*, Електрофореграми, що підтверджують ампліфікацію гена 16S рРНК, Відсотковий розподіл типів мікроорганізмів відносно загального спектру, ідентифікованого у кишківнику *Apis mellifera buckfast*, Родове різноманіття мікробіоти кишківника *Apis mellifera buckfast*, Відсотковий розподіл типів мікроорганізмів відносно загального спектру, ідентифікованого у кишківнику *Apis mellifera carpatica*, Родове різноманіття мікробіоти кишківника *Apis mellifera carpatica*, Відсотковий розподіл типів мікроорганізмів відносно загального

спектру, ідентифікованого у кишківнику *Apis mellifera carnica*, Родове різномікробіоти кишківника *Apis mellifera carnica*.


6. Консультанти розділів кваліфікаційної роботи

Розділ	Консультант ПІБ, Посада	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прий
1. Огляд літератури	к. б. н., доцент Шемедюк Н. П.		
2. Методи і матеріали	к. б. н., доцент Шемедюк Н. П.		
3. Результати досліджень та їх обговорення	к. б. н., доцент Шемедюк Н. П.		
4. Висновки	к. б. н., доцент Шемедюк Н. П.		

7. Дата видачі завдання 06.02.2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів бакалаврської роботи	Термін виконання	Приміт
	I атестація:	<u>10.04.23</u>	30%
2.	Методи і матеріали		20%
3.	Результати досліджень та їх обговорення		35%
	II атестація:	<u>20.04.23</u>	55%
6.	Висновки		15%
	III атестація:	<u>02.05.23</u>	15%
	Допущено до захисту	<u>10.05.23</u>	100%

Здобувач Маковей **Маковей Р.**
 Керівник кваліфікаційної роботи  **Шемедюк**

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
АНОТАЦІЯ.....	4
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1 Особливості мікробіому <i>Apis mellifera</i>	9
1.2. Основні представники мікробіому та їхня роль в метаболізмі <i>Apis mellifera</i>	13
1.2.1 Рід <i>Lactobacillus</i>	14
1.2.2 Рід <i>Bifidobacterium</i>	16
1.2.3 Рід <i>Gilliamella</i>	18
1.2.4 Рід <i>Bartonella</i>	20
1.2.5 Рід <i>Bombella</i>	21
1.2.6 Рід <i>Frischella</i>	22
1.2.7 Рід <i>Snodgrassella</i>	23
РОЗДІЛ 2 МЕТОДИ І МАТЕРІАЛИ.....	25
2.1 Об'єкти досліджень.....	25
2.2 Відбір матеріалу.....	26
2.3 Приготування розведень.....	26
2.4 Живильні середовища.....	27
2.5 Вирощування бактерій на живильному середовищі.....	28
2.6 Виділення сумарної ДНК.....	28
2.7 Полімеразна ланцюгова реакція.....	29
2.8 Електрофоретичне розділення ДНК в агарозному гелі.....	30
2.9 Очищення ПЛР продукту.....	31
2.10 Секвенування.....	32
2.11 Аналіз нуклеотидних послідовностей.....	33
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	34
3.1 Ізоляція мікроорганізмів зі взірців середньої кишки різних порід <i>A. mellifera</i>	34
3.2. Виділення сумарної ДНК і ампліфікація гена, який кодує 16S рРНК.....	37

3.3 Аналіз нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК бактерій кишківника <i>A. m. buckfast</i>	39
3.4 Аналіз нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК, бактерій кишківника <i>Apis mellifera carpatica</i>	41
3.5 Аналіз нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК, бактерій кишківника <i>Apis mellifera carnica</i>	43
ВИСНОВКИ.....	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	47
ДОДАТОК А.....	52

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Ген 16S рРНК – ген, що кодує 16S рибосомальну РНК;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

MRS – середовище de Man, Rogosa, Sharpe;

TSA – триптон-соєвий агар;

АМВ – група ізолятів виділених з кишківника *Apis mellifera buckfast*, кожен з яких має свій порядковий номер;

АМСр – група ізолятів виділених з кишківника *Apis mellifera carpatica*, кожен з яких має свій порядковий номер;

АМСг – група ізолятів виділених з кишківника *Apis mellifera carnica*, кожен з яких має свій порядковий номер;

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) – національний центр біотехнологічної інформації.

АНОТАЦІЯ

Актуальність теми. Широке застосування бджільництва для отримання меду, воску, прополісу та інших продуктів життєдіяльності бджіл є вагомим чинником економічного потенціалу багатьох держав. Однак, зараз спостерігаються значні проблеми зі здоров'ям популяцій медоносних бджіл, спровоковані як безпосередньо забрудненням навколишнього середовища, так і опосередковано широкою комерціалізацією бджільництва. Серед основних проблем, які заважають ефективному бджільництву, особливе місце займають захворювання кишківника медоносних бджіл, спричинені патогенними мікроорганізмами. Доведено, що саме мікробіота кишківника відіграє ключову роль поряд з імунною системою у боротьбі з патогенними мікроорганізмами. Однією зі стратегій збереження здоров'я медоносних бджіл є розробка профілактичних мікробних препаратів, в основі яких мікроорганізми нативного мікробіому бджіл. Методом секвенування нами ідентифіковано декілька родів мікроорганізмів середньої кишки трьох порід *Apis mellifera*. Дослідження мікробіоти є актуальним, позаяк пов'язане зі стійкістю бджіл до захворювань.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Кваліфікаційна робота є частиною наукових досліджень з теми «Розробка технологій на основі нанотехнологій та біоінженерії з метою одержання відновлювальних джерел енергії і екологічно- безпечних продуктів біоконверсії» (номер державної реєстрації 0122U002494), які виконують співробітники кафедри біотехнології та радіології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – ідентифікація мікроорганізмів середньої кишки порід *Apis mellifera* шляхом секвенування нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК.

Завдання дослідження:

1. Ізоляція мікроорганізмів зі взірців середньої кишки різних порід *Apis mellifera*.

2. Виділення сумарної ДНК і ампліфікація гена, який кодує 16S рРНК.

3. Аналіз нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК, бактерій кишківника *Apis mellifera buckfast*.

4. Аналіз нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК, бактерій кишківника *Apis mellifera carpatica*.

5. Аналіз нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК, бактерій кишківника *Apis mellifera carnica*.

Об'єкт дослідження: мікробіота кишківника порід *Apis mellifera*: *A. m. buckfast*, *A. m. carpatica*, *A. m. carnica*, ДНК мікроорганізмів.

Предмет дослідження: ідентифікація мікроорганізмів; ампліфікація гена, який кодує 16S рРНК; нуклеотидні послідовності представників мікробіоти кишківника порід *Apis mellifera*; залежність між родовою різноманітністю ідентифікованого спектру мікроорганізмів та стійкістю бджіл до захворювань.

Методи дослідження: мікробіологічні (метод розведень, метод отримання чистої культури), виділення ДНК з біомаси чистих культур і ампліфікація гена 16S рРНК, секвенування ампліконів гена 16S рРНК за Сенджером, біоінформатичний аналіз.

Практична цінність роботи. Результати цього дослідження можуть мати практичне застосування в галузі пасічного господарства та біологічного контролю. Отримані дані можуть використовуватись для порівняльного аналізу мікробіому кишківника різних популяцій *Apis mellifera* задля дослідження залежності між різноманітністю ідентифікованого спектру мікроорганізмів та стійкістю бджіл до захворювань. Це сприятиме розробці пробіотиків або пребіотиків з метою профілактики захворювань бджіл.

Апробація результатів дослідження. Результати дослідження апробовано на конференціях:

- Контарева К., Маковей Р., Демчук О., Павліш Р., Юськів Л. Біологічна роль вітаміну D₃ та його вплив на показники харчової цінності молока. «Дні студентської науки у ЛНУВМБ імені С. З. Ґжицького»: Тези

доповідей Студентської наукової конференції (Львів, 13–14 травня, 2021 р.). Ч. 2. Факультет харчових технологій та біотехнології. Львів, ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького, 2021. С.76.

ВСТУП

Apis mellifera (західна медоносна бджола) є єдиним найважливішим запилювачем комах для забезпечення світової продовольчої безпеки [33]. Наприклад економічна цінність медоносної бджоли лише в Сполучених Штатах оцінюється в 17 мільярдів доларів щорічно [20].

Численні продукти медоносних бджіл такі як: мед, прополіс і бджолина отрута, використовуються в традиційній медицині для профілактики та лікування захворювань. Завдяки своїм природним складникам, вони можуть підтримувати загальний стан здоров'я людини, зміцнювати імунну систему, прискорювати загоєння ран, володіють протизапальним та антибактерійним, протівірусним ефектом.

Спостерігається кореляція між родовою, видовою різноманітністю популяції мікроорганізмів кишківника медоносних бджіл, виникненням симбіотичних зв'язків у мікробіомі та зниженням показника смертності особин [30]. Зниження показника загибелі бджіл є актуальним питанням пасічників. З початку 2006 року ця проблема загострилась. Загрозою для бджіл є токсини, зокрема забруднення середовища пестицидами, важкими металами, радіонуклідами та інфекційні захворювання, які часто поширюються у результаті інтродукції видів [20].

На сьогоднішній день наукові дослідження, що стосуються мікробіоти кишківника медоносних бджіл, підтверджують її значущий вплив на різні аспекти життєдіяльності комах. Зокрема, досліджено, що мікробіота кишківника має важливе значення під час проходження процесів травлення бджіл, регуляції ендокринної системи, підтримання функціонування імунної системи та забезпечення стійкості до патогенних організмів. Отже, порушення балансу у популяції мікроорганізмів кишківника може призвести до зниження адаптивних можливостей організму бджіл та стійкості до захворювань [39].

Таким чином, дослідження мікробіоти кишківника бджіл є актуальним завданням на сьогодні. Вивчення аспектів цього питання дозволить зрозуміти

процеси, що відбуваються у кишківнику бджіл, їх кореляцію з загибеллю комах і розробити стратегію профілактики захворювань медоносних бджіл.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Особливості мікробіому *Apis mellifera*

Мікроорганізми, які населяють кишківник, виконують широкий спектр функцій, що мають важливе значення для метаболізму та загального фізичного стану організму. Вони здатні розщеплювати складні цукориди, які не можуть бути перетравлені самотійно, впливають на імунну систему та мають імуномодулюючий ефект. Мікробіота кишківника відіграє важливу роль для багатьох організмів-господарів [33].

Загалом мікробіота є складною екосистемою мікроорганізмів, що відіграє важливу роль у різноманітних метаболічних функціях, включаючи модуляцію глюкозного та ліпідного гомеостазу, контроль апетиту, енергетичний баланс та синтез вітамінів. Крім того, мікробіота бере участь у регуляції різних біохімічних і фізіологічних механізмів шляхом синтезу метаболітів та інших речовин [30].

Також недавно з'явилися докази внеску мікробіоти в травлення і метаболізм раціону *A. mellifera*. Мікробіота забезпечує бджолам живильні переваги, зокрема деградацію пектину та лігніну. Розпад цих двох основних компонентів стінок клітин пилку дозволяє отримати доступ до білка в пилку. Багато інших основних ензимів, виявлених в складі мікробіоти, наприклад целюлази, геміцелюлази та глікозидгідролази, можуть дозволити бджолам краще використовувати енергію у своєму раціоні [33].

Метаболіти, які синтезуються мікробіотою, зокрема коротколанцюгові жирні кислоти, можуть виконувати роль як основного джерела енергії для бджіл, так і функціонувати як нейроактивні сполуки, що впливають на мозкову функцію та поведінку. Тому метаболічні експерименти ґрунтуються на поєднанні *in vitro* аналізу культивованих бактерій кишківника з експериментами *in vivo* (гнотобіологія) для характеристики функціональності окремих видів/штамів та мікробіоти в цілому. Колективні метаболічні функції

мікробіоти призводять до значного позитивного впливу на збільшення маси тіла та кишківника *A. mellifera*, чутливість до сахарози та продукцію простагландинів та вітеллогеніну [33].

Доведено що бджоли є життєво важливими для збереження екосистеми, оскільки вони допомагають підтримувати екологічний баланс. Відомо, що вони мають складні взаємодії з навколишнім середовищем і різноманітними мікроорганізмами [30].

Личинки медоносних бджіл, які тільки вилупилися позбавлені бактерій, але вигодовуються робочими особинами (спочатку маточним молочком, потім медом, нектаром, пилком) протягом усього свого розвитку. Ці взаємодії можуть призвести до накопичення в кишківниках бактерій, присутніх у матеріалах вулика, а також деяких видів, які зазвичай зустрічаються у кишківниках дорослих. Однак як склад, так і кількість цієї мікробіоти кишківника личинок виглядає нестабільним. Розбіжності в консорціумі бактерій кишківника личинок між дослідженнями та між різними місцями відбору можуть відображати відмінності в стані колоній або дієті. Під час процесу метаморфозу у личинок, які досягли дорослої стадії, відшаровується кишківник, що призводить до втрати мікробіоти. Новонароджені дорослі бджоли мають мало або зовсім не мають бактерій в кишківнику і колонізуються нормальною мікрофлорою кишківника протягом перших кількох днів дорослого життя, до того, як покинуть вулик [20].

Основні представники мікробіоти *A. mellifera* як і у багатьох соціальних тварин, передаються через прямий контакт під час перших соціальних взаємодій з іншими бджолами у вулику. Цим бактеріальним угрупованням кишківника характерна висока екологічна стійкість, що означає, що, незважаючи на варіації навколишнього середовища, певна група організмів зберігається як між окремими особинами, так і всередині них [33].

Бактерії, які потрапляють в кишківник медоносної бджоли з навколишнього середовища, як правило, не можуть повністю колонізувати його, що вказує на те, що основні бактерії кишківника мають пристосування,

які дозволяють їм переносити або ухилятися від імунної системи господаря та інших стресових факторів присутніх в кишківнику [39].

