Iranian Journal of Animal Science
Vol 53, No 2, Summer 2022 (97-107)
DOI: 10.22059/ijas.2022.332030.653848

علوم دامی ایران
دورۀ ۵۳، شمارۀ ۲، تابستان ۱۴۰۱ (ص ۱۰۷-۹۷)

مقاله پژوهشی:

بررسی توان پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از دستگاه گوارش زنبور عسل و تأثیر آنها بر برخی فراسنجه‌های عملکردی کلنی‌ها

علیرضا مرادی[۱]، داریوش علیپور[۲]* و ناصر تاج‌آبادی[۳]
۱ و ۲. دانش‌آموخته دکتری و دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۳. پژوهشگر، مؤسسه تحقیقات علوم دامی ایران، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۸)

چکیده

هدف از این مطالعه جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از دستگاه گوارش زنبور عسل و توان پروبیوتیکی جدایه‌ها و تأثیر آنها بر برخی فراسنجه‌های عملکردی کلنی‌ها بود. بدین منظور از زنبورستان با یکصد کلنی زنبور عسل، تعداد ۱۰ کلنی به‌صورت تصادفی انتخاب و جهت نمونه‌گیری استفاده شدند. تعداد ۲۰ زنبور کارگر از هر کندو گرفته و پس از انتقال به آزمایشگاه تحت شرایط کامل آسایش و هوارسانی، با آرامش تحت محیط حاوی دی اکسید کربن، دستگاه گوارش آنها به‌صورت کامل جداسازی شد و پس از کشت در محیط MRS کلنی‌های میکروبی متفاوت انتخاب و کشت‌های تناوبی مایع-جامد تا ۸ مرحله برای رسیدن به کشت‌های خالص تکرار شد. درنهایت نمونه‌های گرم مثبت و کاتالاز و همولایز منفی جدا شده و مورد آزمون تشخیص فیلوژنی قرار گرفتند. نتایج شناسایی باکتری‌های جداسازی‌شده بر اساس توالی‌های 16s rRNA نشان داد جدایه G_1 (سویه MA4) با ۹۹ درصد شباهت با پدایوکوکوس اسیدی لاکتیسای قرابت داشت، جدایه G_2 به دلیل مشکلات فنی در ارسال نمونه‌ها به خارج از کشور توالی یابی نشد و جدایه G_3 (سویه MA5) نیز با ۹۹ درصد شباهت به پدایوکوکوس اسیدی لاکتیسی سویه ۸۱۸۵ شباهت داشت و درنهایت سویه MA14 جدا شده از دستگاه گوارش زنبورعسل در فصل تابستان در شرایط بی‌هوازی با ۹۷ درصد نزدیکی به پدایوکوکوس پنتوسوس سویهHM75-1 شباهت داشت که G_4 نامگذاری شد. این باکتری‌ها در بانک اطلاعات ژنی (NCBI) به ترتیب با شماره‌های MW376601، MW376904، MW376896 و MW405566 ثبت گردیدند. در مطالعات بالینی و مزرعه‌ای نیز اثر مثبت تیمار با جدایه‌ها به دو روش اسپری بر روی قاب‌ها و کشت در شربت بر تخم‌ریزی و تولید و رفتار بهداشتی زنبور عسل مشاهده گردید و مقایسه تیمارها با آزمون چند دامنه دانکن ($p\leq\%5$) نشان داد همه تیمارهای آزمایشی در فاکتورهای کمی جمعیت و تخم‌ریزی و صفات کیفی مانند رفتار نظافت‌گری تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشتند، تیمار شاهد نسبت به تیمارهای آزمایشی، تفاوت معنی‌داری در ذخایر عسل کاهش داشت ($p\leq\%5$) که می تواند به دلیل تخم‌ریزی کمتر و مصرف شهد کمتر باشد.

واژه‌های کلیدی: پدیوکوکوس، پروبیوتیک، رفتار نظافت‌گری، زنبورعسل.

Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from bee gastrointestinal tract and their effect on some productive parameters of colonies

Alireza Moradi[1], Daryoush Alipour[2*] and Naser Tajabadi[3]
1, 2. Ph.D. Candidate and Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran
3. Researcher, Department of Honey Bee, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran
(Received: Oct. 19, 2021 - Accepted: Jan. 18, 2022)

ABSTRACT

This study aimed to isolate lactic acid bacteria from gastrointestinal tract of honey bees (*Apis mellifera*) and assess the probiotic potential of isolates, and their effect on some performance parameters of colonies. Thus, 10 colonies out of an apiary with one hundred bee colonies were randomly selected and used for sampling. Twenty worker bees were sampled from each hive and after being transferred to the laboratory under complete comfort and ventilation conditions, their gastrointestinal tract was completely isolated under carbon dioxide flushing, and after culture in MRS medium different microbial colonies were selected. Liquid-solid periodic cultures were repeated up to 8 steps to achieve pure cultures. Finally, gram-positive, catalase and hemolysis negative samples were isolated and identified based on phylogenetic analysis. The results of identification of the isolated bacteria using 16s rRNA sequences showed that G1 isolate (MA4 strain) was 99% similar to Pediococcus acidilactica, the G2 isolate could not be sequenced due to technical problems in sending samples abroad and isolate G3 (strain MA5) was 99% similar to lactic acid pediococcus strain 8185. Finally, the strain MA14 isolated from the bee's gastrointestinal tract during the summer under anaerobic conditions was 97% similar to the HM75-1 strain Pediacocus pentosus, which was named G4. These bacteria were registered in the Gene bank (NCBI) with accession number of MW376601, MW376904, MW376896 and MW405566, respectively. *In vivo* studies showed the positive effects of treatment with isolates by spraying on frames and bacterial culture mixed in syrup (sugar-water) on spawning, production and hygienic behavior of bees. Comparison of treatments with Duncan's multiple range test ($p\leq 5\%$) showed that all experimental treatments in quantitative population factors and spawning and quality were significantly different from the control treatment. However, the control treatment had a significant difference in honey reserves due to low spawning compared to experimental treatments and less nectar consumption.

Keywords: Grooming behaviore, Honeybees, *Pediococcus*, Probiotics.

* Corresponding author E-mail: alipourd@basu.ac.ir

مقدمه

تغذیه و تولید فرآورده‌های اصلی در زنبور عسل ارتباط زیادی به فعالیت میکروارگانیسم‌ها دارد (Lak *et al.*, 2008). هضم غذا، تخمیر، عمل‌آوری ویتامین‌ها و افزایش ارزش غذایی گرده، علت فسادناپذیری ذخایر کلنی و حتی مدفوع زنبور عسل ناشی از فعالیت‌های باکتری‌ها و گاهی اوقات مخمرها در دستگاه گوارش، سطح بدن و سلول‌های مومی در شان زنبور عسل می‌باشند. همچنین گروهی از میکروارگانیسم‌ها (باکتری‌های اسید لاکتیکی) آنتی‌بیوتیک‌ها و ضد قارچ‌ها را می‌سازند و در ایمنی زنبور عسل نقش دارند (Lak *et al.*, 2008).

