

Таксономическая структура бактериального метагенома в кишечнике рабочих медоносных пчел *Apis mellifera* L. в Крыму

Быкова Т. О., Ивашов А. В.

Институт биотехнологий, экологии и фармации Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского
Симферополь, Республика Крым, Россия
t.o.bykova@mail.ru, aivashov@mail.ru

Секвенирование методом «дробовика» применено для определения маркерных возможностей участка ДНК гена, кодирующего 16S рРНК малой субъединицы бактериальной рибосомы. Определен таксономический состав бактериального метагенома в кишечнике медоносных пчел (*Apis mellifera* L.) Крыма. В кишечниках всех проанализированных пчел присутствует облигатное ядро, состоящее из 7 основных родов домена бактерий, относящихся к 4 типам, 5 классам, 6 порядкам и 6 семействам. Наибольшей долей видов в ядре метагенома бактерий представлено семейство *Orbaceae*. Наибольшим числом видов в этом семействе обладают роды *Gilliamella* и *Frischella* – 39,8 и 20,4 % видов соответственно. Вторую позицию с очень близкими долями видов занимают роды *Snodgrassella* и *Lactobacillus* (соответственно 1,9 и 13,0 % видов). В третью группу родов вошли роды *Bartonella* и *Bifidobacterium*, с 5,8 и 2,21 % видов, соответственно. Замыкает список род *Commensalibacter* с долей менее одного процента видов (0,4 %). На основе литературных данных составлен список видов, относящихся к соответствующим семи родам. На основании анализа литературных источников установлено, что в мероконсорцию метагенома *A. mellifera* с семью родами входит минимум по одному виду. Исключение составляют род *Bifidobacterium*, он представлен тремя видами, и род *Lactobacillus* – семью. Таксоны домена архебактерий представлены 1 типом, 1 классом, 2 порядками, 2 семействами и 3 родами. Однако, их доля в метагеноме не превышала сотые доли процента. Таким образом, можно считать эти бактерии случайным компонентом, не характерным для кишечного микробиома *A. mellifera*.

Ключевые слова: *Apis mellifera*, бактерии, архебактерии, таксономический состав, метагеном, Крым.

ВВЕДЕНИЕ

Еще в середине прошлого века независимо друг от друга зоолог В. Н. Беклемишев (1951) и ботаник Л. Г. Раменский (1952) предложили научному сообществу учение о консорции. Не вдаваясь в детали двух точек зрения этих исторически значимых русских ученых, отметим, что оба они, по сути, определили консорцию как совокупность разнородных живых организмов, обитающих на или в достаточно крупном организме — ядре индивидуальной консорции. Сегодня бурное развитие молекулярной генетики и прежде всего разработка и применение ДНК-технологий с использованием ПЦР и секвенирование методом «дробовика» позволяет получать сведения о подавляющем большинстве микроорганизмов, обитающих в различных органах многоклеточных организмов — мероконсорциях. Благодаря этому, на стыке микробиологии, молекулярной генетики, и экологии развивается новая междисциплинарная наука «экологическая метагеномика», методы которой позволяют получать сведения о таксономическом составе микробных сообществ и функциональной роли отдельных его видов в различных средах, включая организменную. Это позволяет рассматривать ее одним из самых динамично развивающихся разделов современной экологии (Вечерский и др., 2022).

Во многих странах с конца прошлого века и до сегодняшнего времени, проводятся исследования бактериальных метагеномов кишечника медоносной пчелы *Apis mellifera* L. Было установлено оригинальное сочетание бактериальных микроорганизмов в мероконсорции ее кишечника, которое отличается от большинства видов животных, своим очень простым таксономическим разнообразием (Shi et al., 2010; Engel, Moran, 2012; Anderson

et al., 2014; Zheng et al., 2017; Moran et al., 2019). Это позволяет использовать медоносных пчел в качестве модельных объектов в экспериментальных исследованиях по выяснению функциональной роли тех или иных участников микробного сообщества (Kamran et al., 2017; Kwong et al., 2017; Kirsten et al., 2019; Moran et al., 2019; Nowak et al., 2021). Социальность медоносных пчел поддерживает постоянство состава микрофлоры кишечника (Kwong et al., 2017).

В метаболическом плане большинство членов микробного сообщества в кишечнике пчел являются ферментативными, расщепляя богатую углеводами (нектар, мед) и белками (пыльца, перга) пищу пчел. Эти ферментирующие микроорганизмы играют большую роль в обеспечении питания хозяев. Нормальная микробиота кишечника пчелы способствует снижению ее пораженности патогенами, что уменьшает риски гибели пчелы-хозяина.

Микробиота кишечника также как и физиология взрослых рабочих пчел заметно различается у кормилиц, собирателей и зимних пчел. Зимние пчелы имели самое низкое α -разнообразие среди трех типов пчел, что объясняется наличием меньшего количества условно-патогенных колонизаторов, таких как *Apibacter*, *Bombella* или *Lactobacillus kunkeei* (Edwards et al., 1998). Микробиоту кишечника пчелы можно культивировать *in vitro*, а пчел-гнотобиотиков можно легко получить, изолируя новорожденных особей, что делает пчел удобной моделью для изучения симбиоза кишечных микроорганизмов (Kwong et al., 2016).

Перспективно выделение определенных штаммов для производства пре- и пробиотиков, парапробиотиков и постбиотиков, ингредиентов в фармакологических препаратах и персонализированных продуктах питания (Ильясов и др., 2021). Однако, несмотря на все возрастающее количество публикаций по бактериальным метагеномам кишечника пчелы медоносной, все еще мало данных по таксономическому представительству бактерий у пчел в разных регионах нашей большой страны, и в том числе на Крымском полуострове, где еще в середине прошлого века массово использовалась аборигенная пчела, описанная профессором МГУ В. В. Алпатовым как *Apis mellifera taurica* Alpatov (Алпатов, 1938, 1948). В дальнейшем сюда на протяжении многих десятилетий завозились и скрещивались между собой различные породы. Как под влиянием человека, так и независимо от него формировались беспородные семьи, хорошо адаптированные к местным экологическим факторам (Быкова и др., 2016; Вукова et al., 2020). Часто их можно встретить не только на пасеках, но среди семей, заселивших дупла деревьев в лесу или полости в скальных обнажениях (Ивашов, 2016; Вукова et al., 2020).

На территории полуострова Крым, до сих пор не проводились исследования бактериальных сообществ в кишечнике медоносных пчел.