Мікробіота медоносних бджіл знаходиться в різних частинах кишківника, включаючи зобик (розташований між стравоходом і шлуночком, що використовуються для зберігання і транспортування нектару до вулика); середню кишку, задню кишку, що складається з клубової кишки, просвіту і дистального відділу прямої кишки [30].

Варто зазначити, що переважна більшість бактерій-комменсалів медоносних бджіл мешкає в задній кишці, і що бактеріальні угруповання задньої кишки є більш передбачуваними, на відміну від часто мінливих, змінних угруповань зобика та середньої кишки. Бактерії зобика, швидше за все, надходять з навколишнього середовища до медоносних бджіл [33].

Середня кишка комах, яка функціонує для перетравлення та всмоктування їжі, не є стійким середовищем для бактеріальної колонізації, оскільки вона вистелена хітиновим матеріалом, що постійно скидається, - перитрофічним матриксом. Поздовжнім дослідженням середніх кишок робочих бджіл було виявлено зміни мікробіому протягом 6 місяців, хоча отримані результати можуть бути нестабільними через наявність лише невеликої кількості бактерій у середніх кишках. В іншому дослідженні науковці навпаки спостерігали мінімальні відмінності в мікробних угрупованнях між осінніми та весняними бджолами [20].

Антибіотики та пробіотики можуть здійснювати функціональний вплив на господаря, змінюючи склад видів, присутніх в кишківнику *A. mellifera*. Існують також докази того, що антибіотики можуть вибірково виснажувати деякі види мікробів більше, ніж інші, що призводить до змін у складі кишківника. Наприклад, дослідження (Li et al, 2017) показало, що особини порід бджіл виду *A. mellifera*, з усуненою антибіотиками мікробіотою, були більш сприйнятливі до інфекції *Nosema ceranae* (поширений патоген медоносної бджоли), ймовірно, через негативний вплив на імунну систему, про що свідчить зниження експресії генів, що кодують антимікробні пептиди. Це

дослідження доводить, що захист від *N. ceranae*, що забезпечується мікробами кишківника, полягає в імунній стимуляції, а не в прямому антагонізмі між паразитом і нативною мікробіотою. Інфекція нозематозу в цьому дослідженні істотно не змінила склад або кількість бактерій задньої кишки, ймовірно, через «поділ ніші», в якій існує мінімальна взаємодія між бактеріями кишківника і спорами нозематозу. На додаток до зниження регуляції імунної системи, також було виявлено, що величина негативного впливу антибіотиків на здоров'я бджіл була більшою, ніж у інфекції *Nosema*, що доводить порушення антибіотиками складу мікробіоти бджіл є, як правило, шкідливе. Деякі дослідження також показали прямий антагонізм між представниками мікробіоти кишківника *A. mellifera* і патогенами, що загрожують здоров'ю господаря. Наприклад, Еванс і Армстронг виявили, що бактерії, виділені з *A. mellifera*, пригнічували ріст в личинках мікроорганізмів роду *Paenibacillus*, що викликають американську хворобу гнильцю, хоча ці бактерії не були представниками нині визнаної стабільної мікробіоти кишківника [33].

У організмі кожної бджоли синтезуються антимікробні пептиди, які є найважливішими компонентами вродженого імунітету, спрямованого на захист від вторгнення патогенів. Вони є детермінантами складу мікробіоти, оскільки їх роль полягає в пошкодженні клітин патогенних мікроорганізмів за допомогою перфорації мембран. Чотири сімейства антимікробних пептидів (абаецин, апідаецин, гіменоптаецин і дефенсин) синтезуються в гемолімфі медоносної бджоли під час імунного виклику. Доведено, що саме бактерії кишківника можуть стимулювати такий синтез цих антимікробних пептидів індукуючи імунні реакції у бджіл [30].

На сьогодні лише в кількох експериментах розглядали можливі зв'язки між мікробіотою кишківника медоносних бджіл та їхньою поведінкою. Мікроби кишківника можуть впливати на поведінку господаря, змінюючи рівні біогенних амінів, таких як октопамін, дофамін і серотонін. Рівні цих амінів у мозку робочих особин змінюються сезонно і є вищими влітку, коли активність добування їжі є найвищою. У мозку новонароджених бджіл без мікробіоти

рівень цих амінів значно нижчий, ніж у мозку дорослих бджіл зі звичайною мікробіотою. Тому звичайні бджоли та бджоли без мікробіоти поведуться по-різному: звичайні бджоли легше реагують на сахарозу і, відповідно, більше харчуються, що узгоджується зі змінами, які спостерігаються в інсуліновій сигналізації. Ці результати надають переконливі докази того, що мікробіота кишківника може змінювати поведінку господаря та гормональну сигналізацію [39].

Отже, мікробіота кишківника здійснює значний вплив на процеси життєдіяльності *A. mellifera*, забезпечуючи адаптацію господаря до різних умов середовища і несприятливих чинників.

1.2. Основні представники мікробіому та їхня роль в метаболізмі *Apis mellifera*

Згідно з дослідженнями гена, що кодує 16S рРНК та метагеномним аналізом ДНК взірців кишківника, у кишківнику робочих бджіл домінують дев'ять кластерів бактерій, які складають від 95% до 99,9% бактерій майже у всіх особин [20]. За передніми дослідженнями, це вісім-дев'ять таксонів: "Alpha-1" (*Bartonella apis*), "Alpha-2.1" (*Acetobacteraceae*), "Alpha-2.2" ("*Parasaccharibacter*" або *Bombella*), "Beta" (*Snodgrassella alvi*), "Bifido" (*Bifidobacterium asteroides* та *Bifidobacterium coryneforme*), "Firm-4" та "Firm-5" (*Lactobacillus sp.*), "Gamma-1" (*Gilliamella apicola*) та "Gamma-2" (*Frischella perrara*) [37].

Gilliamella, *Snodgrassella*, *Lactobacillus Firm-4* і *Firm-5* та *Bifidobacterium* є основними філотипами, які зазвичай присутні в кишківнику дорослих робочих бджіл. З іншого боку, *Frischella*, *Bartonella*, *Commensalibacter* або *Bombella* є додатковими філотипами, які часто зустрічаються в колоніях бджіл, але не обов'язково присутні у кишківнику кожної бджоли. Крім цих родів, також виявлені інші філотипи, такі як *Lactobacillus kunkeei*, *Apibacter*, *Serratia*

marcescens та інші ентеробактерії, але вони зазвичай становлять лише невелику частку мікробіоти кишківника бджіл [15].

Однак, варто зазначити, що різноманітність складу мікробіоти кишківника також залежить від топографічних та короткочасних змін у мікробних угрупованнях. Певні мікроорганізми заселяють певні ніші в організмі бджіл під час різних фаз росту та розвитку [30].

Іноді в окремих дорослих робочих бджіл спостерігається значне відхилення від характерного складу мікробіоти кишківника. Ці відхилення часто пов'язані з підвищеним вмістом умовно-патогенних бактерій навколишнього середовища. Опортуністичні бактерії з часом можуть витіснити певні угруповання з відносно стабільного "нормального" консорціуму коадаптованих бактерій кишківника. Причина таких зрушень складу мікробіоти кишківника до кінця незрозуміла [20].

Склад мікробіоти кишківника також може варіюватися між різними кастами бджіл і змінюватися зі зростанням віку окремих особин і розвитком колонії, що може бути наслідком впливу фізіології господаря, дієти та оточуючого середовища на формування складу мікробіому. Схожі динамічні зміни складу мікробіоти кишківника відбуваються у багатьох інших тварин, що свідчить про те, що це є більш нормальним явищем, а не винятком [20].

1.2.1 Рід *Lactobacillus*

В даний час рід бактерій *Lactobacillus* налічує понад 100 видів і підвидів і представляє велику групу грампозитивних бактерій в межах типу *Firmicutes*. *Lactobacillus* добре відомі як основні представники молочнокислих бактерій, які зустрічаються в різних багатих на цукориди середовищах, таких як рослинна сировина, продукти молочної промисловості, репродуктивний тракт жінок та травний тракт ссавців і комах [18].

Lactobacillus є найбільш поширеною групою бактерій у складі кишківника бджіл і, за оцінками, складають 20-99% бактерій у окремих робочих особин. Клітини представників роду *Lactobacillus* можуть варіювати

від довгих і тонких паличок до коротких паличок кокобацил. Колонії мають різну морфологію, але в основному вони є опуклими, гладкими і непрозорими, не мають пігменту. *Lactobacillus*, які входять до складу мікробіоти кишківника бджіл, характеризуються відсутністю каталази та спороутворення, позитивним фарбуванням за Грамом та синтезом молочної кислоти шляхом гомоферментації [7].

Також *Lactobacillus*, які колонізують кишківник бджіл, відрізняються від своїх родичів, що містяться в складі мікробіоти кишківника ссавців, і, як правило, поділяються на дві філогенетично окремі клади - *Firm-4* і *Firm-5*, хоча зрідка зустрічається третя, *Firm-3*. В нещодавніх дослідженнях їх геномів методом секвенування виявлено численні фосфотрансферазні системи, що беруть участь у засвоєнні цукрів, зокрема у *Lactobacillus Firm-5*. В організмі бджолиних біфідобактерій, так і лактобактерій виявлено великі білки клітинної поверхні з невідомою функцією, ці білки можуть бути пов'язані з адгезією або деградацією рослинних сполук. Крім того, біфідобактерії виділені з кишківника бджіл та *Lactobacillus Firm-5* також мають генні кластери для біосинтезу та утилізації трегалози - дисахариду, що використовується для зберігання енергії у комах [20].

Серед мікробіоти кишківника бджіл, *Lactobacillus Firm-5* відіграють основну роль у синтезі коротколанцюгових жирних кислот і продуктів ферментації сукцинату і пімелату. *Lactobacillus Firm-4* і *Firm-5* можуть перетравлювати інші компоненти пилку, включаючи флавоноїди та сполуки в зовнішній оболонці пилку, такі як ω -гідроксикислоти і феноламіді [39]. Отже, бактерії роду *Lactobacillus* відіграють важливу роль у виробництві корисних речовин і обробці компонентів пилку, що допомагає підтримувати оптимальну функцію кишківника бджіл.

Нещодавно було ідентифіковано та охарактеризовано 4 різних класи лактобактерій: *Lactobacillus apinorum*, який філогенетично подібний до *L. kunkeei*; *Firm-4* представлений *Lactobacillus mellifer* і *Lactobacillus mellis* та клад *Firm-5*, представлений нещодавно ідентифікованими філогенетично близькими

видами *Lactobacillus melliventris*, *Lactobacillus kimbladii*, *Lactobacillus helsingborgensis*, *Lactobacillus kullabergensis* та *Lactobacillus apis* [11].

Досить цікавим є останній вид *L. apis*, який є облигатно гомоферментативною лактобактерією. Клітини *L. apis* продукують лише L-молочну кислоту з D-глюкози і нездатні утилізувати пентози і глюконатів. Проте *in vitro* клітини виявляють антагоністичну дію проти збудників американського (*Paenibacillus larvae subsp. larvae*) та європейського (*Melissococcus plutonius*) гнильця, що є дуже корисною властивістю [18].

Нещодавно для іншого штаму *L. apis* було виявлено антагоністичну дію проти *Hafnia alvei* опортуністичного патогену, що викликає септицемію у дорослих бджіл і спричиняє загибель у 90% випадків. Цікаво, що було виявлено підвищену експресію антимікробного пептиду апідаєцину, який виявив високий інгібуючий ефект *in vitro* щодо *H. alvei* [21].

Вважається, що кілька штамів бактерій або суміш штамів є корисними для медоносних бджіл, і саме тому представники *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* розглядаються як потенційні пробіотичні добавки.. Згодовування медоносним бджолам штамів *Lactobacillus* забезпечує вищий вихід меду, сприяючи економічному покращенню бджільництва [11, 22].

1.2.2 Під *Bifidobacterium*

Bifidobacterium присутні у більшості дорослих робочих особин і, за оцінками, складають до 15% бактерій кишківника. Як правило, вони анаеробні або мікроаерофільні; однак було виявлено, що представники *Bifidobacterium* бджолиного кишківника ростуть аеробно. Колонії з'являються протягом 2 днів і є точковими, опуклими, гладкими та сірувато-білими. Біфідобактерії бджолиного кишківника є негативними щодо утворення каталази і спороутворення, грампозитивними і синтезують молочну та оцтову кислоти. Як і лактобактерії, біфідобактерії є звичайними членами мікробіоти кишківника тварин і використовуються як пробіотики. Описано три види біфідобактерій,

специфічних для кишківника медоносних бджіл: *B. asteroides*, *B. coryneforme* і *B. indicum* [7].

Нещодавно від медоносних бджіл було виділено ще чотири нових види біфідобактерій, названих *Bifidobacterium apousia*, *Bifidobacterium choladohabitans*, *Bifidobacterium mizhiense* та *Bifidobacterium polysaccharolyticum*, геномне дослідження яких виявило тісну генетичну спорідненість з *B. asteroides* [27].

До складу біфідобактерій бджіл входить дуже широкий спектр різних генів, продукти експресії яких необхідні для утилізації цукоридів, порівняно з їхніми родичами і іншими бактеріями мікробіому кишківника бджіл, експериментальні тести підтвердили цю метаболічну універсальність. Отже, філогенетично, штами біфідобактерій бджіл переважно належать до основних груп біфідобактерій, які містяться в складі кишківника ссавців. Що відкриває можливості для дослідження еволюційних паралелей та адаптації мікробів кишківника до їхніх господарів. [20].

