

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Kultivácia včelích mikroorganizmov v potravinárskych
médiach s potenciálnym využitím ako nápoje**

Bakalárska práca

Daniel Svatík

**Zemědělství, zahradnictví a rozvoj venkova,
Kvalita produkce**

Vedúci práce Doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že svoju bakalársku prácu “Kultivácia včelých mikroorganizmov v potravinárskych médiach s potenciálnym využitím ako nápoje” som vypracoval samostatne pod vedením vedúceho bakalárskej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú uvedené v zozname použitej literatúry na konci práce. Ako autor uvedenej bakalárskej práce prehlasujem, že som v súvislosti s jej vyhotovením neporušil autorské práva tretích osôb.

V Prahe dňa

Daniel Svatík

Poďakovanie

Rád by som touto cestou poďakoval vedúcemu práce Doc. Jaroslavovi Havlíkovi a konzultantovi Dr. Jiřímu Killerovi, ktorí mi boli vždy ochotní poradiť a pomôcť, ďalej mojej rodine, spolužiačkam a kamarátom za množstvo rád a podporu.

Kultivácia včelích mikroorganizmov v potravinárskych médiach s potenciálnym využitím ako nápoje

Súhrn

Včely medonosné sú nespochybniteľne extrémne dôležitou súčasťou moderného poľnohospodárstva a krajiny. Veľkým problémom sa ale v posledných rokoch stali rozsiahle straty spôsobené tlakom patogénnych vírusov, baktérií a húb šíriacich sa prostredníctvom mohutne rozšíreného roztoča *Varroa destructor* parazitujúceho na včelách. Veľmi významným faktorom môže byť aj často malá diverzita potravinových zdrojov, spôsobená obhospodarovaním obrovských monokultúrne orientovaných pozemkov, ktoré včelám poskytujú monotónnu potravu len pár dní až týždňov v roku. Zlepšeniu situácie by mohla pomôcť suplementácia ich prirodzených črevných baktérií, ktorá by podobne ako u vyšších organizmov mohla mať probiotický efekt vedúci k zlepšeniu obranyschopnosti a zdravotného stavu včiel.

Cieľom práce bolo otestovať rast niektorých prirodzených bakteriálnych kmeňov včelieho tráviaceho traktu z rodov *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, v relatívne lacných potravinárskych médiach ako srvátka alebo sójový proteínový izolát, za účelom ďalšieho probiotického využitia odfiltrovanej biomasy. Okrem toho bolo čiastkovým cieľom otestovať chuťovú prijateľnosť fermentovanej tekutiny v kombinácii s ovocnými šťavami alebo medom.

Nárast bakteriálnej biomasy bol vyhodnocovaný na základe zmeny optickej denzity médií v jednotlivých jamkách mikrotitračných dosiek. Ako média s najlepším kultivačným potenciálom sa ukázali čistá srvátka a sójový proteínový izolát s medom alebo cukrom, prídavky jablkového džúsu bakteriálnu aktivitu skôr inhibovali. Pri vybraných médiach bolo stanovené ich zloženie po 24h kultivácie pomocou ¹H NMR analýzy, ktoré nám potvrdilo zdravotnú nezávadnosť fermentovaných médií.

Pilotný sensorický test nám potvrdil dobrú chuťovú prijateľnosť niektorých nápojov pripravených z fermentovanej srvátky alebo sójového proteínu v kombinácii s ovocnými šťavami.

Experiment celkovo prináša zjednodušený náhľad technologického postupu pri produkcii včelích probiotík a poskytuje dobrý odrazový bod pre ďalšie rozvíjanie, zamerané aj na ďalšie bakteriálne skupiny a výrobu komerčne dostupného nápoja.

Kľúčové slová: včelie probiotiká, srvátka, sójový proteín, fermentované nápoje

Honey bee bacteria cultivation in media with a potential use as a beverages

Summary

Honey bees are definitely an extremely important part of modern agriculture and landscapes. However, a major problem in recent years has been the widespread losses caused by the pressure of pathogenic viruses, bacteria and fungi spreading through the widely expanded parasiting mite *Varroa destructor*. A very important factor can often also be a low diversity of food resources, caused by the large monocultural areas, which provide bees monotonous food only a few days or weeks throught year. One of the solutions could be a supplementation of their natural intestinal bacteria, which, like in higher organisms, could have a probiotic effect leading to improvement of bee defense and health.

The aim of the work was to test the growth of some bacterial strains of the bee gastrointestinal tract from the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in relatively cheap medias such as whey or soy protein isolate for further probiotic utilization of filtered biomass. In addition, a partial objective was to test the palatability of the fermented liquid in combination with fruit juices or honey. The increase in bacterial biomass was evaluated based on the change in the optical density of the media in the individual holes of the microtiter plates. Pure whey and soy protein isolate with honey or sugar proved to be the media with the best cultivation potential, and the addition of apple juice rather inhibited bacterial activity.

In few selected media was determined their composition after 24h of cultivation by ¹H NMR analysis, which confirmed the harmless composition of fermented media.

The pilot sensory test confirmed the good taste acceptance of some drinks made from fermented whey or soy protein in combination with fruit juices.

Overall, the thesis proposes a technological process pipeline, starting from the production of bee probiotics to the utilisation of the fermentation residues as a beverage with added value and acceptable palatability. It provides a good starting point for further development.

Keywords: honeybee probiotics, whey, soy protein, fermented beverages

OBSAH	
1 ÚVOD	7
2 CIELE PRÁCE	8
3 LITERÁRNA REŠERŠ	9
3.1 VČELIA IMUNITA	9
3.2 VČELIA MIKROBIOTA	10
3.2.1 MIKROBIÓM MEDOVÉHO VAČKU (CROP), ŽALÚDKU (MIDGUT) A PYLORU	11
3.2.2 MIKROBIÓM ČREVA (HINDGUT)	12
3.2.3 MIKROBIOTA LARIEV	13
3.2.4 PÔSOBENIE MIKROBIOTY	14
3.2.5 FAKTORY OVPLYVŇUJÚCE VEĽKOSŤ A ROZMANITOSŤ MIKROBIOTY	15
3.2.5.1 <i>Vplyv antibiotík</i>	15
3.2.5.2 <i>Vplyv pesticídov</i>	16
3.2.5.3 <i>Vplyv prostredia</i>	17
3.2.5.4 <i>Kastové zaradenie</i>	17
3.3 VČELIE PROBIOTIKÁ	19
3.3.1 VČELIE PROBIOTICKÉ PRÍPRAVKY NA TRHU	20
3.4 POTRAVINÁRSKE SUROVINY AKO MÉDIÁ PRE BIOLOGICKÉ KULTIVÁCIE	22
3.4.1 FERMENTOVANÉ NÁPOJE ZALOŽENÉ NA SRVÁTKE	23
3.4.2 FERMENTOVANÉ NÁPOJE ZALOŽENÉ NA SÓJOVOM ZÁKLADE	24
4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	26
4.1 MATERIÁLY A METÓDY	26
4.1.1 IZOLÁCIA LAKTOBACILOV A BIFIDOBAKTÉRIÍ Z TRÁVIACEHO TRAKTU ŽIVÝCH VČIEL	26
4.1.2 KLASIFIKÁCIA IZOLÁTOV LAKTOBACILOV A BIFIDOBAKTÉRIÍ	27
4.1.3 PRÍPRAVA MÉDII A OČKOVANIE MIKROTITRAČNÝCH DOSIEK	28
4.1.4 KULTIVÁCIA BAKTÉRIÍ A MERANIE OPTICKEJ DENZITY	29
4.1.5 NMR STANOVENIE ZLOŽENIA FERMENTOVANÝCH MÉDII	30
4.1.6 FERMENTÁCIA VÄČŠIEHO OBJEMU MÉDII PRE SENZORICKÉ HODNOTENIE	30
4.2 VÝSLEDKY A DISKUSIA	31
4.2.1 KLASIFIKÁCIE IZOLÁTOV NA ZÁKLADE KOMPARATÍVNEJ ANALÝZY 16S rRNA GÉNU	31
4.2.2 SPEKTROFOTOMETRICKÉ VYHODNOTENIE ZÁKALU MIKROTITRAČNÝCH DOSIEK	31
4.2.3 LÁTKOVÉ ZLOŽENIE VYBRANÝCH MÉDII PO FERMENTÁCII	33
4.2.4 VYHODNOTENIE SENZORICKEJ PRIJATELNOSTI NÁPOJOV	36
4.3 ZÁVER	37
5 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	38
ZOZNAM OBRÁZKOV A TABULIEK	44

1 Úvod

Včely sú nesmierne významným článkom moderného poľnohospodárstva. Bez ich príspevku k opeleniu by nebolo možné pestovať až 90 % poľnohospodárskych plodín. Včelárstvo sa v poslednej dobe stretáva s problémami, ktoré predstavujú vysoké zimné straty, postihujúce v závislosti na roku okolo 25 % včelstiev. V roku 2018 boli v niektorých krajinách ako Taliansko, alebo Írsko až 30 %, v ČR na úrovni 10 % (Gray a kol. 2019).

Príčina strát je neznáma, špekuluje sa o vplyve skladby potravy, pesticídov, žiarení, ale hlavne vírusov, vysokom výskyte varoázy alebo kombinácii týchto faktorov.

Nové publikácie ukazujú na možné narušenie imunity a homeostázy mikroorganizmov v trávicom trakte včiel. Mikroorganizmy hrajú u včiel ešte oveľa významnejšiu rolu ako u človeka. Včela je geneticky jednoduchší organizmus, mikroorganizmy v tráviacom trakte suplementujú celú radu enzýmov dôležitých k rozkladu sacharidov, pôsobia antagonisticky na patogény, a podieľajú sa na syntéze viacerých vitamínov. Disbalancia týchto ekologických vzťahov môže mať vážne následky, vedúce až k likvidácii včelstva.

Predpokladá sa, že podobne ako u ľudí, by mohla mať suplementácia prirodzených natívnych včelích probiotík pozitívny efekt na prevenciu pred ochoreniami, a zvýšenie produktivity a životaschopnosti včelstiev.

2 Ciele práce

Cieľom práce bolo otestovať niekoľko typov potravinárskych surovín, ako médií s vhodnými vlastnosťami pre rast včelých črevných mikroorganizmov rodov *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, a vyhodnotiť nárast bakteriálnej biomasy v porovnaní so štandardným kultivačným MRS médiom.

Média, ktoré vykazovali vhodné kultivačné vlastnosti pre rast mikroorganizmov, boli po fermentácii analyzované na chemické zloženie pomocou ^1H nukleárnej magnetickej rezonancie a pilotne otestované na senzorickú prijateľnosť pre výrobu nealkoholických nápojov.

Výsledkom práce mal byť návrh technologického postupu pre výrobu včelieho probiotického suplementu, u ktorého by po oddelení bakteriálnej biomasy bolo možné ďalej zhodnotiť fermentovanú tekutinu pri produkcii chutného fermentovaného nápoja vhodného pre ľudskú konzumáciu.

3 Literárna rešerš

V teoretickej časti práce sme sa zamerali na priblíženie problematiky včelej obranyschopnosti, zloženiu črevného mikrobiómu a probiotickej suplementácii včiel.

3.1 Včelia imunita

Priemerné zimné straty včelstiev sa dostali po zime 2017/18 v niektorých krajinách až nad úroveň 25 % (Talianko, Slovinsko, Španielsko, Portugalsko) (Gray a kol. 2019).

Ukazuje sa, že jedným z hlavných faktorov určujúcich zimné straty by mohla byť imunita včiel. Včela ako jedinec má svoj imunitný systém, ktorý sa skladá z troch vzájomne previazaných úrovní. Úplne nezákladnejšou obranou pred patogénmi je zabránenie ich vstupu do tela hostiteľa, za prvú úroveň imunitnej reakcie preto môžeme považovať tzv. fyzikálne bariéry ako kutikula, stena žalúdka a čreva, stena tracheí. Druhý stupeň tvoria bunky nazývané hemocyty, sú to hmyzie analógy ľudských leukocytov. Tieto bunky majú schopnosť pohlcovať a zapúzdrovať cudzorodé bunky, čím ich likvidujú. Niektoré hemocyty sú schopné produkovať chemické látky, ktoré patria do tretej úrovne imunitnej reakcie, tzv. humorálna imunita.

Humorálnu imunitu tvoria enzýmy (lysozým, fenoloxidazová kaskáda), glykoproteíny (lektíny) a antimikrobiálne peptidy (apidaecin, abaecin, hymenoptaecin, defensin, royalisin).

Imunitná reakcia jednotlivých včiel sa mení s vekom, mladé včely, kojičky majú napr. väčšie tukové teleso ako včely lietavky. V tukovom telese sú produkované antimikrobiálne peptidy, ktoré kojičky prenášajú aj do krmnej kaše plodu. V súvislosti s CCD (syndróm kolapsu včelstva) sú momentálne oveľa viac skúmané včelie vírusy, výskum ukazuje, že za úhyny včelstiev môžu pravdepodobne kombinácie viróz, bakterióz, húb a klieštikovitostí. Je preukázané, že klieštik včelí (*Varroa destructor*) slúži ako prenášač mnohých viróz. S nárastom populácie klieštika vo včelstve narastá súčasne aj množstvo viriónov vo včelstve. Pri vysokom napadnutí klieštikom je možné všimnúť si nárast počtu včiel s deformovanými krídlami.

Jednotlivé včelstvá vykazujú rôznu odolnosť proti virózam. Antimikrobiálne peptidy, látky spomínané v súvislosti s humorálnou imunitou, sú namierené predovšetkým proti bakteriálnym a hubovým patogénom. Peptid abaecin vykazuje silnú účinnosť proti pôvodcovi moru včelieho plodu (*Paenibacillus larvae*). Jeho nadexpresia v prípade infekcie by mohla viesť k vyliečeniu včiel, následne aj celého včelstva. Dokonca je zistené, že miera expresie abaecinu má koeficient dedičnosti $h^2 = 0,3-0,4$, sledovanie expresie abaecinu by mohlo viesť k selekcii potenciálne odolných včelstiev. Na odolnosti včelstiev proti moru včelieho plodu sa však podieľajú aj faktory zo sociálnej imunity, včelstvá s dobrým čistiacim pudom majú vyššiu šancu ozdaviť sa bez vzniku alebo pretrvávania klinických príznakov choroby.

Imunitný systém je ale ovplyvňovaný aj abiotickými faktormi. Medzi tieto patrí kvalita výživy, xenobiotiká v životnom prostredí, klimatické pomery ale aj úroveň včelárenia. Je preukázaný škodlivý vplyv pesticídov používaných proti varroáze, taktiež sa diskutuje o vplyve pesticídov používaných v poľnohospodárstve k ošetrovaniu rastlín proti škodcom.

Zaujímavou kapitolou výskumu sa stávajú probiotiká, symbiotické mikroorganizmy žijúce v tráviacom trakte včiel pomáhajúce s trávením potravy (Daníhlík 2011).

3.2 Včelia mikrobiota

Podobne ako aj u vyšších organizmov sa na povrchu tela a v tráviacom trakte včiel nachádzajú pestré mikrobiálne spoločenskú, ktoré sa viac alebo menej podieľajú na včelom metabolizme látok.

