

*Н.С. Романович, Е.Н. Бирюк, к.с-х.н., Т.А. Савельева, к.в.н., доцент
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ ОРГАНИЗМА ПЧЕЛ

*N. Ramanovich, A. Biruk, T. Savelieva
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus*

PECULIARITIES OF OBTAINING ENVIRONMENTAL CULTURES OF LACTIC ACID BACTERIA FROM BEES

e-mail: romanovich28@tut.by, biohimbel@rambler.ru, t.savelieva@tut.by

*Из природных источников (подмор пчел, живые пчелы, шмель) получены накопительные культуры, содержащие молочнокислые бактерии, у которых определены культурально-морфологические свойства. Подтверждена контаминация накопительных культур бактериями рода *Enterococcus* и *Clostridium* и обозначены эффективные способы получения изолятов, не содержащих энтерококков и спорообразующих форм клеток.*

Из 67 накопительных культур выделен 61 изолят, представленный грамположительными каталазоотрицательными палочками, не растущими на среде Кесслер/Эндо.

*From natural sources (death of bees, live bees, bumblebee), enrichment cultures containing lactic acid bacteria were obtained, in which cultural and morphological properties were determined. Contamination of enrichment cultures with bacteria of the genus *Enterococcus* and *Clostridium* has been confirmed, and effective methods for obtaining isolates that do not contain enterococci and spore-forming cell forms have been identified.*

Out of 67 enrichment cultures, 61 isolates were isolated, represented by gram-positive catalase-negative rods that did not grow on Kessler/Endo medium.

Ключевые слова: пчелы; микробиота; накопительные культуры; молочнокислые бактерии.

Key words: bees; microbiota; enrichment cultures; lactic acid bacteria.

Введение. В настоящее время в пчеловодстве широко используются пробиотические микроорганизмы или отдельные группы микроорганизмов, способные оказывать благотворное влияние на повышение устойчивости пчел к различным патогенам, стимулировать активизацию их иммунологической защиты. Механизм действия пробиотических добавок основан на адгезивных и антагонистических свойствах бактерий-пробионтов, вытесняющих из состава кишечной популяции пчелы условно-патогенные микроорганизмы и неспецифически контролирующей избыточность их роста [1].

По данным Рубеля И.С., Перебейнис А.В., Ржевской В.С. (2013 г.) введение в рацион пчел пробиотика «Эмпробио», который включает молочнокислые гомоферментативные бактерии рода *Lactobacillus* и рода *Lactococcus*, одноклеточные грибы *Saccharomyces*, повышает продолжительность жизни пчел на 8,32%, срок появления первых погибших пчел увеличился в 2 раза по сравнению с контролем. Применение пробиотика «Эмпробио» для стимуляции развития пчелиных семей обеспечивает увеличение резистентности пчел, а тем самым - продуктивности семьи и качество производимого ими меда [2].

Согласно результатам исследований Arredondo D. et.al. (2018 г.), при кормлении пчел препаратом на основе бактерий *L. kunkeei*, выделенных из кишечника медоносной пчелы, уменьшилось количество спор *N. ceranae*, по сравнению с контролем [3].

В коммерческих пробиотических препаратах для пчел «Vetafarm Probotic» и «Protexin Concentrate» содержатся молочнокислые бактерии *L. acidophilus* и *L. plantarum*, выделенные из кишечника медоносных пчел [4, 5].