Токсичний вплив кисню на ріст і виживання біфідобактерій висвітлено в багатьох дослідженнях. Повідомляється, що ріст біфідобактерій пригнічується киснем, а тривала аерація культур біфідобактерій може призвести до загибелі клітин і деградації ДНК. У межах роду *Bifidobacterium* є лише кілька видів, які виявилися толерантними до кисню. На відміну від ферментативного метаболізму цукоридів, який був детально вивчений у біфідобактерій, можливість утилізації кисню як кінцевого акцептора електронів через дихальний метаболічний шлях у біфідобактерій не було ідентифіковано [2].

Підчас дослідження штаму *B. asteroides PRL2011* виділеного з кишківника *A. m. ligustica* було отримано переконливі генетичні та фізіологічні докази того, що штам *B. asteroides PRL2011* пристосований до впливу кисневого середовища і може використовувати кисень, адаптуючи свій метаболізм, що лежить в основі першого зареєстрованого випадку клітинного дихання в межах роду *Bifidobacterium*. Методом піросеквенування у цього штаму було досліджено гени, продукти яких задіяні у механізмах клітинного

дихання, а також гени, що кодують ензими такі як каталаза та супероксиддисмутаза, що беруть участь у захисті від негативних ефектів, спричинених киснем в аеробному середовищі. Також для *B. asteroides* PRL2011 було проведено порівняльний геномний аналіз з штамами *B. coryneforme* та *B. indicum*. Варто зазначити, що, крім генів каталази та супероксиддисмутази, які виявилися відсутніми в останніх двох видів, усі інші гени, пов'язані з процесом клітинного дихання, були ідентифіковані в рамках даного дослідження і присутні в геномі цих організмів [2].

Узагальнюючи, *B. asteroides* PRL2011, виділений з кишківника медоносної бджоли, здійснює клітинне дихання на значно нижчому рівні порівняно з іншими бактеріями, для яких клітинне дихання є альтернативним метаболічним шляхом до ферментації, наприклад, *Lactococcus lactis*. Ймовірно, що нижчий рівень оксигенації кишківника комах призвів до еволюції низького рівня клітинного дихання *B. asteroides*, подібно до того, як це спостерігається у наноаеробів [2].

Здатність до аеробного дихання у біфідобактерій може свідчити про різні селективні сили, що діють у кишківнику бджіл (наприклад, різні окислювальні умови) [20].

Kešnerová та інші виявили, що *B. asteroides* стимулює синтез простагландинів господаря та похідних ювенільних гормонів, які впливають на розвиток бджіл [39].

У статті Forsgren et al. 2010 року повідомляється, що молочнокислі бактерії з родів *Lactobacillus* і *Bifidobacterium*, виділені з передньої кишки *A. mellifera*, пригнічують *Paenibacillus in vitro*, а також ефективно знижують кількість заражених личинок при використанні в складі пробіотичного препарату [33].

1.2.3 Під *Gilliamella*

Колонії гладкі, білі, круглі діаметром ~2,5 мм, які утворюються протягом 2 днів інкубації, морфологія колоній може варіювати між штамами. Клітини

грамнегативні, паличкоподібні, нерухомі, можуть утворювати ниткоподібні ланцюжки. *Gilliamella* не утворюють каталазу, нітратредуктазу та оксидазу. Єдиний описаний вид цього роду характерний для медоносної бджоли - *Gilliamella apicola*, представник родини *Orbaceae* та класу *Gammaproteobacteria*. У ранніх публікаціях *G. apicola* називали "Gamma-1" або "Gammaproteobacteria-1". Штами *G. apicola* були виділені від медоносних бджіл і джмелів, а типовим штамом є *G. apicola wkB1^T*. За оцінками, *Gilliamella* складають 0,6-30% бактерій у кишківнику окремих працівників [7].

За допомогою геномного аналізу у штамів *G. apicola* виявлено великий спектр генів необхідних для поглинання і ферментації цукрів, але неповний цикл трикарбонових кислот і дегенеративний аеробний дихальний ланцюг. Штами виду *G. apicola* здатні ферментувати основні цукри нектару d-глюкозу, d-фруктозу і сахарозу, але не здатні ферментувати мальтозу [20, 26].

У деяких штамів *G. apicola* були виявлені гени, що кодують ензими, необхідні для розщеплення пектину - основного компоненту клітинної стінки пилкових зерен. Пектинолітичні ензими, що синтезуються цими штамми, відіграють важливу роль у розщепленні пилку, що є важливою складовою частиною раціону бджіл. Саме ензиматична активність продуктів експресії генів цих штамів має велике значення для бджіл, оскільки вони, так само як багато інших тварин, не здатні синтезувати пектинази самостійно [20].

Дослідниками доведено існування симбіотичних зв'язків між *G. apicola* і *S. alvi* у кишківнику бджіл. Виявлено, що *S. alvi* колонізують ділянки біля епітелію кишківника, тоді як *G. apicola* колонізує кишківник в напрямку до просвіту кишківника. Це пов'язано з толерантністю цих бактерій щодо кисню: *G. apicola* є факультативним анаеробом і може існувати в присутності кисню, тоді як *S. alvi* – облігатний аероб, що заселяє вистилку стінки кишківника [33].

На основі аналізу анотацій було запропоновано механізми їхніх передбачуваних симбіотичних взаємозв'язків. *S. alvi*, ймовірно, не містить генів, продукти експресії яких забезпечують поглинання і катаболізм цукоридів, можливо бактерія отримує піруват та подібні продукти метаболізму

цукоридів від *G. apicola*, яка отримує більшу частину своєї енергії шляхом катаболізму цукоридів. *S. alvi* може синтезувати і постачати *G. apicola* вітаміни та нуклеїнові кислоти, які остання не здатна синтезувати самостійно. Ці взаємозв'язки були підтверджені експериментами з використанням метаболоміки та дослідженнями *in vivo* [33].

1.2.4 Рід *Bartonella*

Bartonella - типовий рід родини *Bartonellaceae* класу *Alphaproteobacteria*. Рід *Bartonella* наразі містить 37 охарактеризованих видів і три підвиди. Добре відомо, що види *Bartonella* інфікують еритроцити та ендотеліальні клітини різних ссавців, таких як люди, коти, собаки, жуйні тварини, дикі кролики та дикі гризуни. Найвідомішим представником *Bartonella* є *Bartonella henselae*, збудник хвороби котячих подряпин. Предки патогенних бартонел були симбіонтами кишківника комах, і вважається, що колонізація кровосисних членистоногих була ключовим кроком у їх еволюції від симбіонтів кишківника до патогенів. *Bartonella* є одним із представників мікробіоти кишківника медоносних бджіл, які обмежені цим господарем, оскільки вони чітко ідентифіковані в *Apis spp.*, але не в кишківнику джмелів. Дотепер з кишківника медоносної бджоли був виділений лише один вид – *B. apis*. Проте у 2022 році дослідникам з Китаю вдалось виділити два нові види, з кишківника медоносних бджіл: *Bartonella choladocola sp. nov.* та *Bartonella apihabitans sp. nov.* У зимових бджіл вміст *Bartonella* в кишківнику різко збільшується. Зимові бджоли живуть набагато довше, ніж бджоли сезону збору корму, і стан їхнього здоров'я має вирішальне значення для виживання колонії. Тому можна вважати що *Bartonella* відіграє важливу роль у виживанні зимових бджіл, але точний вплив *Bartonella* на здоров'я і спосіб життя медоносних бджіл залишається незрозумілим [25].

Bartonella є другорядними бактеріями в складі кишківника медоносних бджіл, що вказує на можливий сприятливий вплив на імунну функцію. Існує гіпотеза, що бактерії роду *Bartonella* забезпечують підвищення стійкості

медоносних бджіл до хвороб, однак загалом конкретні функції цих бактерій досі не з'ясовані [32].

Отже, роль представників роду *Bartonella* характерних для медоносних бджіл недостатньо вивчена, і на сьогодні залишається потреба їх дослідити.

1.2.5 Рід *Bombella*

Bombella (раніше також помилково позначені як *Parasaccharibacter* або "Alpha-2.2") – рід оцтовокислих бактерій, що складається з чотирьох описаних видів, а саме *Bombella apis*, *Bombella intestini*, *Bombella favorum* і *Bombella mellum*. Увага була прикута до цього роду, оскільки було доведено, що він має позитивний вплив на грибкові патогени. Бактерії цього роду колонізують не тільки кишківник робочих бджіл, наприклад, передню і задню кишки, але й різні ніші у вулику, личинки або кишківник матки. У всіх видів роду *Bombella* відсутні гени, що кодують ензими шляху Ембдена-Меєргофа-Парнаса та циклу трикарбонових кислот, що вказує на те, що внутрішньоклітинний метаболізм цукоридів зосереджений на пентозофосфатному шляху або шляху Ентнера-Дудорова. Гени, що кодують ензими цих метаболічних шляхів, були ідентифіковані в геномах видів роду *Bombella*. [11].

Вид *B. intestini* виділений з джмеля *Bombus lapidarius* був першим ідентифікованим представником, від якого походить назва роду *Bombella* [23]. *B. favorum* і *B. mellum* були виділені з стільників вулика населеного *A. mellifera* [10].

Особливий інтерес становить вид *B. apis* виділений з середньої кишки *A. mellifera*. *B. apis* – це грамнегативна, суворо аеробна, нерухома, неспороутворююча бактерія паличкоподібної форми. На агарі MRS утворює колонії кремово-бежевого кольору, круглі з цілими краями [38].

В штаму *B. apis* MRM1^T було виявлено стійкість до тетрацикліну та доксицикліну. Тетрациклін є антибіотиком широкого спектру дії, який використовується в країнах, що не входять до ЄС, для запобігання мікробних інфекцій, наприклад *Paenibacillus*, бактерії, що вражає личинки і викликає

хворобу гнилець. Було доведено, що тетрациклін негативно впливає склад мікробіому кишківника медоносних бджіл і на стійкість бджіл до інших умовно-патогенних бактерій [11].

Також було доведено, що *V. apis* пригнічує двох грибкових патогенів комах *Aspergillus flavus* та *Beauveria bassiana*. Гіпотетичним механізмом цього пригнічення є можливий секретований полікетид. Всі відомі штами містять кластер генів полікетидсинтази типу 1, що є спільною рисою для багатьох симбіонтів з фунгіцидною активністю. Було доведено, що цей механізм пригнічує ріст грибів *in vitro* та *in vivo*, і як наслідок, захищає бджолиний розплід (личинки) від інфекції [28].

Отже *V. apis* може бути хорошою альтернативою штучним фунгіцидам у боротьбі з грибковими інфекціями та частково зменшити потребу у їх використанні у бджолярстві. Однак, щоб досягти цього, потрібно провести додаткові дослідження для кращого розуміння ролі *V. apis* у метаболізмі *A. mellifera*.

1.2.6 Під *Frischella*

Під *Frischella* був вперше виділений, ідентифікований та описаний групою вчених (Engel et al, 2013), які ізолювали вид *F. perrara* з кишківника медоносної бджоли [8].

Симбіонт кишківника медоносних бджіл *F. perrara* належить до нещодавно описаної родини *Orbaceae* у складі *Gammaproteobacteria*. Вид таксономічно близький до симбіонта бджолиного кишківника *Gilliamella* і має схожий метаболізм. Вид *F. perrara* дуже поширений серед касти робочих бджіл, споріднені до цього виду бактерії також було виявлено у *Apis cerana*. [34].

Клітини *Frischella* є факультативно анаеробними, але не ростуть в повністю аеробних умовах. За морфологічними ознаками колонії представників роду *Frischella*, гладкі, круглі, плоскі, напівпрозорі, діаметром ~1 мм культивуються приблизно за 3 дні. Клітини паличкоподібної форми, можуть утворювати нитки або ланцюжки. Представники роду *Frischella* можуть

отримувати карбон шляхом ферментації глюкози, фруктози та манози. Вони є каталазо-позитивними і негативними щодо утворення нітратредуктази та оксидази, а отже можуть синтезувати каталазу, яка розщеплює перекись водню, і не можуть використовувати нітрати як джерело азоту для своєї життєдіяльності, не синтезують ензиму оксидази, який допомагає у розкладі кисню [7].

F. perrara досить специфічно колонізує кишківник *A. mellifera*, порівняно з іншими представниками мікробіоти кишківника бджіл. *F. perrara* переважно колонізує перехідну зону між середньою та клубовою кишкою, тобто пілорус. Більше того, колонізація цієї зони *F. perrara* призводить до появи матеріалу від коричневого до чорного кольору на світлій стороні епітеліальної поверхні між кутикулярним шаром тканини господаря та прикріпленими клітинами *F. perrara*. Цей так званий фенотип парші, який формується через 5-7 днів після колонізації, до цього часу не було повідомлень про те, що утворення фенотипу парші спричиняє будь-який інший симбіонт кишківника, окрім *F. perrara*. За допомогою транскриптомного аналізу господаря доведено, що *F. perrara* викликає специфічну імунну відповідь, яка включає посилення регуляції шляху меланізації господаря, ймовірно, відповідального за формування фенотипу парші. Більше того, від 25 до 80% всіх робочих бджіл колонії мають видимий фенотип парші в області пілоруса кишківника, що, як було показано, тісно корелює з високою чисельністю *F. perrara*. Однак вплив цього фенотипу на господаря залишається невідомим [34].

F. perrara присутня у більшості дорослих робочих особин, її вміст за оцінками, становить до 13% бактерій кишківника медоносної бджоли [7].

1.2.7 Рід *Snodgrassella*

За сучасними даними рід *Snodgrassella*, як і *Gilliamella* є монофілетичними групами, в яких всі представники мешкають в одній екологічній ніші - кишківнику бджіл [19]. Представники роду *Snodgrassella* переважно колонізують передню частину заднього відділу кишківника (клубову

кишку та прилеглий пілорус, тобто, перехідну зону між середньою та клубовою кишками) [34].

