

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Izolácia mikroorganizmov z včelieho tráviaceho traktu
a overenie ich technologických a kultivačných vlastností**

Diplomová práca

Daniel Svatík

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

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

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že svoju diplomovú prácu "Izolácia mikroorganizmov z včelieho tráviaceho traktu a overenie ich technologických a kultivačných vlastností" som vypracoval samostatne pod vedením vedúceho diplomovej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce. Ako autor uvedenej diplomovej práce ďalej prehlasujem, že som v súvislosti s jej vytvorením neporušil autorské práva tretích osôb.

V Prahe, dňa

Daniel Svatík

Pod'akovanie

Rád by som touto cestou poďakoval vedúcemu práce Doc. Jaroslavovi Havlíkovi a Doc. Jiřímu Killerovi, s ktorými som sa počas práce najviac radil a spolupracoval. Ďalej mojim rodičom, príbuzným, Zuzke a skupine blízkých spolužiačok za každú pomoc a podporu, ktorú mi poskytli.

Izolácia mikroorganizmov z včelieho tráviaceho traktu a overenie ich technologických a kultivačných vlastností

Súhrn

Včely sú vďaka opeľovacej činnosti, nespochybniteľne jednou z esenciálnych zložiek moderného, rozmanitého a ekologickejšieho poľnohospodárstva a zároveň úžasným superorganizmom s charakteristickou bakteriálnou populáciou. Domnievame sa, že práve modulácia bakteriálnych pomerov u včiel by mohla podporiť ich imunitu v boji proti patogénom a zlepšiť efektivitu včelej rodiny.

Cieľom mojej práce bolo vyizolovať z včelieho tráviaceho traktu škálu zástupcov skupiny laktobacilov a bifidobaktérii, ktoré sú najčastejšie spájané s pozitívnym vplyvom na hostiteľa, overiť kultivačné vlastnosti baktérii na srvátkovom médiu a pripraviť bakteriálny lyofilizát s definovanou životaschopnosťou bakteriálnych buniek.

Zo šiestich včiel z každej lokality bol extrahovaný celý tráviaci trakt, a po kultivácii zriedeného homogenizátu sme izolovali čisté kolónie. Z 95 izolátov sa pomocou komparatívnej analýzy 16S rRNA génu podarilo identifikovať 35 bakteriálnych kmeňov. Izolovali sme takmer celý včelý „core microbiome“ (Kwong a Moran 2016) a optimalizovali srvátkového médium, tak, aby boli baktérie schopné množiť sa a zároveň, aby peleta bakteriálneho lyofilizátu obsahovalo minimálne množstvo reziduálnej laktózy, ktorá je pre včely toxická (Sylvester 1979).

Pri vybraných 7 kmeňoch (*Lactobacillus kimbladii* (KT3), *Bifidobacterium asteroides* (P1/TP2), *Bifidobacterium asteroides* (D1/TP1), *Bifidobacterium coryneforme* (syn. *Bifidobacterium indicum*) (D1/TP5), *Lactobacillus apis* (P1/MR10), *Lactobacillus melliventris* (P1/MR11) a *Lactobacillus helsinborgensis* (KR10)) bolo počas 48 hodín v srvátkovom médiu zaznamenané zvýšenie množstva životaschopných buniek o minimálne 2 rády. Najviac však o 4 rády pri druhu *L. kimbladii* (KT3).

Médiá boli po fermentácii podrobené stanoveniu zloženia pomocou ¹H-NMR analýzy, ktorá zachytila zmeny koncentrácií látok charakteristických pre fermentačné procesy. Nakoniec bola testovaná schopnosť izolátov prežívať proces lyofilizácie s prídavkom cukorného kryoprotektantu. Ako najvhodnejší kryoprotektant bol zvolený 5% roztok sacharózy.

Experiment prináša pilotný návrh prípravy bakteriálneho lyofilizátu, ktorý bude dôležitou súčasťou ďalších pokusov na prípravu funkčného včelieho probiotického doplnku.