До недавнего времени большинство исследований микробных сообществ медоносных пчел были сосредоточены на болезнетворных микроорганизмах, и гораздо меньше внимания уделялось непатогенным микроорганизмам, в то время как бактерии рода *Lactobacillus* являются важными представителями микробиоты пищеварительного тракта пчел [6]. Согласно данным Жеребкина М. В. (1965 г.), Таранова Г. Ф. (1986 г.) пищеварительная система пчелы имеет ряд особенностей, связанных со специализацией на питании нектаром и пыльцой растений, характером постройки гнезда и выведения потомства, а также особенностями жизненного цикла [7, 8]. Чечёткина У.Е. (2011 г.) установила, что микрофлора кишечника играет важную роль в поддержании гомеостаза организма пчелы при развитии различных заболеваний, в том числе инфекционных. Бактерии-симбионты способствуют созреванию иммунной системы, помогают утилизировать питательные вещества, поступающие в организм пчел, подавляют развитие посторонней микрофлоры, продуцируют биологически активные вещества (витамины, ферменты и т.д.) [9]. Согласно данным Бахир В.М. (2002 г.), Грובהва О.Ф. (2003 г.), микробиоценоз пчел в основном определяется тем, в какой среде обитания живут их семьи, чем питаются и с чем контактируют. Поэтому его участниками бывают не только сапрофитные, но и условно-патогенные микроорганизмы [10, 11]. Билад Н.Г. (2009 г.), Ляпуновым Я.Э. (2008 г.), Маннаповым А.Г. (2009 г.) установлено, что микробиоценоз пищеварительного тракта пчел формируется в течение всего активного периода жизнедеятельности семьи. У пчел, уходящих в зимовку, состояние здоровья семьи и отдельных пчел, их воспроизводительная и продуктивная активность будут зависеть от групп микроорганизмов, заселяющих микрофлору кишечника у молодых и взрослых пчел [12–14].

Согласно данным Евтеевой Н.И. (2007 г.), основными группами обитателей кишечного тракта пчелы медоносной являются энтеробактерии, молочнокислые бактерии, бифидобактерии, стафилококки, энтерококки, псевдомонады, дрожжи и плесневые грибы [15]. Марковой Ю.А. (2005 г.), Евтеевой Н.И. (2009 г.) показано, что в период зимовки энтеробактерии обнаруживаются в переднем отделе пищеварительного тракта пчелы практически с такой же частотой, как и в заднем. Возможно, это связано с тем, что в течение зимы пчелы не опорожняют кишечник, что способствует миграции размножающихся там бактерий в верхние отделы пищеварительного тракта. После весеннего облета состав энтерофлоры пчел полностью меняется. Доминирующая зимой *Klebsiella oxytoca* после очистительного облета не обнаруживается. Наиболее часто обнаруживаются микроорганизмы рода *Enterobacter*, а также в небольшом количестве *Morganella* spp., *Serratia* spp. и *Pantoea* spp., что косвенно может свидетельствовать о контаминации пчел в период посещения медоносных растений [16, 17]. По данным Московской Н.Д. (2019 г.) самыми многочисленными представителями кишечника пчел являются энтеробактерии и стафилококки. Их среднегодовое содержание составляет 10^5 . Максимальное количество энтеробактерий регистрируется в зимний период, в летний сезон пищеварительная система пчел освобождается от энтеробактерий. В то время как лактобактерии в кишечном биоценозе пчел регистрируются постоянно, их уровень колеблется в пределах 10^1 - 10^3 [18].

Moran N.A. (2015 г.) установлено, что в кишечнике рабочих пчел *A. mellifera* присутствуют и бактерии рода *Bifidobacterium*, в частности, *Bifidobacterium asteroides*,

Bifidobacterium actinocoloniiforme, *Bifidobacterium bohemicum* [19]. Bottacini F. et al. (2012 г.) определили, что *Bifidobacterium asteroides*, присутствующие в кишечнике медоносных пчел, сохраняют способность к аэробному дыханию, в отличие от *Bifidobacterium* из кишечника млекопитающих, которые полностью анаэробны [19], что вероятно связано с содержанием более высоких концентраций кислорода в кишечнике пчел по сравнению с кишечником млекопитающих. Zheng, H. et al. (2019 г.) путем анализа геномов кишечной микробиоты медоносных пчел установлено, что бактерии рода *Bifidobacterium* и *Gilliamella* вносят основной вклад в расщепление гемицеллюлозы и пектина [20].

Таким образом, изучение микробиоты пчел является перспективным для дальнейшего выделения микроорганизмов с целью их использования в составе пробиотических препаратов, однако выделение чистых культур молочнокислых бактерий может быть значительно осложнено сопутствующей микрофлорой кишечного тракта пчел.