باکتری‌ها و مخمرهای سطح بدن زنبور عسل شامل باسیل‌های اسپوردار، لاکتو باسیل‌ها، میکروکوک‌ها، سارسینا، باسیل‌های گرم منفی، اکتینومایسس و ساکارو مایسس می‌باشند (Hassani *et al.*, 2013). خواص و فعالیت میکروارگانیسم‌های مفید در دستگاه گوارش و کلنی زنبور عسل به دلیل آثار پروبیوتیکی می‌باشد. این میکروارگانیسم‌ها از طریق متعادل‌سازی نسبت و تعداد میکروب های ساکن طبیعی روده اثرات مفید خودرا بر بدن میزبان اعمال می‌کنند (Tajabadi *et al.*, 2015). بسیاری از پروبیوتیک‌ها به گروه بزرگی از باکتری‌ها بنام باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک تعلق دارند (Pattabhiramaiah *et al.*, 2012). لاکتوباسیل‌ها در ترمیم اکوسیستم و تأمین شرایط تغذیه‌ای و زندگی میکروب‌های روده و خود میزبان نقش مهمی دارند که به خاطر این خواص، گونه‌های لاکتوباسیلوس به طور گسترده به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند (Sharifpour *et al.*, 2016). آندرسون و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیان نمودند تمام یوکاریوت‌ها، میزبان باکتری‌های مفید در لومن روده‌ای خود هستند که این‌ها را یا به ارث می‌برند یا از محیط زیست دریافت می‌کنند (Andersoun *et al.*, 2013). در بسیاری از مطالعاتی که بر روی فلور میکروبی زنبور عسل انجام گرفته اند وجود میکرو ارگانیسم‌های مفید و دارای خواص پروبیوتیک در سطح بدن و دستگاه گوارش زنبور عسل به اثبات رسیده و ارتباط این میکروب‌ها با ویژگی‌هایی نظیر توان سیستم ایمنی، بهبود تغذیه با فرآوری گرده و شهد و زمستان گذرانی و حتی مقابله با بیماری‌های انگلی نیز تایید شده است. تعادل مناسب بین باکتری‌های اسید لاکتیک در دستگاه گوارش زنبور عسل باعث مقاومت دستگاه گوارش به عفونت‌ها و افزایش توان نگه داری مدفوع در زمستان می‌شود (Evans & Lopez, 2004).

مطالعات مختلف نشان می‌دهند تنوع میکرو ارگانیسم‌های محیط کندو، دستگاه گوارش زنبور عسل و تمام محصولات نیز تابعی از میکروب‌های سطح بدن زنبور بوده و ناشی از فعالیت زنبور در پوشش‌های گیاهی و محیط های مختلف از نظر آب و هوا، رطوبت، دما، اسیدیته محیط، طول روز و شب و سایر فاکتورهای مؤثر می‌باشد. مکان جغرافیایی، نوع پوشش گیاهی و شیوه نگهداری زنبورها بر تنوع جمعیت میکروبی و در نتیجه باکتری‌های مفید تأثیرگذار است (Strauss *et al.*, 2015). تاکنون تحقیقات محدودی در زمینه جداسازی باکتری‌های مفید از دستگاه گوارش زنبور عسل و اثرات آن‌ها در عملکرد و مقاومت کلنی‌ها در ایران انجام شده است. نظر به اهمیت بسیار زیاد میکروارگانیسم‌ها در زندگی، صفات کمی و کیفی و حتی ایمنی زنبور عسل و تاکیدات منابع مختلف به استفاده از پروبیوتیک‌ها در جهت افزایش کمی و کیفی محصولات زنبورعسل و حتی جایگزینی آنها با آنتی‌بیوتیک‌ها برای تولید محصولات ارگانیک و بی ضرر برای انسان و محیط زیست، هدف مطالعه حاضر جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از دستگاه گوارش زنبور عسل و بررسی توان پروبیوتیکی جدایه‌ها و تأثیر آنها بر برخی فراسنجه‌های عملکردی کلنی‌ها بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه با استقرار تعداد ۱۰۰ کلنی زنبور عسل در فصل بهار در مناطق کوهستانی آوج استان قزوین و در فصل تابستان در مزارع رازیانه (یک نوع گیاه دارویی) منطقه رزن استان همدان در سال ۱۳۹۷ با برخورداری از تنوع پوشش گیاهی و نمونه‌گیری از این زنبورستان‌ها برای جداسازی و بررسی باکتری‌های اسید لاکتیک از دستگاه گوارش زنبور عسل انجام شد.

پوشش گیاهی مناطق کوهستانی آوج شامل گون، آویشن، پونه و مرزه کوهی و سایر گیاهان مرتعی و پوشش گیاهی غالب منطقه رزن شامل رازیانه و صیفی‌جات بود. برای نمونه‌گیری با تعیین تصادفی ۱۰ کلنی از زنبورستان اثر انتخاب از بین رفت و ۲۰ زنبور کارگر از هر کلنی جهت انجام مراحل مختلف آزمایش، نمونه‌گیری انجام شد (Tajabadi *et al.*, 2011). نمونه‌ها پس از برداشت داخل شیشه‌های تمیز حاوی سرم شستشو قرار گرفت و به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس دستگاه گوارش زنبوران جدا گردید و محتویات آن در محیط کشت MRS (Man, Rogosa Sharpe)کشت داده شد و کلنی‌های میکروبی با شکل متفاوت جدا گردید (Tajabadi *et al.*, 2011).

ابتدا محیط کشت مایع طبق پروتکل شرکت سازنده تهیه شده و کشت در محیط مایع انجام گرفت. سپس کشت در محیط آگار انجام و کلنی‌های متفاوت انتخاب و کشت‌های تناوبی مایع- جامد تا ۸ مرحله برای رسیدن به کشت‌های خالص تکرار شد. محتویات قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش پس از تشریح و جداسازی در محیط کشت غنی‌شده با MRS و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس در دی اکسید کربن ۵٪ کشت داده شدند (Tajabadi *et al.*, 2011).

پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت کلنی‌های با مورفولوژی متفاوت جدا شده و کشت جدایه انجام گرفت. غربال‌گری اولیه باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز و تست همولایز نیز با محیط کشت MRS حاوی ۵ تا ۸٪ خون گوسفندی انجام گرفت. در نهایت نمونه‌های گرم مثبت و کاتالاز و همولایز منفی جدا شده و در محیط کشتMRS با ۲۰٪ گلیسرول و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌ها هر سه ماه کشت مجدد و احیا می شدند (Tajabadi *et al.*, 2013).