Цель данного исследования — выявить таксономическую структуру бактериального микробиома в кишечнике рабочих пчел крымских пасек.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для получения общего представления о таксономическом составе микробиомов кишечника *A. mellifera* и определения минимального (облигатного) набора родов обеспечивающего жизнедеятельность хозяина взяли в работу пчел из трех семей разного породного происхождения, которые имелись на одной из крымских пасек. Так же препарировали целый кишечник, хотя известно, что в разных его отделах концентрируются специфические наборы бактериальных родов (Kwong, Moran, 2016). Кроме того, на каждом этапе нисходящего анализа таксонов отбрасывали те из них, которые встречались не у всех проанализированных особей. В результате решалась задача получения перечня родов с дополнением их видами, которые обнаружены у медоносных пчел авторами. Таким образом, полученные результаты, как мы надеемся, можно будет считать исходной точкой отсчета для постановки экспериментов в дальнейших исследованиях крымских и других пчел.

Исследование бактериального метагенома кишечника рабочих пчел проводили у особей, отобранных из трех семей разного породного происхождения (Крым, Бахчисарайский район, устье Бельбекского каньона, окрестности села Танковое, пасека М. Н. Люманова). Это были

семьи, происходящие от серой горной кавказской (*A. mellifera caucasica* Gorb, второе поколение), карники (*A. mellifera carnica*, второе поколение.) и беспородной горной дикой пчелы (*A. mellifera*, второе поколение). Беспородная крымская пчела происходила от отводка, полученного из расплода, извлеченного из семьи, обитавшей в полости скального отвеса горы Крокодил в Крымских горах. Эту семью наблюдал в течение двух лет крымский пчеловод И. С. Эмирсинов (Вукова et al., 2020), который организовал отбор сот с расплодом, а затем получение пчел второго поколения на своей пасеке, после чего эти семьи были переданы на пасеку пчеловода-любителя М. Н. Люманова. Если первые две семьи по своим морфометрическим показателям строго соответствовали своему статусу, то последняя имела совокупность признаков характерных для разных пород (Быкова и др., 2016; Вукова et al., 2020; Триселева и др., 2023)

В общей сложности анализу подвергались 12 пчел по четыре из каждой семьи. Все семьи были примерно одинаковой силы и содержались в одинаковых условиях. Для отбора пчел применялся метод окулирования, затем все образцы помещали в промаркированные стерильные контейнеры.

После усыпления пчел с помощью хлороформа, и дезинфекции 70 % этиловым спиртом с помощью ножниц и пинцета извлекался полностью кишечник (средняя, тонкая, толстая кишка), которые по 4 штуки от каждой категории породности собирали в отдельные пробирки.

Определение бактериального метагенома в кишечнике пчел выполняли в Центре Коллективного Пользования «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ «Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии».

Тотальную ДНК выделяли из кишечников пчел набором PowerSoil DNA isolation kit (Qiagen, Германия) основанным на методе очистки с помощью спин-колонок с мембранным фильтром по протоколу производителя. Для разрушения образцов использовали настольный гомогенизатор Vortex-Genie® 2 (США).

Очищенные препараты ДНК использовали для создания библиотек маркерного гена 16S рРНК методом ПЦР с применением универсальных праймеров на вариабельный участок V4: F515/R806 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA /GACTACVSGGGTATCTAAT) (Bates et al., 2010), а также присоединением адаптеров и уникальных баркодов компании Illumina. Последующая подготовка библиотек и секвенирование проводились в соответствии с рекомендациями производителя на платформе «Illumina MiSeq» (Illumina, США) с использованием набора реагентов MiSeq® ReagentKit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2*300 н).

Первоначальная обработка полученных данных, а именно, демультимплексирование образцов и удаление адаптеров, проводилась ПО Illumina (Illumina, США). Для последующего денойзинга, объединения последовательностей, удаления химерных прочтений, восстановления исходных фило типов (ASV, Amplicon sequence variant) и дальнейшей таксономической классификации полученных ASV использовались программные пакеты dada2 (Bolger et al., 2014), phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013) и DECIPHER, работа которых осуществлялась в программной среде R. Для представления данных таксономического анализа использовались средства программного пакета QIIME (Caporaso et al., 2010).

Полученные данные были представлены большим количеством прочтений (фрагментов ДНК, прочитанных секвенатором). По количеству этих прочтений определяли мажорных (присутствующих во всех 12-ти образцах) и минорных (редко встречающихся в образцах) представителей бактерий. Затем рассчитали долю каждого мажорного таксона бактерий в образцах – сумма прочтений данной бактерии, деленную на общую сумму основных таксонов бактерий, выраженную в процентах. Частота встречаемости рассчитывалась как количество образцов пчел, содержащих данный таксон бактерий, также в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Домены и типы бактерий. В процессе исследования идентифицировались маркеры, указывающие на присутствие в кишечном метагеноме медоносных пчел представителей домена Archaea. Однако они отмечались не у всех пчел и их представленность была крайне низкой. Скорее всего, они попадали в кишечник с пищей. Следует отметить, что представители этого домена (Archaea; Crenarchaeota; Nitrososphaeria; Nitrososphaerales; Nitrososphaeraceae; Candidatus Nitrocosmicus) постоянно присутствует в почвах Крыма, причем в значительных концентрациях (около 10 %), тогда как в метагеноме кишечника у некоторых из проанализированных пчел их доля в метагеноме не превышала 0,01 %. Таким образом, можно считать эти бактерии случайным компонентом не характерным для микробиома. В дальнейшем при подготовке табличных данных и рисунков также как и не идентифицированные таксоны, не учитывались. В итоге в домене Bacteria идентифицировали четыре типа (табл. 1).

Таблица 1

Ранжированный ряд встречаемости типов бактерий в обобщенном метагеноме кишечника медоносных пчел крымской пасеки и пасек Китая*

Типы (филы)	Встречаемость типов бактерий, %	
	Крымская пасека	Университетские пасеки (Китай)*
Proteobacteria	83,9	63,2
Firmicutes	12,9	17,6
Actinobacteriota	2,2	4,1
Bacteroidota	0,8	1,7

Примечание к таблице. * – по С. Вангу с соавторами (Wang et al., 2020a).

Как и ожидалось, протеобактерии (*Proteobacteria*) занимает лидирующее положение. Это как известно, наиболее многочисленная группа бактерий. В систематике в нее входит примерно треть от всех известных видов бактерий, но у наших пчел доля этого типа гораздо выше и колебалась от 70,8 до от 87,2 %. Таким образом, из 24 известных типов имеющих в царстве бактерий в дальнейшей работе используем только эти четыре.

Обращает на себя внимание тот факт, что тип Firmicutes в отличие от метагенома человека в разы уступает протеобактериям. Аналогично тип Actinobacteriota в разы уступает типу Firmicutes, а ему также уступает тип Bacteroidota.

Из многочисленных литературных источников для сравнения этих результатов использовали достаточно свежие данные, полученные китайскими исследователями из Хубэйского Университета и Китайского университета геонаук (Ухань, Китай) (Wang et al., 2020a; Wang et al., 2020b). Они представлены также в таблице 1. Их сравнение с нашими результатами показывает достаточно высокое сходство, хотя крымские пчелы показали более выраженное доминирование типа Proteobacteria.