Материалы и методы исследований. Объектами исследований являлись пчелы и шмель, отобранные на территории Республики Беларусь; а также накопительные культуры и изоляты, полученные с их использованием.

Получение накопительной культуры. Пробирки с посевами образцов инкубировали при температуре $(30\pm 1)^\circ\text{C}$ (в среде ВОМ-10), $(45\pm 1)^\circ\text{C}$ (в среде ВОМ-10) до образования молочного сгустка, но не более 48 ч. Образцы в средах MRS на основе МПБ (рН $5,5\pm 0,1$) и ПГС инкубировали при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$, а в среде ГО при температуре $(28\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение не более 48 ч до интенсивного помутнения. Для обогащения накопительной культуры проводили однократную перевивку каждой культуры в среде накопления.

Микроскопический препарат готовили по [22].

Определение грампринадлежности проводили по [22].

Определение способности к росту в среде ГО с содержанием 6,5% хлорида натрия. Накопительные культуры выращивали в течение (16 ± 1) ч в среде ГО, после чего 0,1 мл бактериальной суспензии клеток вносили в 10 мл среды ГО с содержанием 6,5% хлорида натрия, инкубировали в термостате при $(30\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 часов. Помутнение среды свидетельствовало о росте исследуемых культур.

Определение наличия каталазы. На предметное стекло наносили каплю 5% раствора перекиси водорода. В нее помещали такое же количество клеток исследуемой культуры и тщательно ресуспендировали. О наличии у микроорганизмов каталазы судили по разложению перекиси водорода, которое происходит с выделением пузырьков кислорода.

Посев на среду Кесслера и Эндо. 1 мл накопительной культуры вносили в 5 мл среды Кесслера. Инкубировали при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (16 ± 1) ч. О наличии бактерий группы кишечной палочки судили по формированию пузырьков газа в поплавке. После этого бактериологической петлей производили посев из среды Кесслера поверхностно штрихом на среду Эндо. Инкубировали при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (16 ± 1) ч, после чего визуально фиксировали наличие/отсутствие роста на чашках Петри.

Выделение общей ДНК. ДНК выделяли с использованием коммерческого набора АртДНК MiniSpin (ООО «АртБиоТех»).

Результаты и их обсуждение. Для выделения накопительных культур молочнокислых бактерий отобрано 23 образца, в том числе: 19 образцов подмора рабочих пчел, 2 образца живых пчел, 1 образец подмора трутней, 1 образец подмора шмеля.

Для получения накопительных культур образцы вносили в 4 питательные среды: ПГС, MRS (на основе МПБ, рН 5,5), ГО, ВОМ-10. Для получения

накопительных культур молочнокислых палочек образцы инкубировали на среде MRS (на основе МПБ, рН 5,5) при 37°C. Для получения накопительных культур молочнокислых палочек и бифидобактерий образцы инкубировали на среде ПГС при 37°C. Для получения накопительных культур слабых кислотообразователей образцы инкубировали на среде ГО при 28±1°C. Также образцы инкубировали на среде ВОМ-10 при 45±1°C и при 30±1°C, однако на данной питательной среде не удалось выделить ни одной накопительной культуры.

После обогащения в различных питательных средах получено 67 накопительных культур, в том числе: 60 культур получены из подмора рабочих пчел, 4 культуры из пчел живых, 1 культура из подмора шмеля и 2 культуры из подмора трутней. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Количество накопительных культур, полученных из различных природных образцов на различных питательных средах.

Наименование природного источника накопительной культуры	Количество природных образцов	Количество накопительных культур на среде					
		ГО		ПГС		MRS	
		преимущественно кокки	смешанные формы клеток (кокки, палочки, спорообразующие палочки)	преимущественно кокки	смешанные формы клеток (кокки, палочки, спорообразующие палочки)	преимущественно кокки	смешанные формы клеток (кокки, палочки, спорообразующие палочки)
подмор рабочих пчел	19	-	4	5	32	4	15
подмор трутней	1	-	-	-	1	-	1
подмор шмеля	1	-	-	-	1	-	-
пчелы живые	2	-	-	-	4	-	-
ВСЕГО	23	-	4	5	38	4	16

Источник данных: собственная разработка.