Mikroorganizmy v živočíšných črevách sa podieľajú na trávení potravy, detoxikácii škodlivých molekúl (Rothman a kol. 2019), môžu sprístupňovať alebo poskytovať esenciálne živiny, pôsobiť antagonisticky na patogény a parazity a podieľať sa na vývoji imunity jedinca (Kwong a Moran 2016).

Živočíšne vnútornosti obsahujú rôzne mikrobiálne spoločenstvá, ktorým často dominujú sady baktérií, ale môžu zahŕňať aj archaea, vírusy, prvoky a huby. Neustále prítomné základné bakteriálne druhy sú pre ich hostiteľa často prospešné a predpokladá sa, že sú neoddeliteľnou súčasťou evolúcie zvierat ovplyvňujúce rast, vývoj, zdravie a správanie hostiteľa. Narušené proporcie medzi základnými mikrobiálnymi spoločenstvami môžu narušiť homeostázu, ktorá môže vyústiť do zmeny zdravotného stavu hostiteľa. Napríklad zmeny veľkostí bakteriálnej populácie v čreve cicavcov boli spojené so zápalovými poruchami čriev, cukrovkou a obezitou. Príčiny a následky dysbiózy sú teda kľúčom k pochopeniu zdravia a chorôb živočíchov.

Zatiaľ čo rozmanité črevné spoločenstvá cicavcov obsahujú funkčnú redundanciu, ktorá môže tlmiť posuny v zložení, hmyz má zvyčajne oveľa nižšiu diverzitu mikróbov, a preto môže byť oveľa ľahšie postihnutý dysbiózou (Schwartz a kol. 2016).

Tráviaca sústava včely medonosnej je osídlená prevažne 9 bakteriálnymi skupinami (core microbiota) organizmov, ktoré u takmer všetkých jedincov zastupujú od 95 % do 99,9 % všetkých mikroorganizmov. U všetkých jedincov sú prítomné G⁻ druhy baktérií *Snodgrassella alvi* a *Gilliamella apicola*, patriace do skupiny Proteobaktérií. Z G⁺ baktérií sa v hojnom počte vyskytujú zástupcovia skupiny Firmicutes, konkrétne skupiny laktobacilov Firm-4 a Firm-5. Menej početnú zložku, stále sa ale vyskytujúcu u väčšiny jedincov tvoria bifidobaktérie, hlavne *Bifidobacterium asteroides*, patriace do skupiny Actinobacterium. Menej početnými a zriedkavejšími prítomnými sú zástupcovia proteobaktérií *Frischella perrara*, *Bartonella apis*, *Parasaccharibacter apium* a *Gluconobacter spp.*

Spolu 5 hlavných bakteriálnych skupín a 4 menej zastúpené druhy tvoria dominantné zložky včelej črevnej mikrobioty. Aj keď občas môžu byť prítomné aj iné bakteriálne druhy, týchto 9 predstavuje línie, ktoré sa zdajú byť špecificky prispôbené životu s ich včelími hostiteľmi. Rozdiely v ich hojnosti a prevalencii sú pravdepodobne spôsobené tým, že každá skupina sa kvôli svojim vysoko špecifickým metabolickým pochodom vyskytuje na charakteristickej lokácii v tráviacom trakte, ako je to aj pri iných živočíšných mikrobiómoch. Dokopy tieto baktérie vytvárajú špecializovanú mikrobiálnu komunitu, ktorá sa vyvíjala spoločne s ich včelími hostiteľmi počas miliónov rokov (Kwong a Moran 2016).

Ďalej uvádzajú, že šírenie základnej mikrobioty je silne viazané na sociálne interakcie medzi jedincami v kolónii. Okrem toho patria spomínané kmene medzi mikroaerofilné, prípadne fakultatívne anaeróbne kmene a ich výskyt mimo včelí tráviaci trakt nieje takmer vôbec zaznamenaný.

Pri jednotlivých včelách boli občas zaznamenané jednoznačné odchyľky od normálneho zloženia mikrobiómu, išlo hlavne o vyššie množstvá oportunistických organizmov zo skupiny Enterobacteriaceae (*Klebsiella* spp., *Pantoea* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Hafnia* spp.) a Gammaproteobacteria. Tieto zmeny by mohli potenciálne reflektovať narušenie mikrobiómu spojené s ochorením.

Zaujímavým faktom je to, že každá časť tráviacej sústavy včiel sa líši charakteristickým mikrobiálnym zložením (Kwong a Moran 2016).

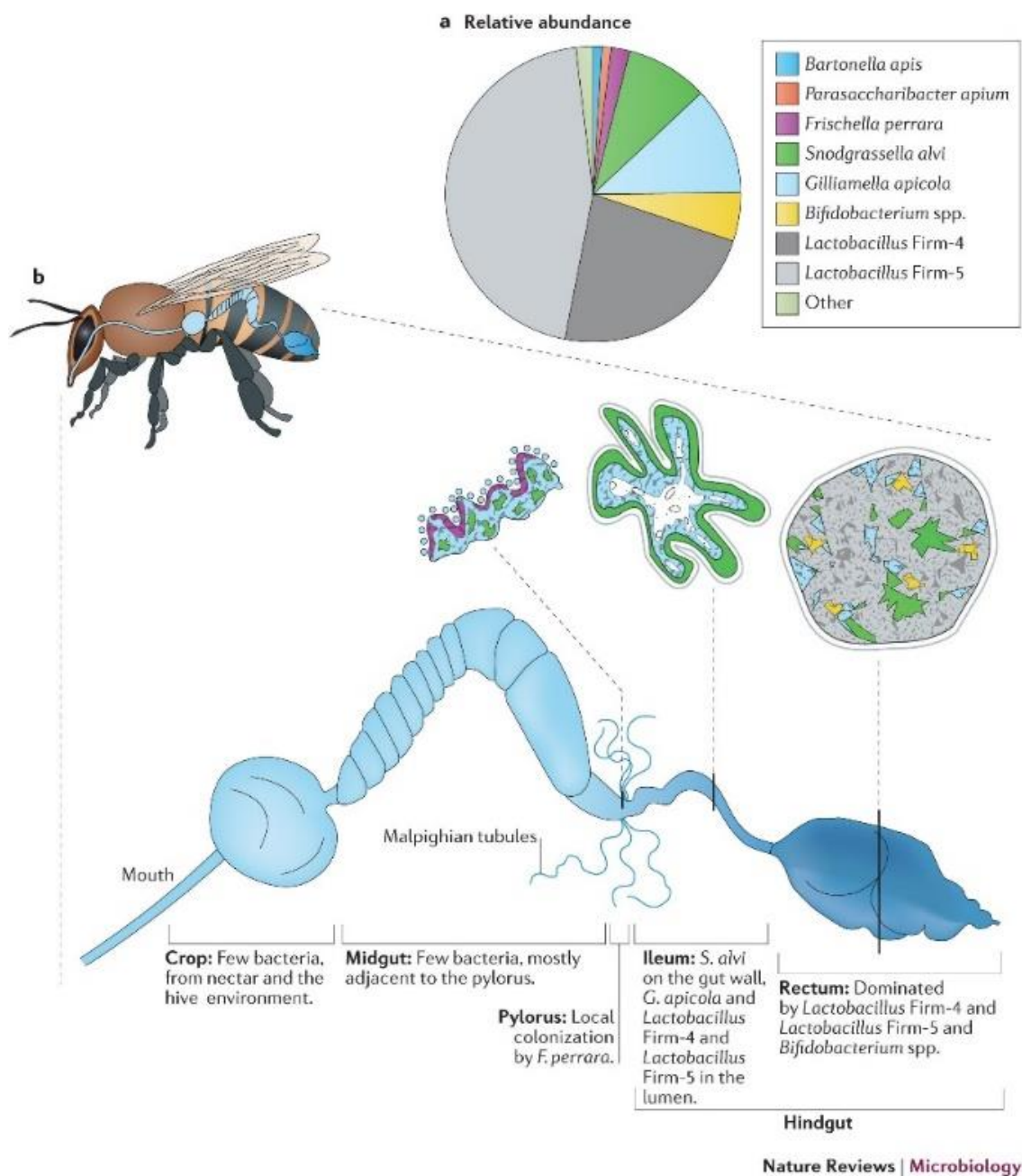
3.2.1 Mikrobióm medového vačku (crop), žalúdka (midgut) a pyloru

V medovom vačku (Obr.1) prenášajú včely do úľa tekutú potravu. Má rovnakú anatomickú stavbu ako hltan, je ale vakovito rozšírený do hruškovitého tvaru. Jeho objem sa môže zväčšiť až na 60 mm³ a hlavnou funkciou je filtrovať nazbieranú potravu a posúvať ju do žalúdka (Rada a kol. 2009).

Kwong a Moran (2016) uvádzajú, že v medovom vačku včiel robotníc boli nájdené len nízke množstvá baktérií. Identifikovaní boli zastupcovia skupiny Enterobacteriaceae, *Lactobacillus kunkee* a *Parasaccharibacter apium*, ktoré sa často vyskytujú v nektari alebo na stenách úľa, a môžu byť kultivované pri atmosférických koncentráciách kyslíka. Celkovo boli v tejto oblasti identifikované hlavne oportunitné organizmy epifitnej mikroflóry rastlín.

Funkciou úseku Midgut je trávenie a vstrebávanie živín. Zo žalúdka býva izolované len zanedbateľné množstvo baktérií, pravdepodobne preto, že neposkytuje stabilný substrát pre bakteriálnu kolonizáciu a je pokrytý neustále sa obnovujúcim chitinóznym materiálom nazývaným peritrophic matrix.

Pylorus je zúženina spájajúca oblasť žalúdka a čreva. V tejto oblasti sa v najvyššom počte vyskytuje *Frischella perrara* (Kwong a Moran 2016).



Obrázok 1. Popis tráviacej sústavy včely a výskytu charakteristickej mikrobioty v jednotlivých úsekoch (Kwong a Moran 2016)

3.2.2 Mikrobióm čreva (hindgut)

Črevo je pokryté stabilnou vrstvou kutikuly a poskytuje vhodné prostredie pre veľké množstvo baktérii. Tento úsek je rozdelený na 2 samostatné časti, ileum (tenké črevo) a rectum (výkalový vak), vid' Obr.1, ktoré majú odlišné bakteriálne zloženie (Kwong a Moran 2016, Raymann a Moran, 2018). Zároveň sú miestami s najväčším počtom mikroorganizmov v tráviacom trakte včely. Z týchto častí boli izolované baktérie, kvasinky a tiež mikroskopické plesne (Rada a kol. 2009). Ďalej uvádza, že pri svojej práci v roku 1997 boli izolované štatisticky nižšie počty aeróbných baktérií (10^4 /g tráveniny) v porovnaní s anaeróbnymi (10^8 /g tráveniny). Absolútne dominantnými boli G+ acidorezistentné tyčinky.

Prakticky vo všetkých včelách (50 jedincov) bola dokázaná prítomnosť anaeróbných aj aeróbných baktérií, laktobacilov, koliformných baktérií, stafylokokov, bacilov a kvasiniek. Boli tiež sledované rozdiely v mikroflóre letných a zimných včiel. Žalúdok zimných včiel obsahoval ešte viac anaeróbných baktérií, pravdepodobne ako následok obmedzenia kontaktu s epifitnou mikroflórou rastlín. Na druhej strane ale žalúdok a výkalový vak letných včiel obývalo viac koliformných baktérií a stafylokokov. Celkovo počty aeróbných baktérií kolísali oveľa viac ako počty anaeróbných mikroorganizmov.

Corby-Harris a kol. (2014) uvádzajú, že pri ich analýze mikrobiómu tráviaceho traktu boli v čreve každej skúmanej lietavky zástupcovia rodu *Lactobacillus Firm - 5*, *Snograssella alvi*, *Gilliamella apicola*, Acetobacteraceae a *Lactobacillus Firm - 4*. Rod *Bifidobacterium* bol detekovaný u 21 z 23 jedincov. V črevách lietaviek extrahovaných na jar a na jeseň boli zaznamenané minimálne zmeny, tieto baktériálne skupiny reprezentovalo 94 % až 99 % izolovaných sekvencií.

Ileum je rovná trubica so šietimi pozdĺžnymi záhybmi, ktorej dominujú G- bakteriálne druhy *S. alvi* a *G. apicola*. Okrem toho sa tu v nižšom počte vyskútujú aj zástupci skupín laktobacilov. *S. alvi* zo skupiny Neisseriaceae ako obligátne mikroaerofilná baktéria sa vyskytuje hlavne na periférii čreva a na črevnom epiteli. Táto lokalizácia je pre baktériu najvhodnejšia, pretože u hmyzu býva na črevnej periférii najvyššia koncentrácia kyslíka. Baktéria stratila všetky metabolické cesty zamerané na glykolýzu sacharidov, a zisk energie je sústredený na aeróbnou oxidáciu organických kyselín (citrát, malát, acetát, laktát). Využívanie odlišných energetických zdrojov pravdepodobne ponúka *S. alvi* možnosť koexistencie v jednom črevnom prostredí s ďalšími baktériami schopnými fermentácie. Tieto metabolické odlišnosti podnecujú myšlienku na možnosť syntrofickú interakcie, pretože spomínané org. kyseliny sú často produktami metabolizmu fermentačných baktérií, ktoré sú v črevných systémoch taktiež prítomné.

Výkalový vak je miesto, kde sa pred defekáciou skladujú nestrávené zložky potravy a dochádza k resorpcii vody a minerálov. V tejto oblasti dominujú fermentatívne G+ baktérie zo skupín *Lactobacillus Firm-4*, *Lactobacillus Firm-5* a *Bifidobacterium asteroides* (Kwong a Moran 2016).

3.2.3 Mikrobiota lariev

Včelia robotnica sa vyvíja v bunke plástu z nakladeného vajíčka, mení sa na larvu, kuklu až dospelého jedinca, celý proces trvá 21 dní (Weiss 2010).

Čerstvo vyliahnuté včelie larvy neobsahujú žiadne bakteriálne spoločenstvá. Prvé baktérie sa k nim dostanú až s potravou (materská kašička, med, nektár a peľ). Tento fakt vedie k akumulácii charakteristickej mikrobioty úľu v ich slepom čreve, ako aj baktérií dospelých jedincov. Zloženie larválnej mikrobioty sa ale zdá byť, kvôli svojej nepravidelnosti skôr náhodné, a výrazne ovplyvnené potravou v danej lokalite, ročným obdobím a zdravotným stavom kolónie. Novo vyliahnutý dospelý jedinec je takmer alebo úplne bez baktérií a

k charakteristickému osídleniu príde počas prvých dní prostredníctvom sociálnych interakcií v kolónii (Kwong a Moran 2016).

Hroncová a kol. (2015) uvádza, že v rámci experimentu bola vykonaná rozsiahla analýza mikrobioty tráviaceho traktu všetkých vývojových štádií včiel z troch lokalít v Stredočeskom kraji a južných Čechách, vždy z troch včelstiev z každej lokality. Od prvého dňa vývoja v tráviacom trakte prevažovala skupina tzv. Gammaproteobaktérií, kde boli hlavnými zástupcami kmene *Gilliamella apicola* a *Frischella perrara*. Piaty a šiesty deň prišlo k zmene, a u lariev prudko vzrástlo množstvo laktobacilov. To potom vzápätí kleslo spolu s tým, ako sa včela zakuklila a začal sa jej pretvárať tráviaci trakt na trakt dospelého jedinca. V priebehu tejto zmeny laktobacily zmizli a do popredia sa opäť dostali gammaproteobaktérie, avšak len vo veľmi malom množstve. Potom, čo sa včela prehrýzla von z plástu, počas týždňa jej trakt osídlili laktobacily a gammaproteobakterie v pomere približne 1:9, a dosiahli početného maxima. Od tejto chvíle počty baktérií neustále klesali.