Классы бактерий. Всего выделено 5 классов представленных у всех проанализированных пчел. Причем тип Proteobacteria представлен двумя классами. Наиболее высокая доля наблюдалась у класса Gammaproteobacteria. В несколько раз меньше регистрировалось доля класса Alphaproteobacteria.

Обобщенные данные по классам выделенных бактерий у всех крымских пчел представлены на рисунке 2А. На диаграмме Б для сравнения использовали данные, полученные международной группой исследователей из Пакистана, Саудовской Аравии и Китая. При исследовании рабочих медоносных пчел (*A. mellifera*), собранных на пчеловодческих фермах, расположенных в районах Кохат, Карак и Банну на северо-западе Пакистана (Anjum et al., 2017).

Как можно видеть на рисунке 1, пчелы, находящиеся на разных континентах, достаточно сильно отличаются по доле участия всех классов. Особенно сильные отличия по классу

Gamma proteobacteria. Причем соотношение наиболее представительных классов Bacilli и Gamma proteobacteria у медоносных пчел из Пакистана (Anjum, 2017) как 1:1,2, тогда как у крымских пчел оно выражено во много раз сильнее 1:6. Почти в 6 раз у крымских пчел меньше доля Actinobacteria. Что касается класса Alphaproteobacteria то его представительство сходное. Кроме того, у крымских пчел отсутствовал класс Betaproteobacteria.

Ранее в метагеномном исследовании кишечника *A. mellifera* была выявлена устойчивая кишечная бактериальная флора в семьях широкого географического происхождения, включая Африку, Германию и Швейцарию (Cox-Foster et al., 2007). Используя порог идентификации 16S-последовательности, равный 97 %, исследователи идентифицировали 8 различных филотипов бактерий из 5 классов, включая актиномицеты (*Bifidobacterium*), альфа-протеобактерии (α -1 и α -2), бациллы (*Lactobacillus Firm-4* и *Lactobacillus Firm-5*), бета-протеобактерии (*Snodgrassella*) и гамма-протеобактерии (γ -1 и γ -2). В совокупности эти типы бактерий составляют более 95 % бактерий кишечника медоносной пчелы (Cox-Foster et al., 2007).

В таблице № 2 представлены общие данные по порядкам бактерий, с разными долями встречаемости у 12 образцов медоносных пчел из исследуемой крымской пасеки.

Как видно из данных, представленных в этой обобщающей таблице, заслуживают внимания для дальнейшего рассмотрения, следующие первые 7 порядков, которые присутствовали у всех 12 особей. На их долю приходится 99,8 % метагенома.

Не у всех особей, а только у двух третей, найдены представители порядка Pseudomonadales причем в достаточно заметной концентрации, варьирующей около чуть больше одного процента. Считать этот порядок облигатным участником метагенома, по видимому, нельзя, хотя его представители могут играть пока еще неизвестную роль в

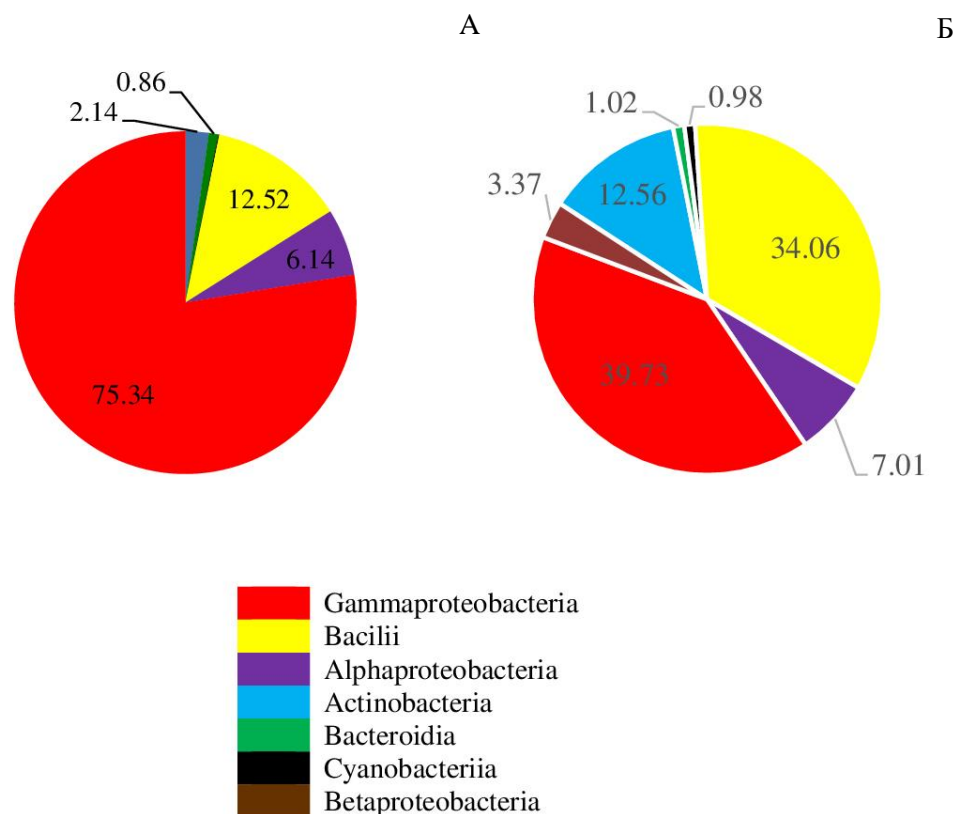


Рис 1. Доля классов бактерий (в %) у рабочих медоносных пчел
 А – медоносные пчелы из Крыма (средние величины по трем семьям); Б – медоносные пчелы из северо-западного Пакистана (Anjum et al., 2017).

Таблица 2

Ранжированный ряд порядков бактерий по частоте встречаемости в обобщенном метабеноме кишечника медоносных пчел и представленность их среди 12 проанализированных особей

Тип	Класс	Порядок	Доля, %	Частота Встречаемости, %
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Orbales	61,31	100
		Burkholderiales	13, 10	100
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	13,34	100
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	5,747	100
Acidobacteriota	Actinobacteria	Bifidobacteriales	2,165	100
Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	0,780	100
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Acetobacterales	0,709	100
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	1,214	67,7
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	0,389	91,6
Acidobacteriota	Actinobacteria	Propionibacteriales	0,160	91,6
Cyanobacteria	Cyanobacteriia	Leptolyngbyales	0,065	91,6
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	0,051	83,3
		Chitinophagales	0,044	66,7
Cyanobacteria	Cyanobacteriia	Cyanobacteriales	0,001	33,3
Acidobacteriota	Blastocatellia	Blastocatellales	0,007	41,6
Acidobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	0,007	25,0

сообществе. В качестве доминирующего таксона можно видеть абсолютного лидера порядок Orbales. Данный порядок относится к классу Gammaproteobacteria и типу Proteobacteria. Эти бактерии относительно недавно получили свой статус порядка (Volkman et al., 2010; Kwong et al., 2013; Martinson et al., 2014) именно этот порядок определяет специфику пчелиного метабенома.