Проведена характеристика обогащенных накопительных культур, выделенных из организма пчел, по морфологическим свойствам (таблица 1).

В результате исследований на среде ГО при 28±1°C получены 4 обогащенные накопительные культуры, у всех культур в микроскопическом препарате присутствуют смешанные формы клеток в виде палочек и кокков, у 1 культуры также визуализируются спорообразующие палочки. При этом, на среде ПГС при 37°C получено 43 накопительные культуры, у 5 культур (выделены из подмора рабочих пчел) в микроскопическом препарате преобладают клетки в форме кокков, у 38 культур присутствуют смешанные формы клеток в виде палочек, спорообразующих палочек и кокков (32 культуры выделены из подмора рабочих пчел, 1 – из подмора трутней, 1 – из подмора шмеля и 4 – из живых пчел). Установлено, что все полученные на среде ПГС культуры, содержащие палочковидные формы клеток, контаминированы клетками в форме кокков и палочками с выраженным спорообразованием.

На среде MRS на основе МПБ (рН 5,5) при 37°C получено 20 обогащенных накопительных культур, при этом у 4 культур (выделены из подмора пчел) в микроскопическом препарате преобладают клетки в форме кокков и 16 культур представлены смешанными формами клеток в виде палочек и кокков (15 культур выделено из подмора пчел и 1 культура – из подмора трутней). Установлено, что все культуры, полученные на среде MRS на основе МПБ (рН 5,5), содержащие палочковидные формы клеток, контаминированы клетками в форме кокков. Следует отметить, что на среде с пониженным значением активной кислотности (5,5 ед. рН) ни у одной накопительной культуры в микроскопическом препарате не зафиксировано спорообразующих клеток.

Форма и расположение клеток в микроскопическом препарате полученных накопительных культур представлены на рисунке 1.

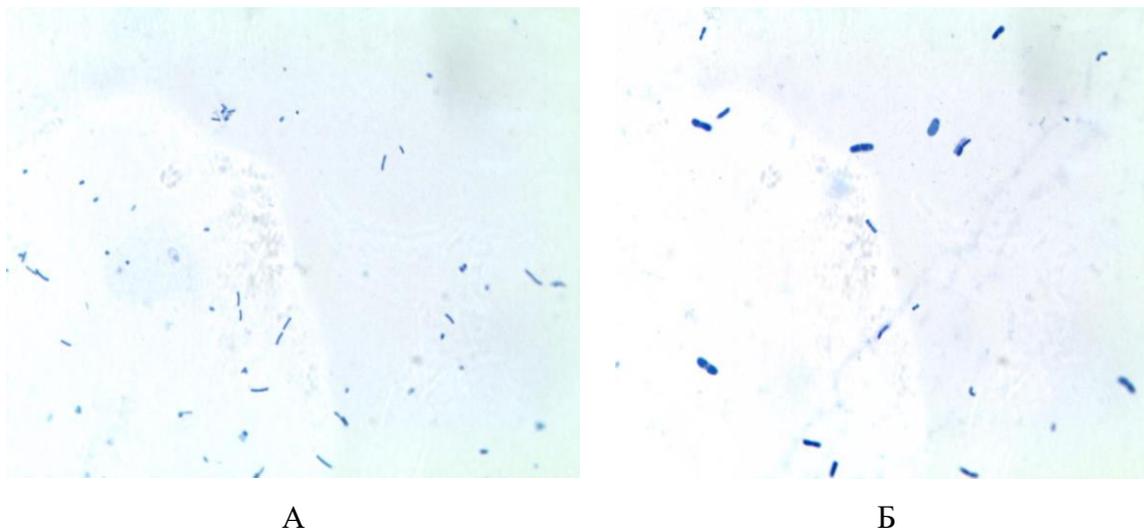


Рисунок 1 – Микроскопический препарат накопительных культур, полученных из образцов подмора пчел на среде ПГС

(А – культура p1911/5-5, представлена смешанными формами клеток в виде палочек и кокков, Б – культура p1909/5-1, представлена палочками утолщенными с выраженным спорообразованием и кокками).