3.2.4 Pôsobenie mikrobioty

Vnímanie funkcií a účinkov nepatogénnej mikrobioty má v poslednej dobe rastúci charakter. Napríklad ľudský črevný mikrobióm plní dôležitú úlohu v hostiteľovej fyziológii, výžive, vývoji imunity, správaní a tiež tvorí jednu z barier pôsobiacu proti patogénnym mikroorganizmom. Včely hostia špecifickú črevnú mikrobiotu pozostávajúcu z úzko špecializovaných mikroorganizmov, ktorá je ale v niektorých znakoch podobná mikrobiote cicavcov (prenos sociálnym kontaktom, lokalizácia hlavne v črevnej sústave, metabolizácia komplexnejších sacharidov, ochrana pred patogénmi) (Raymann a Moran 2018).

Črevné baktérie sa podieľajú na neutralizácii prijatých toxínov, biosyntéze niektorých živín alebo trávení zložiek potravy. Tieto zmeny zahŕňajú procesy ako fermentácia komplexných sacharidov a cukrov, štandardne nestráviteľných pre včely. Niektoré kmene *G. Apicola* obsahujú gény schopné podieľať sa na degradácii pektínu, obsiahnutého v stenách peľových zŕn. Štepenie pektínu v bunkových stenách následne vedie k uvoľneniu a sprístupneniu živín. Taktiež je jeho rozklad dôležitý, pretože je pre včely toxický (Engel a kol. 2012).

Pri viacerych cicavcoch je známe, že fermentačné produkty, zahŕňajúce hlavne organické kyseliny s krátkym reťazcom (acetát, propionát, butyrát) sú v organizme hostiteľa absorbované a využité v metabolizme. Podobný model bol zaznamenaný aj u niektorých druhov hmyzu, ale konkrétne u včiel ešte pravdepodobne nebol dokázaný (Kwong a Moran 2016).

Priamy dôkaz dôležitej symbiózy črevnej mikrobioty a jedinca, bol získaný pri európskom druhu šmeliaka *Bombus terrestris*. Robotnice, ktoré boli experimentálne zbavené črevnej mikrobioty (antibiotikami alebo aseptickým chovom) vykazovali oveľa vyššiu náchylnosť k bežnému včeliemu patogénu *Crithidia bombi*, v porovnaní s jedincami, ktorý boli chovaní pri štandardných podmienkach s prirodzenou črevnou mikrobiotou (Koch a kol. 2011).

Cariveau a kol. (2014) sledoval na čmeliakoch zmeny mikrobiómu, a zistili, že miera výskytu infekcie spôsobenej parazitom *Crithidia* spp. negatívne koreloval s výskytom dôležitej črevnej baktérie *Gilliamella apicola* a zároveň koreloval pozitívne s baktériami, ktoré nepatria medzi základné zložky včelej mikrobioty. Tieto výsledky naznačujú, že pri narušení črevnej bakteriálnej rovnováhy čmeliakov, môže prísť k prepuknutiu infekcie bežne sa vyskytujúcim patogénom.

Forsgren a kol. (2010) v štúdií sledovali inhibičné účinky 11 jednotlivých baktérií alebo ich kombinácií, izolovaných zo včelieho tráviaceho traktu, na 4 fylotypy *Paenibacillus larvae* (ERIC I-IV). Kombinácia všetkých 11 baktérií vyústila vo všetkých prípadoch k totálnej inhibícii patogéna. Jednotlivé fylotypy samostatne ale vykazovali odlišné výsledky. Dva fylotypy z roku *Lactobacillus* úplne inhibovali rast všetkých štyroch genotypov *P. larvae*. *Bifidobacterium coryneforme* totálne inhibovalo rast genotypu *P. larvae* ERIC III a IV. Fylotyp BMA 5 z rodu *Lactobacillus* totálne inhiboval rast ERIC I-III. Ďalej výsledky jasne ukázali, že po pridaní baktérií do včelieho plodu sa výrazne znížil počet lariev, ktoré podľahli infekcii spôsobenej *P. larvae*. Z výsledkov je pravdepodobné, že tieto bakterie majú pozitívny efekt vo včelej patológii všeobecne a konkrétne pri prevencii prepuknutia moru včelieho plodu.

Vásquez a kol. (2012) uvádzajú, že sa im podarilo z medového vačku včiel rodov *Apis* a *Milliponini* identifikovať 13 bakteriálnych kmeňov zo skupín *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, ktoré pravdepodobne plnia úlohu pri produkcii medu a včelieho chleba. Jasne sa ukázalo, že jednotlivé kmene baktérií medového vačku potláčajú organizmy epifitnej mikroflóry. *Lactobacillus kunkee*, ako najčastejšie sa vyskytujúci, sa javil ako najúčinnjší inhibítor. Bakterie medového vačku čiastočne dokázali potlačiť včelí patogén *Melissococcus plutonius* v in vivo podmienkach a totálne v in vitro. *L.kunkee* samostatne a všetkých 13 baktérií medového vačku spolu preukázalo najlepšie inhibičné vlastnosti. Celkovým efektom po pridaní izolovaných baktérií do potravy pre larvy bolo jednoznačné zníženie počtu mŕtvych lariev.

3.2.5 Faktory ovplyvňujúce veľkosť a rozmanitosť mikrobioty

Zloženie živočíšnej mikrobioty v tráviacej sústave je ovplyvňované mnohými faktormi ako sú stres, imunitné reakcie, vek jedinca, úlohy v kolónii, diverzita zdrojov potravy alebo vystavenie antibiotikám. Zloženie mikroflóry, hlavne relatívne počty *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, sa môžu meniť v priebehu sezóny, čo pravdepodobne reflektuje zmeny v potrave. Dokázalo sa, že narušenie tejto črevnej rovnováhy vedie k vyššej úmrtnosti a zvýšenej citlivosti na ochorenia.

Disbióza negatívne pôsobí aj na expresiu vitelogenínu, fosfolipoglykoproteínu podieľajúceho sa na vývoji vajíčok matky a významného antioxidantného činidla (Raymann a Moran 2018).

3.2.5.1 Vplyv antibiotík

Antibiotiká použité na kontrolovanie infekcie spôsobenej bakteriálnymi patogénmi taktiež pôsobia aj na iné mikróby, zahŕňajúc prospešné bakterie prítomné u zdravých

hostiteľov. U niektorých baktérií s prirodzene vyššou odolnosťou voči antibiotikám to môže viesť k akumulácii génov rezistencie. Tieto gény sú často situované na mobilných baktériálnych komponentoch (plazmidy), ktoré sú schopné sa v rámci bakteriálnej komunity relatívne ľahko rozšíriť. Dopad antibiotík na črevnú mikrobiotu živočíchov je znepokojivý, lebo môže výrazne narušiť jej rovnováhu a obmedziť tak pozitívne účinky na hostiteľa, druhým faktorom je akumulácia génov rezistencie, ktoré by mohli byť ľahko prenesené na patogény (Tian a kol. 2012).

Raymann a Moran (2018) uvádzajú, že včely medonosné sú v niektorých oblastiach bežne vystavované antibiotikám používaným ako preventívne opatrenie pri liečbe moru včelieho plodu spôsobeného patogénom *Paenibacillus larvae* alebo *Melissococcus plutonius*. Oxytetracyklín sa týmto spôsobom používa už desaťročia a u niektorých kmeňov bol zaznamenaný vznik rezistencie na toto liečivo.

Črevná mikrobiota amerických včiel je jasným príkladom mikrobiálnej komunity dlhodobo vystavovanej antibiotikám tetracyklínu. Pri týchto bakteriálnych komunitách bola dokázaná akumulácia širokej diverzity génov zodpovedných za rezistenciu voči tetracyklínu, zahŕňajúca 8 lokusov. Naopak pri včelách z oblastí, kde sa tetracyklín systematicky nepoužíval (SUI, CZ, NZ) boli u baktérií zaznamenané len 2 až 3 lokusy, pri oveľa nižšom počte opakovaní, spájané s možnosťou rezistencie voči tetracyklínu.

Vásquez a kol. (2012) pozorovali pri in vitro kultivácii 13 oddelených kmeňov baktérií mliečneho kvasenia izolovaných z medového vaku *A. mellifera* vystavených dvom druhom antibiotík (oxytetracyklín, tylozín) bežne sa využívajúcich pri liečbe moru včelieho plodu. Všetky baktérie vykazovali vysokú citlivosť na účinky tylozínu ale niekoľko kmeňov bolo rezistentných voči tetracyklínu.

Dlhodobá expozícia širokospektrálnych antibiotík vedie k výraznému obmedzeniu bakteriálnej diverzity. Je dokonca možné, že vedie k vytvoreniu alternatívneho stavu, ktorý je ale v kľúčových aspektoch odlišný, keďže prirodzená symbióza poskytuje značné výhody pre obe strany (Tian a kol. 2012).

3.2.5.2 Vplyv pesticídov

Kakumanu a kol. (2016) pozorovali zmeny vo včelom mikrobióme pri podávaní peľu s obsahom reziduí pesticídov. Pri dodávaní peľu s obsahom chlorothalonilu, pesticídu používaného ako fungicíd, bola pozorovaná trojnásobne vyššia prevalencia nosematózy. Výsledky tejto štúdie naznačujú, že vystavenie včiel tomuto pesticídu môže indukovať zmeny vo včelom črevnom mikrobióme, konkrétne znižuje množstvo baktérií a nie ich diverzitu, čo si ale vyžaduje ďalšie skúmanie, či môže mať táto alebo podobná pesticídna expozícia vážne dôsledky na zdravie, funkciu a prežitie včiel.

3.2.5.3 Vplyv prostredia

Zloženie včelej mikrobioty je výsledkom dlhoročnej symbiôzy mikroorganizmov a včiel ovplyvňovanej prostredím, zložením včelej potravy, ktorá výrazne ovplyvňuje kondíciu jednotlivých jedincov a následne aj celého včelstva. Organizmy žijúce v ich tráviacej sústave sa podieľajú na premene živín, pričom jedinca zásobujú inými dôležitými látkami. Nadobudnutá cenná symbiôza sa ale môže ľahko porušiť vplyvom tlaku ochorení a parazitov, nepriaznivými poveternostnými podmienkami alebo absenciou pestrých zdrojov potravy. Včely spracovávajú nektár na med, ktorý kolónii slúži ako primárny zdroj sacharidov a obsahuje len stopové množstvá aminokyselín a vitamínov. Peľ poskytuje v podstate všetky ostatné nutrienty, zahŕňajúc aminokyseliny, lipidy, vitamíny a minerály. Väčšina druhov peľu ale neobsahuje kompletne živinové zloženie, alebo obsahuje len stopové množstvo niektorých esenciálnych aminokyselín, z toho vyplýva, že včely musia zberať peľ z rôznych rastlín, pokiaľ je na to príležitosť (Matilla a kol. 2012).

Olofson a Vásquez (2008) na jar v druhom roku sledovania mikroflóry medného vačku včiel *A. mellifera* zaznamenali nárast populácie patogénu *Paebacillus larvae*, ktorý bol izolovaný z medných vačkov, aj čerstvého medu. Pretože neboli zaznamenané žiadne typické príznaky tohoto ochorenia včelieho plodu, úl bol nepretržite používaný počas štúdie. Počty *P. larvae* narastali počas kvitnutia repky olejnej a divých malín ale ich rozvoj sa zastavil s kvitnutím lipy. V tomto bode sa zastúpenie *P. larvae* začalo znižovať z 8000000 KTJ na larvu, a v priebehu troch týždňov sa úplne vytratilo bez prepuknutia ochorenia moru. Počas obdobia rozvoja *P. larvae* boli zaznamenané aj vyššie počty troch bakteriálnych fylotypov u vylietavajúcich včiel, lariev aj v čerstvom mede. Fylotypy boli veľmi blízke rodom *Actinobacillus* a *Phocoenobacter*, ktoré sa radia do skupiny Pasteurellaceae.

3.2.5.4 Kastové zaradenie

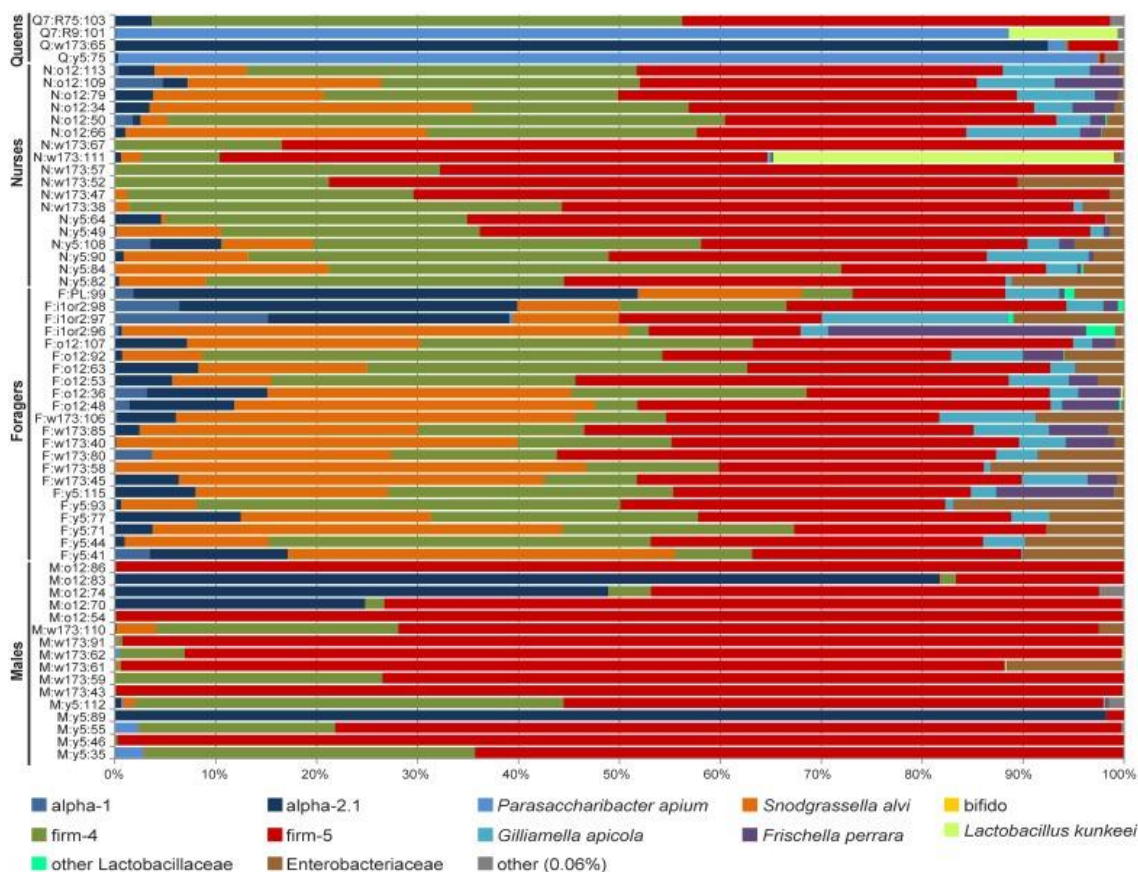
Kapheim a kol. (2015) skúmali vzťah medzi proporciami symbiontov v oblasti výkalového vaku a sociálnym správaním naprieč rôznymi kastami včiel (matky, trúdy, mladušky-krmíčky, lietavky). Aj napriek spoločnému úlu a prenosu potravy z úst do úst boli detekované rozdiely v zložení mikrobiómu medzi jednotlivými skupinami.