Колонії представників роду гладенькі, білі, круглі, діаметром ~1 мм, культивуються протягом 2 днів. Клітини грамнегативні, паличкоподібні, нерухомі. *Snodgrassella* може використовувати лимонну або яблучну кислоту як основне джерело карбону. Бактерія є каталазо і нітратредуктазо-позитивною, і негативною щодо оксидази. Єдиний описаний вид цього роду – *S. alvi*, є представником родини *Neisseriaceae* та класу *Betaproteobacteria*. За оцінками, рід *Snodgrassella* складає 0,6-39% бактерій кишківника окремих робочих бджіл [7].

Шляхом споживання кисню *S. alvi* допомагають підтримувати анаеробні умови в глибині просвіту кишківника. В кишківнику бджіл, *S. alvi* здатний асоціюватись зі стінкою кишківника та використовувати ацетат як донор електронів для споживання кисню *in vitro*. Це має важливе значення, оскільки зміна мікросередовища в кишківнику може суттєво впливати на метаболічну активність цих мікроорганізмів [19, 39].

Існує багато доказів перехресного живлення основними метаболітами між бактеріями кишківника бджіл. Доведено, що існує кілька взаємодоповнюючих шляхів, які вказують на таке перехресне живлення. Вони включають синтез і використання пірувату, який накопичується в кишківнику бджіл, моноколонізованих *G. apicola*, але концентрація якого знижується в кишківнику бджіл, колонізованих *S. alvi*, видом, у якого відсутній функціональний шлях гліколізу. Спостереження, що ріст *S. alvi* в культурі покращується при додаванні супернатанту з культур *G. apicola*, ще більше підтверджує припущення, що ці два види беруть участь у перехресних взаємодіях при живленні. Всі представники мікробіоти кишківника бджоли використовують нуклеозиди, що секретуються в кишківнику, за винятком виду *S. alvi*, який містить гени, що кодують ензими функціонального шляху біосинтезу нуклеозидів. Цей вид здатний синтезувати нуклеозиди, що утилізуються іншими бактеріями [39].

Досліджено роль *S. alvi* у модуляції імунної відповіді *A. mellifera*. Дослідженням доведено, що колонізація бджіл без мікробіоти, мікробіотою кишківника, зокрема моноколонізація *S. alvi*, спричиняє стимуляцію експресії генів бджоли, що кодують антимікробні пептиди, такі як апідаецин і гіменоптаецин. За рахунок чого концентрація апідаецину підвищується як у тканині кишківника бджоли, так і в гемолімфі, що спричиняє очищення гемолімфи від деяких патогенних організмів. Крім того, колонізація як живими, так і термічно вбитими *S. alvi* призводить до підвищення регуляції антимікробних пептидів і захищає господаря від інфікування патогенними бактеріями *Serratia marcescens* [21].

РОЗДІЛ 2 МЕТОДИ І МАТЕРІАЛИ

2.1 Об'єкти досліджень

У роботі було використано робочі особини трьох порід *A. mellifera*:

A. m. carpatica - підвид, який походить з Карпатських гір. Має ряд цінних біологічних властивостей, таких як: хороша адаптація до різних кліматичних умов, підвищена стійкість до зимівлі та хвороб, м'якість характеру, підвищена плодючість маток і високі навички накопичення бджолиної продукції в гнізді [4].

A. m. carnica – місцевий підвид у Південно-Центральній Європі і, можливо, другий за популярністю підвид у бджільництві в усьому світі. Бджолярі прагнуть утримувати цей підвид через його сприятливі фенотипічні ознаки, такі як миролюбна поведінка, висока продуктивність меду та активне весняне нарощування колоній [29].

A. m. buckfast – гібридний підвид, виведений братом Адамом в абатстві Бакфаст, на південному заході Англії. Бджолярі цінують цю породу за стійкість до акаринового кліща, та відмінну продуктивність меду. Через велику кількість

схрещувань з багатьма різними породами, родовід бджіл породи Бакфаст залишається незрозумілим [31].

2.2 Відбір матеріалу

Відбір матеріалу проводили наприкінці листопада. Для відбору взірців середньої кишки використовували дванадцять робочих особин *A. mellifera*: чотири *A. m. carpatica*, чотири *A. m. carnica*, чотири *A. m. buckfast*. Загалом було відібрано дванадцять взірців по чотири з кожної породи.

2.3 Приготування розведень

По чотири взірці середньої кишки (рис. 2.1) від кожної із досліджуваних порід було внесено в окремі стерильні пропіленові пробірки і додано 1 мілілітр стерильного ізотонічного розчину Натрію хлориду в кожен з трьох пробірок. Матеріал ретельно розтерто скляними стерильними паличками до утворення гомогенної маси.

З гомогенату було приготовано низку десятикратних розведень (10^{-1} – 10^{-5}) у стерильному ізотонічному розчині Натрію хлориду.

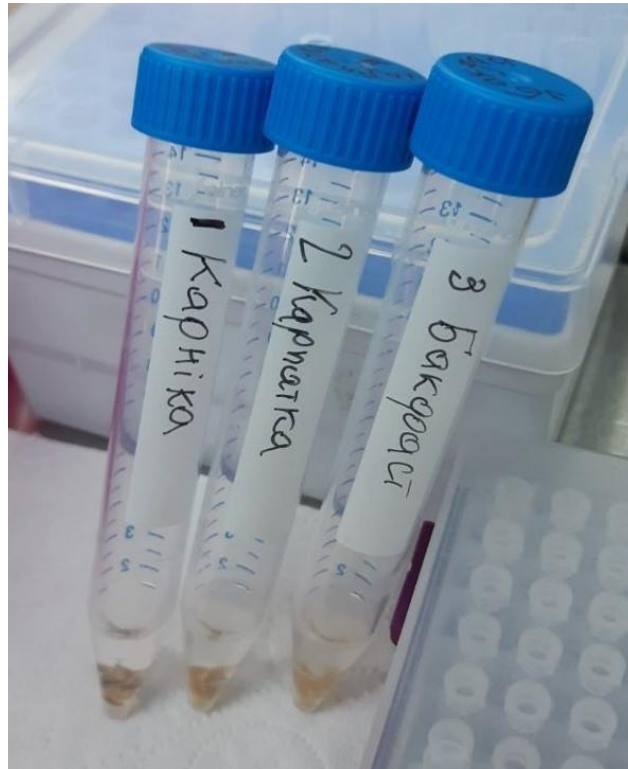


Рис 2.1. Взірці кишківників робочих особин *Apis mellifera* в ізотонічному розчині натрій хлориду.

2.4 Живильні середовища

Мікроорганізми культивували на середовищах такого складу:

MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) [6], г/л:

- 1.0% пептон – 10 г;
- 1.0% м'ясний екстракт – 8 г;
- 0.4% дріжджовий екстракт – 4 г;
- 2.0% глюкоза – 20 г;
- натрій ацетат тригідрат – 5 г;
- твін 80 – 1 мл;
- 0.2% K_2HPO_4 – 2 г;
- 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.2 г;
- 0.005% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ – 0.05 г;

- 1.0% агар – 10 г.

Довести до рН 6.2 за потреби

TSA (Триптон-соєвий агар) г/л:

- триптон-соєвий бульйон – 30 г;
- агар – 20 г.

Для селекції в середовище MRS було додано:

- циклогексимід - 50 мг / мл;
- Br cresol green – 26 мг / мл (індикатор рН).

Для селекції в середовище TSA було додано:

- циклогексимід - 50 мг / мл.

2.5 Вирощування бактерій на живильному середовищі

По 1 мл з кожного розведення було висіяно на окремі живильні середовища (MRS і TSA), і ретельно розтерто стерильними шпателеми.

Чашки Петрі з MRS інкубували в термостаті при 35°C протягом 24-48 годин. Чашки Петрі з TSA інкубували в термостаті при 30°C протягом 24-48 годин.

Для отримання біомаси певні колонії було пересіяно з чашок з висіяними розведеннями після інкубації. Для пересівів як субстрат використовували середовища (MRS і TSA) без селективних агентів, інкубували за попередніх умов. При роботі дотримувались правил асептики, кожного разу ретельно фламбували петлю.

2.6 Виділення сумарної ДНК

Перед виділенням отримав чисті культури пересівом певних колоній з середовищ, на які висіяно серійні розведення.

Виділення сумарної ДНК (метод з кульками модифікований) бактерій [17]:

1. Відбирали біомаси бактерій в мікропробірки типу еппендорф, додали скляні кульки Scientific Industries SI™ SI-BG01 (приблизний об'єм кульок 300 мл) і 50 мкл TE-буферу. Вортексували впродовж 10 хв.
2. До гомогенату додали 100 мкл TE-буфера.
3. Центрифугували при 10000 об/хв впродовж 30 с.
4. Додали 50 мкл 5М NaCl, згодом обережно перемішали.
5. Додали 200 мкл 10% додецилсульфату натрію (SDS), обережно перемішали.
6. Інкубували 10 хв на водяній бані при температурі 55°C, перемішуючи кожні 5 хв.
7. Для осадження білків додали 240 мкл 5 М ацетату калію. Інкубували 10 хв на льоді.
8. Осаджували 10 хв при 13200 об/хв.
9. Відібрали 500 мкл супернатанту у новий еппендорф. Додали 500 мкл ізопропанолу.
10. Знову осаджували при 13200 об/хв протягом 10 хв. Злили супернатант.
11. Додали 500 мкл 70% етилового спирту.
12. Осаджували при 13200 об/хв протягом 5 хв .
13. Повторно додали 500 мкл 70% етилового спирту.
14. Повторно осаджували при 13200 об/хв протягом 5 хв.
15. Осадили останню краплю і відібрати її.
16. Підсушили осад при кімнатній температурі впродовж 10 хв.
17. Осад розчинили у 30 мкл MilliQ H₂O.

2.7 Полімеразна ланцюгова реакція

Перед ампліфікацією готували реакційну суміш загальним об'ємом 50 мкл.

Склад реакційної суміші:

- матриця – 1 мкл;
- суміш 10 мМ дНТФ (Thermo Scientific) – 1 мкл;
- DMSO – 5 мкл;
- десятикратний буфер - 5 мкл;
- форвардний праймер 8F – 1 мкл;
- реверсний праймер 1510R – 1 мкл;
- ДНК-полімераза (Taq) – 0.25 мкл;
- деіонізована вода – довести до об'єму 50 мкл.

ДНК гену 16S рРНК ампліфікували за допомогою універсальних праймерів 8F, 1510R (табл. 2.7.1) [35]:

Таблиця 2.7.1

Назва праймера	Нуклеотидна послідовність
8F	5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'
1510R	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Полімеразна ланцюгова реакція проходила за наступних умов (табл.2.7.2):

Таблиця 2.7.2

Температура	Час	
95°C	3 хв	
95°C	35 с	x30
55°C	40 с	
72°C	1 хв 20 с	
72°C	10 хв	

2.8 Електрофоретичне розділення ДНК в агарозному гелі

Суміш агарози і ТАЕ-буфера нагрівали і кип'ятили до повного розчинення. Перед заливанням суміші в плашку з гребінцем її попередньо охолоджували до 50°C.

Електрофорез проводили в електрофориметричній ванні АОТН. Напругу в ванні створювали за допомогою приладу Consort EV231. В електрофоретичну камеру наповнену буфером для електрофорезу поміщали плашку з вже полімеризованою агарозою і витягали гребінець для формування лунок. В лунки гелю вносили суміш ДНК і десятикратний буфер (Thermo Scientific). Також маркери за потреби. Електрофорез проводили при напрузі 150 В/см² протягом 20 хвилин. Для візуалізації гель поміщали у бромистий етидій, а згодом реєстрували піддаючи гель дії ультрафіолетового випромінювання.

2.9 Очищення ПЛР продукту

Перед очищенням ПЛР-продукти поміщали у гель з великими лунками і проводили електрофоретичне розділення ДНК. Під ультрафіолетовою лампою стерильним скальпелем вирізали з гелю смуги ДНК, що кодують 16S рРНК і поміщали в мікропробірки типу еппендорф. Мікропробірки зважували, щоб визначити об'єм необхідного буферу. Для очищення ПЛР-продуктів використовували QIAquick Gel Extraction Kit, всі маніпуляції проводили згідно з протоколом від компанії. Щоб розчинити гель в кожну з мікропробірок було додано Solubilization buffer. Вміст мікропробірок було перелито мікропробірки з спіні-колонками для очищення ДНК. Мікропробірки витримували з спіні-колонками протягом 2 хв для максимальної адсорбції ДНК мембраною спіні-колонки. Домішки з ПЛР-продукту осаджували при 12000 об/хв протягом 2 хв. Злили супернатант. В колонку додали Wash buffer для вимивання домішок і осаджували при 12000 об/хв протягом 2 хв. Злили супернатант. ДНК з колонки елюювали додавши 27 мкл води і осаджуючи при 12000 об/хв протягом 2 хв.

2.10 Секвенування

Ген 16S рРНК – це послідовність ДНК розміром ~1500 п.н, що складається з дев'яти варіабельних ділянок (V1 – V9), розташованих по всій висококонсервативній послідовності. Ген 16S рРНК є загально визнаним молекулярним маркером, оскільки він функціонально постійний, має мозаїчну структуру з консервативних і варіабельних ділянок, зустрічається у всіх організмів, так як кодує 16S рибосомальну РНК (рРНК), а також тому, що його довжина дозволяє легко проводити секвенування. Секвенування лише повної області V1-V9 послідовно надає найкращі результати, адже наприклад, область V1–V2 погано зчитується при аналізі нуклеотидних послідовностей виділених з бактерій, що належать до типу *Proteobacteria*, тоді як область V3–V5 погано зчитується при аналізі нуклеотидних послідовностей виділених з бактерій, що належать до типу *Actinobacteria*. Часткове секвенування окремих варіабельних ділянок не може точно відобразити повну різноманітність видів, як при секвенуванні повного гена розміром ~ 1500 п.н. Варіабельні ділянки зазвичай досить для ідентифікації родів, але не завжди здатні адекватно розрізняти види. Отже, незалежно від роздільної здатності, з якою вони кластеризовані, варіабельні ділянки, ймовірно, не відображають справжнє видове багатство досліджуваних зрізів і можуть бути використані лише для ідентифікації родів [5, 12]. Загалом сучасні критерії передбачають, що ізоляти можуть бути віднесені до виду з $\geq 99\%$ збігом, до роду з $\geq 95\%$ збігом або до вищого таксону з $< 95\%$ збігом у базах даних [36].