Источник данных: собственная разработка.

Для всех культур, содержащих преимущественно клетки в форме кокков (9 культур), зафиксирован рост в среде ГО с содержанием 6,5% хлорида натрия, что свидетельствует о их принадлежности к роду *Enterococcus*, все 9 культур исключены из дальнейших исследований.

Установлено, что все полученные обогащенные накопительные культуры, содержащие палочковидные формы клеток (58 культур), контаминированы клетками в форме кокков и/или палочками с выраженным спорообразованием. Для них проведен поверхностный рассев на чашки Петри с питательной средой, в которой проводилось обогащение, истощающим штрихом до получения изолированных колоний. Далее образцы инкубировали при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 72 часов в анаэробных условиях. Полученные различные изолированные колонии размером не более 2-х мм, белого, светло-бежевого и бежевого цвета перевивали в пробирки с соответствующей питательной средой (не менее 10 колоний для одного образца) и также инкубировали при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 72 часов. В результате эксперимента получено 174 изолята, для которых определены форма и расположение клеток в микроскопическом препарате.

Установлено, что максимальное количество изолятов (135) получено на среде ПГС. В микроскопическом препарате у 97 изолятов зафиксированы однородные клетки в форме кокков, у 32 изолятов – однородные клетки в форме палочек и у 6 изолятов – разнородные клетки в форме палочек. На среде MRS на основе МПБ (рН 5,5) получено 37 изолятов: у 16 изолятов в микроскопическом препарате зафиксированы однородные клетки в форме кокков и у 21 изолята – однородные клетки в форме палочек. На среде ГО получено 2 изолята, оба представлены однородными палочками.

Для изолятов, содержащих клетки в форме кокков (113 изолятов), определены способность к росту в среде ГО с содержанием 6,5% хлорида натрия и способность к формированию газа из глюкозы. Установлено, что у всех исследованных изолятов

зафиксирован рост в среде ГО с содержанием 6,5% хлорида натрия и отсутствует способность к формированию газа из глюкозы, что свидетельствует о принадлежности данных изолятов к роду *Enterococcus*. Для подтверждения результатов исследований проведена идентификация изолята p1897/5-9-6 с использованием молекулярно-генетических методов (секвенирование последовательности гена 16S рНК). Установлено, что изолят p1897/5-9-6 принадлежит к виду *Enterococcus faecalis*.

Для изолятов, содержащих клетки в форме палочек (61 изолят), определены грампринадлежность, способность к росту на среде Кесслер/Эндо и наличие каталазы. Определено, что все полученные изоляты представлены грамположительными каталазоотрицательными палочками, которые не растут на среде Кесслер/Эндо.

Накопительная культура p1895/5-1, полученная на среде ПГС, также дополнительно исследована методом глубинного посева в анаэробных условиях в среду ПГС с содержанием агара 0,15%. После инкубирования в течение 48 часов при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ получен изолят p1895/5-1-1 с выраженным газообразованием, клетки которого в микроскопическом препарате представлены длинными утолщенными спорообразующими палочками. Проведена идентификация изолята p1895/5-1-1 методом секвенирования нуклеотидной последовательности гена 16S рНК и подтверждена принадлежность его к виду *Clostridium perfringens*.

Заключение. С помощью культурально-морфологических и молекулярно-генетических методов подтверждена контаминация накопительных культур, выделенных из пчел, спорообразующими бактериями и бактериями рода *Enterococcus*. Следует отметить, что спорообразующие палочки зафиксированы в микроскопических препаратах накопительных культур, обогащенных на среде ПГС и ГО, а в микроскопических препаратах накопительных культур, обогащенных на среде MRS на основе МПБ (рН 5,5), данные формы клеток отсутствуют. После поверхностного посева в анаэробных условиях на чашки Петри накопительных культур, обогащенных на среде ПГС, в микроскопических препаратах полученных изолятов также не отмечены спорообразующие палочки. Таким образом, установлено, что снижение активной кислотности селективной питательной среды для получения и обогащения накопительных культур до величины 5,5 ед. рН, а также поверхностный посев накопительных культур позволяют в дальнейшем выделять изоляты, не содержащие спорообразующих форм клеток.