Výsledky ukázali, že diverzita bakteriálnych 16S rRNA sekvencií pri trúdoch a matkách bola až z 98,87 % rovnaká ako u iných včiel robotníc. Líšilo sa ale pomerné zastúpenie jednotlivých skupín, matky mali výrazne vyššie zastúpenie baktérií *Parasaccharibacter apium* ako ostatné kasty, dokonca pri robotniciach, ktoré ale nemajú možnosť reprodukcie, táto skupina takmer nebola prítomná. Gény identifikované z genómu spomínaných baktérií sú spájané s možnosťou syntézy ferredoxínov a oxidoraduktáz podieľajúcich sa na metabolizme a biogenéze membrán, ako dôležitej časti oogenézy. Tieto baktérie by preto mohli napomáhať pri premene veľkých množstiev prijatých proteínov na produkciu vajíčok. U trúdov bolo zasa 75,7 % izolovaných sekvencií zo skupiny *Lactobacillus firm-5*.

U mladušiek bolo zistené vyššie zastúpenie skupiny laktobacilov Firm-5 (49,4 %) ako u lietaviek (30,4 %) ale aj napriek tomuto zisteniu bolo zloženie mikrobiómu prekvapivo veľmi

podobné, nakoľko Mladušky a lietavky majú v kolónii úplne odlišné funkcie a konzumujú rozdielnu potravu.

Táto mikrobiálna podobnosť môže byť spôsobená veľmi úzkou spoluprácou medzi jednotlivými kastami, kedy lietavky tesne po prilete do úľa odovzdávajú nazbieraný nektár a naopak mladušky im poskytnú potravu na doplnenie energie pred každým odletom. Zastúpenie jednotlivých skupín mikroorganizmov u testovaných jedincov je uvedené na Obr.2.



Obrázok 2. Zastúpenie jednotlivých bakteriálnych skupín v oblasti hindgut (Obr.1) u matiek, mladušiek, lietaviek a trúdiv (Kapheim a kol. 2015)

3.3 Včelie probiotiká

V poslednom období sa dostáva do popredia vývoj prípravkov obsahujúcich funkčné mikrobiálne kmene, prirodzene sa vyskytujúce v tráviacom trakte včiel, ktoré potláčajú pôvodcov iných bakteriálnych, či vírusových nákaz. Tieto baktérie sú ďalej zdieľané medzi včelami prostredníctvom potravy a vytvárajú prirodzenú imunitu včelstva. Využitie probiotických mikroorganizmov je veľmi perspektívne už preto, že tieto mikroorganizmy tvoria podstatnú časť prirodzenej mikroflóry zdravého tráviaceho traktu, takže sú veľmi pravdepodobne účastníkmi určitých imunitných reakcií u jednotlivých včiel.

Zástupcovia týchto skupín sa nenachádzajú len v tráviacom trakte včely, môžeme ich nájsť tiež v mede, peli, nektári a na povrchu rastlín. Účinok probiotických mikroorganizmov spočíva v ich schopnosti osídlovať tráviaci trakt a súťažiť tam o priestor na tráviacom epiteli, takže dochádza k vytesneniu patogénnych mikroorganizmov z tkanív. Probiotické mikroorganizmy sú tiež schopné syntetizovať peptidy s baktériostatickým a baktericídny účinkom, ovplyvňujú imunitnú odpoveď organizmu, produkujú organické kyseliny s krátkym reťazcom, ako je kyselina mliečna, octová, maslová a propionová (Dubná 2012).

Niekoľko bakteriálnych kmeňov alebo zmes kmeňov sa považuje za prospešné pre včely medonosné a považujú sa za probioticky využiteľné, najmä rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Avšak predpoklad, že laktobacily alebo bifidobaktérie majú všeobecne priaznivé účinky na včely medonosné, môže byť zjednodušovaný, pretože fyziologická dynamika mikrobiómu včelích čriev nie je dokonale známa.

Boli identifikované 3 až 4 odlišné triedy laktobacilov a nedávno boli charakterizované: *Lactobacillus apinorum*, ktorý je fylogeneticky podobný ako *Lactobacillus kunkee*, skupina Firmicutes (Firm 4) reprezentovaná *Lactobacillus mellifer* a *Lactobacillus mellis* a Firm 5 reprezentovaná nedávno identifikovanými fylogeneticky blízkymi druhmi *Lactobacillus melliventris*, *Lactobacillus kimbladii*, *Lactobacillus helsingborgensis*, *Lactobacillus kullabergensis* a *Lactobacillus apis*.

Bifidobaktérie sa vyskytujú v medonosných včelách v pomerne nízkom počte. Vyššia variabilita bifidobaktérií bola pozorovaná u úzko príbuzných čmeliakov. Úloha gama (gammaproteobaktérie predstavované kmeňmi *G. apicola* alebo *F. perrara*), ako veľká mikrobiálna skupina špecifická pre včely a medonosné včely však zostáva málo preskúmaná, hoci sa môžu tiež podieľať na obrane proti patogénom (Hroncová a kol. 2015).

Ptaszińska a kol. (2015) podávali včelám infikovaných patogénom *Nosema ceranae* cukrovú vodu s prídavkom baktérie *Lactobacillus rhamnosus* a prebiotikom inulínom. Pri takto liečených včelách bola zaznamenaná výrazne vyššia mortalita jedincov, a až 25 násobne vyšší výskyt patogénnych spór. Toto zistenie poukazuje na to, že nesprávne zvolený bakteriálny kmeň nielen že vznikajúcej nosematóze nepredchádza, ale môže výrazne rozladiť včelý imunitný systém a úmrtnosť ešte zvýšiť.

Vásquez a kol. (2012) prišli s hypotézou, že včelia mikrobiota pôsobí antagonisticky na mikroorganizmy prítomné v nektári a peli v medovom vačku, kde takto zabraňujú možnej nežiaducej kontaminácii medu a včelieho chleba epifitnou mikroflórou počas ich produkcie,

ktorá môže trvať niekoľko dní až týždňov. Včelý chleba je spracovaný a skladovaný peľ v bunkách. Oproti čerstvému peľu má odlišné chemické zloženie a obsahuje hlavne viac kyseliny mliečnej (Kaznowski a kol. 2005). Zástupcovia skupiny Fungi, môžu tiež hrať dôležitú úlohu. Saccharomyces v spojení so včelami boli popísané taktiež ako organizmy podieľajúce sa na fermentačných procesoch pri tvorbe včelieho chleba (Kakumanu a kol. 2016).

Hyršl a kol. (2015), uskutočnili experiment založený na pôsobení rastlinného extraktu sanguisarínu a probiotickej dotácie založenej na kombinácii vybraných mikroorganizmov (*L. apis*, *L. melliventris*, *G. apicola*) izolovaných zo včieho trávicieho traktu na larvy a kukly umelo infikované entomoparazitickými háďatkami *Heterorhabditis bacteriophora* a *Steinernema feltiae*.

Nematobakteriálna infekcia kombinuje infekciu spôsobenú baktériami a vplyvom viacbunkového parazita ktorý, následne pôsobí ako vektor bakteriálnych patogénov. Výsledky ukázali, že larvy a kukly ošetrované predchádzajúcou aplikáciou alkaloidu do cukrovej vody prežívali v oboch prípadoch vo väčšom počte. Konkrétne po 48 hodinách od infekcie bola vitalita ošetrovaných lariev vyššia o $13.5 \pm 6.43\%$ pri *S. feltiae* a o $11.25 \pm 5.77\%$ pri *H. bacteriophora*. U vzoriek ošetrovaných rorprašovaním roztoku s obsahom baktérií sa ich vitality zvýšila o $23.25 \pm 1.53\%$ pri *S. feltiae* a o $11.0 \pm 6.0\%$ pri *H. bacteriophora* oproti kontrole.

3.3.1 Včelie probiotické prípravky na trhu

Aj keď sú vedecké dôkazy o účinnosti probiotík pre včely zatiaľ limitované len na niekoľko málo prác, existuje na globálnom trhu rada prípravkov s ekonomickým potenciálom. Z pomedzi nech vyberám nasledovné:

EM-Kin Probien

Predajca uvádza, že je to prírodné probiotikum, ktoré posilňuje imunitný systém a tým zvyšuje vitalitu včiel. Pri práci so včelami ukludňuje včelstvo a rovnako sa dá použiť pri rojení včiel. Vhodný na zvyšovanie vitality pri zimnom prikrmovaní a v lete na prípravu pitnej vody. Kyslé prostredie nezriedeného EM Kin-Probien zároveň poskytuje prvú ochranu pred klieštikom. Ako ďalšie možnosti použitia sú uvedené preventívne postreky na upokojenie včiel a rojov.

Zloženie: baktérie mliečneho kvasenia, kvasinky, fotosyntetické baktérie, živinový roztok na základe obilného sladu, voda, citrón, kamilka, Manju soľ

Dostupné z: <http://bit.ly/2wXfwqD>

ApiBio – FARMA Probiotický doplněk stravy pro včely

Podľa predajcu je to prírodný probiotický doplnok krmiva obsahujúci zmes prospěšných mikroorganizmov a cielene vybraných bylín pre zdravý rast včiel. Zaisťuje mikrobiologickú rovnováhu v organizme včiel, chráni ich pred patogénmi, choroboplodnými zárodkami, toxínmi a celkovo posilňuje ich imunitu.

Zloženie: materská kultúra SCD ProBio original a rastlinné prísady produkované v procese riadenej fermentácie

Dostupné z: <http://bit.ly/38bKrwe>

Super DFM Honey bee – Natural Bee Probiotic

Podľa informácii predajcu ide o prírodné probiotikum pre včely určené na priame prikrmovanie, zamerané na obnovu mikrobiálnej mikroflóry. Lepšie trávenie znamená zdravšie včely. Super DFM – Honey bee obsahuje kombináciu baktérií mliečného kvasenia, prospěšných baktérií rodu *Bacillus*, kvasiniek a enzýmov používaných na zmiernenie chorôb včelieho plodu.

Podľa etikety výrobok obsahuje *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *B. bifidum*, *E. faecium* v minimálnom množstve 5×10^8 CFU/g. Ďalej obsahuje aj kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v minimálnom množstve 10^9 CFU/g.

Dostupné z: <http://bit.ly/2uEioYJ>

Pro DFM

Výrobok určený na priame skrmovanie včelám, ktorý svojím zložením podporuje znovnavodenie zdravej mikrobioty včelieho tráviaceho traktu. Pro DFM revitalizuje včelí imunitný systém popritom ako potláča škodlivé patogény zahŕňajúce pôvodcu vápenatenie včelieho plodu, moru včelieho plodu a nosematózy.

Dostupné z: <http://bit.ly/3apnqaT>

3.4 Potravinárske suroviny ako médiá pre biologické kultivácie

Pri veľkoobjemovej kultivácii rozhoduje hlavne cena média. Sója a jej produkty, ako sójový proteínový izolát (SPI), predstavujú lacnú surovinu s cenou začínajúcou okolo 6 €/kg v malopredaji.

Podobne aj srvátka ako vedľajší produkt vo veľkom produkovanej pri výrobe syrov obsahujúci nezanedbateľné množstvo kvalitných bielkovín a veľké množstvo sacharidu laktózy. Prípadné využitie čerstvej srvátky na výrobu chutných fermentovaných nápojov s výživovými benefitmi pre konzumentov so sebou nesie výrazný komerčný potenciál.

Obidve suroviny obsahujú bielkoviny a sacharidy vhodné pre rast mikroorganizmov, prípadne se vlastnosti týchto produktov dajú modifikovať prísadami, ako je napríklad repný cukor. Podľa Mondragón-Parada a kol. (2006) by sa srvátka dala dobre využiť pri veľkoobjemovej kultivácii laktobacilov.

Opačným cieľom kultivácie je fermentácia týchto médií, kde mikroorganizmy v konečnom produkte nie sú žiadúce a cieľom je získať tekutinu obohatenú o kvasné produkty - fermentovaný nápoj.

V súvislosti s produkciou fermentovaných nápojov založených na rastlinnej bielkovine je často spomínaný sójový nápoj. V porovnaní so srvátkou je jeho výhodou absencia laktózy, ktorá pre istú časť populácie predstavuje výrazný problém. "Sójové mlieko" je tradičný orientálny nápoj pripravený zo sójových semien a vody, ktorý je lacným a významným zdrojom bielkovín a energie. Jeho nevýhodou je ale fakt, že obsahuje nestráviteľné oligosacharidy ako stachyóza a rafinóza, ktoré môžu spôsobovať črevné problémy. Ich koncentrácia sa ale pri procese fermentácie dá znížiť (Wang a kol. 2002).

Vo svete existuje veľké množstvo rôznych nápojov a potravín založených na fermentácii laktobacilmi, prípadne bifidobaktériami. Ak ale chceme daný produkt považovať za probiotický, musí v čase konzumácie obsahovať aspoň 10^8 /g živých baktérií, aby časť z nich bola schopná prekonať všetky ochranné bariéry organizmu a dostali sa v dostatočnom počte až do koncových častí tráviacej sústavy.

Z rodu *Lactobacillus* sa na prípravu najčastejšie využívajú *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovarus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. salivarius subsp. salivarius*, *L. casei*, *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. paracasei subsp. tolerans*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. reuteri* a z rodu *Bifidobacterium* *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. animalis*.

Ako probiotiká sa ešte používajú *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Saccharomyces boulardii*, *Leuconostoc* (Kandyliis a kol. 2016).

3.4.1 Fermentované nápoje založené na srvátke

V priebehu rokov sa vynaložilo výrazné úsilie na premenu veľkého množstva srvátky, generovanej, ako vedľajší produkt v syrárskom priemysle na výrobok použiteľný ako potravina. Srvátka predstavuje asi 85-90 % objemu mlieka, použitého pri výrobe syra. Tekutá srvátka sa skladá z vody (93 %), laktózy (5 %), bielkovín (0,85 %), minerálov (0,53 %) a minimálneho množstva tuku (0,36 %). Srvátkové bielkoviny majú výraznú biologickú hodnotu, najmä kvôli vysokému obsahu esenciálnych aminokyselín s rozvetveným reťazcom (izoleucín, leucín a valín). Tieto aminokyseliny stimulujú špecifické intracelulárne dráhy spojené so syntézou svalových proteínov (Pescuma a kol. 2010).

Záujem o využívanie odpadových produktov na výrobu funkčných nápojov sa v posledných rokoch zvýšil, pričom srvátka je najvýznamnejším príkladom. V snahe zvýšiť jej hodnotu sa v mnohých štúdiách skúmala možnosť fermentácie pomocou baktérií mliečného kvasenia, použité baktérie preukázali aj dobré prežívanie počas skladovania. Súčasná popularita jogurtových nápojov ochutených ovocnou zložkou by mohla poskytnúť veľmi dobrú príležitosť pre začlenenie srvátky do produkcie podobných ovocno-srvátkových výrobkov (Kandyliš a kol. 2016).