جهت بررسی توان پروبیوتیکی جدایه‌ها به تحمل شرایط اسیدی به مدت ۲ تا ۴ ساعت در محلول نرمال سالین حاوی HCl با pH ۴ و ۲ اعمال شد (Alberoni *et al.*, 2016). همچنین جهت سنجش تحمل جدایه‌های لاکتوباسیلی بدست آمده به صفرا از محیط MRS مایع حاوی ۰/۳ ٪ نمک سدیم اگزالات استفاده شد (Audisio *et al.*, 2015). در بخش آزمایش‌های مولکولی، مطابق با پروتکل کیت استخراج DNA سیناکلون، DNA استخراج شد. مقدار ۲ سی‌سی سوسپانسیون باکتری در میکروتیوب اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه با دور (4000 rpm) ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب باکتری ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم پری لایزیز و ریبوتیناز اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر بافر رسوب‌دهنده به میکروتیوب اضافه شده و ۵ ثانیه تحت ورتکس شدید قرار گرفت. این نمونه دوباره در دور ۱۳۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شده و DNA استخراج شده مورد آزمون‌های بعدی قرار گرفت.

در این مطالعه از پرایمر اول (27F) (5´ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3´) و پرایمر دوم (1492R) (5´GTTACCTTGTTACGACTT3´) استفاده شد. واکنش‌های زنجیره پلیمراز در دستگاه ترمال سایکلر *Applied Biosystems* مدل en61327 (PCR) انجام شده و محصول PCR در ژل آگارز با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با کیت تخلیص سازی و جهت تعیین توالی ژنی 16s rRNA به شرکت BGI واقع در انستیتو ژنومیکس سکانس دانشگاه کوپن هاگن دانمارک ارسال و سکانس‌ها با نرم‌افزار Bioedit خوانش و ویرایش شدند.

درخت فیلوژنی با استفاده از Clustal W به روش neighbour-joining با نرم‌افزار MEGA6 (Tamura *et al.*, 2007) با استفاده از رفرنس های موجود در NCBI که شماره اختصاصی آنها داخل پرانتز آورده شده است رسم گردید.

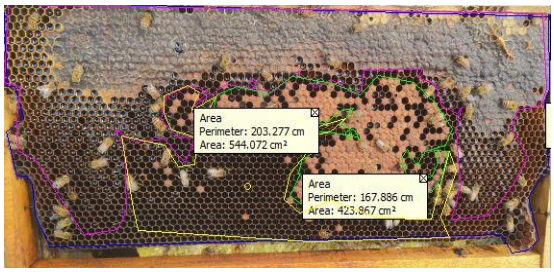
پس از انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی و تشخیص نوع باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های مورد مطالعه، آزمایش‌های بالینی (*in vivo*) شامل تأثیر تیمار با باکتری‌های جدا شده از دستگاه گوارش بر صفات رفتار نظافت‌گری کلنی، تولید و تخم‌ریزی نیز بررسی گردید. تیمار به دو روش اسپری ۵۰ سی سی شربت حاوی جدایه‌ها بر روی قاب‌ها و افزودن ۱۰ سی‌سی محیط کشت حاوی هرکدام از جدایه‌ها در ۵۰۰ سی‌سی (۰/۵ لیتر) شربت یک به یک و به

صورت یک روز در میان، در یک طرح کاملا تصادفی با ۵ تیمار (نمونه بهار باکشت هوازی، نمونه بهار با کشت بی‌هوازی، نمونه تابستان با کشت هوازی و نمونه تابستان با کشت بی‌هوازی و شاهد) و ۳ تکرار استفاده شدند. قبل از انجام این آزمایش نمونه‌ها در محیط‌های حاوی شربت یک به یک مورد استفاده در آزمایش کشت شده و پس از سه بار تکرار کشت، رشد و زنده‌مانی آن‌ها در این محیط به اثبات رسید.

صفات رفتار نظافت‌گری[1] زنبور عسل، میزان تخم‌ریزی، ذخایر عسل و گرده کلنی و مساحت شان بافته شده (نمود تولید موم) نیز در این مطالعه مورد آزمون قرار گرفتند. رفتار نظافت‌گری در زنبور عسل شامل مجموعه‌ای از رفتارها و اعمال فردی و گروهی در کلنی است که باعث نظافت و بهداشت کندو و افراد کلنی می‌شود. از جمله مهم‌ترین تأثیر این رفتار در مقابله با آفات و انگل‌های داخلی و خارجی زنبور عسل بوده که یک نوع پتانسیل دفاعی محسوب می‌شود و این رفتار در سطوح بالای تغذیه، ایمنی، آرامش، جمعیت و فلور مناسب میکروبی کلنی تقویت شده و با کیفیت بالاتری انجام می‌گیرد (Engel *et al.*, 2012).

نمونه‌گیری که طبق دستورالعمل سازمان دامپزشکی کشور به‌صورت ۲۰۰ زنبور کارگر از کلنی‌های تیمارشده با جدایه‌ها تهیه شد، نشان داد که کلنی‌های تیمارشده با باکتری‌های جدا شده از دستگاه گوارش، عاری از کنه واروآ بر روی سطح بدن خود بودند. بررسی وجود کنه برروی سطح بدن زنبورها با استفاده از صد زنبور عسل در صد سی‌سی آب و با استفاده از چند قطره مایع ظرفشویی انجام می‌گیرد. همچنین با قراردادن ورقه سفیدی (جهت مشاهده کنه‌های مرده و افتاده در کف کندو) به مدت ۵ روز در کف جعبه کندو، علاوه بر شدت آلودگی درگیری زنبورها با کنه (رفتار نظافت‌گری) مشخص می‌شود. با بررسی کنه‌های مرده با میکروسکوپ مشاهده شد که بیش از ۵۰٪ کنه‌های مرده بر روی ورقه سفید علائمی از درگیری با زنبورها داشتند. برای بررسی تأثیر تیمارها بر تخم‌ریزی و تولید عسل و گرده تعداد سه قاب از هر تیمار به‌صورت تصادفی از تکرارهای مختلف انتخاب و مساحت نواحی مختلف (مساحت کل شان، عسل، تخم روز، لارو، شفیره و گرده) به روش کادر مدرج (شکل ۱) و استفاده از نرم‌افزار دی جی مایزر[2] در روی شان‌ها محاسبه گردید. این نرم‌افزار یک بسته نرم‌افزاری جهت تجزیه و تحلیل تصاویر با کاربردی آسان و انعطاف پذیر است که امکان اندازه‌گیری دقیق دستی و همچنین تشخیص خودکار اشیا را فراهم می کند و قابلیت تشخیص اجزا مختلف یک عکس برای محاسبه محیط و مساحت قسمت‌های مختلف عکس را دارد.