Семейства бактерий. По данным (Moran et al., 2015; Anderson et al., 2017; Romero et al., 2019) у медоносной пчелы (*A. mellifera*) в кишечнике в основном доминируют следующие шесть семейств бактерий:

1. Lactobacillaceae,
2. Acetobacteraceae (*Parasaccharibacter apis*),
3. Rhizobiaceae (*Bartonella apis*),
4. Bifidobacteriaceae
5. Neisseriaceae (*Snodgrassella alvi*)
6. Orbaceae (*Gilliamella apicola*, *Frischella perrara*)

Представленность семейств в бактериальном метабеноме крымских пчел можно видеть в таблице 3.

Таблица 3

Ранжированный ряд основных семейств по встречаемости и доли бактерий в обобщенном метабеноме кишечника медоносных пчел

Семейство	Доля в бактериальном метабеноме, %	Частота встречаемости среди 12 пчёл крымской пасеки, %
Основные семейства		
Orbaceae	60,68	100
Neisseriaceae	13,93	100
Lactobacillaceae	13,02	100
Rhizobiaceae	5,76	100
Bifidobacteriaceae	2,11	100
Acetobacteraceae	0,42	100
Дополняющие семейства		
Weeksellaceae	0,78	91,6
Acetobacteraceae	0,26	41,7
Leuconostocaceae	0,20	75
Propionibacteriaceae	0,14	83,3
Prevotellaceae	0,05	50

По данным (Bleau et al., 2020) Acetobacteriaceae (*Bombella* sp., *Commensalibacter* sp.), Bifidobacteriaceae, Enterobacteriaceae (*Arsenophonus* sp., *Pantoea* sp.), Lactobacillaceae, Neisseriaceae (*Snodgrassella* sp.), Orbaceae (*Frischella* sp., *Gilliamella* sp.) и Rhizobiaceae (*Bartonella* sp.) составляют основную микробиоту *A. mellifera* в Канаде. Но бывают и исключения: как отметили упомянутые авторы, у медоносных пчел изученных семей, обитающих на северо-востоке Канады, летом семейство Enterobacteriaceae (*Arsenophonus* sp., *Pantoea* sp.), составляли почти 40 % микробиоты кишечника. Но поскольку это была единственная семья, в которой было обнаружено это бактериальное семейство, авторы исключили его из анализа (Bleau et al., 2020). У наших пчел доля бактерий этого семейства не превышала 0,19, и оно встречалось не у всех пчел, и не было включено в перечень основных.

Ряд авторов пришли к заключению о том, что у медоносной пчелы в кишечнике преобладает простая основная микробиота, в которой в основном доминируют шесть семейств бактерий: Lactobacillaceae, Acetobacteriaceae (*Parasaccharibacter apium*), Rhizobiaceae (*Bartonella apis*), Bifidobacteriaceae, Neisseriaceae (*Snodgrassella alvi*) и Orbaceae (*Gilliamella apicola*, *Frischella perrara*) (Moran et al., 2015; Anderson et al., 2017; Romero et al., 2019; Bleau et al., 2020). Семейство Rhizobiaceae как видно из данных таблицы 3 (*Bartonella apis*).

Согласно данным таблицы 4, у крымских пчел не определены роды: *Bartonella*, *Parasaccharibacter*, *Saccharibacter*, *Serratia*, *Lactococcus*. То есть ровно половина родов. Это свидетельствует о том, что это минорные компоненты родового состава, без которых пчелы могут нормально существовать. Не у всех пчел обнаруживался род *Apibacter*, а только у 11 из 12.

Роды бактерий. Согласно данным таблицы 4, у крымских пчел не определены роды: *Bartonella*, семейство *Parasaccharibacter*, *Saccharibacter*, *Serratia*, *Lactococcus*. То есть ровно половина родов. Это свидетельствует о том, что это минорные компоненты родового состава, без которых пчелы могут нормально существовать. Не у всех пчел обнаруживался род *Apibacter*, а только у 11 из 12.

Таблица 4

Ранжированный ряд родов бактерий по встречаемости и доли в обобщенном метагеноме
кишечника медоносных пчел

Порядок	Семейство	Род	Доля в метагеноме, %	Частота встречаемости, %
Orbales	Orbaceae	<i>Gilliamella</i>	39,79	100
		<i>Frischella</i>	20,36	100
Burkholderiales	Neisseriaceae	<i>Snodgrassella</i>	13,93	100
Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	13,02	100
Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Bartonella</i>	5,76	100
Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium</i>	2,21	100
Acetobacterales	Acetobacteraceae	<i>Commensalibacter</i>	0,42	100
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	1,20	58,3
Orbales	Orbaceae	unclassified Orbaceae	0,87	25,00
Flavobacteriales	Weeksellaceae	<i>Apibacter</i>	0,78	91,70
Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Paucibacter</i>	0,46	91,70
Acetobacterales	Acetobacteraceae	<i>Bombella</i>	0,26	41,70
Lactobacillales	Leuconostocaceae	<i>Weissella</i>	0,20	75,00
Enterobacterales	Enterobacteriaceae	unclassified Enterobacteriaceae	0,19	58,30
Propionibacteriales	Propionibacteriaceae	<i>Cutibacterium</i>	0,14	83,30
Leptolyngbyales	Leptolyngbyaceae	<i>Phormidesmis</i> ANT.L52.6	0,08	75,00
Enterobacterales	Morganellaceae	unclassified Morganellaceae	0,07	8,30
Bacteroidales	Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>	0,05	50,00
Burkholderiales	Comamonadaceae	unclassified Comamonadaceae	0,04	41,70
Staphylococcales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	0,03	33,30
Burkholderiales	Oxalobacteraceae	<i>Massilia</i>	0,02	25,00
Lactobacillales	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	0,02	16,70
Cytophagales	Cytophagaceae	<i>Cytophaga</i>	0,02	8,30
Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	0,01	8,30
	Xanthobacteraceae	<i>Bradyrhizobium</i>	0,01	8,30

Ранее европейскими исследователями в кишечнике *A. mellifera* были охарактеризованы и предложены как типовые штаммы *Snodgrassella. alvi* и *Gilliamella apicola*, представляющие собой, флотипы, называемые «Бетапротеобактерии» и «Гаммапротеобактерии-1»/«Гамма-1» в более ранних публикациях (Moran et al., 2012).

Как было показано недавно, два таксона, это роды *Frischella* sp. и *Bartonella* sp., могут варьироваться в зависимости от окружающей среды, но они являются неосновными членами кишечника пчелы (Kešnerová et al., 2020). Однако, как видно по данным в таблице 4, *Frischella* может достигать весомых концентраций в сообществах (Kwong et al., 2016).