V porovnaní s čisto mliečnymi produktami je nevýhodou srvátky nízky obsah sušiny, ktorý je spojený s nevýraznou, vodnatou chuťou a redšou konzistenciou. Preto sa pri výrobe fermentovaných nápojov musia použiť štartovacie kultúry produkujúce exopolysacharidy alebo priamo pridať hydrokoloidy, ktoré sú schopné v relatívne malých koncentráciách výrazne zvyšovať viskozitu a tým aj predchádzať možnej sedimentácii dispergovaných častíc (Gallardo – Escamilla a kol. 2007). Výber vhodného množstva a typu použitého hydrokoloidu pri mliečnych produktoch je veľmi dôležitý, aby toto aditívum neovplyvnilo charakteristickú chuť pripraveného produktu alebo aby hydrokoloid bol schopný plniť svoju funkciu aj pri nízkom pH fermentovaných výrobkov (4,0 – 4,6). Vhodnými hydrokoloidmi sú karboxymetyl celulóza (CMC), pektín, algináty alebo xantánová guma (XG) (Williams a Phillips 2003).

Legarová a Kouřimská (2010) testovali senzoryckú prijateľnosť srvátkových nápojov s 25% a 50% prídavkom mlieka fermentovaných jogurtovou kultúrou (*Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrüeckii subsp. Bulgaricus*). Pri sledovaní titračnej acidity podľa Soxhlet – Henkel metódy bolo zistené, že vzorky s vyšším obsahom mlieka ju mali vyššiu oproti srvátkovým vzorkám, čo napovedá, že prídavok mlieka pozitívne ovplyvnil fermentačný proces.

V senzoryckých testoch získala najviac bodov nefermentovaná vzorka s 50% obsahom mlieka. Celkovo z výsledkov ale vyplynulo, že fermentácia mala na organoleptické vlastnosti nápojov oveľa menší, až zanedbateľný vplyv v porovnaní s množstvom pridaného mlieka. Podobné výsledky uvádza aj Bulatović a kol. (2014), ktorý testoval prijateľnosť fermentovanej čistej srvátky a srvátky s 30% prídavkom mlieka. Nápoje boli fermentované jogurtovou kultúrou ABY-6 alebo kombináciou ABY-6 s *Lactobacillus rhamnosus*. Verzia s mliekom, fermentovaná jogurtovou kultúrou bola chuťovo jednoznačne lepšia. *L. rhamnosus* pôsobil na chuť výsledných nápojov negatívne ale v kombinácii s jogurtovou kultúrou bolo v nápoji

prítomných až o 3 rády viac životaschopných baktérií, čo je z hľadiska probiotickej aktivity výrazné pozitívum.

Shukla a kol. (2013) testovali senzorickú prijateľnosť nápojov založených na kombinácii srvátky a ananasového džúsu v pomeroch 80:20, 75:25, 70:30 a 65:35, fermentovaných probiotickým kmeňom *Lactobacillus acidophilus*. Senzorické hodnotenie a meranie počtu KTJ/ml bolo vykonávané po 5, 10, 15, 20 a 24 hodinách fermentácie. Už po 15 hodinách fermentácie boli v nápojoch zaznamenané takmer rovnaké množstvá baktérií, ako po 24 hodinách (10^8 KTJ/ml). Najlepšiu celkovú prijateľnosť mal nápoj s 35% obsahom ananasového džúsu, v ktorom aj po 28 dňoch skladovania pri 5 °C, bolo viac ako 10^7 KTJ/ml. Z výsledkov vyplýva, že ideálnou kombináciou, vzhľadom na počet baktérií a senzorickú prijateľnosť, bol nápoj s 35% obsahom džúsu, fermentovaný 15 hodín. Hernandez-Mendoza a kol. (2007) pri fermentácii srvátky s prídavkom sacharózy a pektínu zaznamenali dosiahnutie maximálneho množstva baktérií už po 11 hodinách. Použité bakteriálne kmene (*Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium bifidum*) následne preukázali aj dobrú schopnosť prežívať v nápoji pri podmienkach skladovania bez výraznejšej zmeny chuti počas prvých 14 dní.

Bežne dostupné ovocno-srvátkové nápoje produkuje spoločnosť Milsy a.s., ktorá má vo svojom portfóliu 2 nápoje obsahujúce srvátku s 15% prídavkom ovocnej zložky (marakuja, mango) s bližšie nešpecifikovanou bakteriálnou kultúrou. Dostupné z: <https://bit.ly/2wrl1ge>.

Štúdie jednoznačne potvrdzujú potencial srvátky pre fermentáciu a výrobu nápojov, avšak v našich zemepisných podmienkach sa s podobnými produktami stratávame len ojedinele, a srvátka sa používa skôr v sušenej forme, ktorej výroba je ale spojená s vyššou energetickou náročnosťou.

3.4.2 Fermentované nápoje založené na sójovom základe

V nadväznosti na vývoj mliečnych probiotických výrobkov sa zaviedli nové výrobky obsahujúce prospešné baktérie, najmä v ovocných nápojoch a nápojoch založených na obilninách a rastlinných bielkovinách (Champagne a kol. 2009). Sójový nápoj je najbežnejšie používanou alternatívou k mlieku ako lacný substrát na výrobu probiotických produktov. Na vývoj probiotických nápojov sa sójové „mlieko“ používa samostatne alebo častejšie v kombinácii s obilninami, bylinkami alebo inými ochucovadlami (Kandyliis a kol. 2016).

Sója je vynikajúcim kandidátom pre takéto výrobky, tiež sa považuje za dobrý substrát pre výrobu funkčných potravín, pretože fermentácia má potenciál znižovať hladiny niektorých sacharidov, ktoré môžu byť zodpovedné za produkciu plynov v črevnom systéme, zvyšovať hladiny voľných izoflavónov a podporiť žiaduce zmeny bakteriálnych populácií v gastrointestinálnom trakte (Champagne a kol. 2009).

Z technologického hľadiska je mliečne kvasenie jednou z najlepších možností úpravy nežiadúce sójovej arómy. Kvôli veľmi nízkému obsahu cukrov v semenách je ale fermentácia klasickými mliekarenskými kultúrami (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* a *L. casei*) nemožná, preto musí byť sójový nápoj pred fermentáciou fortifikovaný sacharózou, glukózou alebo laktózou. Fermentačné produkty a proteolytická aktivita, ktorú vykazujú kmene *L.*

acidophilus a *L. casei* sa výrazne podieľajú na zmene chuti a a arómy nápoja, spojenej s odbúraním n-hexanal a pentanal zodpovedných za charakteristickú sójovú vôňu (Behrens a kol. 2004).

Champagne a kol. (2009) uvádza, že pri čistých kultúrach je výber kmeňa nevyhnutný na dosiahnutie primeranej rýchlosti acidifikácie. V prípade čistých probiotických kultúr sú fermentačné časy potrebné na dosiahnutie pH < 4,5 zvyčajne 10 hodín a viac, pri 37 ° C.

Z priemyselného hľadiska sú výhodné krátke fermentačné časy, aby sa zvýšila produkcia a obmedzili nežiaduce kontaminujúce mikroorganizmy. Okrem toho samotné probiotické kultúry môžu produkovať metabolity s nepríjemnými chuťami a vôňou. Potenciálnym riešením týchto dvoch problémov je použitie zmiešaných kultúr obsahujúce napr. jogurtové bakteriálne kmene. Probiotické baktérie obvykle pri výrobe jogurtov nedosahujú tak dobré rastové hodnoty ako štartovacie jogurtové kultúry. Štúdie ale naznačujú, že sójový nápoj by pre ne mohol byť dobrým substrátom, a spolu s jogurtovými kultúrami by sa im v sójovom médiu darilo viac (Rivera -Espinoza a Gallardo- Navarro 2010).

Espirito-Santo a kol. (2014) pripravili nemliečny probiotický nápoj s pH a viskozitou podobnou jogurtu s použitím kmeňov *Lactobacillus* a ďalších probiotických baktérií (*L. acidophilus*, *L. casei*, *B. animalis subsp. Lactis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*) na fermentáciu sójového mlieka kombinovaného s marakujovou dužinou.

İcier a kol. (2015) uvádzajú, že testovali senzorickú prijateľnosť, schopnosť baktérií prežívať počas skladovania a zmeny pH fermentovaného nápoja založeného na kombinácii sójového nápoja a jablkovej šťavy v maximálnej koncentrácii 25 %. Pri koncentrácii jablkovej šťavy 25 % bol probiotický kmeň *L. acidophilus* schopný prežiť v rozmedzí 8,73 - 9,11 log KTJ/g po 21 dňoch skladovania pri 4 ° C. Nápoj mal aj veľmi dobrú senzorickú prijateľnosť u konzumentov.

4 Experimentálna časť

4.1 Materiály a metódy

Z dvoch lokalít v okolí Prahy (ČR) boli odobrané včely druhu *Apis mellifera* a z ich tráviaceho traktu boli vyizolované 4 bakteriálne kmene (Tab.4), ktoré boli charakterizované pomocou elektroforéznej metódy zameranej na dĺžku génu 16S rRNA.

Následne bol na mikrotitračných doštičkách testovaný nárast bakteriálnej biomasy v kombináciach rôznych potravinárskych médií, založených na srvátke, sójovom proteínovom izoláte (SPI) a jablkovom džúse s prídavkami sacharidových roztokov medu alebo cukru. Nárast baktérií bol vyhodnocovaný spektrofotometricky, na základe zmeny optickej denzity médií.

Pri kmeňoch *Bifidobacterium asteroides* a *Lactobacillus helsingborgensis* bolo uskutočnené 1H NMR stanovenie látkového zloženia vybraných fermentovaných médií.

Na záver bola testovaná senzoričná prijateľnosť vybraných médií fermentovaných kmeňom *Lactobacillus mellivestrus*.

4.1.1 Izolácia laktobacilov a bifidobaktérií z tráviaceho traktu živých včiel

Včely použité pri experimente pochádzali z dvoch lokalít v okolí Prahy. Prvá skupina včiel, pochádzala z úľu patriaceho pod Výskumný ústav včelařský v Dole (50°12'20.3"N 14°22'01.7"E). Druhá skupina bola odchytená na demonštračnom a pokusnom poli ČZU v Suchdole (50°07'37.4"N 14°22'27.2"E). Z každej rodiny bolo do plastovej kletky obsahujúcej medovocukrové cesto odobratých 5 robotníc z najvyššieho nádstavku. Všetky včely boli odchytené 25.4.2019 a druhý deň prebehla extrakcia obsahu tráviaceho traktu.

Včely boli ihneď po transporte do LAM (Laboratoř Anaerobní Mikrobiologie) ÚŽFG (Ústavu živočišné fyziologie a genetiky) AV ČR, v.v.i. usmrtené CO₂. Bezprostredne potom z nich boli za aseptických podmienok vybraté kaudálne časti (črevo a rektum) tráviaceho traktu a vložené do hermeticky uzatvárateľnej skúmavky (tzv. „Hungate's tube“; výrobca SciQuip, VB) obsahujúcej 1,8 mL sterilného, modifikovaného anaeróbneho M.R.S. bujónu (zloženie g / L : 12 g trypton, 20 g glukóza, 5 g kvasničný extrakt, 5 g sójový pepton, 5 octan sodný, 5 NaCl, 1 MgCl₂ x 6 H₂O; 0,2 cystein x HCl, 1 mL Tween 80; pH pred steriláciou bolo upravené na 7,3 pomocou 5M NaOH) s prídavkom sklenených črepín pre homogenizáciu vzorky. Anaeróbne podmienky boli zabezpečené vytesnením atmosférického O₂ pomocou CO₂ z tlakovej fľaše (čistota plynu > 99,99 %). Ručným pretrepaním boli tráviace trakty robotníc homogenizované a alikvotne nariadené desiatkovým systémom sústavou skúmaviek, ktoré obsahovali zhodný objem bujónu. Nariadené vzorky o objeme 0,5 mL boli za aseptických podmienok aplikované do sterilných Petriho misiek a inkubované po pridaní modifikovaného M.R.S. agaru (bujón s vyššie uvedením zložením a prídavkom 13,5 g bakteriologického agaru, Oxoid, VB), modifikovaného TPY agaru (Killer a kol., 2011) za anaeróbnych podmienok (vyvíjač anaeróbnej atmosféry AnaeroGen™ 3.5L; Oxoid, VB) v 3,5L anaerostatu (Anaerobic jar, Oxoid, VB) pri teplote 37 °C po dobu 48 hodín.

Narastené kolónie rôznej veľkosti a morfológie boli sterilným bakteriologickým očkom transportované do skúmaviek obsahujúcich 9 mL vyššie zmieneného M.R.S. bujónu a kultivované 24-48 h pri 37 °C. Po náraste bola u bakteriálnych izolátov zhodnotená pomocou svetelnej, kontrastnej mikroskopie čistota, resp. potenciálna kontaminácia, a zároveň morfológia buniek.

Z cca. 25 izolátov boli vyselektované pre účely klasifikácie 4 z nich, u ktorých bola preukázaná čistota a zároveň morfológia typická pre laktobacily (zjednodušene pravidelné tyčinky vyskytujúce sa jednotlivo, v dvojiciach či krátkych retiazkach) a bifidobaktérie (nepravidelné kratšie či dlhšie, občas vetvené tyčinky dosahujúce najčastejšie kyjovitý tvar a tvary pripomínajúce písmená Y a X; taxony obývajúce tráviaci trakt opeľovačov navyše často tvoria v tekutých rastových médiách viacmenej rozsiahle zhluky buniek – tzv. autoagregáty).

4.1.2 Klasifikácia izolátov laktobacilov a bifidobaktérií

Chromozomálna DNA vybraných izolátov, nevyhnutná pre klasifikáciu, na základe komparatívnej analýzy 16S rRNA genu (kódujúca ribozomálnu RNA malej podjednotky ribozómov), bola extrahovaná prostredníctvom roztoku PrepMan™ Ultra Reagent (Applied Biosystems, VB) podľa inštrukcií výrobcu, pričom základom bol pelet buniek izolátov získaný centrifugáciou (13 500 ot. / min. v trvaní 3 min.) 1 mL kultúry. Primerový pár 616 V (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') – 630R (5'-CAKAAAGGAGGTGATCC-3') (Loy et al. 2002) a konkrétne PCR podmienky: (94°C/2 min) 1 x, (94°C/45 s, 52°C/1 min, 72°C/30 s) 30 x, (94°C/1 min, 72°C/4 min) 1x (Ehrmann et al. 2003) boli použité pre amplifikáciu takmer kompletnej sekvencie 16S rRNA génu. PCR reakcia v objeme 25 µL pozostávala z 1x PPP Master Mix (75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate, 1.25 U *Taq*-purple DNA polymerase; Top-Bio, ČR), 0.5 µM oboch primérov a 20–50 ng templátovej DNA. Úspešná amplifikácia bola potvrdená na základe 1.5 % agarózovej elektroforézy pri týchto podmienkach: 110 V, 40 min, ethidium bromid pre zafarbenie DNA v koncentrácii 50 ng / 100 mL. Získané amplikóny boli purifikované kitom QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Nemecko) podľa inštrukcií výrobcu a sekvenované z oboch strán, tj. pomocou oboch primérov, v spoločnosti SEQme company (ČR). Kompletné sekvencie boli rutinne zostavené v programe Geneious version 7.1.7 software (Biomatters Ltd., Nový Zéland). Výsledné sekvencie boli vložené do databázy EzBioCloud voľne prístupnej na webovej stránke: <https://www.ezbiocloud.net/identify> (Yoon a kol. 2017) porovnávajúcej vloženú sekvenciu so všetkými kompletnými (v najvyššej miere vyextrahované z kompletných genómov) sekvenciami príslušného génu typových kmeňov prokaryót.