Установлено, что на средах ГО, ПГС и MRS на основе МПБ (рН 5,5) получены накопительные культуры, содержащие смешанные формы клеток (в виде кокков и палочек). В данном случае также целесообразно проводить посев накопительных культур, что позволяет получать изоляты, содержащие клетки исключительно в форме палочек. Все полученные после посева изоляты, содержащие клетки в форме кокков, принадлежат к роду *Enterococcus*. При этом данные изоляты выделены, в том числе, и из накопительных культур, обогащенных на среде MRS на основе МПБ (рН 5,5). Следовательно, можно утверждать, что микроорганизмы рода *Enterococcus* активно развиваются и при пониженных значениях активной кислотности селективной питательной среды.

Таким образом, в ходе исследований из 23 образцов насекомых после обогащения в различных питательных средах получено 67 накопительных культур, из которых выделен 61 изолят с клетками в форме палочек. Установлено, что полученные изоляты представлены грамположительными каталазоотрицательными палочками, которые не растут на среде Кесслер/Эндо. Данные изоляты лиофилизированы, заложены на хранение при минус 40°C и будут использованы для дальнейших исследований по изучению их физиолого-биохимических, производственно-ценных и пробиотических свойств.

Список использованных источников

1. Бармина, И.Э. Стимулирующие подкормки для пчелиных семей с добавлением комплексных аминокислотных и пробиотических препаратов /

1. Barmina, I. Je. Stimulirujushhie podkormki dlja pchelinyh semej s dobavleniem kompleksnyh aminokislotnyh i probioticheskikh