شکل ۱. محاسبه نواحی مخلف به روش کادر مدرج
Figure 1. Measuring the comb different area by the calibrated box method



شکل ۲. محاسبه مساحت نواحی مختلف شانه با نرم‌افزار Digimizer
Figure 2. Measuring the comb different area by Digimizer software

این تحقیق در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تیمار و ۳ تکرار انجام شد و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه دانکن (مقایسه دو به دو تمام میانگین‌ها) مقایسه شدند. تمام آنالیزها با نرم‌افزار SAS 9.4 و با ($P \leq 5\%$) انجام گرفت[2].

1. Grooming

2. Digimizer 5.4.9

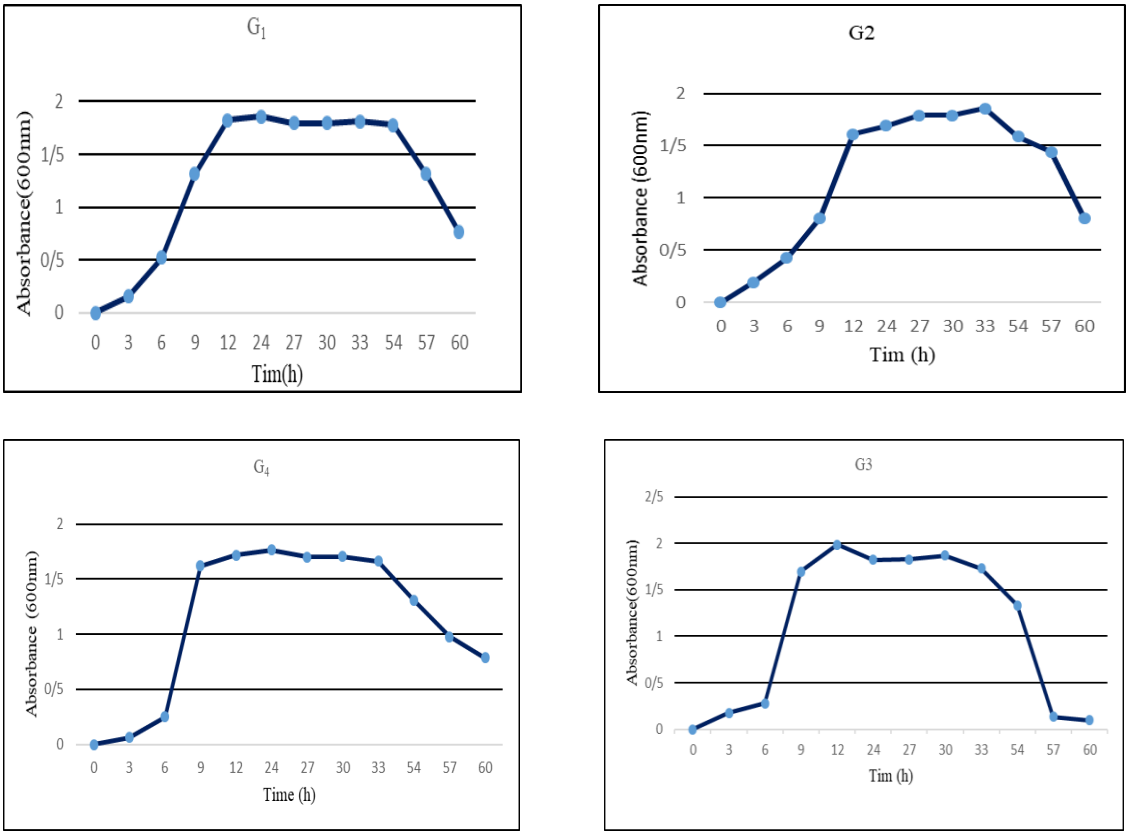
نتایج و بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که همه جدایه‌ها در این مطالعه گرم مثبت، کاتالاز، همولایز و نیترات آگار (*Nitrte Agar*) منفی (احیای نیترات به نیتریت) و با خاصیت تخمیرکننده (ویژگی‌های باکتری‌های اسید لاکتیک پروبیوتیک) بودند که آن‌ها را برای انتخاب به عنوان پروبیوتیک مناسب می نمود. همه جدایه‌ها در دماهای ۱۰، ۱۵، ۳۵ و ۴۵ درجه سلسیوس قابلیت رشد و تکثیر داشتند. هر چهار نمونه مورد مطالعه از نظر تست بایل اسکولین (Bile Esculin Agar) که برای جداسازی باکتری‌های دارای توانایی تبدیل گلیکوزید اسکولین به اسکولتین و دکستروز انجام می‌گیرد، مثبت بودند که نشان دهنده توانایی رشد و تکثیر این باکتری‌ها در محیط صفراوی و در حضور *oxgal* است. سرعت رشد و تکثیر باکتری‌ها ۳ الی ۶۰ ساعت پس از تلقیح نیز با استفاده از دستگاه جذب نوری اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد، که در نمودارهای شکل ۳ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود مرحله تصاعدی[1] یا فاز فعال رشد و تکثیر باکتری‌های جدا شده در تمام جدایه‌های مورد آزمایش از ساعت ۳ تا ۱۲ پس از تلقیح بوده است؛ با این تفاوت که شیب و سرعت تکثیر در نمونه‌های بی‌هوازی بیشتر بوده است (شکل ۳).

نتایج شناسایی باکتری‌های جداسازی‌شده بر اساس توالی‌های 16s rRNA در شکل ۴ و جدول ۱ ارائه شده است. جدایه G_1 (سویه MA4) با ۹۹ درصد شباهت با *پدایوکوکوس اسیدیلاکتیسای* قرابت داشت، جدایه G_2 به‌علت مشکلات فنی و شرایط ارسال به خارج از کشور توالی یابی نشد. جدایه G_3 (سویه MA5) نیز با ۹۹ درصد شباهت به *پدایوکوکوس اسیدیلاکتیسای* سویه ۸۱۸۵ شباهت داشت و درنهایت سویه MA14 جدا شده از دستگاه گوارش زنبورعسل در فصل تابستان در شرایط بی‌هوازی با ۹۷درصد نزدیکی به پدایوکوکوس پنتسوس سویهHM75-1 شباهت داشت که G_4 نامگذاری شد. این باکتری‌ها در بانک اطلاعات ژنی (NCBI) با شماره‌های MW376601، MW376904 و MW405566 ثبت شدند. باکتری پدایوکووس اسیدی لاکتیسای و پدایوکوکوس پنتسوس از اعضای معروف باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که هوازی اختیاری و هموفرمنتاتیو بوده و توانایی تولید دی اکسید کربن ندارند. این باکتری‌ها بر روی تعداد زیادی از گیاهان و میوه‌ها شناسایی شده‌اند (Carina Audisio *et al.*, 2011). گزارش‌های محدودی از جداسازی این باکتری‌ها از دستگاه گوارش انسان و جانوران ارائه شده است. دستگاه گوارش طیور یکی از زیستگاه‌هایی است که این دو باکتری از آن جداسازی شده‌اند (Liu *et al.*, 2021). بر اساس جستجوی نگارندگان گزارشی مبنی بر جداسازی این باکتری‌ها از دستگاه گوارش زنبور یافت نشد. در یک گزارش، وجود این دو باکتری در گرده‌های جمع‌آوری‌شده توسط زنبور، گزارش شده است.