Výsledkom je percentuálna podobnosť s najbližším(i) taxónom. V prípade fragmentu génu ≥ 1200 nukleotidov a similarity (podobnosti) ≥ 99.0 % patrí izolát veľmi pravdepodobne k príslušnému taxónu.

4.1.3 Príprava médií a očkovanie mikrotitračných dosiek

Sušenú srvátku značky Mogador sme destilovanou vodou regenerovali na približne dvojnásobný obsah pôvodnej sušiny.

Sójový proteínový izolát (ďalej len SPI) značky MyProtein sme rozmiešali v destilovanej vode v pomere, ktorý zodpovedal uvádzanému obsahu bielkovín v regenerovanej srvátke.

Medové roztoky sme pripravili z kvetového medu a destilovanej vody v dvoch verziách v pomeroch 1:10 a 2:10.

Cukrové roztoky sme pripravili z bieleho repného cukru a destilovanej vody v dvoch verziách v pomeroch 1:10 a 2:10.

Jablková šťava bola manuálne pripravená vylisovaním nastrúhaných jablák odrody Gala.

Všetky média sme pripravili s dvojnásobnou koncentráciou, kvôli ich následnému vzájomnému kombinovaniu. Jednotlivé navážky sú uvedené v Tabuľke 1. Suspenzie sme dokonale zhomogenizovali, hrdlo hermeticky uzavreli gumenou zátkou a zakrimpovali. Ako kontrolné štandardné médium sme zvolili rovnaký MRS bujón, ako pri izolácii jednotlivých bakteriálnych kmeňov z tráviaceho traktu včiel.

Tabuľka 1. Navážky surovín

Ozn.	Názov média	Zloženie		
		Médium (g)	Dest. voda (ml)	Džús (ml)
1	Srvátka + voda	12	100	
2	Srvátka + voda + džús	12	50	50
3	Srvátka + džús	12		100
4	SPI + voda	1,7	100	
5	SPI + voda + džús	1,7	50	50
6	SPI + džús	1,7		100
7	Med + voda 1:10	10	100	
8	Med + voda 2:10	20	100	
9	Cukor + voda 1:10	10	100	
10	Cukor + voda 2:10	20	100	
11	Destilovaná voda		100	
12	MRS bujón			

Pripravené flaštičky s médiami sme sterilovali v autokláve 23 minút, pri 121 °C a tlaku 101,3 kPa. Sterilné médiá sme v digestóriu pomocou striekačky s ihlou asepticky previedli do sterilných centrifugačných skúmaviek a odstredovali pri 9000 otáčkach/ min., po dobu 10 minút.

Číre supernatanty sme v digestóriu preliali do sterilných jednorázových misiek a pomocou multikanálovej pipety previedli do jamiek mikrotitračných doštičiek s kónickým

profilom, vid'. Tabulka 2. Do horizontálne orientovaných riadkov (A-H) sme pipetovali 100 μ L roztokov obsahujúcich srvátku, SPI, destilovanú vodu a originálne kultivačné médium pre baktérie mliečného kvasenia (MRS). Do stĺpcov (1-10) sme v dvoch opakovaní pipetovali 100 μ L vody alebo roztoky medu a cukru.

Tabuľka 2. Náhľad pripravenej mikrotitračnej doštičky.

Ozn.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Médium	Voda	Voda	Med 1:10	Med 1:10	Med 2:10	Med 2:10	Cukor 1:10	Cukor 1:10	Cukor 2:10	Cukor 2:10
A	1										
B	2										
C	3										
D	4										
E	5										
F	6										
G	11										
H	12										

Izolované bakteriálne kmene boli počas pokusu skladované v mrazničke pri -80 °C s prídavkom glycerínu ako kryoprotektívneho činidla, ktorého prídavok zabraňuje poškodeniu bakteriálnych buniek pri zmrazovaní. Po rozmrazení sme sterilnou striekačkou asepticky odobrali 2 ml suspenzie a naočkovali novú flaštičku s MRS médiom. Po 24 hodinách sme baktérie znova preočkovali a nechali kultivovať 24 hodín.

Pripravené inokulum sme sterilne previedli do Petriho misky. Pomocou ožíhaného inokulačného ježka sme naočkovali každú jamku mikrotitračnej doštičky. Vždy jedným kmeňom pre jednu doštičku. Pri oboch opakovaní pokusu sme nechali jednu mikrotitračnú doštičku sterilnú, ktorá slúžila ako kontrolná vzorka.

4.1.4 Kultivácia baktérií a meranie optickej denzity

Mikrotitračné doštičky sme vložili do vakuovacieho sáčku spolu s vyvíjačom anaeróbného prostredia (Oxoid AnaeroGen 2.5L Sachet, Thermo Scientific™, UK). Vakuovačkou sme odsali vzduch a zatavili. Takto pripravené doštičky sme nechali 24 hodín kultivovať v termostate pri 37 °C.

Optickú denzitu v jamkách mikrotitračných doštičiek sme merali spektrofotometricky pomocou Microplate readeru (Synergy H1, Biotek, USA) pri 600nm.

4.1.5 NMR stanovenie zloženia fermentovaných médií

Na vybraných vzorkách fermentovaných médií sme urobili ¹H NMR analýzu zloženia na spektrometri Bruker Avance III 500 MHz vybavenom 5 mm BBFO sondou (Bruker Biospin, DE) pracujúcom na frekvencii 500.23MHz. Vzorky (540μL boli zmiešané s 60μL NMR roztokom (fosfátový tlmič, 1.5M, pH 4.0, 0.2% NaN₃ and 5 mM TSP). Spektrá boli skenované pomocou metódy 1d noesy, 32k dátových bodov v časovej doméne, šírka spektra 16 ppm, akvizíčný čas 4s, relaxačná doba 1s a mixing time 0.1s. Spektrá boli upravené v programe Chenomx ver. 8.4, ktorý bol tiež použitý na kvantifikáciu metabolitov. Celkom bolo vo fermentačných tekutinách nájdených a kvantifikovaných 16 látok, ktoré boli súčasťou média alebo vznikali v priebehu fermentácie.

4.1.6 Fermentácia väčšieho objemu médií pre sensorické hodnotenie

Pre pilotné sensorické hodnotenie fermentovaných médií sme zvolili 2 médiá s najlepším nárastom biomasy (Srvátka, SPI + 5 % cukor) a bakteriálny kmeň *L. melliventris*. K srvátke pripravíme regeneráciou sušenej srvátky značky Mogador (60 g/1000ml) sme už oproti vzorkám fermentovaným v mikrotitračných doštičkách (Tab.2) nepridával cukor ani med.

SPI s 5% prídavkom cukru sme pripravili v rovnakom pomere ako na mikrotitračných doštičkách (17,3 g/1000ml + 50 g cukru).

Média sme po dôkladnom rozmiešaní odstreďovali 5 minút pri 9000 otáčkach. Supernatanty sme nechali 30 minút prebublávať dusíkom a následne sterilovali v autokláve 23 minút, pri 121 °C a tlaku 101,3 kPa. Po vychladnutí sme médiá naočkovali 20ml čerstvej kultúry v MRS bujóne, a nechali kultivovať 13 h pri 37 °C.

Pre sensorické hodnotenie sme pre každé médium pripravili 4 varianty s ochucujúcimi zložkami, ako jablkový džús, pomarančový džús a med (Tab.3).

Tabuľka 3. Varianty pripravených nápojov pre sensorické hodnotenie

Médium	Ochucovadlo	Pomer alebo prídavok (g/100ml)
SPI + 5 % cukor		
SPI + 5 % cukor	Jablkový džús	2:1
SPI + 5 % cukor	Pomarančový džús	3:1
SPI + 5 % cukor	Med	7
Srvátka		
Srvátka	Jablkový džús	3:1
Srvátka	Pomarančový džús	3:1
Srvátka	Med	4

4.2 Výsledky a diskusia

4.2.1 Klasifikácie izolátov na základe komparatívnej analýzy 16S rRNA génu

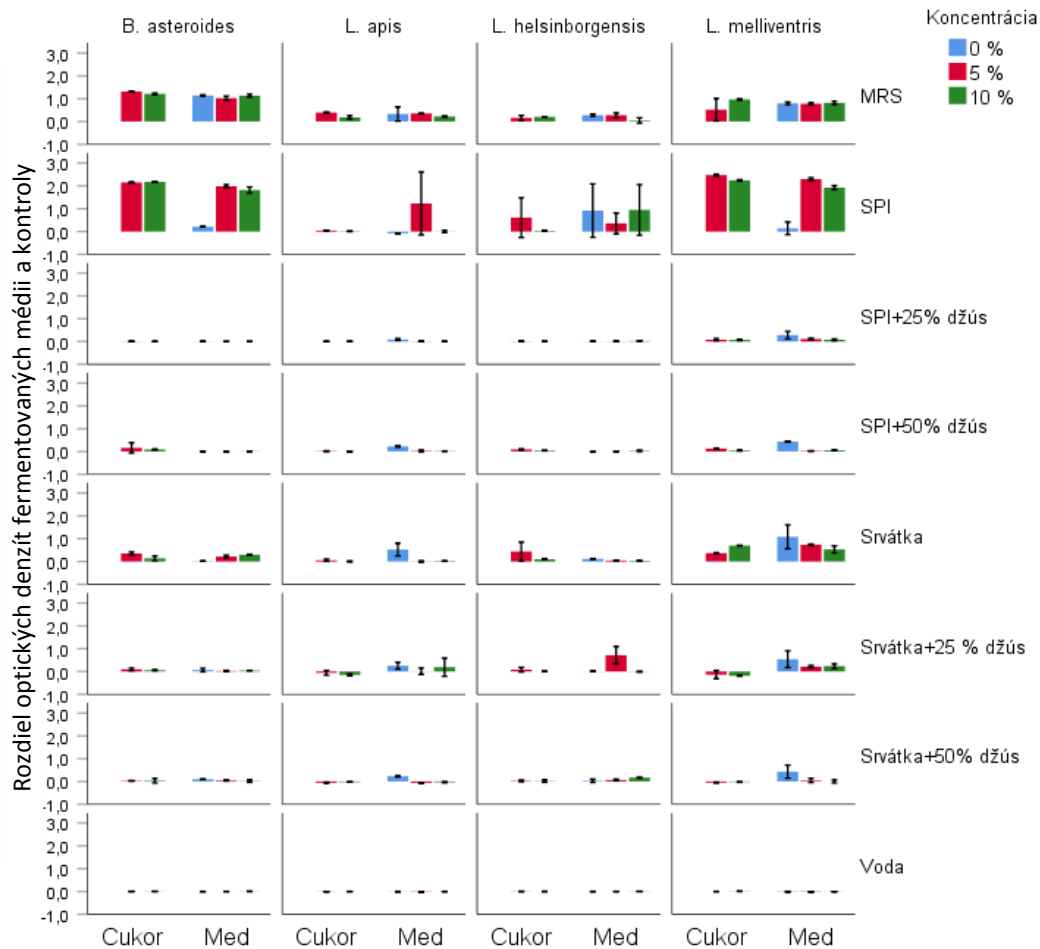
Pomocou elektroforéznej analýzy zameranej na dĺžku 16S rRNA sa podarilo izolovať 4 bakteriálne taxóny (*Bifidobacterium asteroides*, *Lactobacillus apis*, *Lactobacillus helsingborgensis*, *Lactobacillus melliventris*), uvedené v Tabuľke 4.

Tabuľka 4. Charakterizácia použitých bakteriálnych kmeňov pomocou 16S rRNA

Ozn. kmeňa	Dĺžka 16S rRNA	16S rRNA génová similarita s najpríbuznejším taxónom
2 MTP/6	1200 nts	<i>Bifidobacterium asteroides</i> 99.42%
2 TP/5	1477 nts	<i>Lactobacillus apis</i> 99.30%
R 1/4	1106 nts	<i>Lactobacillus helsingborgensis</i> 100%
R 2/8	1481 nts	<i>Lactobacillus melliventris</i> 99.79%

4.2.2 Spektrofotometrické vyhodnotenie zákalu mikrotitračných dosiek

Nárast bakteriálnej biomasy bol vyhodnotený spektrofotometricky po 24 h kultivácie. Už na prvý pohľad sme v niektorých jamkách pozorovali vznik charakteristického zákalu, spôsobeného nárastom bakteriálnej biomasy a pravdepodobne aj proteolytickou aktivitou baktérií. Pomnoženie mikroorganizmov bolo vyhodnotené ako ΔOD_{600} , odčítaním hodnoty optickej denzity jamky s nárastom mikroorganizmov po 24 h – denzita jamky rovnakého média bez zaočkovania po 24 h. Každá kombinácia bola testovaná v 2 opakovaniach. Výsledky sme spracovali do Obr. 3.



Obrázok 3. Graf rozdielov optickej denzity jamiek po kultivácii včelích mikroorganizmov v médiu (n=2)

MRS médium sa bralo ako referenčný substrát. Rástli v ňom všetky testované kmene najlepšie. Najlepší nárast bol pre kmeň *B. asteroides*, nasledovaný *L. melliventris*. *L. apis* a *L. helsingborgensis* mali v tomto médiu nárast slabší. Pre MRS médium nebol pozorovaný žiadny vplyv prídavku medu alebo cukru.

Druhé najlepšie médium bol SPI, s prídavkom cukru alebo medu. V samotnom SPI nebol pozorovaný žiadny nárast. V SPI médiách s prídavkom zdroja sacharidov bol pozorovaný dobrý nárast *B. asteroides* a *L. melliventris*, koncentrácia 5 % bola vhodnejšia než 10 %. Médium nebolo až tak vhodné pre kultiváciu *L. apis* a *L. helsingborgensis*, odchylka tu však bola dosť vysoká aj kvôli malému počtu opakovaní (n=2). Z pohľadu zmeny optickej denzity sa SPI javilo ako jednoznačne najlepšie médium na množenie použitých baktérií, ale vytvorenie tak intenzívneho zákalu mohlo byť spojené s charakteristickými proteolytickými pochodmi, ktoré nemuseli v plnej miere reflektovať nárast bakteriálnej biomasy. Vhodnosť média založeného na sójovom proteine potvrdzuje aj práca od Coghetto a kol. (2016), ktorý testovali kultiváciu *Lactobacillus plantarum* zameranú aj na produkciu mliečnej kyseliny.

Srvátka sa taktiež preukázala ako vhodné médium. Najlepší rastový potenciál sa ukázal pri kmeni *L. mellivetrus* v čistej srvátke, ale dobré nárasty boli zaznamenané aj vo verziách s 5% alebo 10% prídavkom medu alebo cukru. Viditeľný nárast preukázal aj kmeň *B. asteroides* vo verzii s 5% aj 10% prídavkom cukru alebo medu. *L. apis* rástol hlavne v čistej srvátke, aj keď sme zaznamenali dosť vysokú odchylku, a ďalší sacharidový prídavok mu skôr škodil. *L. helsingborgensis* najlepšie rástol v srvátke s 5% prídavkom cukru, ale pri tejto kombinácii bola taktiež prítomná výrazná odchylka.