Секвенування проводилось з використанням форвардного (прямого) і реверсного (зворотнього) праймерів в ТОВ "Експлоджен" (Львів, Україна).

Метод секвенування ДНК шляхом термінації ланцюга розроблений Сенджером базується на принципі, що одноланцюгові молекули ДНК, які відрізняються за довжиною лише на один нуклеотид, можна відокремити одна від одної за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі. Це означає, що можна розділити спектр молекул, що різних довжин від 10 до 1500

нуклеотидів, на серію смуг в пластинчастому або капілярному гелі. Метод було автоматизовано, що дозволило проводити багато індивідуальних експериментів секвенування одночасно. Метод термінації ланцюга дозволяє отримати до 96 нуклеотидних послідовностей одночасно за один запуск секвенатора [3].

Метод ґрунтується на реакції синтезу нуклеотидного ланцюга, що каталізується ензимом ДНК-полімеразою і потребує чотирьох дезоксирибонуклеотидтрифосфатів (дНТФ - дАТФ, дЦТФ, дГТФ і дТТФ) як субстратів. Зазвичай реакція триває доти, доки не буде полімеризовано кілька тисяч нуклеотидів. Але при секвенуванні за Сенджером цього не відбувається, оскільки, окрім чотирьох дезоксинуклеотидів, в реакцію додається невелика кількість кожного з чотирьох дидезоксинуклеотидів (ддНТФ: ддАТФ, ддЦТФ, ддГТФ і ддТТФ). Кожен з цих дидезоксинуклеотидів мічений різним флуоресцентним маркером. В ході реакції ензим полімераза не розрізняє дезокси- і дидезоксинуклеотиди, але після включення в нуклеотидний ланцюг дидезоксинуклеотид блокує подальше подовження ланцюга, оскільки в сполучі відсутня 3'-гідроксильна група, необхідна для утворення зв'язку з наступним нуклеотидом. В результаті утворюється набір нових молекул, всі різної довжини, кожна з яких закінчується дидезоксинуклеотидом, ідентичність якого вказує на нуклеотид - А, Ц, Г або Т - який присутній в еквівалентній позиції в шаблоні ДНК [3].

Щоб визначити послідовність ДНК ідентифікують дидезоксинуклеотид на кінці кожної молекули. Саме для цього використовують поліакриламідний гель. Суміш завантажують у лунку поліакриламідного пластинчастого гелю або в пробірку капілярної гель-системи, і проводять електрофорез, щоб розділити молекули відповідно до їх довжини. Після розділення молекули пропускають крізь флуоресцентний детектор, здатний розрізняти мітки, прикріплені до дидезоксинуклеотидів. Таким чином, детектор визначає, чи закінчується кожна молекула на А, Ц, Г або Т [3].

2.11 Аналіз нуклеотидних послідовностей

Перед аналізом здійснювали редагування, вирівнювання, елаймент, прямих і зворотних нуклеотидних послідовностей отриманих після секвенування, для створення консенсусних послідовностей (рис 2.2), які необхідні для ідентифікації родів. Всі ці маніпуляції здійснювали за допомогою програми Geneious.



Рис 2.2. Консенсусна послідовність нуклеотидів створена для ізоляту AMCr1 в програмі Geneious.

Пошук гомологічних нуклеотидних послідовностей здійснювали за допомогою алгоритму BLAST в базі даних NCBI (Національного центру біотехнологічної інформації).

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Ізоляція мікроорганізмів зі взірців середньої кишки різних порід *A. mellifera*

Ми відібрали взірці середньої кишки трьох порід бджіл: *A. m. carpatica*, *A. m. carnica*, *A. m. buckfast*. Гомогенати взірців (у розведеннях 10^{-1} - 10^{-5}) висівали на тверді живильні середовища: TSA і MRS. На 2-3-й день культивування на середовищі MRS за морфолого-культуральними ознаками ми виокремили 25 різних колоній. На 2-3-й день культивування на середовищі TSA за морфолого-культуральними ознаками ми виокремили 13 різних колоній.

Для отримання чистих культур з метою ідентифікації колоній мікроорганізмів ми здійснили пересів взірців кожної колонії. Відповідний взірець пересіювали методом газону на середовище TSA або MRS, що залежало від того, на якому з них попередньо колонію виокремлено за морфолого-культуральними ознаками. Наступним нашим кроком було виділення ДНК для проведення ПЛР. Таким чином, ми отримали 10 чистих культур мікроорганізмів, які вирощено на живильному середовищі TSA та 22-і – на MRS. З кожної колонії мікроорганізмів виділено ДНК, продуковано амплікони.

На Рисунках 3. 1. 1 – 3. 1. 3. продемонстровано морфологічні ознаки деяких чистих культур мікроорганізмів, ДНК яких вдалось ізолювати, ампліфікувати, а згодом ідентифікувати із застосуванням методу секвенування. Кожен з ізолятів зашифровано, відповідність виду наведено у Додатку А.

Досліджено чисті культури п'яти колоній бактерій середньої кишки *A. m. buckfast* – ізоляти: АМВ1, АМВ2, АМВ3, АМВ4, АМВ5 (рис. 3. 1. 1).

Досліджено чисті культури чотирьох колоній бактерій середньої кишки *A. m. carpatica* – ізоляти: АМСр1, АМСр2, АМСр3, АМСр4 (рис. 3. 1. 2).

Досліджено чисті культури чотирьох колоній бактерій середньої кишки *A. m. carpatica* – ізоляти: АМСr1, АМСr2, АМСr3, АМСr4 (рис. 3. 1. 3).

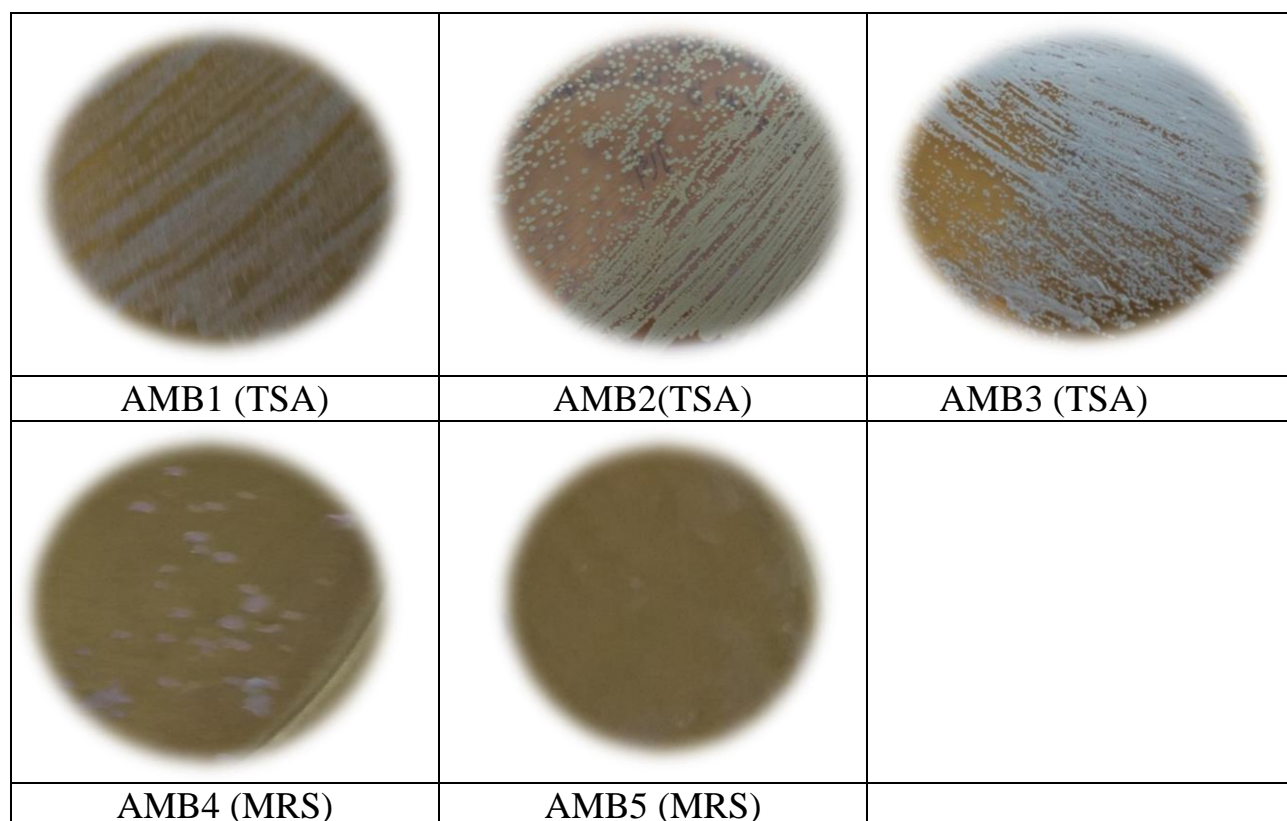


Рис. 3.1.1. Чисті культури бактерій, ізольованих з середньої кишки *A. m. buckfast*

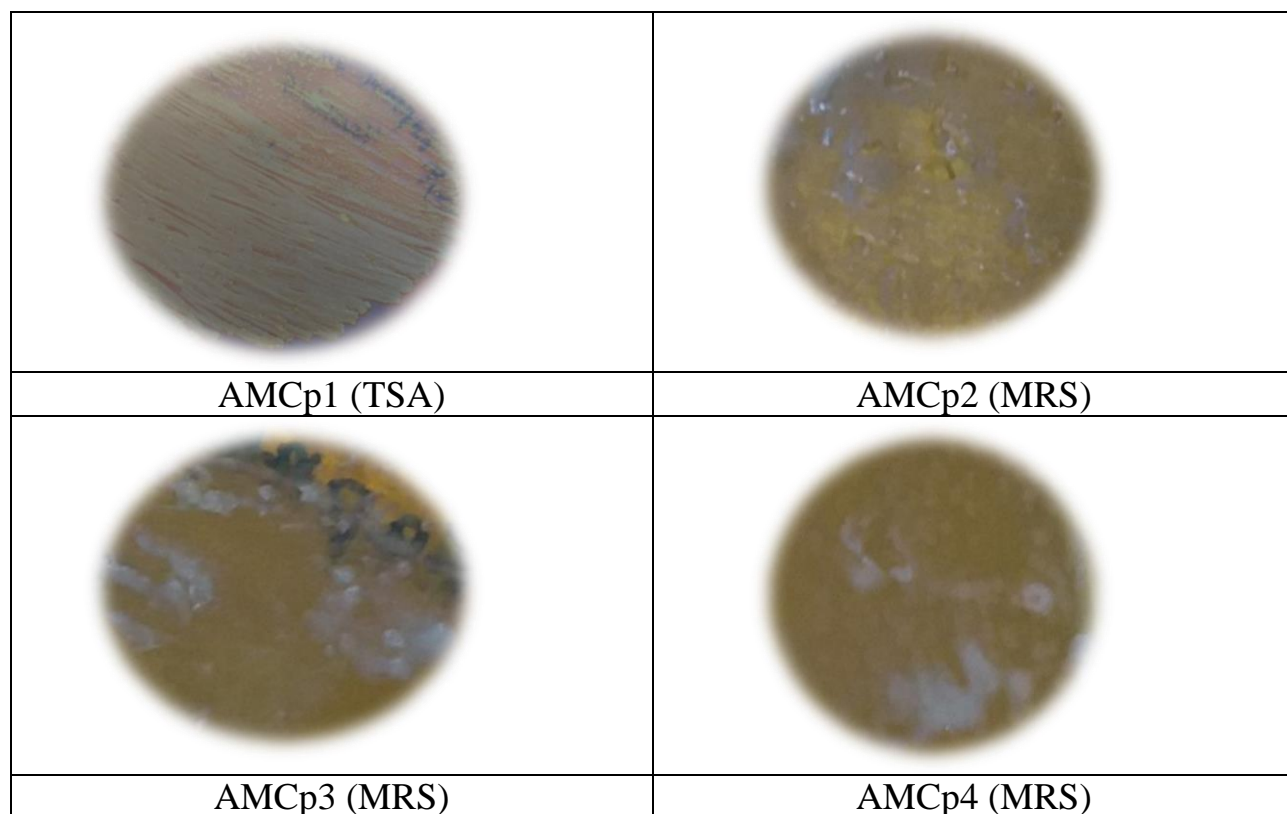


Рис. 3. 1. 2. Чисті культури бактерій, ізольованих з середньої кишки *A. m. carpatica*