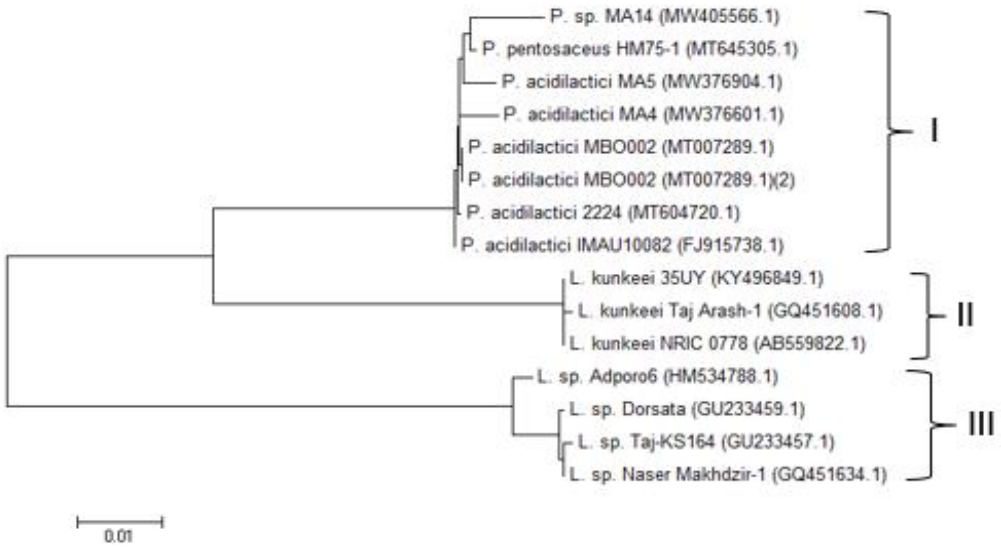
اثر جدایه‌های مختلف بر برخی صفات عملکردی کلنی‌ها در مقایسه با تیمار شاهد در جدول ۲ نمایش داده شده است. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در مساحت کل شان بافته شده و ذخایر گرده و لارو تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف وجود ندارد. در مساحت ناحیه عسل تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری با تیمارهای مورد مطالعه دارد و ذخیره عسل در تیمار شاهد بیشتر از تیمارهای دیگر بود (P=0.0005). در نتایج به دست آمده نوعی هماهنگی و ارتباط وجود دارد به طوری‌که سهم بالاتر ذخیره عسل در تیمار شاهد به معنی تخم‌ریزی و زاد و ولد کمتر در این کلنی‌ها می باشد. در تیمارهای آزمایشی مخصوصا نمونه‌های بهاره دلیل تفاوت معنی‌دار در کاهش ذخایر عسل، سهم بالای مساحت تخم روز و لارو و شفیره می‌باشد (P=0.045) و قطعا این میزان تخم‌ریزی نیاز و مصرف غذایی بالایی برای کلنی داشته و برای رشد و تکامل لارو و شفیره ذخایر شهد و گرده مصرف شده است. اما از نظر اینکه جمعیت و زاد و ولد نیاز کلنی است و درنهایت عملکرد کلنی را بالا خواهد برد حائز اهمیت می‌باشد.

1. Exponential phase



شکل ۳. سرعت رشد جدایه‌های دستگاه گوارش زنبور عسل در طیف نوری ۶۰۰ نانومتر، (G1) هوازی جدا شده در فصل بهار؛ (G2) بی‌هوازی جدا شده در فصل بهار؛ (G3) هوازی جدا شده در فصل تابستان؛ (G4) بی‌هوازی جدا شده در فصل تابستان

Figure 3. growth rate of bacteria isolated from digestive tract of honey bees, measured at 600 nm, G1 and G2; isolated in the spring, aerobic and anaerobic, respectively. G3 and G4; isolated in the summer, aerobic and anaerobic, respectively.



شکل ۴. آنالیز فیلوژنی باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک جدا شده از دستگاه گوارش زنبورعسل در فصل بهار و تابستان در شرایط هوازی و بی‌هوازی

Figure 4. Phylogenetic analysis of lactic acid bacteria isolated from bee digestive tract in spring and summer under aerobic and anaerobic conditions

جدول ۱. تیپ‌های باکتریایی جدا شده از دستگاه گوارش زنبورعسل در فصل بهار و تابستان در شرایط هوازی و بی‌هوازی
Table 1. Bacterial types isolated from bee digestive tract in spring and summer under aerobic and anaerobic conditions

Dedicated number	Similarity (Percentage)	The closest type to the isolate	Sequence length	Isolated name	Sample code	Row
MW376601	99	*Pediococcus acidilactici* 2224 (MT604720)	698	MA4	G_1	1
MW376896	99	*Unkown*	722	MA6	G_2	2
MW376904	99	*Pediococcus acidilactici* 8185 (MT538932)	726	MA5	G_3	3
MW405566	97	*Pediococcus pentosaceus* HM75-1 (MT645305)	792	MA14	G_4	4

پژوهشگران، باکتری‌های اسید لاکتیکی را بهترین و مهمترین جمعیت میکروبی روده و دستگاه گوارش زنبور عسل دانسته و تأثیر فعالیت‌های مفید و ویژه آنها بر سلامت دستگاه گوارش و انواع آن‌ها از جمله *Pediococcus acidilactici* (PA) را گونه‌ای ایده‌آل و مهم و ابزاری مطمئن برای ساخت و استفاده از پروبیوتیک‌ها معرفی کرده اند (Nowak *et al*., 2021). اعتقاد بر این است استفاده از این تکنیک یک راه حل علمی تضمین سلامت فردی و کلنی زنبور عسل بوده و آگاهی از شرایط میکروبیوتای دستگاه گوارش را استراتژی وسیع برای حفظ زندگی زنبور عسل و توسعه داروهای پروبیوتیک مدرن بجای آنتی‌بیوتیک‌ها و بایواسیدهای دوستدار محیط زیست و روش کنترل بیولوژیکی آفات و بیماری‌ها معرفی کرده‌اند (Nowak *et al*., 2021).

