

Analiza zmian składu mikrobioty pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.) w trakcie suplementacji pożywienia ekstraktami *n*-butanolowymi ze *Scleranthus perennis* L. i *Hottonia palustris* L.

EWA SAJNAGA¹, MONIKA E. JACH², AGNIESZKA KALWASIŃSKA³, ADRIAN WIATER⁴, MICHAŁ TOMCZYK⁵, KATARZYNA JAKIMIUK⁵, JAKUB STRAWA⁵, AGNIESZKA ROKITA², ANETA PTASZYŃSKA⁶

¹Katedra Biomedycyny i Badań Środowiskowych, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II; ²Katedra Biologii Molekularnej, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II; ³Katedra Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; ⁴Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, Uniwersytet Marii Skłodowskiej-Curie w Lublinie; ⁵Zakład Farmakognozji, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku; ⁶Katedra Immunobiologii, Uniwersytet Marii Skłodowskiej-Curie w Lublinie

WPROWADZENIE

Obecnie obserwuje się znaczny spadek populacji pszczoły miodnej, m.in. ze względu na zakażenie patogenami. Jedną ze strategii wzmocnienia odporności pszczoł może być podawanie im wybranych ekstraktów roślinnych. Wcześniej analizy dowiodły, że dodatek do pożywienia ekstraktów *n*-butanolowych z *Hottonia palustris* (okrężnica bagienna) i *Scleranthus perennis* (czerwiec trwały) powodował wydłużenie życia pszczoł oraz zmniejszenie ich podatności na zakażenie *Nosema* spp. (Fot 1).

CEL BADANIA

Celem badań było określenie czy suplementacja pożywienia pszczoł zdrowych i zakażonych *Nosema* spp. ekstraktami z okrężnicy i czerwca wywołuje zmiany w składzie ich mikrobioty.

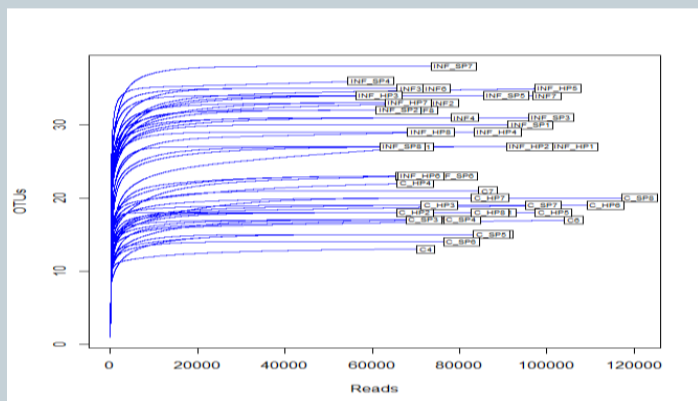


METODY

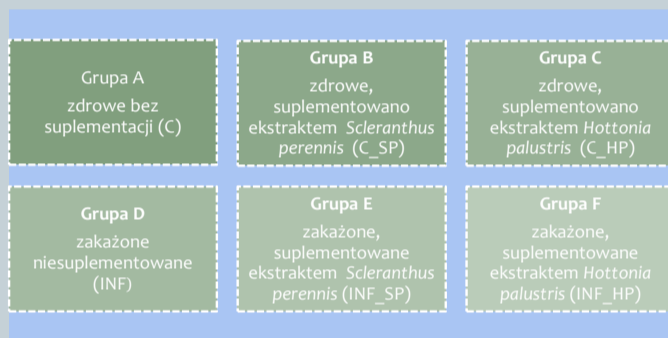
Badaniami objęto pszczoły niesuplementowane (kontrolne) oraz suplementowane (Fot. 1), zarówno niezakażone jak i zakażone *Nosema* spp. (Rys. 1). DNA z całych pszczoł (48 próbek) wyizolowano za pomocą PureLink Microbiome DNA purification Kit (Invitrogen). Skład mikrobioty bakteryjnej jelita myszy określono poprzez metabarkodowanie genu 16S rDNA (fragment V3-V4). NGS wykonano w technologii Illumina MiSeq w firmie Genomed. Analizę α i β bioróżnorodności mikrobioty przeprowadzono za pomocą programów: R phylosec, R vegan i Past. Do analizy różnicowej zawartości taksonów zastosowano program DESeq2