Pri médiách obsahujúcich 25 % alebo 50 % jablkového džúsu boli zaznamenané minimálne prírastky biomasy, z čoho usudzujeme, že jablkový džús obsahuje látky výrazne inhibujúce aktivitu použitých baktérií. Takto výrazná inhibícia mohla byť spôsobená príliš nízkym pH média, čo z časti potvrdzuje fakt, že v srvátke s 25% prídavkom džúsu, bol nárast o niečo vyšší ako v SPI s 25% obsahom džúsu. Tento jav mohol byť spôsobený vyššou pufracnou schopnosťou srvátkových bielkovín.

Okrem príliš nízkeho pH sa na vytvorení nevhodných vlastností média mohli podieľať aj triesloviny a polyfenoly, spojené s bakteriostatickými účinkami, bežne sa vyskytujúce v ovocí.

4.2.3 Látkové zloženie vybraných médií po fermentácii

Pomocou ¹H NMR analýzy sme pre vybrané média po 24h fermentácie a ich nefermentované ekvivalenty, stanovili látkové zloženie. Podarilo sa nám identifikovať 16 látok, ktorých koncentrácie sme porovnali na Obr.4, Obr.5, Obr.6 a Obr.7.

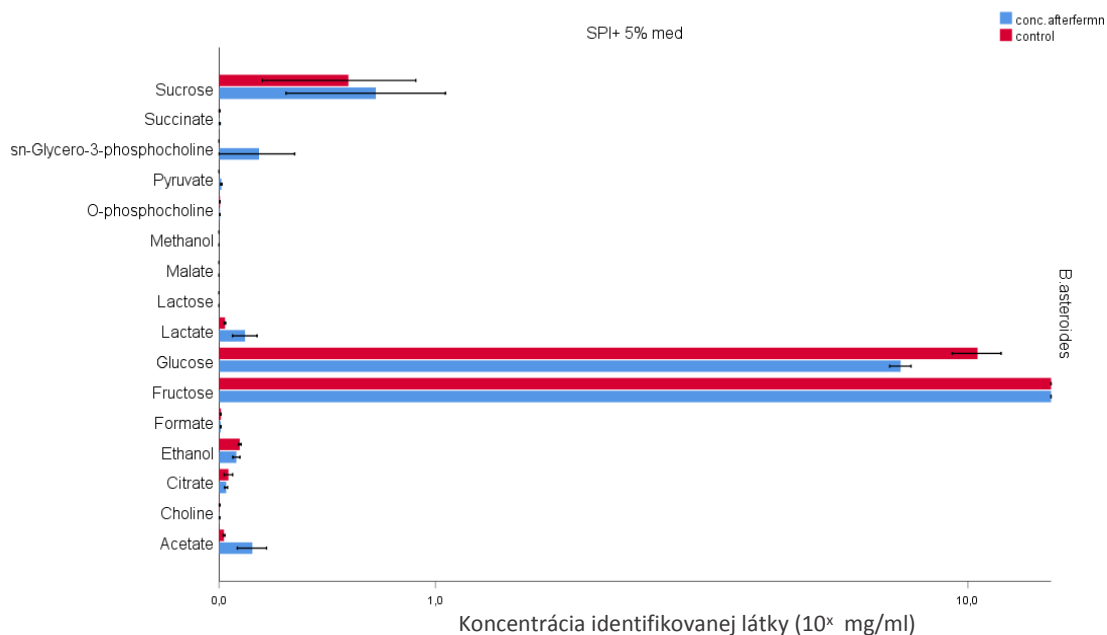
Pri stanoveniach boli zistené charakterické nárasty koncentrácie laktátu, acetátu a dokonca u všetkých fermentovaných vzoriek sa objavil pyruvát, pričom v kontrolných vzorkách nebol vôbec prítomný. Zistené zvýšenia koncentrácií charakteristických metabolitov baktérií mliečneho kvasenia, považujeme za jasný dôkaz vhodnosti médií pre ich množenie.

Najvýraznejšou zmenou bol niekoľkonásobný nárast koncentrácie acetátu, ktorý bol vyhodnotený pri všetkých médiách fermentovaných kmeňom *B. asteroides*, čo potvrdzuje heterofermentatívny potenciál bifidobaktérií.

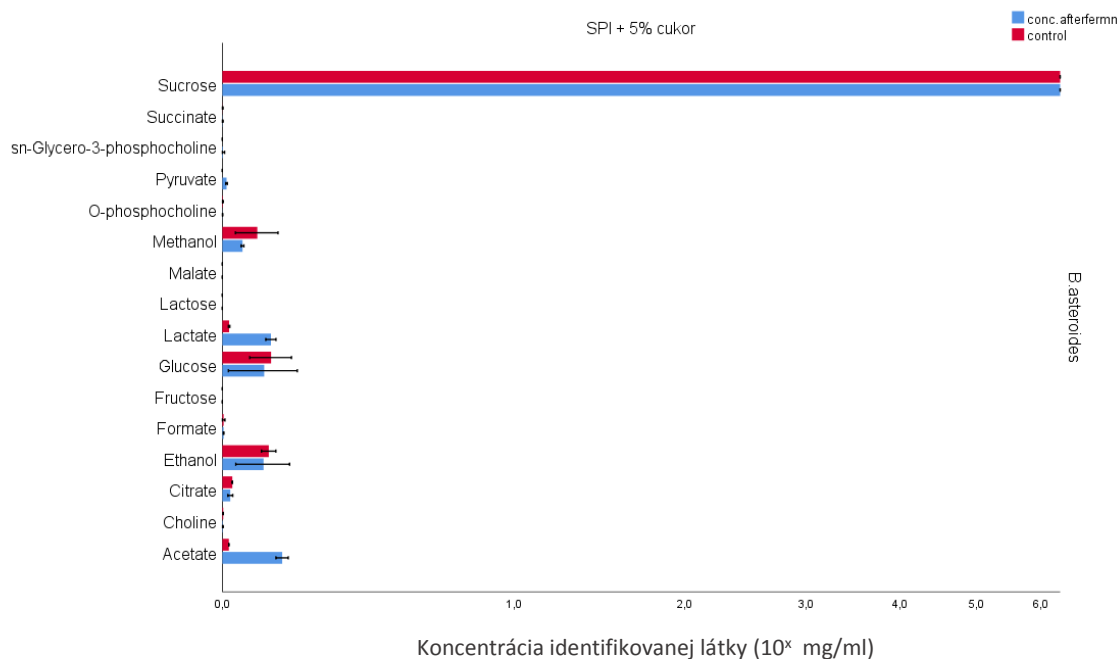
Najnižšie zmeny v koncentracii metabolitov sme zaznamenali pri vzorke Srvátky s 25% prídavkom jablkového džúsu a 5% obsahom medu, fermentovanej kmeňom *L.helsingborgensis* (Obr.7), ktorý mal aj podľa spektrofotometrických výsledkov (Obr.3) slabší nárast s vysokou odchylkou. Pre laktát bol dokonca zaznamenaný mierny pokles koncentrácie, čo ale mohlo byť spôsobené aj vysokou odchylkou pri malom počte opakovaní (n=2).

Pri médiách s prídavkom cukru sme identifikovali metanol (Obr.5, Obr. 6), ktorého koncentrácia sa po fermentácii mierne znižovala. Prítomnosť metanolu vo vzorkách s cukrom pripisujeme nedostatočnému vyčisteniu repného cukru od pektínu, z ktorého počas fermentácie môže byť metanol odštepovaný.

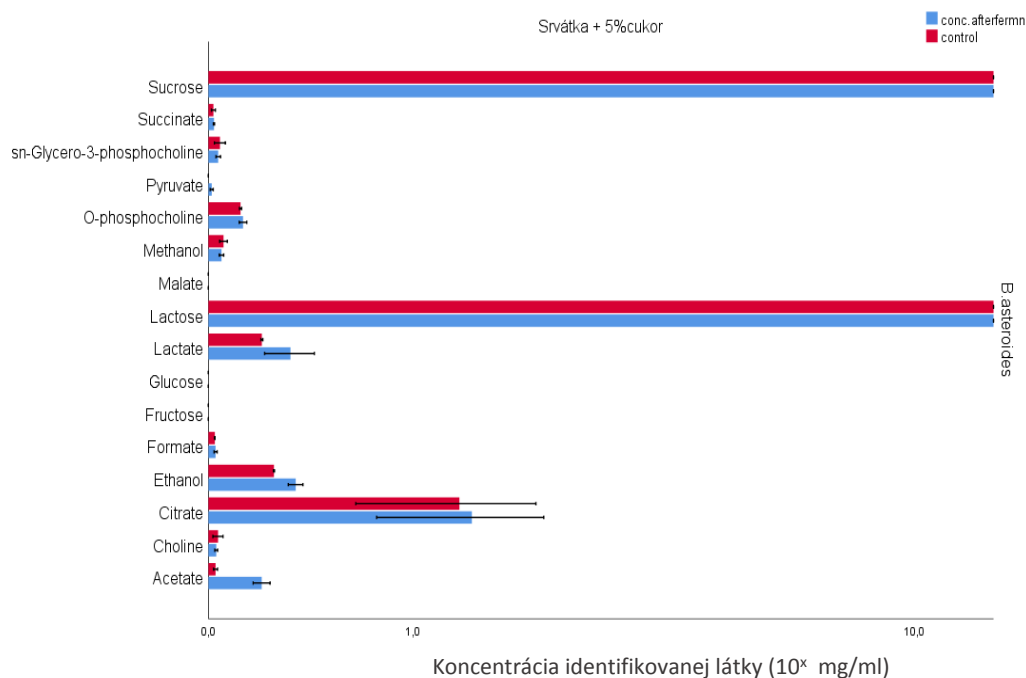
Výsledky nám potvrdili zdravotnú nezávadnosť fermentovaných médií, pre ďalšie potravinárske použitie.



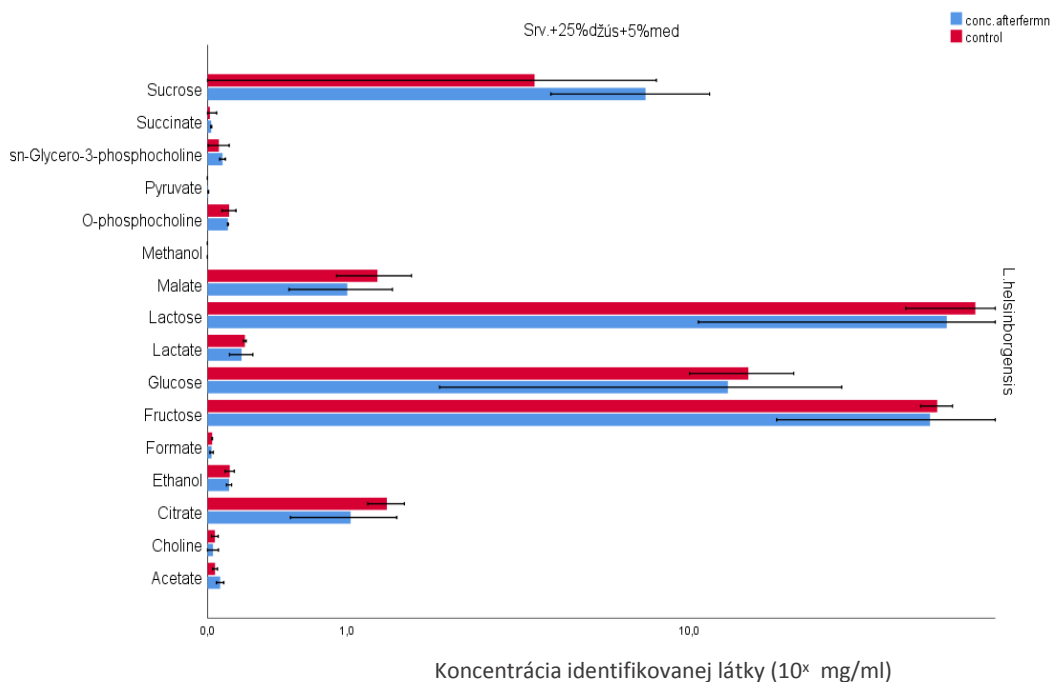
Obrázok 4. 1H NMR analýza obsahu zložiek fermentovaného média v mikrotitračných doštičkách po 24h kultivácii *B. asteroides* pre SPI s 5% prídavkom medu (mg/ml) porovnaná s nefermentovaným ekvivalentom



Obrázok 5. 1H NMR analýza obsahu zložiek fermentovaného média v mikrotitračných doštičkách po 24h kultivácii *B. asteroides* pre SPI s 5% prídavkom cukru (mg/ml) porovnaná s nefermentovaným ekvivalentom



Obrázok 6. *1H NMR* analýza obsahu zložiek fermentovaného média v mikrotitračných doštičkách po 24h kultivácii *B. asteroides* pre Srvátku s 5% prídavkom cukru (mg/ml) porovnaná s nefermentovaným ekvivalentom



Obrázok 7. *1H NMR* analýza obsahu zložiek fermentovaného média v mikrotitračných doštičkách po 24h kultivácii *L. helsingborgensis* pre Srvátku s 25% prídavkom jablkového džúsu 5% obsahom medu (mg/ml) porovnaná s nefermentovaným ekvivalentom

4.2.4 Vyhodnotenie senzorickej prijateľnosti nápojov

Pilotné senzorické hodnotenie bolo realizované na 4 jednotlivcoch, ktorí mali za úlohu rozdeliť nápoje (Tab.5) do troch skupín podľa ich chuťovej prijateľnosti na chutné, menej prijateľné a neprijateľné. Za zaradenie nápoja do skupiny chutné bolo prideľovaných 10 bodov, za skupinu menej prijateľné 5 bodov a za neprijateľné 0 bodov.

Plný bodový zisk získala kombinácia srvátky a jablkového džúsu. Druhou najlepšou variantou bola verzia so srvátkou a pomarančovým džúsom. Treťou najchutnejšou variantou boli nápoje založené na SPI s prídavkom jablkového alebo pomarančového džúsu, ktoré ale oproti srvátkovým ekvivalentom viditeľne zaostali.

Najhoršie hodnoteným nápojom sa stal samotný SPI s cukrom bez ďalšieho prídavku ochucujúcej zložky, pri ktorej boli najčastejšie spomínanou vadou výrazne kyslá chuť a charakteristickou prenikavou sójovo-fermentovanou arómou.

Verzie s prídavkom medu sa nepresadili pravdepodne kvôli príliš sladkej chuti, čo by sa dalo ale do budúcnosti vyriešiť ďalším senzorickým testom so širším spektrom vzoriek líšiacich sa množstvom sladidla.

Jednoznačne sa potvrdil fakt, že na chutnosti pripraveného nápoja sa bude najviac podieľať množstvo pridaného džúsu, podobne ako pri senzorickom hodnotení rôznych koncentrácií ananasového džúsu a srvátky fermentovaných *L. acidophilus* (Shukla a kol. 2012).