- И.Э. Бармина, А.Г. Маннапов, Г.В. Карпова // Вестник ОГУ.-Оренбург.-2011.-№12(131). - С. 376-377.
2. Рубель, И.С. Влияние микробиологического препарата Эмпроббио на увеличение продолжительности жизни рабочих пчел / И.С. Рубель, А. В. Перебейнис, В.С. Ржевская // Экосистемы, их оптимизация и охрана. - Симферополь, 2013. - Вып.9.
3. Arredondo D. *Lactobacillus kunkeei* strains decreased the infection by honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Nosema ceranae* / D. Arredondo, L. Castelli; M.P. Porrini; P.M. Garrido, M.J. Eguaras; P. Zunino, K. Antúnez, // *Benefic. Microbes.* – 2018. – Vol. 9. – P. 279–290.
4. Audisio M.C. *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies / M.C. Audisio, M.R. Benítez-Ahrendts // *Benefic. Microbes.* – 2011. – Vol. 2. – P. 29–34.
5. Tajabadi N. et al. Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee / N. Tajabadi et al. // *Brazilian Journal of Microbiology.* – 2013. – Vol. 44, № 3. – P. 717–722.
6. Андреева Н.Л. Альтернатива антибиотикам / Н.Л. Андреева // *Международный вестник ветеринарии.* - № 2. - 2009. – С. 10-13.
7. Жеребкин, М. В. Возрастные и сезонные изменения некоторых процессов пищеварения у медоносной пчелы / М. В. Жеребкин // *Вестник НИИ пчеловодства.* – М. : Московский рабочий. – 1965. – 45с.
8. Таранов, Г. Ф. Корма и кормление пчел / Г. Ф. Таранов. – М. – 1986. – 160 с.
9. Чечёткина, У.Е. Энтеробактерии в составе микрофлоры пищеварительной системы медоносных пчёл в различные сезоны года / У.Е. Чечёткина, Н.И. Евтеева, А.И. Речкин, А.А. Радаев // *Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.* - 2011. - №2. - С. 149-153.
10. Бахир, В.М. Пчелы в окружении микробов / В.М. Бахир, А.М. Кожемякин // *Пчеловодство.* – 2002. – №3. – С. 23-26.
11. Гробов, О.Ф. Болезни и вредители пчел / О.Ф. Гробов, А.К. Лихотин // *Москва: Мир.* - 2003. - 288 с.
12. Билаш, Н.Г. Подкормка пчелиных семей на зиму / Н.Г. Билаш, В.И. Лебедев // *Пчеловодство.* – 2009. – №7. – С. 48-49.
- preparatov [Stimulating nutrition for bee families with the addition of complex amino acid and probiotic preparations] / I.Ie. Barmina, A.G. Mannapov, G.V. Karpova // *Vestnik OGU.-Orenburg.-2011.-№12(131).* - S. 376-377.
2. Rubel', I.S. Vlijanie mikrobiologicheskogo preparata Jemprobio na uvelichenie prodolzhitel'nosti zhizni rabochih pchel [Influence of the microbiological preparation Emprobio on the increase in the lifespan of worker bees] / I.S. Rubel', A. V. Perebejn'is, V.S. Rzhetskaja // *Jekosistemy, ih optimizacija i ohrana.* - Simferopol', 2013.- Vyp.9.
6. Andreeva N.L. Alternativa antibiotikam [An alternative to antibiotics] / N.L. Andreeva // *Mezhdunarodnyj vestnik veterinarii.* - № 2. - 2009. – S. 10-13.
7. Zherebkin, M. V. Vozrastnye i sezonnye izmenenija nekotoryh processov pishhevarenija u medonosnoj pchely [Age and seasonal changes in some digestive processes in the honey bee] / M. V. Zherebkin // *Vestnik NII pchelovodstva.* – M. : Moskovskij rabochij. – 1965. – 45s.
8. Taranov, G. F. Korma i kormlenie pchel [Feeding and feeding bees] / G. F. Taranov. – M. – 1986. – 160 s.
9. Chechjotkina, U.E. Jenterobakterii v sostave mikroflory pishhevaritel'noj sistemy medonosnyh pchel v razlichnye sezony goda [Enterobacteriaceae in the microflora of the digestive system of honey bees in different seasons of the year] / U.E. Chechetkina, N.I. Evteeva, A.I. Rechkin, A.A. Radaev // *Vestnik Nizhegorodskogo gosuniversiteta im. N.I. Lobachevskogo.* - 2011. - №2. - S. 149-153.
10. Bahir, B.M. Pchely v okruzhении mikrobov [Bees surrounded by microbes] / B.M. Bahir, A.M. Kozhemjakin // *Pchelovodstvo.* – 2002. – №3. – S. 23-26.
11. Grobov, O.F. Bolezni i vrediteli pchel [Diseases and pests of bees] / O.F. Grobov, A.K. Lihotin // *Moskva: Mir.* - 2003. - 288 s.
12. Bilash, N.G. Podkormka pchelinyh semej na zimu [Feeding of bee colonies for the winter] / N.G. Bilash, V.I. Lebedev // *Pche-lovodstvo.* – 2009. – №7. – S. 48-49.