Как известно, при исследовании Rhizobiaceae в пределах альфа-группы Proteobacteria, начиная с 1991 года, был принят минимальный стандарт для подтверждения новых видов ризобий, в который включено: определение последовательностей 16S рибосомных генов, ДНК-ДНК или рРНК-ДНК – гибридизацию, ПДРФ – полиморфизм длины рестриктазных фрагментов (RFLP, Restriction и др.) (Баймиев и др., 2013).

На сегодня известно более 35 видов, принадлежащих к роду *Bartonella*. Три вида рода *Bartonella* считаются важными причинами заболеваний человека. Подчеркнем, что этот род находится в семействе Bartonellaceae класс Alphaproteobacteria. Представительный штамм типа РЕВ0122Т (= NCIMB 14961Т = DSM 29779Т), выделенный из кишечника медоносной пчелы получил название *Bartonella apis*. Филогенетический анализ показал, что РЕВ0122Т и родственные штаммы из кишечника медоносной пчелы образуют родственную кладу рода *Bartonella* (Kešnerová et al., 2016). При сравнении наших данных и данных из статьи Л. Кешнерова с соавторами (Kešnerová et al., 2016) было выявлено, что у нас присутствует род *Commensalibacter*, который не указан в статье зарубежных авторов.

Ё. Х. Тола с соавторами (Tola et al., 2020) проанализировали микробиоту кишечника *A. mellifera* из африканских регионов Кении к югу от Сахары, где в пчеловодстве принято минимальное вмешательство человека в развитие пчелиных семей. Они установили гораздо большее количество основных членов микробиоты кишечника медоносной пчелы. В их перечне присутствовали следующие роды:

1. *Gilliamella*,
2. *Snodgrassella*,
3. *Lactobacillus* (Firm-4 и Firm-5),
4. *Bifidobacterium*,
5. *Frischella*,
6. *Commensalibacter*,
7. *Bombella*,
8. *Apibacter*,
9. *Bartonella*.

Причем доли родов бактерий, в кишечнике *A. mellifera scutellata*, в трех различных агроэкологических зонах Кении, *Frischella* sp. был третьим наиболее доминирующим родом (16,9 %), в то время как *Lactobacillus* (Firm-4 и Firm-5) демонстрировали более низкую численность, чем в других исследованиях (Tola et al., 2020). *Gilliamella* и *Snodgrassella* — были доминирующими представителями (30,4 % и 21,4 %); интересно, что авторы обнаружили, что *Frischella* является третьим доминирующим родом со средней 16,9 % в населенных пунктах Кении с высокой распространенностью – 94 %. Относительная численность *Lactobacillus* Firm-5 и Firm-4 оказалась ниже ожидаемой по сравнению с другими исследованиями – всего 12,9 % и 1,7 % соответственно, а распространенность – 100 % и 85 % соответственно. Кроме того, был обнаружен *Commensalibacter* sp. (Альфа 2.1) с распространенностью 81 % при численности 2,4 %, а в наших пробах всего 0,42 %, но при 100 % встречаемости! Совсем недавно китайскими исследователями была выделена из кишечника медоносной пчелы (*A. mellifera*) и идентифицирована с использованием полифазного таксономического подхода новая *Bifidobacterium* обозначенная как штамм F753-1Т (Jiang et al., 2024).

В метагеноме исследованных нами пчел род *Apibacter* присутствует с долей 0,78 % и встречаемостью среди пчел 91,6 %, что значительно ниже, чем у других видов пчел рода *Apis*. Например, в бактериальных метагеномах *A. dorsata* и *A. cerrana*, наблюдалась значительно более высокая относительная распространенность этого рода (Kwong et al., 2016; Kwong et al., 2017; Kwong et al., 2018; Praet et al., 2016). Также в этих работах помимо основных представителей кишечной микробиоты, наш анализ выявил второстепенные группы таксонов, которые встречались не у всех пчел (минорные роды), куда вошли: *Bombella* (0,26 %), *Weissella* (0,20 %), *Cutibacterium* (0,14 %) и *Prevotella* (0,05 %), – в сумме составивших лишь

0,65 % от всех прочтений. Интересен тот факт, что эти роды не отмечены у *A. mellifera* из восточной Африки (Tola et al., 2020), зато у нее авторы указывают на относительно высокую долю *Pseudomonas* (2,3 %); при этом второе место занимал *Acidovorax* с 2,1 %, затем *Spiroplasma* с 2 % и, наконец, *Gluconobacter* с 1,7 %. Вместе эти четыре таксона составляли около 8 % прочтений, что на порядок выше, чем у исследованных нами пчел. Также эти авторы указали на их высокую вариативность представленности и распространенности среди образцов из одного и того же улья или из одной и той же пасеки (Tola et al., 2020)

В отличие от рода *Commensalibacter* относящийся к тому же семейству род *Bombella* в наших исследованиях присутствовала у менее чем половины пчел.

Хотя анализ 16S рРНК успешно применяется в бактериальной филогенетике, создавая основу для разграничения родов, известно, что ему не хватает таксономической точности на уровне видов (Konstantinidis et al., 2007).

Примечательно, что на 95 % уровне геномного сходства гена 16S рРНК не удается достичь различия видовых единиц (Konstantinidis & Tiedje, 2007). Такое положение привело к путанице и ошибкам в таксономии бактерий (Engel et al., 2014). Поскольку в нашем исследовании не был идентифицирован видовой состав родов, представляется целесообразным дополнить их видами, которые встречались в кишечнике у *A. mellifera*, но были описаны многими другими исследователями. Эти данные приведены в таблице 5.

Таблица 5

Виды бактерий, обнаруженных в кишечнике медоносных пчел

Род	Вид/штамм	Источник
<i>Gilliamella</i>	<i>Gilliamella apicola</i>	Moran et al., 2012
<i>Snodgrassella</i>	<i>Snodgrassella alvi</i>	Martinson et al., 2012; Moran et al., 2015; Anderson et al., 2017; Romero et al., 2019
<i>Frischella</i>	<i>Frischella perrara</i>	Engel et al., 2013
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> (штаммы Firm-4 и Firm-5)	Motta et al., 2018; Zheng et al., 2020; Tola et al., 2020
<i>Bartonella</i>	<i>Bartonella apis</i>	Kešnerová et al., 2016
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium asteroides</i> , <i>B. coryneforme</i> , <i>B. indicum</i>	Papp et al., 2022
<i>Commensalibacter</i>	<i>C. intestini</i> , <i>C. melissae</i>	Botero et al., 2023

Согласно имеющимся данным, существует два грамположительных вида, принадлежащих к типу *Firmicutes*, которые распространены повсеместно и многочисленны; а именно, *Lactobacillus* Firm-4 и *Lactobacillus* Firm-5, которые обитают в дистальном отделе прямой кишки (Zheng et al., 2017). У большинства взрослых рабочих, но не у всех, также обнаруживаются *Bifidobacterium asteroides*, хотя и в гораздо меньшей численности (Bleau et al., 2020; Kwong et al., 2016). Недавняя оценка патогенности двух штаммов этого вида показала, что они совершенно безопасны для человека (Pino et al., 2022).