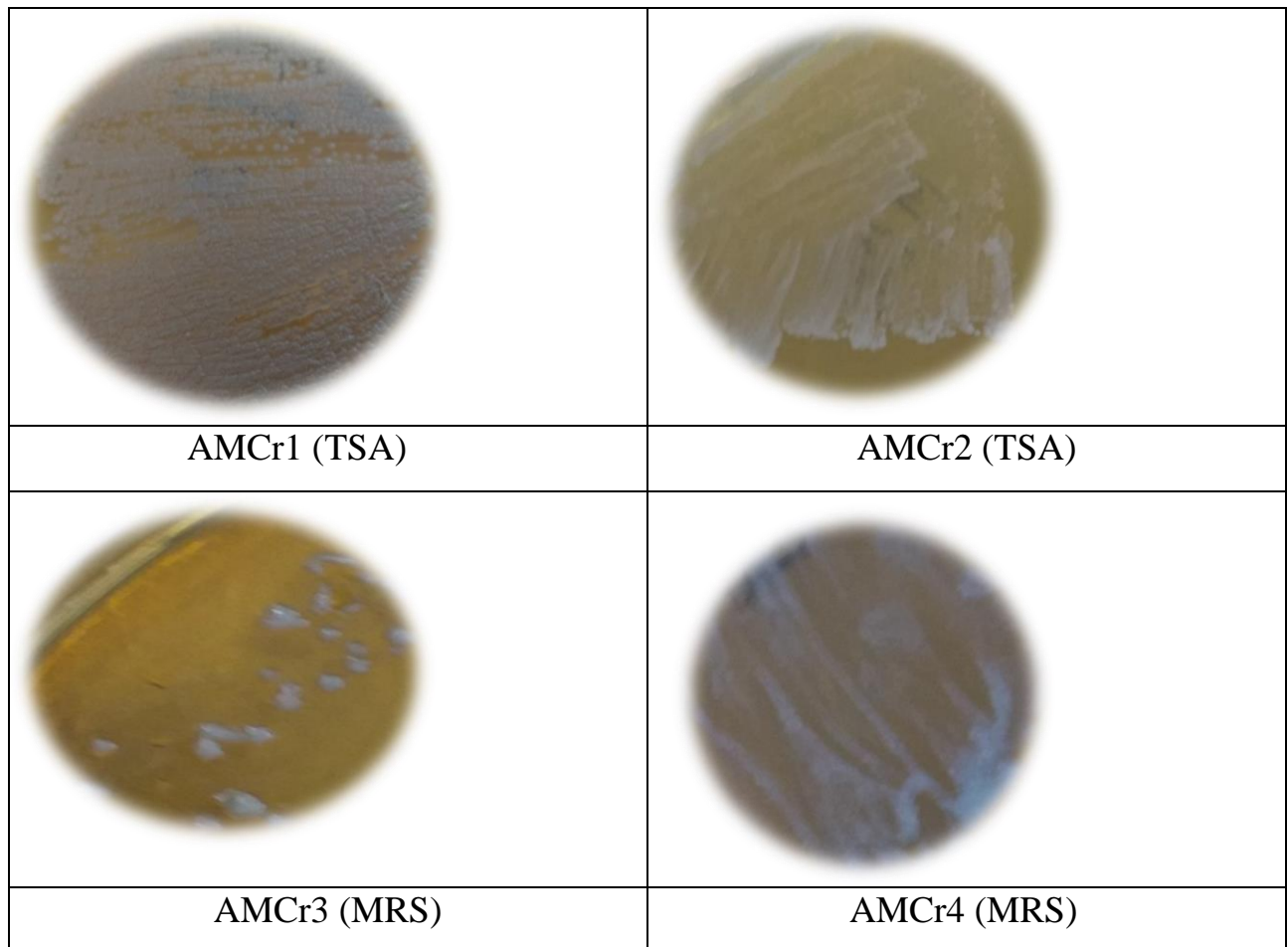


Рис. 3. 1. 3. Чисті культури бактерій, ізольованих з середньої кишки *A. m. carnica*

Отже, з досліджуваних зразків середньої кишки трьох порід бджіл: *A. m. carpatica*, *A. m. carnica*, *A. m. buckfast* отримано чисті культури мікроорганізмів на живильних середовищах TSA та MRS. З шести різних колоній мікроорганізмів отримано чисті культури за культивування на середовищі TSA і з семи – за культивування на середовищі MRS.

3.2. Виділення сумарної ДНК і ампліфікація гена, який кодує 16S рРНК

З біомаси чистих культур успішно виділено ДНК, у складі якої ген 16S рРНК. Ген успішно ампліфіковано, проведено електрофоретичне розділення ДНК в агарозному гелі. Дані відображено на електрофореграмах (рис. 3.2.1).

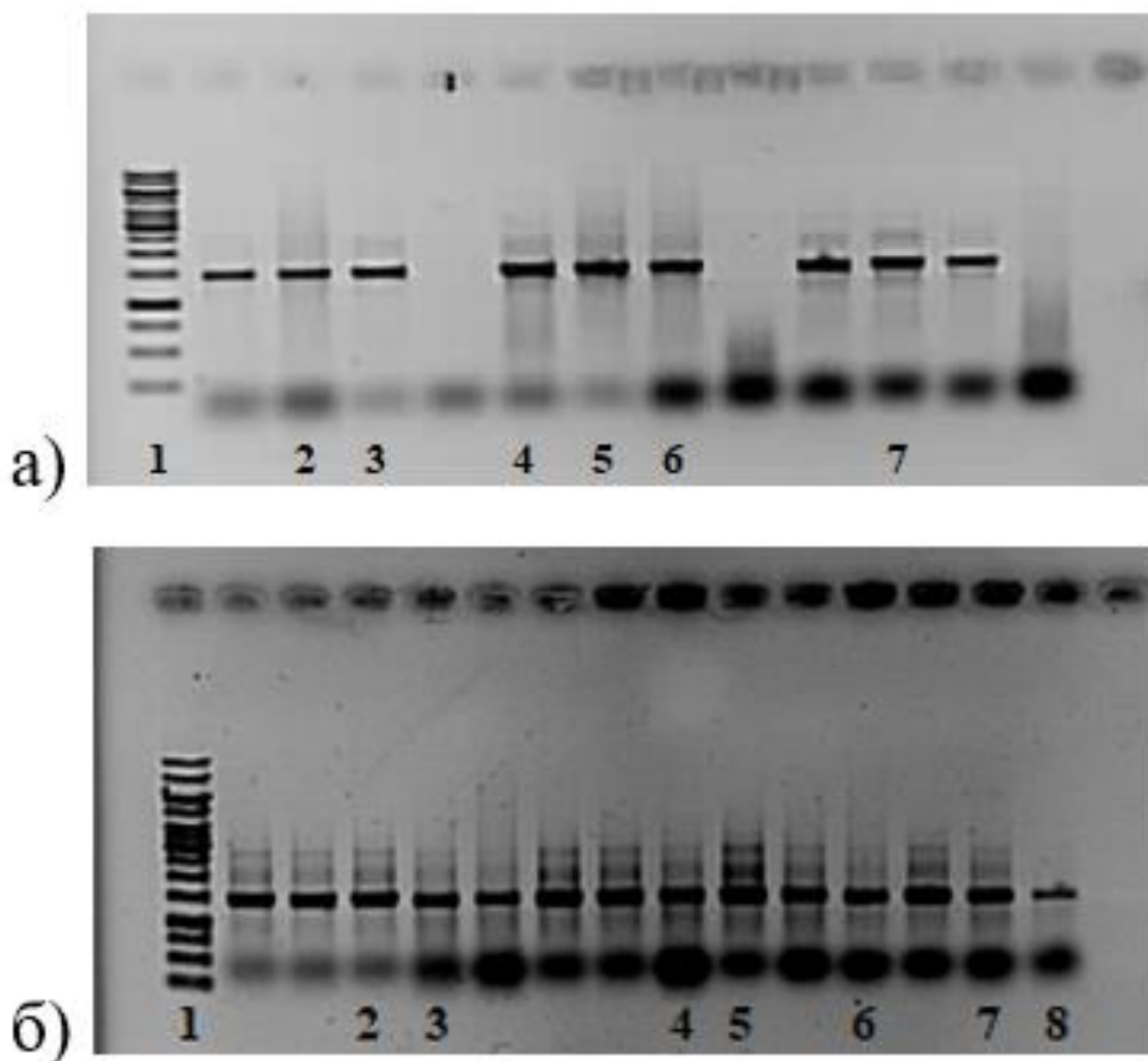


Рис. 3.2.1. Електрофореграми, що підтверджують ампліфікацію гена 16S рРНК: а) амплікони ізолятів, отриманих на середовищі TSA: 1- маркер молекулярної маси (GeneRuler 1kb DNA Ladder), 2 - AMB1, 3 - AMB2, 4 - AMB3, 5 - AMCr1, 6 - AMCr1, 7 - AMCr2; б) амплікони ізолятів, отриманих на середовищі MRS: 1 - маркер молекулярної маси (GeneRuler 1kb DNA Ladder); 2 - AMB4; 3 - AMB5; 4 - AMCr3; 5 - AMCr4; 6 - AMCr2; 7 - AMCr3; 8 - AMCr4.

Візуально порівняно смуги, отриманих ампліконів, зі смугами маркера молекулярної маси. Виснуємо, довжина досліджуваних ампліконів у межах 1500-1600 пар нуклеотидів, що відповідає такій маркерному гену 16S рРНК на маркері молекулярної маси.

Успішне виділення ДНК, зокрема гена 16S рРНК із кожної з 13-ти чистих культур мікроорганізмів кишківника бджіл доведено методом електрофору.

3.3 Аналіз нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК бактерій кишківника *A. m. buckfast*

Загалом з взірців кишківника *A. m. buckfast* ми ідентифікували п'ять родів мікроорганізмів, які відносяться до трьох типів: *Actinomycetota* (*Actinobacteria*), *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*), *Bacillota* (*Firmicutes*) (рис. 3.3.1).

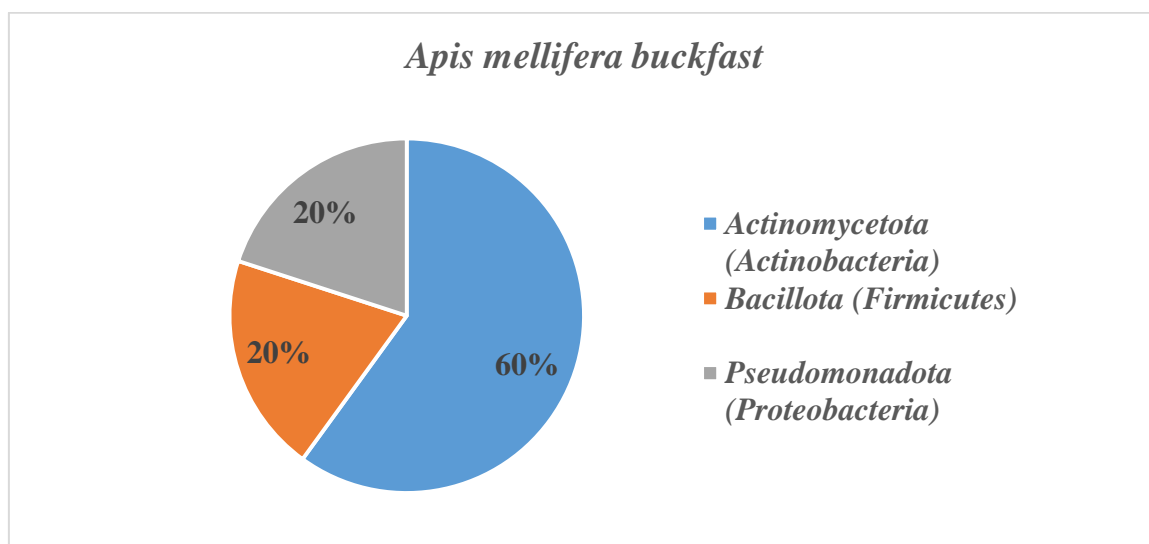


Рис. 3.3.1. Відсотковий розподіл типів мікроорганізмів відносно загального спектру, ідентифікованого у кишківнику *Apis mellifera buckfast*

Аналізуючи нуклеотидні послідовності генів 16S рРНК, виділених з бактерій кишківника *A. m. buckfast* за допомогою алгоритму BLAST, ідентифіковано три роди мікроорганізмів: *Microbacterium* (ізолят АМВ1), *Micrococcus* (ізолят АМВ2), *Janibacter* (ізолят АМВ3), які відносять до типу *Actinomycetota*, один рід *Lactobacillus* (ізолят АМВ4), який відносять до типу *Bacillota*, і ще один рід *Bombella* (ізолят АМВ5), який віднесено до типу *Pseudomonadota* (рис. 3.3.2).

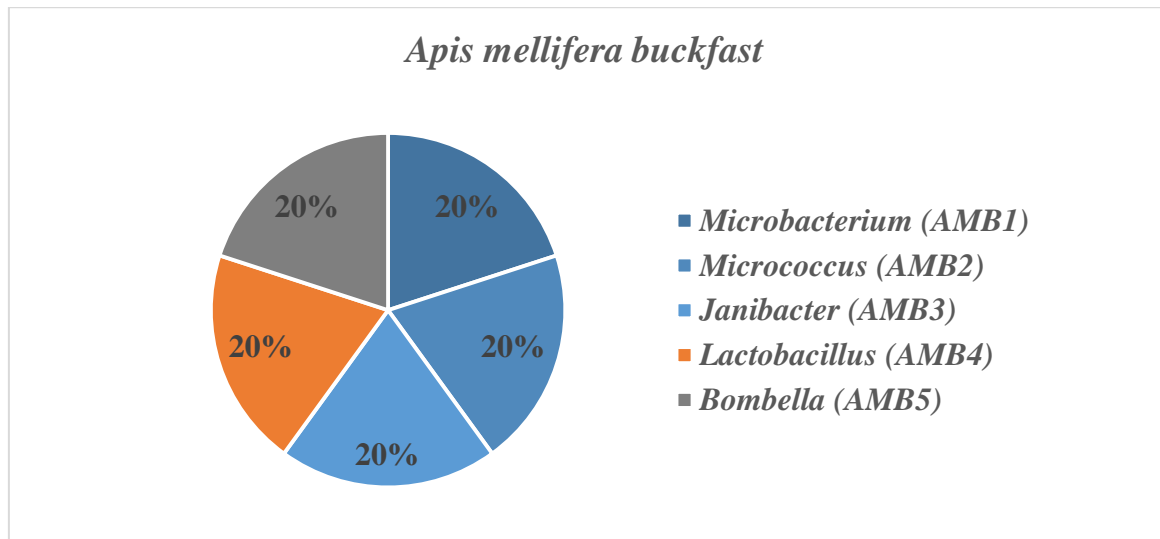


Рис. 3.3.2. Родове різноманіття мікробіоти кишківника *Apis mellifera buckfast*. Дані наведено у відсотках відносно загального числа ідентифікованих нами родів. У дужках зазначено номери ізолятів, для яких ідентифіковано відповідний рід.