ایوریزو و همکاران از افزایش استفاده از پروبیوتیک‌های تجاری و باکتری‌های جداشده از قسمت‌های مختلف کندو و زنبور عسل جهت بهبود عملکرد کلنی‌ها و افزایش بهره‌وری در کلنی در نقاط مختلف جهان در سال‌های اخیر گزارش کرده اند (*Iorizzo et al*., 2020). در مطالعه Potts *et al.* (2016) تیمار با باکتری‌های جدا شده از دستگاه گوارش و سطح بدن زنبور عسل یا پروبیوتیک‌های صنعتی با تأثیر در انواع مختلف عملکردهای متابولیک، از جمله تعدیل گلوکز و هموستاز چربی، تنظیم سیری، مدیریت انرژی و تولید ویتامین‌ها، تحریک و تنظیم سیستم ایمنی، سم زدایی از آفت کش‌ها و داروها، تحریک افزایش وزن افراد کلنی با تنظیم ذخایر غذایی و تأثیر بر ایمنی فردی و جمعی و درنهایت بر عملکرد کلنی‌ها بیان شده است. مشخص شده است عواملی مانند استرس، داروهای مختلف و تغییر جیره که بـه اختلال در تعادل جمعیت میکروبی روده می‌انجامند باعث تضعیف مکانیسم‌های دفاعی بدن شده و بدین ترتیب، اجرام بیماریزا فرصت فعالـیـت پـیـدا کرده و باعث آسیب به میزبان می‌شوند، بنابر این تعادل صحیح میکرو ارگانیسم‌ها به بهبود سطح ایمنی و بروز بهتر رفتار بهداشتی منجر می‌گردد (Khan *et al*., 2020).

Tajabadi *et al.* (2013) در مالزی، لاکتوباسیلوس پلانتاریوم، لاکتوباسیلوس پنتوسوس و لاکتوباسیلوس فرمنتوم را از عسلدان (معده عسلی) زنبورعسل جداسازی و شناسایی کردند. ایمنی ذاتی (غیراختصاصی) نخستین خط دفاعی بدن است و باکتری‌های پدیوکوکوس اسید لاکتیسای از طریق تحریک رسپتورهای سیستم ایمنی ذاتی، باعث فعال شدن یک سری سیگنال‌ها و در نتیجه افزایش بیان برخی میانجی‌ها و در نهایت شروع پاسخ ایمنی می‌گردند، اجزای سیستم ایمنی ذاتی از طریق گیرنده‌های خود قادر به شناسایی میکروارگانیسم‌ها یا فرآورده‌های آن‌ها هستند و با اتصال به مسیرهای انتقال پیام، منجر به فعال سازی فاکتورهای نسخه برداری و بیان ژن‌های مهم در پاسخ‌های ایمنی ذاتی می‌شوند. این اثر پروبیوتیک‌ها در زنبور عسل بیش از سایر موجودات حائز اهمیت است، به‌خاطر اینکه ایمنی زنبور عسل بیشتر ذاتی بوده و زنبور عسل تقریبا فاقد ایمنی اکتسابی می‌باشد (Awad *et al*., 2006). باکتری‌های پدایوکوکوس اسیدیلاکتیسای دارای دو اثر عمده هستند، تولید باکتریوسین‌ها که مانع تکثیر و رشد باکتری‌های پاتوژن می‌شوند و همچنین افزایش نسبت بین سیتوکین‌های ضد التهابی و پیش التهابی و ترکیبات لیپوپروتئینی و اگزوپلی ساکاریدی که باعث افزاش پاسخ التهابی ایمنی می‌شوند. در یک گزارش بر روی هلیکوباکتر، تیمار با باکتری‌های پدایوکوکوس اسیدیلاکتیسای باعث تجمع باکتری‌های پاتوژن در یک نقطه و افزایش عملکرد

سیستم ایمنی انسان اعلام گردیده است. این باکتری‌ها با تولید ترکیبات و متابولیت‌های محافظتی علیه ویروس‌های داخلی و ویروس‌هایی که از طریق غذا وارد لومن دستگاه گوارش شده‌اند، باعث بهبود لایه اپیتلیال روده انسان و حیوانات شده‌اند، این اثر بیشتر در تیمار با باکتری لاکتوباسیلوس پنتوسوس مشاهده شده است (Nowak *et al*., 2021).

پدیوسین‌ها ترکیبات اختصاصی باکتریوسین‌ها بوده که توسط جنس پدایوکوکوس تولید می‌شوند و احتمالاً آثار مثبت این جنس و گونه از طریق تولید این ترکیب اعمال می‌شود (Liu *et al*., 2021). به‌طور کلی برای تمییز یک سویه "پروبیوتیک" در زنبور عسل آن سویه باید دارای ویژگی‌هایی نظیر تحریک سیستم ایمنی، مهار پاتوژن، تخریب، اتصال یا خنثی‌سازی آفت‌کش‌ها باشد و این ویژگی برای همه لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشد. به عنوان مثال، تیمار با باکتری‌های پدایوکوکوس اسیدیلاکتیسای باعث کاهش اثر مرگبار آفت‌کش‌های Thiamethoxam و Boscalid شده است (Liu *et al*., 2011).

تیمار با باکتری‌های جداشده در این مطالعه باعث افزایش توان ایمنی و بروز رفتار بهداشتی کلنی‌ها شد به طوری که در تیمارهای G_1 و G_2 تعداد ۳۲ کنه از ۶۰ کنه (۵۳٪) که به کف کندو افتاده بودند و دارای درجاتی از آسیب‌های پا، دهان و شکم بودند. در تیمارهای G_3 و G_4 نیز به ترتیب ۴۵ و ۴۸ درصد کنه‌ها آسیب دیده بودند. اما در تیمار شاهد (w) تعداد کنه‌های آسیب دیده ۱۸ کنه از ۶۰ کنه بود که حدوداً ۳۰٪ کنه‌ها را شامل می‌شود. در مطالعه ایی در شمال شرق آرژانتین تأثیر تیمار با باکتری‌های *Lactobacillus johnsonii* CRL1647 که از دستگاه گوارش زنبور عسل جداسازی شده بودند باعث افزایش عملکرد اقتصادی کلنی‌ها و فعالیت مدیریتی و تخم‌ریزی ملکه و افزایش شدید جمعیت و بروز رفتار نظافت‌گری در تمام کلنی‌های تحت تیمار را به همراه داشت که با نتایج این مطالعه هم خوانی دارد (Potts *et al*., 2016). درمطالعه ماسیمو لوریزو و همکاران در ایتالیا نیز تأثیر بالای تیمار با ۵ سویه از باکتری‌های لاکتیپلانتی باسیلوس پلانتاروم (*Lactiplantibacillus plantarum*) جدا شده از دستگاه گوارش زنبور عسل و نان گرده بر فراسنجه‌های عملکردی مانند تولید محصول و بازسازی جمعیت و بهره‌وری در کلنی‌ها گزارش گردید (Iorizzo *et al*., 2020). نتایج مطالعه پگهیر و همکاران که ۶ سویه باکتری اسید لاکتیک را برای بررسی تأثیر آنها در درمان نوزما و آثار سموم قارچ‌کش و حشره‌کش در زنبور عسل استفاده کرده بودند، نشان می‌دهد که در میان آن‌ها، *پدایوکوکوس اسیدیلاکتیسای* بهترین اثر محافظتی را در برابر انگل‌ها و آفت‌کش‌ها دارد (Peghaire *et al*., 2020).