Указанные кластеры видов бактерий являются наиболее важными микроорганизмами в кишечнике пчел, так называемыми «ядерными бактериями» (Kešnerová et al., 2020). Есть также менее распространенные, но стабильные виды *Proteobacteria*: *Gammaproteobacteria Frischella perrara* (семейство *Orbaceae*); *Alphaproteobacteria Parasaccharibacter apium*, *Bombella Favorum*, *Bombella mellum*, *Bombella apis* (семейство *Acetobacteraceae*, *Alpha 2.2*); и *Commensalibacter* sp. (*Альфа 2.1*) и *Bartonella apis* (*Альфа 1*) из семейства *Rhizobiaceae* (Dong et al., 2020; Bleau et al., 2020; Jones et al., 2017; Tola et al., 2020; Kešnerová et al., 2020; Hilgarth et al., 2021).

В исследовании Л. Кешнерова с соавторами основной штамм *Lactobacillus* Firm-4 был обнаружен у 98,4 % всех проанализированных пчел (Kešnerová et al., 2020). Также недавно

(Zheng et al., 2020) было предложено переклассифицировать род *Lactobacillus* на 25 родов, включая измененный род *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, и 23 вновь введенных рода. При этом лактобациллы, *A. mellifera*, разделились, по существу, на две различные линии, одну из них предложено выделить в новый род, *Vombilactobacillus* (Zheng et al., 2020).

Commensalibacter – это род уксуснокислых бактерий-симбионтов встречающихся в кишечнике медоносных пчел и других видов насекомых и о нем имеется мало информации о разнообразии и функциях этих бактерий. Хотя комменсал-бактерия *Commensalibacter intestini* была первоначально выделена из *Drosophila melanogaster*, она также была обнаружена у медоносных пчел и шмелей. Исследования продолжаются и совсем недавно были определены полногеномные последовательности 12 изолятов (Botero et al., 2023).

На основе референсных штаммов *Commensalibacter* LMG 31900T (= ESL0284T) и LMG 27436T (= A911T), которые были получены из коллекции бактерий BCCM/LMG (Бельгия) было описано 4 новых вида (Botero et al., 2023).

Род *Snodgrassella* с доминирующей кладой, ассоциируемой с *A. mellifera*, а именно *Snodgrassella-2*, представлен видом *Snodgrassella alvi* (типовой штамм WKB2T) (Martinson et al., 2012).

Согласно недавно опубликованным данным (Papp et al., 2022) по результатам исследований, проведенных на различных пасеках и в различных условиях среды на территории Венгрии, основными представителями бактерий, относительная численность которых превышает 0,1 %, по крайней мере, в половине образцов, выявлены следующие пять родов с одним видом: *Bartonella apis*, *Commensalibacter* sp. AMU001, *Frischella perrara*, *Gilliamella apicola*, *Snodgrassella alvi*. Род *Bifidobacterium* представлен тремя видами: *B. asteroides*, *B. coryneforme*, *B. indicum*. Род *Lactobacillus* включал следующие семь видов: *L. is*, *L. bombi*, *L. helsingborgensis*, *L. kullabergensis*, *L. kunkeei*, *L. mellis*, *Lactobacillus* sp. wkB8. Было показано, что их доля на каждой пасеке была уникальной и сильно варьировала в различных условиях окружающей среды.

Таким образом, проведенный анализ по сопоставлению полученных нами данных с имеющимися данными в мировой литературе показал, что бактериальный метагеном крымских пчел характеризуется доминированием бактерий двух родов из семейства Orbaceae: *Gilliamella* и *Frischella*. Вместе эти два рода занимают 60,1 % микробиома.

ВЫВОДЫ

1. В кишечнике взрослых медоносных пчел на крымской пасеке определено семь бактериальных филотипов, которые имеют сходство последовательностей > 97–98 % ДНК выбранного фрагмента малой субъединицы (16S рРНК) рибосомы. В кишечниках всех проанализированных пчел встречались 7 основных родов домена бактерий, относящихся к 4 типам, 5 классам, 6 порядкам и 6 семействам.

2. Не у всех пчел встречался род *Pseudomonas* (58,3 %). Также, не у всех пчел встречались еще 13 второстепенных родов, относящихся к 4 типам, 10 порядкам и 13 семействам; их доля каждого из них не превышала одного процента, а в сумме 2,1 %.

3. Наибольшей долей в ядре метагенома представлено семейство Orbaceae: род *Gilliamella* (39 %) и род *Frischella* (20 %). Вторую позицию с очень близкими долями занимают роды *Snodgrassella* и *Lactobacillus* (соответственно 13,93 и 13,02 %). В третью группу вошли роды *Bartonella* (5,76 %) и *Bifidobacterium* (2,21 %). Замыкает список род *Commensalibacter* с долей менее одного процента (0,42 %).

4. На основании анализа литературных источников установлено, что в мероконсорцию метагенома *A. mellifera* с семью родами входит минимум по одному виду. Исключение составляют род *Bifidobacterium*, он представлен тремя видами, и род *Lactobacillus* семью.

5. Таксоны домена археобактерий выявлялись далеко не у всех пчел и представлены 1 типом, 1 классом, 2 порядками, 2 семействами и 3 родами. Однако, их доля в метагеноме не превышала 0,012 %, и они выявлялись только у 41,7 % особей. Таким образом, можно считать эти бактерии случайным компонентом, не характерным для кишечного микробиома *A. mellifera*.

Благодарности. Авторы выражают признательность к б. н., зав. лабораторией молекулярной генетики, протеомики и биоинформатики ФГБУН «НИИ сельского хозяйства Крыма» С. Ф. Абдурашитову за помощь в проведении исследований и за оказание консультативной помощи.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 20-316-80033 «Выделение и испытание новой линии медоносной пчелы от диких пчел горно-лесной зоны Крыма».