Tabuľka 5. Priemerný bodový zisk pre jednotlivé nápoje

Médium	Ochucovadlo	Pomer alebo prídavok (g/100ml)	Priemerný bodový zisk
SPI + 5 % cukor			0
SPI + 5 % cukor	Jablkový džús	2:1	6,25
SPI + 5 % cukor	Pomarančový džús	3:1	6,25
SPI + 5 % cukor	Med	7	1,25
Srvátka			3,75
Srvátka	Jablkový džús	3:1	10
Srvátka	Pomarančový džús	3:1	8,75
Srvátka	Med	4	1,25

4.3 Záver

Experiment celkovo priniesol zjednodušený náhľad na technologický postup pri produkcii včelých probiotík a potenciálne nových fermentovaných nápojov s prídavkom ovocných štiav.

Výsledky nám potvrdili možnosť využitia srvátky a roztoku sójového proteínového izolátu na množenie bakteriálnej biomasy, ktorá by sa po odfiltrovaní použila na výrobu včelieho probiotického doplnku. Najlepšie podmienky pre baktérie sa ukázali u základných médií (srvátka, SPI s cukrom alebo medom).

Analýza chemického zloženia vybraných fermentovaných médií nám potvrdila ich zdravotnú nezávadnosť, čo bolo základným predpokladom pre ich ďalšie použitie pri príprave nápojov.

Pilotná senzorická analýza naznačila, že pripravené nápoje by vo vhodnom pomere s ovocnými šťavami mohli byť dobre prijateľné u zákazníkov.

Pri produkcii klasických fermentovaných potravín sú používané presné pomery jednotlivých bakteriálnych kmeňov, ktorých metabolity zodpovedajú za vytvorenie charakteristickej arómy. Fermentáciu srvátky alebo SPI nami izolovanými bakteriálnymi kmeňmi pravdepodobne ešte nikto nerobil, preto nám tento experiment poslúži ako smerovník, od ktorého sa odrazíme do budúcnosti. Okrem toho by bolo zaujímavé otestovať rast aj ďalších bakteriálnych kmeňov ako napr. *Giliamella apicola*, ktorá je taktiež jednou zo základných zložiek včelej črevnej mikrobioty a pripraviť produkt vo forme vhodnej pre jednoduchú aplikáciu do včelstva.

5 Zoznam použitej literatúry

Behrens JH, Roig SM, Da Silva MAAP. 2004. Fermentation of soymilk by commercial lactic cultures: Development of a product with market potential. *Acta Alimentaria* [online]. **33**(2), 101-109 [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.1556/AAlim.33.2004.2.2. ISSN 0139-3006. Dostupné z: <http://www.akademiai.com/doi/abs/10.1556/AAlim.33.2004.2.2>

Bulatović ML, Krunić TŽ, Vukašinović-Sekulić MS, Zarić DB, Rakin MB. 2014. Quality attributes of a fermented whey-based beverage enriched with milk and a probiotic strain. *RSC Adv* [online]. **4**(98), 55503-55510 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1039/C4RA08905G. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4RA08905G>

Cariveau D, P, Powell JE, Koch H, Winfree R, Moran NA. 2014. Variation in gut microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees (*Bombus*). *The ISME Journal* [online]. **8**(12), 2369-2379 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1038/ismej.2014.68. ISSN 1751-7362. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ismej201468>

Champagne CP, Green-Johnson J, Raymond Y, Barrette J, Buckley N. 2009. Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. *Food Research International* [online]. **42**(5-6), 612-621 [cit. 2020-03-14]. DOI: 10.1016/j.foodres.2008.12.018. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996909000222>

COGHETTO, Chaline Caren, Carolina Bettker VASCONCELOS, Graziela Brusca BRINQUES a Marco Antônio Záchia AYUB, 2016. Lactobacillus plantarum BL011 cultivation in industrial isolated soybean protein acid residue. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. **47**(4), 941-948 [cit. 2020-06-08]. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.06.003. ISSN 15178382. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838216305317>

Corby-Harris V, Maes P, Anderson KE, Gerardo NM. 2014. The Bacterial Communities Associated with Honey Bee (*Apis mellifera*) Foragers. *PLoS ONE* [online]. **9**(4) [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1371/journal.pone.0095056. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0095056>

Danihlík J. 2011. Referáty z konferencie Včelařský výzkum v době J. G. Mendela a dnes – 1. část. *Moderní včelař* **11**: 147-148.

Dubná S, Sedláček I, Killer J. 2012. Probiotické bakterie a jejich význam pro zdraví včel. Page 16 in Danihlík J, editor. *Věda a výzkum včelařské praxi*. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc.

Ehrmann MA, Müller MR, Vogel RF. 2003. Molecular analysis of sourdough reveals *Lactobacillus mindensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**:7-13.

Engel P, Martinson VG, Moran NA. 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **109**(27), 11002-11007 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1073/pnas.1202970109. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1202970109>

Espirito-Santo AP, Mouquet-Rivier C, Humblot Ch, Cazevielle Ch, Icard-Vernière Ch, Soccol CR, Guyot JP. 2014. Influence of cofermentation by amylolytic *Lactobacillus* strains and probiotic bacteria on the fermentation process, viscosity and microstructure of gruels made of rice, soy milk and passion fruit fiber. *Food Research International* [online]. **57**, 104-113 [cit. 2020-03-14]. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.01.028. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996914000349>

Forsgren E, Olofsson TC, Vásquez A, Fries I. 2010. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus* larvae in honey bee larvae. *Apidologie* [online]. **41**(1), 99-108 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1051/apido/2009065. ISSN 0044-8435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1051/apido/2009065>

Gallardo-Escamilla FJ, Kelly AL, Delahunty CM. 2007. Mouthfeel and flavour of fermented whey with added hydrocolloids. *International Dairy Journal* [online]. **17**(4), 308-315 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1016/j.idairyj.2006.04.009. ISSN 09586946. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694606001142>

Gray A. 2019. Loss rates of honey bee colonies during winter 2017/18 in 36 countries participating in the COLOSS survey, including effects of forage sources. *Journal of Apicultural Research* [online]. **58**(4), 479-485 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1080/00218839.2019.1615661. ISSN 0021-8839. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00218839.2019.1615661>

Hernandez-Mendoza A, Robles VJ, Angulo JO, De La Cruz J, Garcia HS. 2007. Preparation of a Whey-Based Probiotic Product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*. *Food Technology and Biotechnology*, **45** (1), 27-31. Prevezaté z <https://hrcak.srce.hr/30432>

Hroncová Z, Havlík J, Killer J, a kol. 2015. Variation in Honey Bee Gut Microbial Diversity Affected by Ontogenetic Stage, Age and Geographic Location. *PLOS ONE* [online]. **10**(3) [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1371/journal.pone.0118707. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0118707>

Hyršl P, Dobeš P, Vojtek L, Hroncová Z, Tyl J, Killer J. Plant alkaloid sanguinarine and novel potential probiotic strains *Lactobacillus apis*, *Lactobacillus melliventris* and *Gilliamella apicola* promote resistance of honey bees to nematobacterial infection. *Bulletin of Insectology*, Bologna, 2016, roč. 70, č. 1, s. 31-38. ISSN 1721-8861

Içier F, Gündüz GT, Yilmaz B, Memeli Z. 2015. Changes on some quality characteristics of fermented soy milk beverage with added apple juice. *LWT - Food Science and Technology* [online]. **63**(1), 57-64 [cit. 2020-03-14]. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.03.102. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643815002558>

Kakumanu ML, Reeves AM, Anderson TD, Rodrigues RR, Williams MA. 2016. Honey Bee Gut Microbiome Is Altered by In-Hive Pesticide Exposures. *Frontiers in Microbiology* [online]. **7** [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01255. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01255/abstract>

Kandyli P, Pissaridi K, Bekatorou A, Kanellaki M, Koutinas A. 2016. Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science* [online]. **7**, 58-63 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1016/j.cofs.2015.11.012. ISSN 22147993. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214799315001411>

Kapheim KM, Rao VD, Yeoman CJ, Wilson BA, White BA, Goldenfeld N, Robinson GE, Zoetendal EG. 2015. Caste-Specific Differences in Hindgut Microbial Communities of Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLOS ONE* [online]. **10**(4) [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1371/journal.pone.0123911. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0123911>

Kaznowski A, Szymas B, Jazdzinska E, Kazimierzak M, Paetz H, Mokracka J. 2005. The effects of probiotic supplementation on the content of intestinal microflora and chemical composition of worker honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* [online]. **44**(1), 10-14 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1080/00218839.2005.11101139. ISSN 0021-8839. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00218839.2005.11101139>

Killer J, Kopečný J, Mrázek J, Koppová I, Havlík J, Benada O, Kott T. 2011. *Bifidobacterium actinocoloniiforme* sp. nov. and *Bifidobacterium bohemicum* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *Int J Syst Evol Microbiol*. **61**:1315-1321.

Koch H, Schmid-Hempel P. 2011. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **108**(48), 19288-19292 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1073/pnas.1110474108. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1110474108>

Legarová V, Kouřimská L. 2010. Sensory quality evaluation of whey-based beverages. *Mljekarstvo*. **60** No.4: 280-287.

Loy A, Lehner A, Lee N, Adamczyk J, Meier H, Ernst J, Schleifer KH, Wagner M. 2002. Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl Environ Microbiol*. **68**:5064-5081.

Mattila HR, Rios D, Walker-Sperling VE, Roeselers G, Newton ILG, Amdam GV. 2012. Characterization of the Active Microbiotas Associated with Honey Bees Reveals Healthier and Broader Communities when Colonies are Genetically Diverse. *PLoS ONE* [online]. **7**(3) [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1371/journal.pone.0032962. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0032962>

Mondragón-Parada, M.E., Nájera-Martínez, M., Juárez-Ramírez, C. *et al.* Lactic acid bacteria production from whey. *Appl Biochem Biotechnol* **134**, 223–232 (2006). <https://doi.org/10.1385/ABAB:134:3:223>

Moran NA, Kwong WK. 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*. **14**(6), 374-384. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.43. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.43>

Olofsson TC, Vásquez A. 2008. Detection and Identification of a Novel Lactic Acid Bacterial Flora Within the Honey Stomach of the Honeybee *Apis mellifera*. *Current Microbiology* [online]. **57**(4), 356-363 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1007/s00284-008-9202-0. ISSN 0343-8651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-008-9202-0>

Pescuma M, Hébert EM, Mozzi F, Font de Valdez G. 2010. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **141**(1-2), 73-81 [cit. 2020-03-14]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510002217>

Ptaszińska AA, Borsuk G, Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M, Małek W. 2016. Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee nose mosis? *Parasitology Research* [online]. **115**(1), 397-406 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1007/s00436-015-4761-z. ISSN 0932-0113. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-015-4761-z>

Rada V, Havlík J, Flesar J. 2009. Biologicky aktivní látky ve výživě včel. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha – Uhřetěves.

Raymann K, Moran NA. 2018. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science* [online]. **26**, 97-104 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1016/j.cois.2018.02.012. ISSN 22145745. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214574517301761>

Rivera-Espinoza Y, Gallardo-Navarro Y. 2010. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* [online]. **27**(1), 1-11 [cit. 2020-03-14]. DOI: 10.1016/j.fm.2008.06.008. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002008001111>

Rothman JA, Leger L, Kirkwood JS, McFrederick QS, Stabb EV. 2019. Cadmium and Selenate Exposure Affects the Honey Bee Microbiome and Metabolome, and Bee-Associated Bacteria Show Potential for Bioaccumulation. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **85**(21), e01411-19 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1128/AEM.01411-19. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.01411-19>

Schwartz RS, Moran AN, Evans JD. 2016. Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **113**(33), 9345-9350. DOI: 10.1073/pnas.1606631113. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1606631113>

Shukla M, Kumar Y, Admassu S. 2012. Development of Probiotic Beverage from Whey and Pineapple Juice. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **04**(02), 73-81 [cit. 2020-03-14]. DOI: 10.4172/2157-7110.1000206. ISSN 21577110. Dostupné z: <https://www.omicsonline.org/development-of-probiotic-beverage-from-whey-and-pineapple-juice-2157-7110.1000206.php?aid=10937>

Tian B, Fadhil NH, Powell JE, Kwong WK, Moran NA, Kolter R. 2012. Long-Term Exposure to Antibiotics Has Caused Accumulation of Resistance Determinants in the Gut Microbiota of Honeybees. *MBio* [online]. **3**(6), e00377-12 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1128/mBio.00377-12. ISSN 2150-7511. Dostupné z: <https://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.00377-12>

Vásquez A, Forsgren E, Fries I, Paxton RJ, Flaberg E, Szekely L, Olofsson TC. 2012. Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. *PLoS ONE* [online]. **7**(3) [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1371/journal.pone.0033188. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0033188>

Wang Y-C, Yu R-C, Chou C-C. 2002. Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. *Food Microbiology* [online]. **19**(5), 501-508 [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.1006/fmic.2002.0506. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S074000200290506X>

Weiss K. 2010. Víkendový včelař. Víkend, Český Tešín.

Williams PA, Phillips GO. 2003. GUMS | Food Uses. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* [online]. Elsevier, 2003, 3001-3007 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1016/B0-12-227055-X/00574-5. ISBN 9780122270550. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B012227055X005745>

Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol.* **67**:1613-1617.

Zoznam obrázkov a tabuliek

Obrázok 8: Popis tráviacej sústavy včely a výskytu charakteristickej mikrobioty v jednotlivých úsekoch	12
Obrázok 9: Zastúpenie jednotlivých bakteriálnych skupín v oblasti hindgut u matiek, mladušiek, lietaviek a trúdov	18
Tabuľka 4: Navážky surovín.....	28
Tabuľka 5: Náhľad pripravenej mikrotitračnej doštičky.....	29
Tabuľka 6: Varianty pripravených nápojov pre sensorické hodnotenie.....	30
Tabuľka 4: Charekterizácia použitých bakteriálnych kmeňov pomocou 16S rRNA.....	31
Obrázok 10:Graf rozdielov optickej denzity jamiek po kultivácii včelích mikroorganizmov v médiu (n=2).....	32
Obrázok 11: 1H NMR analýza obsahu zložiek fermentovaného média v mikrotitračných doštičkách po 24h kultivácii <i>B. asteroides</i> pre SPI s 5% prídavkom medu (mg/ml) porovnaná s nefermentovaným ekvivalentom.....	34
Obrázok 12: 1H NMR analýza obsahu zložiek fermentovaného média v mikrotitračných doštičkách po 24h kultivácii <i>B. asteroides</i> pre SPI s 5% prídavkom cukru (mg/ml) porovnaná s nefermentovaným ekvivalentom.....	34
Obrázok 13: 1H NMR analýza obsahu zložiek fermentovaného média v mikrotitračných doštičkách po 24h kultivácii <i>B. asteroides</i> pre Srvátku s 5% prídavkom cukru (mg/ml) porovnaná s nefermentovaným ekvivalentom.....	35
Obrázok 14: 1H NMR analýza obsahu zložiek fermentovaného média v mikrotitračných doštičkách po 24h kultivácii <i>L. helsingborgensis</i> pre Srvátku s 25% prídavkom jablkového džúsu 5% obsahom medu (mg/ml) porovnaná s nefermentovaným ekvivalentom.....	35
Tabuľka 5: Priemerný bodový zisk pre jednotlivé nápoje.....	36