Fot. 1. A) *Apis mellifera*, B) *Scleranthus perennis*, C) *Hottonia palustris* (źródło: Wikipedia)

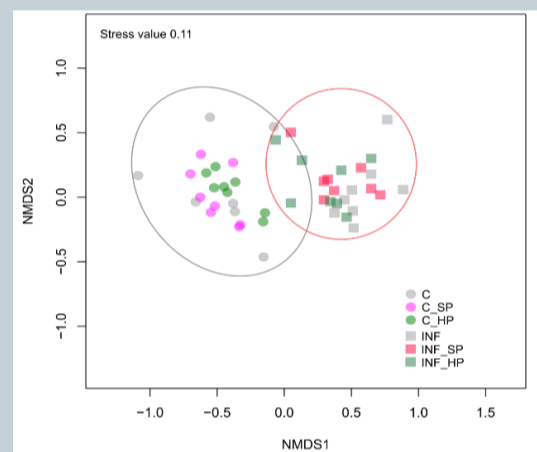
WYNIKI



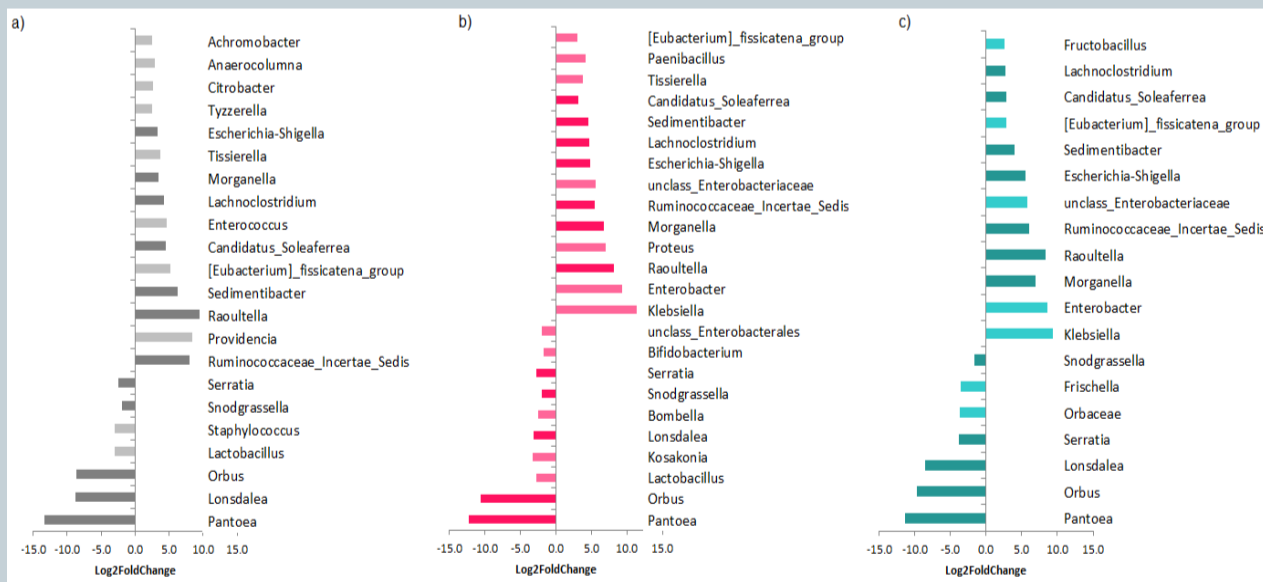
Rys 2. Krzywe rozrzedzenia próbek po sekwencjonowaniu