Роди *Micrococcus* і *Microbacterium* ідентифіковано нами в кишківнику *A. m. buckfast*. Вони не є представниками основної мікробіоти медоносних бджіл. Часто їх виявляють, досліджуючи мед і пилок [16]. Проаналізувавши дані літератури, бачимо, що представників родів *Micrococcus*, *Microbacterium* у складі мікробіоти кишкового тракту *A. mellifera* ідентифіковано й іншими науковцями за допомогою мікробіологічних досліджень [24, 13].

Щодо ідентифікації у кишківнику *A. mellifera* мікроорганізмів роду *Janibacter*, у літературі даних не знайдено.

Цікаво, що ізолят АМВ3, який у результаті аналізу нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК в базах даних ідентифіковано як *Janibacter*, показав 100% ідентичність за геном з видом *Janibacter anophelis*. *Janibacter anophelis* є характерним мікроорганізмом кишківника москіта роду *Anopheles*. Такий факт може свідчити про здатність представників цього роду до колонізації кишківника комах загалом [14].

Отже, проаналізовано нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК бактерій кишківника *A. m. buckfast* за допомогою алгоритму BLAST. У результаті ідентифіковано представників п'яти родів мікроорганізмів: *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Janibacter*, *Lactobacillus*, *Bombella*, які відносять до трьох типів: *Actinomycetota*, *Bacillota*, *Pseudomonadota*. Представники родів *Lactobacillus* і *Bombella* є типовими симбіонтами кишківника *A. mellifera*, тоді як *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Janibacter* більш характеризують мікробіоту пилку, нектару.

3.4 Аналіз нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК, бактерій кишківника *Apis mellifera carpatica*

Загалом з взірців кишківника *A. m. carpatica* ми ідентифікували два роди мікроорганізмів, які відносяться до двох типів (рис. 3.4.1): *Actinomycetota* (*Actinobacteria*), *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*).

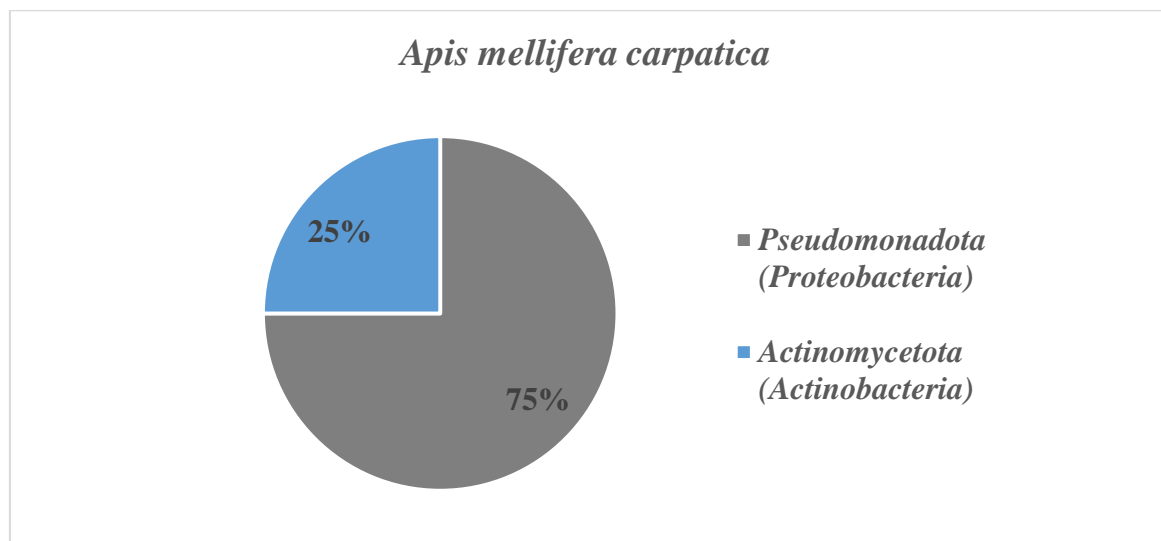


Рис. 3.4.1. Відсотковий розподіл типів мікроорганізмів відносно загального спектру, ідентифікованого у кишківнику *Apis mellifera carpatica*.

Аналізуючи нуклеотидні послідовності генів 16S рРНК, виділених з бактерій кишківника *A. m. carpatica* за допомогою алгоритму BLAST було ідентифіковано два роди (рис. 3.4.2): рід *Bombella* (ізоляти АМСр2, АМСр3, АМСр4), який було віднесено до типу *Pseudomonadota*, і рід *Neomicrococcus* (ізолят АМСр1), який було віднесено до типу *Actinomycetota*.

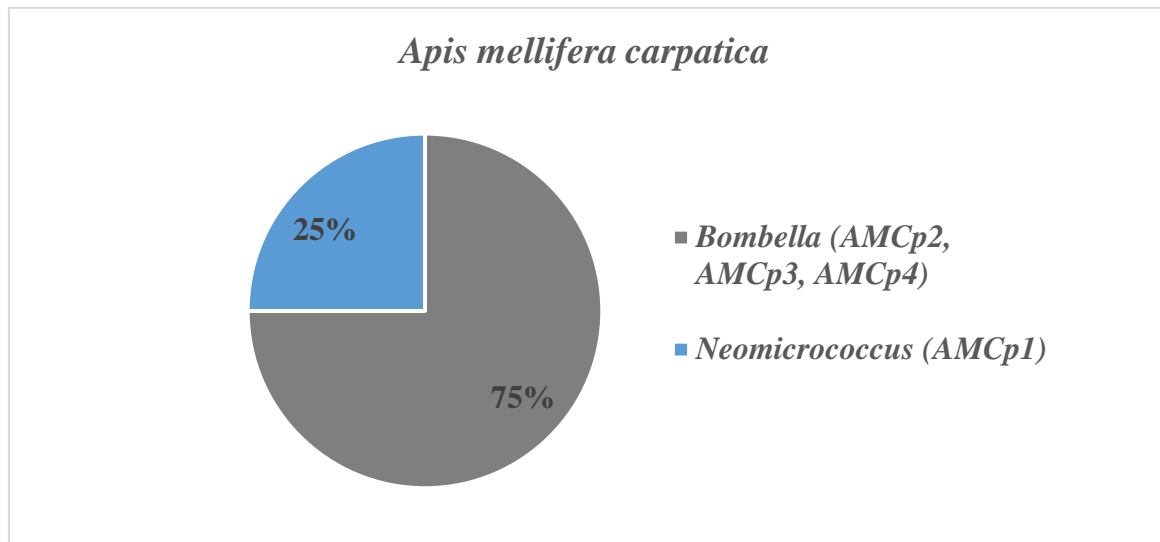


Рис. 3.4.2. Родове різноманіття мікробіоти кишківника *Apis mellifera carpatica*. Дані наведено у відсотках відносно загального числа ідентифікованих нами родів. У дужках зазначено номери ізолятів, для яких ідентифіковано відповідний рід.

Рід *Bombella* ідентифікований нами в кишківнику *A. m. carpatica*. Представників роду *Bombella* відносять до основної мікробіоти медоносних бджіл, проте вони поширені в колоніях, і не обов'язково присутні у кишківнику кожної бджоли. Рід *Bombella* ідентифікований нами в найбільшій чисельності, виявився єдиним спільним родом для *A. m. carpatica* і *A. m. buckfast*.

Щодо ідентифікації у кишківнику *A. mellifera* мікроорганізмів роду *Neomicrococcus*, у літературі даних не знайдено.

Отже, проаналізовано нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК бактерій кишківника *A. m. carpatica* за допомогою алгоритму BLAST. У результаті

ідентифіковано представників двох родів мікроорганізмів: *Bombella* і *Neomicrococcus*, які відносять до двох типів: *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, відповідно. З'ясовано, що представники роду *Bombella* домінують серед бактерій кишківника *A. m. carpatica* і є єдиним спільним родом у популяціях мікроорганізмів кишківника *A. m. carpatica* і *A. m. buckfast*.

3.5 Аналіз нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК, бактерій кишківника *Apis mellifera carnica*

Загалом в середній кишці *A. m. carnica* було ідентифіковано три роди, представники яких належали до двох типів (рис. 3.5.1): *Actinomycetota* (*Actinobacteria*), *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*).

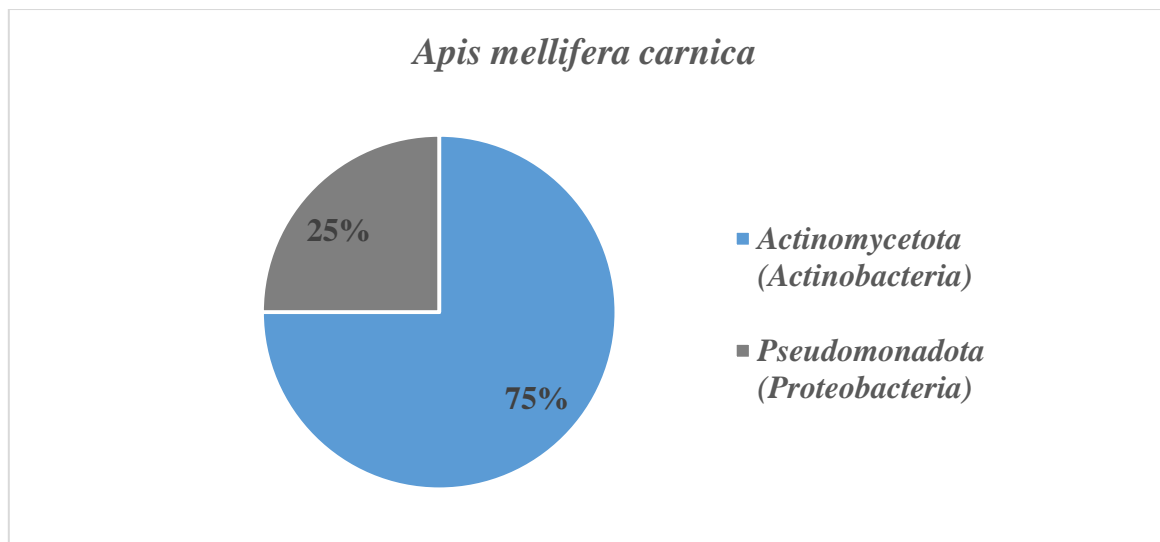


Рис. 3.5.1. Відсотковий розподіл типів мікроорганізмів відносно загального спектру, ідентифікованого у кишківнику *Apis mellifera carnica*.

Роди бактерій виділених з кишківника *A. m. carnica* ідентифіковано секвенуванням та їхню чисельність наведено в діаграмі (рис. 3.5.2).

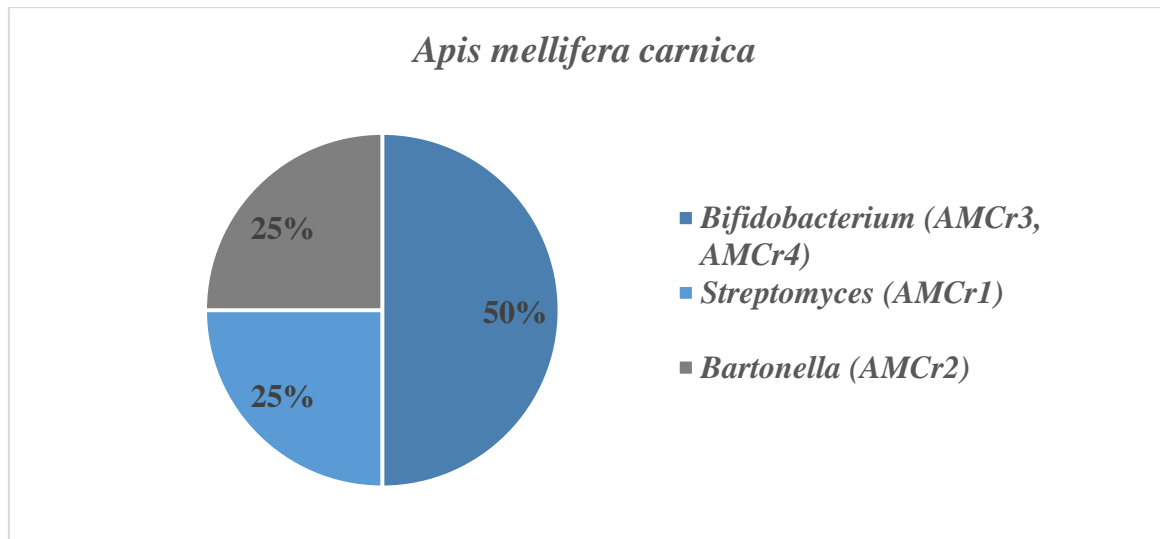


Рис. 3.5.2. Родове різноманіття мікробіоти кишківника *Apis mellifera carnica*. Дані наведено у відсотках відносно загального числа ідентифікованих нами родів. У дужках зазначено номери ізолятів, для яких ідентифіковано відповідний рід.

Аналізуючи нуклеотидні послідовності генів 16S рРНК, виділених з бактерій кишківника *A. m. carnica* за допомогою алгоритму BLAST, ідентифіковано три роди (рис. 3.5.2): роди *Bifidobacterium* (ізоляти AMCr3, AMCr4) і *Streptomyces* (ізолят AMCr1), які відносять до типу *Actinomycetota* і рід *Bartonella* (ізолят AMCr2), який віднесено до типу *Pseudomonadota*.