13. Ляпунов, Я.Э. Энтеробактерии кишечника зимующих пчел *Apis mellifera* / Я.Э. Ляпунов, Р.З. Кузьяев, Р.Г. Хисматуллин, О.А. Безгодова // Микробиология. – 2008. – № 3. – Т.77. – С. 421-427.
14. Маннапов, А.Г. Использование микробиологических препаратов / А.Г. Маннапов, Г.С. Мишуковская, О.С. Ларионова // Пчеловодство. – 2009. – № 10. – 8 с.
15. Евтеева, Н.И. Поиск новых резервуаров для персистенции и участников циркуляции энтеробактерий в естественных экосистемах / Н.И. Евтеева, А.И. Речкин // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2007. - № 6. - С. 99-103.
16. Маркова, Ю.А. Выделение бактерий семейства Enterobacteriaceae из растительных тканей / Ю. А. Маркова, А.С. Романенко, А.В. Духанина // Микробиология. - 2005. - Т. 74. - № 5. - С. 663-666.
17. Евтеева, Н.И. Энтерофлора медоносных пчел / Н.И. Евтеева, А.И. Речкин, В.Н. Крылов // Пчеловодство. - 2009. - № 8. - С. 6-7.
18. Московская, Н.Д. Механизмы естественной защиты и изменение микробиоты кишечника медоносных пчел под влиянием адаптогенов: дисс. канд. с-х. наук: 03.03.01 / Н.Д. Московская. - М., 2019. - 164 с.
19. Moran, N.A. Genomics of the honey bee microbiome / N.A. Moran // Current Opinion in Insect Science. – 2015. – Vol. 10. – P. 22–28.
20. Bottacini, F. et al. *Bifidobacterium asteroides* PRL2011 genome analysis reveals clues for colonization of the insect gut / F. Bottacini et al. // PLoS ONE. / ed. by Horn M. – 2012. – Vol. 7, № 9. – P. E44229.
21. Zheng, H. et al. Division of labor in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion / H. Zheng et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2019. – Vol. 116, № 51. – P. 25909–25916.
22. Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа. Межгосударственный стандарт // ГОСТ 32901-2014. – Введ. 01.01.2016. – М.: Стандартинформ, 2015.
13. Ljapunov, Ja.Je. Jenterobakterii kishechnika zimujushhih pchel *Apis mellifera* [Enterobacteriaceae of the intestines of wintering bees *Apis mellifera*] / Ja.Je. Ljapunov, R.Z. Kuzjaev, R.G. Hismatullin, O.A. Bezgodova // Mikrobiologija. – 2008. – № 3. – T.77. – S. 421-427.
14. Mannapov, A.G. Ispol'zovanie mikrobiologicheskikh preparatov [Use of the microbiological preparations] / A.G. Mannapov, G.S. Mishukovskaja, O.S. Larionova // Pchelovodstvo. – 2009. – № 10. – 8 s.
15. Evteeva, N.I. Poisk novyh rezervuarov dlja persistencii i uchastnikov cirkuljicii jenterobakterij v estestvennyh jekosistemah [Search for new reservoirs for persistence and participants in the circulation of enterobacteria in natural ecosystems] / N.I. Evteeva, A.I. Rechkin // Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo. 2007. - № 6. - S. 99-103.
16. Markova, Ju.A. Vydelenie bakterij semejstva Enterobacteriaceae iz rastitel'nyh tkanej [Isolation of Enterobacteriaceae family bacteria from plant tissues] / Ju. A. Markova, A.S. Romanenko, A.V. Duhanina // Mikrobiologija. - 2005. - T. 74. - № 5. - S. 663-666.
17. Evteeva, N.I. Jenteroflora medonosnyh pchel [Enteroflora of honey bees] / N.I. Evteeva, A.I. Rechkin, V.N. Krylov // Pchelovodstvo. - 2009. - № 8. - S. 6-7.
18. Moskovskaja, N.D. Mehanizmy estestvennoj zashhity i izmenenie mikrobioty kishechnika medonosnyh pchel pod vlijaniem adaptogenov [Natural defense mechanisms and changes in the intestinal microbiota of honey bees under the influence of adaptogens]: diss. kand. s-h. nauk: 03.03.01 / N.D. Moskovskaja. - M., 2019. - 164 s.
19. Moran, N.A. Genomics of the honey bee microbiome / N.A. Moran // Current Opinion in Insect Science. – 2015. – Vol. 10. – P. 22–28.
20. Bottacini, F. et al. *Bifidobacterium asteroides* PRL2011 genome analysis reveals clues for colonization of the insect gut / F. Bottacini et al. // PLoS ONE. / ed. by Horn M. – 2012. – Vol. 7, № 9. – P. E44229.
21. Zheng, H. et al. Division of labor in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion / H. Zheng et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2019. – Vol. 116, № 51. – P. 25909–25916.
22. Moloko i molochnye produkty. Metody mikrobiologicheskogo analiza. Mezghosudarstvennyj standart [Milk and dairy products. Methods of microbiological analysis. Interstate standard] // GOST 32901-2014. – Vved. 01.01.2016. – M.: Standartinform, 2015.