باکتری پدایوکوکوس اسیدیلاکتیسای به طور قابل توجهی طول عمر زنبور عسل آلوده را به عنوان درمان های پیشگیرانه و درمانی (به ترتیب ۲.۳ برابر و ۱.۷ برابر) بهبود بخشید. علاوه بر این، قرار گرفتن در معرض سموم دفع آفات باعث افزایش مرگ و میر زنبور عسل در مقایسه با گروه کنترل ($P \leq 5\%$) شد که با درمان پدایوکوکوس اسیدیلاکتیسای ترمیم شد. همچنین این مطالعه گزارش می‌دهد که نوزما سرانا و آفت کش ها ژن‌های دخیل در توسعه زنبور عسل (ویتلوژنین)، ایمنی (پروتئین سرین ۴۰، دفنسین) و سیستم سم زدایی (شبیه گلوتاتیون پراکسیداز ۲، کاتالاز) را از بین می برند و این اثرات با درمان پدایوکوکوس اسیدیلاکتیسای اصلاح شد که این تأثیر میتواند بهبود عملکردی کلنی در تولیدات و جمعیت و رفتار بهداشتی را باعث شود که با نتایج مطالعه حاضر در مطالعات مزرعه ایی نیز مطابقت دارد (Paris *et al*., 2020). در تحقیقات ژنگ و همکاران تأثیر همزیستی باکتری‌های محیطی و داخلی زنبور عسل بر سطح ایمنی و بروز رفتارهای اجتماعی و دفاعی زنبور عسل با بررسی تیمار باکتری‌های *Lactobacillus* sp. بررسی شده که نتایج این تحقیق نشان می‌دهد تیمار با این باکتری‌ها باعث افزایش سطح ایمنی و بروز رفتارهای اجتماعی دفاعی (حمله به آفت‌ها) شده است که این اعمال با اثر آنتاگونیستی علیه پاتوژن‌ها و قارچ‌ها، تحریک و ترویج رفتارهای اجتماعی خاص، مانند رفتار نظافت‌گری، اسیدی‌کردن محیط علیه برخی پاتوژن‌ها، ساختار بایوفیلم و حتی بی‌اثرکردن و سم‌زدایی آفت کشها قابل توجیه است (Zheng *et al*., 2018). این تحقیق با بررسی تأثیر گلیفوزات بر اختلال ترکیب میکروبیوتای روده و بروز اثر آفت‌ها و پاتوژن‌ها و افت سطح ایمنی تکمیل شده است.

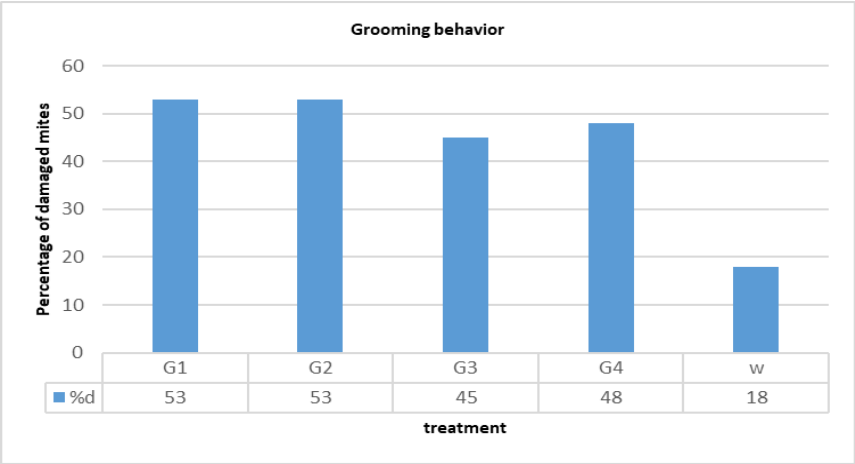
جدول ۲. اثر باکتری‌های جداشده از دستگاه گوارش زنبور عسل (*Apis mellifera*) بر مساحت نواحی عسل، گرده، تخم روز و لارو

Table 2. Effect of different bacteria isolated from digestive tract of honey bee (*Apis mellifera*) on the area of honey, pollen, larva and egge

Treatments	Area (cm^2)				
	Total	Honey	Pollen	Egg	Larvae
G1	3147.76[a]	1556.13[a]	7.09[a]	452.96[a]	652.2[a]
G2	2965.88[a]	1556.88[a]	6.07[a]	544.07[a]	423.8[a]
G3	2976.07[a]	1334.26[a]	7.09[a]	405.21[a]	426.3[a]
G4	3098.65[a]	1467.34[a]	7.08[a]	476.37[a]	503.9[a]
W	2976.75[a]	2016.76[b]	29.61[b]	53.68[b]	408.6[c]
SEM	183/52	112.21	8.523	122.84	203.4
P value	0.2856	0.0005	0.3013	0.0459	0.2723

* مقایسات میانگین به‌صورت ستونی است و میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ایکس با هم ندارند. G1 و G3 سویه‌های پدایوکوکوس اسیدیلاکتیسای بودند، G2 شناسایی نشد اما خصوصیات آن شبیه پدایوکوکوس‌ها بود. G4 باکتری پدایوکوکوس پنتوسوس بود. W گروه شاهد.

* Means with the same letters in each column are not significantly different at p<x. G1 and G3 were strains of *Pedicoccus* G2 was not identified, G4 was *Pediococcus pentosaceus* and W was control group.



شکل ۵. مقایسه رفتار بهداشتی بین تیمارهای مختلف (%d به معنای درصد جراحات و صدمات است)

Figure 5. Comparison of grooming behavior between different treatments (%d: percentage of damage)

نتیجه‌گیری کلی

بطور کلی نتایج این تحقیق و مطالعات دیگری که بررسی شده‌اند بیانگر آن است که باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک (پروبیوتیکی) تأثیر به‌سزایی بر روی تولیدات زنبورعسل و سلامت آنها دارند. جنس پدایوکوکوس به‌عنوان مهمترین و عمده ترین جنس تولید کننده متابولیت‌های ثانویه مانند پدیوسین‌ها تأثیر چندجانبه‌ای بر سیستم ایمنی، سلامت کلنی و فرآوری محصولات زنبور عسل دارد و می‌تواند به عنوان یک پروبیوتیک جامع در تغذیه زنبور عسل مورد استفاده قرار گیرد. توصیه می‌شود در تحقیقات آتی کشت‌های تخلیص‌شده این جنس‌ها برروی زنبورعسل مطالعه و تأثیر متابولیت‌های آنها بر فیزیولوژی، ایمنی، عملکرد کمی و کیفی کلنی بررسی گردد.