Список литературы

- Алпатов В. В. К познанию изменчивости медоносной пчелы. VI. Пчелы Крайны и Крыма и их место среди других форм *Apis mellifera* L. // Зоологический журнал. – 1938. – Т. XVII. – Вып 3. – С. 473–481.
- Алпатов В. В. Породы медоносной пчелы. – М.: Колос, 1948. – 261 с.
- Баймиев Ан. Х., Гуменко Р. С., Матниязов Р. Т., Чубукова О. В., Баймиев Ал. Х. Современная систематика клубеньковых бактерий // Биомика. – 2013. – № 3–4. – С.136–157.
- Беклемишев В. Н. О классификации биогеоценологических симфизиологических связей // Бюллетень МОИП. Отдел биологический. – 1951. – Т. 65, Вып. 2. – С. 3–30.
- Быкова Т. О., Триसेлева Т. А., Ивашов А. В., Сафонкин А. Ф. К оценке морфо-генетического разнообразия медоносной пчелы *Apis mellifera* из горно-лесной зоны Крыма // Известия РАН. Серия биологическая / Biology Bulletin. – 2016. – Вып. 6. – С. 625–630.
- Вечерский М. В., Семенов М. В., Лисенкова А. А., Степаньков А. А. Метагеномика – новое направление в экологии // Известия РАН. Серия биологическая. – 2022. – № 1. – С. 70–81.
- Ивашов А. В., Быкова Т. О., Саттаров В. Н., Маннапов А. Г. Состояние и сохранность *Apis mellifera taurica* на территории Крыма // Пчеловодство. – 2016. – № 9. – С. 20–23.
- Раменский Л. Г. О некоторых принципиальных положениях современной геоботаники // Ботанический журнал. – 1952. – Т. 37, № 2. – С. 181–202.
- Триселева Т. А., Сафонкин А. Ф., Быкова Т. О., Рухкян М. Внутривидовое разнообразие и взаимоотношения между карпатской (*Apis mellifera carpathica*) и кавказской (*Apis mellifera caucasica*) расами медоносной пчелы // Известия РАН. Серия биологическая / Biology Bulletin. – 2023. – Вып. № 4. – С. 356–365.
- Anderson K. E., Carroll M. J., Sheehan T., Mott B. M., Maes P., Corby-Harris V. Hive-stored pollen of honey bees: many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion // Molecular Ecology. – 2014. – 23. – P. 5904–5917.
- Anderson K. E., Ricigliano V. A. Honey bee gut dysbiosis: A novel context of disease ecology // Current Opinion in Insect Science. – 2017. – 22. – P. 125–132.
- Anjum S. S., Abdul H. A., Muhammad K., Junaid A., Kamran A., Mohammad Bin. Li. Characterization of gut bacterial flora of *Apis mellifera* from north-west Pakistan // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2017. – 25 p.
- Bates S. T., Berg-Lyons J. G., Caporaso W. A., Walters W. A., Knight R., Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil // The ISME Journal. – 2010. – N 5. – P. 908–917.
- Bolger F., Wentholt M. Principles and practice of selecting and motivating experts // Guidance on Expert Knowledge Elicitation in Food and Feed Safety Risk Assessment. Parma, Italy: European Food Safety Authority (EFSA). – 2014. – P. 138–162.
- Botero J., Sombolostani A. S., Cnockaert M., Peeters C., Borremans W., De Vuyst L., Vereecken N. J., Michez D., Smaghe G., Bonilla-Rosso G., Engel P., Vandamme P. A phylogenomic and comparative genomic analysis of *Commensalibacter*, a versatile insect symbiont // Anim Microbiome. – 2023. – 5 (1). – 25 p.
- Bleau N., Bouslama S., Giovenazzo P., Derome N. Dynamics of the honeybee (*Apis mellifera*) gut microbiota throughout the overwintering period in Canada // Microorganisms. – 2020. – 29. – P. 1146.
- Быкова Т. О., Krivozubov A. S., Ivashov A. V., Sattarov V. N., Safonkin A. F., Triseleva T. A., Soloviev A. M., Emirsinov I. S. Morphometric variability of wild honey bees of the mountain forest zone of Crimea as a material for breeding // E3S Web of Conferences. Topical Problems of Agriculture, Civil and Environmental Engineering (TPACEE 2020). – 2020. – 12 p.
- Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., Fierer N., Peña A. G., Goodrich J. K., Gordon J. I., Huttley G. A., Kelley S. T., Knights D., Koenig J. E., Ley R. E., Lozupone C. A., McDonald D., Muegge B. D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J. R., Turnbaugh P. J., Walters W. A., Widmann J., Yatsunenko T.,

- Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat Methods*. – 2010. – 7(5). – P. 335.
- Cox-Foster D. L., Conlan S., Holmes E. C., Palacios G., Evans J. D., Moran N. A., Quan P.-L., Briese T., Hornig M., Geiser D. M., Martinson V., VanEngelsdorp D., Kalkstein A. L., Drysdale A., Hui J., Zhai J., Cui L., Hutchison S. K., Simons J. F., Egholm M., Pettis J. S., Lipkin W. I. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder // *Science*. – 2007. – 318. – P. 283–287.
- Dong Z. X., Li H. Y., Chen Y. F., Wang F., Deng X. Y., Lin L. B., Zhang Q. L., Li J. L., Guo J. Colonization of the gut microbiota of honey bee (*Apis mellifera*) workers at different developmental stages // *Microbiological Research*. – 2020. – 231. – P. 126–370.
- Edwards C. G., Haag K. M., Collins M. D., Hutson R. A., Huang Y. C. *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organism associated with grape juice fermentations // *The Journal of Applied Microbiology*. – 1998. – 84. – P. 698–702.
- Engel P., Martinson V. G., Moran N. A., Moran N. A. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – 109. – P. 11–27.
- Engel P., Kwong W. K., and Moran N. A. *Frischella perrara* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from the gut of the honey bee, *Apis mellifera* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2013. – 63. – P. 3646–3651.
- Hilgarth M., Redwitz J., Ehrmann M. A., Vogel R. F., Jakob F. *Bombella favorum* sp. nov. and *Bombella mellum* sp. nov., two novel species isolated from the honeycombs of *Apis mellifera* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2021. – 7 p.
- Ilyasov R., Nikolenko A., Saltykova E., Kaskinova M., Gaifullina L., Kwon H.-W., Marsova V. N. Role of the gut microbiome of the honeybee // *Пчеловодство*. – 2021. – С. 18–20.
- Jiang C. S., Li C. Y., Gu C. T. The Type Strain of *Bifidobacterium indicum* Scardovi and Trovatelli 1969 (Approved Lists 1980) is ATCC 25912, not DSM 20214, and Rejection to Reclassify *Bifidobacterium coryneforme* as *Bifidobacterium indicum* // *Current Microbiology*. – 2024. – 81 (7). – 168 p.
- Jones J. C., Fruciano C., Hildebrand F., Toufalilia H., Balfour N. J., Bork P., Engel P., Ratnieks F. L. W., Hughes W. O. Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees // *Ecology and Evolution*. – 2017. – 8. – P. 441–451.
- Kamran S., Shahid I., Baig D. N., Rizwan M., Malik K. A., Mehnaz S. Contribution of Zinc Solubilizing Bacteria in Growth Promotion and Zinc Content of Wheat // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – 21 (8). – P. 2593.
- Konstantinidis K. T., Tiedje J. M. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead // *Current Opinion in Microbiology*. – 2007. – 10 (5). – P. 504–509.
- Kešnerová L., Moritz R., Engel P. *Bartonella apis* sp. nov., a honey bee gut symbiont of the class Alphaproteobacteria // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2016. – 66(1). – P. 414–421.
- Kešnerová L., Emery O., Troilo M., Liberti J., Erkosar B., Engel P. Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer // *The ISME Journal*. – 2020. – 14. – P. 801–814.
- Kirsten M. E., Engel P. Genomic diversity landscape of the honey bee gut microbiota // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10. – 446 p.
- Kwong W., Moran, N. 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 // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2012. – 63. – P. 2008–2018.
- Kwong W., Moran N. Gut microbial communities of social bees // *Nature Reviews Microbiology*. – 2016. – 14(6). – P. 374–384.
- Kwong W., Luis M., Hauke K., Kong-wah S., Eunice S., Rodolfo J., Moran N., John A. Dynamic microbiome evolution in social bees // *Science Advances*. – 2017. – P. 3.
- Kwong W. K., Steele M. I., Moran N. A. Genome Sequences of *Apibacter* spp., Gut Symbionts of Asian Honey Bees // *Genome Biology and Evolution*. – 2018. – 10. – P. 1174–1179.
- Martinson V. G., Moy J., Moran N. A. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – 78. – P. 2830–2840.
- Martinson V. G., Magoc T., Koch H., Salzberg S. L., Moran N. A. Genomic features of a bumble bee symbiont reflect its host environment // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2014. – 80 (13). – P. 3793–803.
- Motta E. V., Raymann K.S., Moran N. A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bee // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2018. – 115. – P. 10305–10310.
- Moran N. A., Hansen A. K., Powell J. E., Sabree Z. L. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees // *PLoS ONE*. – 2012. – P. 363–393
- Moran N. A. Genomics of the honey bee microbiome // *Current Opinion in Insect Science*. – 2015. – 10. – P. 22–28.
- Moran N. A., Ochman H., Hammer T. J. Evolutionary and ecological consequences of gut microbial communities // *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*. – 2019. – 50 (1). – P. 451–475.
- 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). – P. 701.
- Papp M., Békési L., Farkas R., Makrai L., Judge M.F., Maróti G., Tózsér D., Solymosi N. Natural diversity of the honey bee (*Apis mellifera*) gut bacteriome in various climatic and seasonal states // *PLoS One*. – 2022. – 17 (9). – P. 17.