Рід *Streptomyces* ідентифіковано нами в кишківнику *A. m. carnica*. Він не є представником основної мікробіоти медоносних бджіл. Хоча представників роду *Streptomyces* виділено з кишківника *A. mellifera*, вважається, що їх виділення з кишківника комах є складнішим завданням, ніж ізоляція зі звичайних середовищ, через наявність обмежених бактеріальних угруповань *Streptomyces*. Проаналізувавши дані літератури, бачимо, що виділення і ідентифікація представників роду *Streptomyces*, які синтезують біологічно активні метаболіти, з конкурентних середовищ існування, таких як кишківник *A. mellifera*, є життєво важливим напрямком досліджень з огляду на існуючу дилему резистентності до ліків та пошуку нових антимікробних препаратів [1].

Отже, проаналізовано нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК бактерій кишківника *A. m. carpatica* за допомогою алгоритму BLAST. У результаті ідентифіковано представників трьох родів мікроорганізмів: *Bifidobacterium*, *Streptomyces*, *Bartonella*, які відносять до двох типів: *Actinomycetota*, *Pseudomonadota*. Представники родів *Bifidobacterium* і *Bartonella* є найбільш чисельними у складі популяції мікроорганізмів кишківника бджіл і відіграють важливу роль для фізіологічно нормального функціонування організму комах.

ВИСНОВКИ

1. З досліджуваних взірців середньої кишки трьох порід бджіл: *A. m. carpatica*, *A. m. carnica*, *A. m. buckfast* отримано чисті культури мікроорганізмів на живильних середовищах TSA та MRS. З шести різних колоній мікроорганізмів отримано чисті культури за культивування на середовищі TSA і з семи – за культивування на середовищі MRS.

2. З мікроорганізмів кишківника бджіл виділено ДНК і ампліфіковано ген 16S рРНК.

3. Проаналізовано нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК бактерій кишківника *A. m. buckfast*. У результаті ідентифіковано представників п'яти родів мікроорганізмів: *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Janibacter*, *Lactobacillus*, *Bombella*, які відносять до трьох типів: *Actinomycetota*, *Bacillota*, *Pseudomonadota*.

4. Проаналізовано нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК бактерій кишківника *A. m. carpatica*. У результаті ідентифіковано представників двох родів мікроорганізмів: *Bombella*, *Neomicrococcus*, які відносять до двох типів: *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*.

5. Проаналізовано нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК бактерій кишківника *A. m. carnica*. У результаті ідентифіковано представників трьох родів мікроорганізмів: *Bifidobacterium*, *Streptomyces*, *Bartonella*, які відносять до двох типів: *Actinomycetota*, *Pseudomonadota*,

6. Досліджено, що представники роду *Bombella* є спільними для *A. m. buckfast* і *A. m. carpatica* мікроорганізми та найчисельнішим секвенованим родом (4 ізоляти).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Al-Enazi NM, Abdel-Raouf N, Alharbi RM, Sholkamy EN. Metabolic Profiling of *Streptomyces* sp. Strain ess_amH1 Isolated from *Apis mellifera yemintica*'s Gut Microbiome, and Its Anticancer Activity against Breast Cancer (MCF7) and Hepatocarcinoma (HepG2) Cell Lines, as Well as Antimicrobial Activity. *Applied Sciences*. 2022; 12(23):12257. <https://doi.org/10.3390/app122312257>
2. Bottacini F, Milani C, Turrone F, et al. Bifidobacterium asteroides PRL2011 genome analysis reveals clues for colonization of the insect gut. *PLoS One*. 2012; 7(9):e44229. doi:10.1371/journal.pone.0044229
3. Brown, TA. Gene Cloning and DNA Analysis, An Introduction. 6th ed. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, UK. 2010. 336p.
4. CEBOTARI, V., BUZU, I. The morpho-productive particularities of queens *Apis mellifera carpatica* inseminated instrumentally. In: Scientific Papers. Series D // Animal Science. 2021, Vol. 2, N 64. P. 25-34.
5. Coenye T, Vandamme P. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiol Lett*. 2003; 228(1):45-49. doi:10.1016/S0378-1097(03)00717-1
6. de Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E. A Medium for the Cultivation of Lactobacilli // *Journal of Applied Bacteriology*. 1960. Vol. 23. P. 130–135.
7. Engel, P., James, R.R., Koga, R., Kwong, W.K., McFrederick, Q.S. and Moran, N.A. Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. *Journal of Apicultural Research*. 2013. Vol. 52, P. 1–24.
8. Engel P, Kwong WK, Moran NA. Frischella perrara gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from the gut of the honeybee, *Apis mellifera*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013; 63(10):3646-3651. doi:10.1099/ijs.0.049569-0

9. Härer L, Hilgarth M, Ehrmann MA. Comparative Genomics of Acetic Acid Bacteria within the Genus *Bombella* in Light of Beehive Habitat Adaptation. *Microorganisms*. 2022; 10(5):1058. doi:10.3390/microorganisms10051058
10. Hilgarth M, Redwitz J, Ehrmann MA, Vogel RF, Jakob F. *Bombella favorum* sp. nov. and *Bombella mellum* sp. nov., two novel species isolated from the honeycombs of *Apis mellifera*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2021; 71(2):10.1099/ijsem.0.004633. doi:10.1099/ijsem.0.004633
11. Hroncova Z., Havlik J., Killer J, et al. Variation in honey bee gut microbial diversity affected by ontogenetic stage, age and geographic location. *PLoS One*. 2015; 10(3):e0118707. doi:10.1371/journal.pone.0118707
12. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun*. 2019; 10(1):5029. doi:10.1038/s41467-019-13036-1
13. Kačániová M, Terentjeva M, Žiarovská J, Kowalczewski PŁ. In Vitro Antagonistic Effect of Gut Bacteriota Isolated from Indigenous Honey Bees and Essential Oils against *Paenibacillus Larvae*. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(18):6736. Published 2020 Sep 14. doi:10.3390/ijms21186736
14. Kämpfer P, Terenius O, Lindh JM, Faye I. *Janibacter anophelis* sp. nov., isolated from the midgut of *Anopheles arabiensis*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006; 56(2):389-392. doi:10.1099/ijms.0.63905-0
15. Kešnerová L, Emery O, Troilo M, Liberti J, Erkosar B, Engel P. Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer. *ISME J*. 2020; 14(3):801-814. doi:10.1038/s41396-019-0568-8
16. Khan KA, Al-Ghamdi AA, Ghramh HA, et al. Structural diversity and functional variability of gut microbial communities associated with honey bees. *Microb Pathog*. 2020; 138:103793. doi:10.1016/j.micpath.2019.103793
17. Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., & Hopwood D. A. Practical streptomyces genetics. John Innes Foundation. Norwich, 2000. 613p.

18. 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. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014; 64(1):152-157. doi:10.1099/ijs.0.053033-0
19. Kwong WK, Moran NA. Cultivation and characterization of the gut symbionts of honey bees and bumble bees: description of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a member of the family Neisseriaceae of the Betaproteobacteria, and *Gilliamella apicola* gen. nov., sp. nov., a member of Orbaceae fam. nov., Orbales ord. nov., a sister taxon to the order 'Enterobacteriales' of the Gammaproteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013; 63(6):2008-2018. doi:10.1099/ijs.0.044875-0
20. Kwong WK, Moran NA. Gut microbial communities of social bees. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14(6):374-384. doi:10.1038/nrmicro.2016.43
21. Lang H, Duan H, Wang J, et al. Specific Strains of Honeybee Gut *Lactobacillus* Stimulate Host Immune System to Protect against Pathogenic *Hafnia alvei*. *Microbiol Spectr.* 2022; 10(1):e0189621. doi:10.1128/spectrum.01896-21
22. Leska A, Nowak A, Rosicka-Kaczmarek J, Ryngajłło M, Czarnecka-Chrebelska KH. Characterization and Protective Properties of Lactic Acid Bacteria Intended to Be Used in Probiotic Preparation for Honeybees (*Apis mellifera* L.)-An In Vitro Study. *Animals (Basel).* 2023; 13(6):1059. doi:10.3390/ani13061059
23. Li L, Praet J, Borremans W, et al. *Bombella intestini* gen. nov., sp. nov., an acetic acid bacterium isolated from bumble bee crop. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015; 65(1):267-273. doi:10.1099/ijs.0.068049-0
24. Li Y, Chang L, Xu K, Zhang S, Gao F, Fan Y. Research Progresses on the Function and Detection Methods of Insect Gut Microbes. *Microorganisms.* 2023; 11(5):1208. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051208>

25. Liu Y, Chen J, Lang H, Zheng H. *Bartonella choladocola* sp. nov. and *Bartonella apihabitans* sp. nov., two novel species isolated from honey bee gut. *Syst Appl Microbiol.* 2022; 45(6):126372. doi:10.1016/j.syapm.2022.126372
26. Ludvigsen J, Porcellato D, Amdam GV, Rudi K. Addressing the diversity of the honeybee gut symbiont *Gilliamella*: description of *Gilliamella apis* sp. nov., isolated from the gut of honeybees (*Apis mellifera*). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018; 68(5):1762-1770. doi:10.1099/ijsem.0.002749
27. Lugli GA, Fontana F, Tarracchini C, et al. Exploring the biodiversity of *Bifidobacterium asteroides* among honeybee microbiomes. *Environ Microbiol.* 2022; 24(12):5666-5679. doi:10.1111/1462-2920.16223
28. Miller DL, Smith EA, Newton ILG. A Bacterial Symbiont Protects Honey Bees from Fungal Disease. *mBio.* 2021; 12(3):e0050321. doi:10.1128/mBio.00503-21
29. Moškrič A, Marinč A, Ferik P, et al. The Carniolan Honeybee from Slovenia-A Complete and Annotated Mitochondrial Genome with Comparisons to Closely Related *Apis mellifera* Subspecies. *Insects.* 2022; 13(5):403. doi:10.3390/insects13050403
30. Nowak A, Szczuka D, Górczyńska A, Motyl I, Kręgiel D. Characterization of *Apis mellifera* Gastrointestinal Microbiota and Lactic Acid Bacteria for Honeybee Protection-A Review. *Cells.* 2021; 10(3):701. doi:10.3390/cells10030701
31. Okuyama H, Hill J, Martin SJ, Takahashi JI. The complete mitochondrial genome of a Buckfast bee, *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) in Northern Ireland. *Mitochondrial DNA B Resour.* 2018; 3(1):338-339. doi:10.1080/23802359.2018.1450660
32. Panjad P, Yongsawas R, Sinpoo C, et al. Impact of Nosema Disease and American Foulbrood on Gut Bacterial Communities of Honeybees *Apis mellifera*. *Insects.* 2021; 12(6):525. doi:10.3390/insects12060525

33. Romero S, Nastasa A, Chapman A, Kwong WK, Foster LJ. The honey bee gut microbiota: strategies for study and characterization. *Insect Mol Biol.* 2019; 28(4): 455-472. doi:10.1111/imb.12567
34. Schmidt K, Santos-Matos G, Leopold-Messer S, et al. Integration host factor regulates colonization factors in the bee gut symbiont *Frischella perrara*. *Elife.* 2023; 12:e76182. doi:10.7554/eLife.76182
35. Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS One.* 2014; 9(8):e105592. doi:10.1371/journal.pone.0105592
36. Tewari D, Cieply S, Livengood J. Identification of bacteria recovered from animals using the 16S ribosomal RNA gene with pyrosequencing and Sanger sequencing. *J Vet Diagn Invest.* 2011; 23(6):1104-1108. doi:10.1177/1040638711425583
37. Yun JH, Jung MJ, Kim PS, Bae JW. Social status shapes the bacterial and fungal gut communities of the honey bee. *Sci Rep.* 2018; 8(1):2019. doi:10.1038/s41598-018-19860-7
38. Yun JH, Lee JY, Hyun DW, Jung MJ, Bae JW. *Bombella apis* sp. nov., an acetic acid bacterium isolated from the midgut of a honey bee. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017; 67(7):2184-2188. doi:10.1099/ijsem.0.001921
39. Zheng H, Steele MI, Leonard SP, Motta EVS, Moran NA. Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab Anim (NY).* 2018; 47(11):317-325. doi:10.1038/s41684-018-0173-x

ДОДАТОК А

Характеристика секвенованих ізолятів, виділених із середньої кишки

A. mellifera.

Таблиця 1

Назва ізоляту	Довжина нуклеотидної послідовності	Концентрація амплікону, нг/мкл	Вид	Ідентичність, %
АМВ1	1397	26	<i>Microbacterium lacus</i>	99.57
АМВ2	1412	36	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	99.71
АМВ3	1372	12	<i>Janibacter anophelis</i>	100.00
АМВ4	1449	20	<i>Lactobacillus apis</i>	96.02
АМВ5	1340	12	<i>Bombella apis</i>	95.67
АМСр1	1412	33	<i>Neomicrococcus lactis</i>	99.78
АМСр2	1346	8	<i>Bombella apis</i>	95.40
АМСр3	1350	13	<i>Bombella apis</i>	96.75
АМСр4	1306	8	<i>Bombella apis</i>	80.28
АМСр1	1413	46	<i>Streptomyces pratensis</i>	99.72
			<i>Streptomyces anulatus</i>	99.72
			<i>Streptomyces praecox</i>	99.72
			<i>Streptomyces anulatus</i>	99.72
АМСр2	1350	17	<i>Bartonella apis</i>	96.82
АМСр3	1403	12	<i>Bifidobacterium choladohabitans</i>	99.14
АМСр4	1408	10	<i>Bifidobacterium choladohabitans</i>	99.57