Rys 1. Schemat grup eksperymentalnych (N=8)



Rys 3. Analiza niepodobieństwa składu mikrobioty w próbkach metodą NMDS oparta o wskaźnik Bray-Curtisa



Rys 4. Analiza DeSeq2 różnic w składzie taksony pomiędzy grupami pszczoł zdrowych i po infekcji w każdym wariancie suplementacji; A – bez suplementacji; B – suplementacja ekstraktem *Scleranthus perennis*; C – suplementacja ekstraktem *Hottonia palustris*

Tabela 1. Wskaźniki α – bioróżności badanych grup próbek i ich porównanie

	Variant	Średnia	SD	Variant	Średnia	SD	Wartość P
Obs	C	18 ^a	±4	INF	33 ^a	±2	P<0.001
	C_SP	17 ^a	±2	INF_SP	31 ^a	±5	P<0.001
	C_HP	20 ^a	±2	INF_HP	29 ^a	±4	P<0.001
Shannon	C	1.73 ^a	±0.18	INF	2.34 ^a	±0.19	P<0.001
	C_SP	1.71 ^a	±0.17	INF_SP	2.31 ^a	±0.24	P<0.001
	C_HP	1.90 ^a	±0.15	INF_HP	2.18 ^a	±0.22	P<0.05
Evenness	C	0.61 ^a	±0.07	INF	0.67 ^a	±0.05	P>0.05
	C_SP	0.60 ^a	±0.04	INF_SP	0.67 ^a	±0.04	P>0.05
	C_HP	0.64 ^a	±0.04	INF_HP	0.65 ^a	±0.05	P<0.05

Tabela 2. Analiza β -bioróżnorodności badanych grup próbek metodą NPMANOVA obejmująca pszczoły zdrowe i zakażone różniące się suplementacją

		Df	Suma	Średnia	Model F1	R ²	Pr(>F)
Kontrola zdrowe	Treatment	2	0.123	0.061	0.683	0.064	0.733
	Residuals	20	1.800	0.090	0.936		
	Total	22	1.923	1.000			
IZainfekowane	Treatment	2	0.204	0.102	1.090	0.094	0.373
	Residuals	21	1.967	0.094	0.906		
	Total	23	2.172	1.000			

WYNIKI

Analiza uzyskanych danych metataksonomicznych (Rys 2) wykazała znaczące różnice między składem mikrobioty bakteryjnej pszczoł zdrowych i zakażonych:

- Mikrobiota pszczoł zakażonych wykazywała znacząco wyższe wskaźniki α -bioróżnorodności w porównaniu do pszczoł zdrowych (Tabela 1)
 - Próbkę pochodzące z pszczoł zdrowych grupowały się oddzielnie niż te pochodzące od pszczoł zakażonych na wykresie NMDS (Rys. 3)
 - Zaobserwowano znaczące zmiany w zawartości szeregu taksonów w każdym wariancie suplementacji między pszczołami zdrowymi a zakażonymi (Rys. 3).
- Analiza wskaźników α -bioróżnorodności oraz NPMANOVA wykazała, że obrębie pszczoł zdrowych i zakażonych różniących się suplementacją, mikrobiota bakteryjna nie wykazywała znaczących różnic (Tabela 1, 2)

WNIOSKI

- Analiza uzyskanych danych metataksonomicznych wskazuje na odmiennosc składu mikrobioty bakteryjnej pomiędzy pszczołami zdrowymi a zakażonymi, przy jednoczesnym braku zmian w obrębie osobników zdrowych i zakażonych różniących się suplementacją danym ekstraktem roślinnym.
- Wyniki te sugerują, że u podłoża zwiększonej żywotności i odporności pszczoł na patogeny nie leżała ukierunkowana modyfikacja struktury ich mikrobioty.