Pino A., Benkaddour B., Inturri R., Amico P., Vaccaro S. C., Russo N., Vaccalluzzo A., Agolino G., Caggia C., Miloud H., Randazzo C. L. Characterization of *Bifidobacterium asteroides* Isolates // *Microorganisms*. – 2022. – 10 (3). – P. 655.

Praet J., Aerts M., de Brandt E., Meeus I., Smagghe G., Vandamme P. *Apibacter mensalis* sp. Nov.: A rare member of the bumblebee gut microbiota // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2016. – 66. – P. 1645–1651.

Romero S., Nastasa A., Chapman A., Kwong W. K., Foster L. J. The honey bee gut microbiota: Strategies for study and characterization // *Insect Molecular Biology*. – 2019. – 28. – P. 455–472.

Shi W., Syrenne R., Sun J., Yuan J. Molecular approaches to study the insect gut symbiotic microbiota at the 'omics' age // *Insect Science*. – 2010. – 17. – P. 199–219.

Tola Y. H., Waweru J. W., Hurst G. D. D., Slippers B., Paredes J.C. Characterization of the Kenyan honey bee (*Apis mellifera*) gut microbiota: A first look at tropical and Sub-Saharan African bee associated microbiomes // *Microorganisms*. – 2020. – 8. – 1721. – P. 1–14.

Volkman M., Skiebe E., Kerrinnes T., Faber F., Lepka D., Pfeifer Y., Holland G., Bannert N., Wilharm G. *Orbus hercynius* gen. nov., sp. nov., isolated from faeces of wild boar, is most closely related to members of the orders 'Enterobacteriales' and 'Pasteurellales' // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2010. – 60 (11). – P. 2601–2605.

Wang S., Wang L., Fan X., Yu C., Feng L., Yi L. An insight into diversity and functionalities of gut microbiota in insects // *Current Microbiology*. – 2020. – 77. – P. 1976–1986.

Wang H., Liu C., Liu Z., Wan Y., Ma L., Xu B. The different dietary sugars modulate the composition of the gut microbiota in honeybee during overwintering // *BMC Microbiology*. – 2020. – 20. – P. 61.

Wolter L. A., Suenami S., Miyazaki R. *Frischella japonica* sp. nov., an anaerobic member of the *Orbales* in the Gammaproteobacteria, isolated from the gut of the eastern honey bee, *Apis cerana japonica* Fabricius // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2021. – 71 (3). – P. 1–6.

Zheng H., Powell J. E., Steele M.I., Dietrich C., Moran N. A. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – 114. – P. 4775–4780.

Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C. M. A. P., Harris H. M. B., Mattarelli P., O'Toole P. W., Pot B., Vandamme P., Walter J., Watanabe K., Wuyts S., Felis G. E., Gänzle M. G., Lebeer S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae* // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2020. – 70. – P. 2782–2858.

Bykova T. O., Ivashov A. V. Taxonomic Structure of Bacterial Metagenome in the Gut of Worker Honey Bees *Apis mellifera* L. in Crimea // *Ekosistemy*. 2024. Iss. 40. P. 84–97.

Shotgun sequencing was used to assess the marker capabilities of the DNA region of the gene encoding 16S rRNA of the small subunit of the bacterial ribosome. The taxonomic composition of the bacterial metagenome in the gut of honey bees (*Apis mellifera* L.) of Crimea was determined. An obligate nucleus consisting of seven main genera of the bacterial domain belonging to four phyla, five classes, six orders and six families is present in the intestines of all analyzed bees. The highest proportion of species in the bacterial metagenome core is represented by the family Orbaceae. The genera *Gilliamella* and *Frischella* have the highest number of species in this family – 39.8 and 20.4 % of species, respectively. The second position with very close shares of species is occupied by the genera *Snodgrassella* and *Lactobacillus* (1.9 and 13.0 % of species, respectively). The third group includes the genera *Bartonella* and *Bifidobacterium*, with 5.8 and 2.21 % of species, respectively. The list is closed by the genus *Commensalibacter* with less than one per cent of species (0.4 %). Based on literature data, a list of species belonging to the respective seven genera was compiled. The analysis revealed that the metagenome of *A. mellifera*, represented by the seven genera, includes at least one species from each. The exceptions are the genus *Bifidobacterium*, represented by three species, and the genus *Lactobacillus*, comprising seven species. The taxa of the Archaeobacterium domain are represented by one phylum, one class, two orders, two families and three genera. However, their proportion in the metagenome did not exceed hundredths of a per cent. Thus, these bacteria can be considered an incidental component that is not typical for the intestinal microbiome of *A. mellifera*.

Key words: *Apis mellifera*, bacteria, archaeobacteria, taxonomic composition, metagenome, Crimea.

Поступила в редакцию 18.10.24
Принята к печати 15.12.24