سپاسگزاری

از همه عزیزانی که به هر نحوی در به ثمر رسیدن این مطالعه ما را یاری و مساعدت فرمودند، تقدیر و تشکر می‌گردد.

REFERENCES

1. Alberoni, D., Gaggìa, F., Baffoni, L., & Di Gioia, D. (2016). Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(22), 9469-9482.
2. Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M. R., … Corby-Harris, V. (2013). Microbial ecology of the hive and pollination landscape: Bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (Apis mellifera). *PLoS ONE*, *8*(12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083125

3. Audisio, M. C., Sabaté, D. C., & Benítez-Ahrendts, M. R. (2015). Effect of Lactobacillus johnsonii
4. CRL1647 on different parameters of honeybee colonies and bacterial populations of the bee gut. *Beneficial Microbes*, *6*(5), 687-695.
5. Carina Audisio, M., Torres, M. J., Sabaté, D. C., Ibarguren, C., & Apella, M. C. (2011). Properties of different lactic acid bacteria isolated from Apis mellifera L. bee-gut. *Microbiological Research*, *166*(1), 1-13.
6. Engel, P., Martinson, V. G., & Moran, N. A. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 11002-11007.
7. Evans, J. D., & Lopez, D. L. (2004). Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 97, 752-756.
8. Hassani, A. R. & Alami, M. (2013). Isolation and identification yeasts from digestive system of honey bees. Iranian Journal of Bee Science and Technology, 7th (Spring and Summer 2013), pp. 58-64.
9. Iorizzo, M., Lombardi, S. J., Ganassi, S., Testa, B., Ianiro, M., Letizia, F., … De Cristofaro, A. (2020). Antagonistic activity against ascosphaera apis and functional properties of lactobacillus kunkeei strains. *Antibiotics*, *9*(5).
10. Khan, K. A., Al-Ghamdi, A. A., Ghramh, H. A., Ansari, M. J., Ali, H., Alamri, S. A., … Hafeez, M. (2020, January 1). Structural diversity and functional variability of gut microbial communities associated with honey bees. *Microbial Pathogenesis*, Vol. 138.
11. Lak, M., Rouhi, K.K. & Abbassali, Q. (2008). Evaluation of the effect of citric and probiotic acids on the gastrointestinal microflora of bees .Scientific-research journal of Isfahan University. Science. 2008 Year 6 Volume thirty-five. No. 27-36.
12. Liu, C., Xu, C., Du, Y., Liu, J., & Ning, Y. (2021). Role of agglutinin-like sequence protein 3 (Als3) in the structure and antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*.
13. Liu, F., Li, W., Li, Z., Zhang, S., Chen, S., & Su, S. (2011). High-abundance mRNAs in Apis mellifera: Comparison between nurses and foragers. *Journal of Insect Physiology*, *57*(2), 274-279.
14. Nowak, A., Szczuka, D., Górczyńska, A., Motyl, I., & Kręgiel, D. (2021). Characterization of Apis mellifera Gastrointestinal Microbiota and Lactic Acid Bacteria for Honeybee Protection-A Review. *Cells*, Vol. 10.
15. Paris, L., Peghaire, E., Moné, A., Diogon, M., Debroas, D., Delbac, F., & El Alaoui, H. (2020). Honeybee gut microbiota dysbiosis in pesticide/parasite co-exposures is mainly induced by Nosema ceranae. *Journal of Invertebrate Pathology*, *172*.
16. Pattabhiramaiah, M., Reddy, M. S., & Brueckner, D. (2012). Detection of novel probiotic bacterium Lactobacillus spp. in the workers of Indian honeybee, Apis cerana indica. *Agris On-Line Papers in Economics and Informatics*, 2, 1135-1143.
17. Peghaire, E., Moné, A., Delbac, F., Debroas, D., Chaucheyras-Durand, F., & El Alaoui, H. (2020). A Pediococcus strain to rescue honeybees by decreasing Nosema ceranae- and pesticide-induced adverse effects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *163*, 138-146.
18. Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H. T., Aizen, M. A., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., … Vanbergen, A. J. (2016). Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, *540*(7632), 220-229.
19. Sharifpour, M. F., Mardani, K., & Ownagh, A. (2016). Molecular identification and phylogenetic analysis of Lactobacillus and Bifidobacterium spp. isolated from gut of honeybees (Apis mellifera) from West Azerbaijan, Iran. *Veterinary Research Forum : An International Quarterly Journal*, *7*(4).
20. Strauss, U., Pirk, C. W. W., Crewe, R. M., Human, H., & Dietemann, V. (2015). Impact of Varroa destructor on honeybee (Apis mellifera scutellata) colony development in South Africa. *Experimental and Applied Acarology*, *65*(1), 89-106.
21. Tajabadi, N., Mardan, M., Shuhaimi, M., & Abdul Manap, M. Y. (2011). Isolation and identification of enterococcus sp. from honey stomach of honeybee based on biochemical and 16S rrna sequencing analysis. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, *6*(2), 95-100.
22. Tajabadi, Naser, Mardan, M., Abdul Manap, M. Y., Shuhaimi, M., Meimandipour, A., & Nateghi, L. (2011). Detection and identification of Lactobacillus bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee Apis dorsata. *Apidologie*, *42*(5), 642-649.
23. Tajabadi, Naser, Mardan, M., Manap, M. Y. A., & Mustafa, S. (2013). Molecular identification of Lactobacillus spp. isolated from the honey comb of the honey bee (Apis dorsata) by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Apicultural Research*, *52*(5), 235-241.
24. Tajabadi, Naser, Mardan, M., Saari, N., Mustafa, S., Bahreini, R., & Manap, M. Y. A. (2013). Identification of Lactobacillus plantarum, Lactobacillus pentosus and Lactobacillus fermentum from honey stomach of honeybee. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(3).

25. Tajabadi, Naser, Mardan, M., Saari, N., Mustafa, S., Bahreini, R., Yazid, M., … Berloco, M. (2015). Characterization of Commercial Probiotics : Antibiotic Resistance , Acid and Bile Resistance , and Prebiotic Utilization. *Anaerobe*, *10*(1).
26. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, *24*(8), 1596–1599. https://doi.org/10.1093/molbev/msm092
27. Vojvodic, S., Rehan, S. M., & Anderson, K. E. (2013). Microbial Gut Diversity of Africanized and European Honey Bee Larval Instars. *PLoS ONE*, *8*(8).
28. Zheng, H., Steele, M. I., Leonard, S. P., Motta, E. V. S., & Moran, N. A. (2018, November 1). Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab Animal*, 47, 317-325.