Kľúčové slová: včelie probiotiká, lyofilizácia baktérii, kultivácia, srvátka, core microbiome

Isolation of bacteria from honey bee digestive tract and evaluation of their technological and cultivation properties

Abstract

Thanks to the pollination activity bees are undoubtedly one of the essential components of modern, diverse and more ecological agriculture and at the same time an amazing superorganism with a characteristic bacterial population. We believe that it is the modulation of bacterial conditions in bees that could support their immunity in the fight against pathogens and diseases and improve the efficiency of the bee family.

The aim of our work was to isolate range of bacteria from lactobacilli and bifidobacteria from the bee digestive tract, which are most often associated with a positive effect on the host. Next, verify the culture properties of bacteria in whey medium and prepare a bacterial lyophilisate with defined bacterial cell viability.

We extracted entire digestive tract of six bees from each location, and after culturing the diluted homogenate, we isolated pure bacterial colonies. Out of 95 isolates, 35 of them were identified by comparative analysis of the 16S rRNA gene. We isolated almost the entire bee "core microbiome" (Kwong and Moran 2016) and optimized the whey medium so that the bacteria were able to multiply and at the same time the bacterial lyophilisate pellet contained a minimum amount of residual lactose that is toxic to bees (Sylvester 1979). In selected 7 strains (*Lactobacillus kimbladii* (KT3), *Bifidobacterium asteroides* (P1/TP2), *Bifidobacterium asteroides* (D1/TP1), *Bifidobacterium coryneforme* (syn. *Bifidobacterium indicum*) (D1/TP5), *Lactobacillus apis* (P1/MR10), *Lactobacillus melliventris* (P1/MR11) a *Lactobacillus helsinborgensis* (KR10)) increased viable cells by at least 2 orders over 48 hours. Biggest increase, almost 4 orders, was recorded for *L. kimbladii* (KT3).

After fermentation, the media was subjected to composition determination by ¹H-NMR analysis, which captured changes in the concentration of substances characteristic for the fermentation processes. Finally, the ability of the isolates to survive the lyophilization process with the addition of sugar cryoprotectant was tested. A 5 % sucrose solution was chosen as the most suitable cryoprotectant.

Overall the experiment provides a pilot proposal for the preparation of a bacterial lyophilisate, which will be an important part of further attempts to prepare a functional bee probiotic supplement.

Keywords: honeybee probiotics, bacteria lyophilisation, cultivation, whey, core microbiome

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Ciele práce.....	9
3	Literárna rešerš.....	10
3.1	Význam včiel v ekosystéme.....	10
3.1.1	Opeľovanie.....	10
3.1.2	Krajinotvorba.....	11
3.2	Včelia mikrobiota.....	11
3.2.1	Mikrobióm medového vačku (crop), žalúdku (midgut) a pyloru.....	14
3.2.2	Mikrobióm čreva (hindgut).....	14
3.2.3	Význam a pôsobenie včelej mikrobioty.....	15
3.2.4	Faktory ovplyvňujúce veľkosť a diverzitu včelieho mikrobiómu.....	18
3.3	Včelie probiotiká.....	19
3.4	Využitie a kultivácia mikroorganizmov v potravinárskych technológiách.....	20
3.4.1	Využitie laktobacilov v potravinárskej biotechnológii.....	20
3.4.2	Využitie bifidobaktérii v potravinárskej biotechnológii.....	23
4	Metodika.....	24
4.1	Odber včiel a izolácia obsahu čreva.....	24
4.2	Klasifikácia izolátov laktobacilov a bifidobaktérií.....	25
4.3	Príprava srvátkového média.....	25
4.3.1	Stanovenie aktivity laktázy.....	26
4.4	Testovanie rastového potenciálu vybraných bakteriálnych druhov.....	26
4.5	Testovanie možností lyofilizácie bakteriálnej biomasy.....	27
4.6	Testovanie životaschopnosti lyofilizátu pridaného do medocukrového cesta podávaného včelám po 5 mesiacoch od prípravy.....	27
5	Výsledky.....	28
5.1	Klasifikácie izolátov na základe komparatívnej analýzy 16S rRNA génu.....	28
5.2	Stanovenie aktivity laktázy.....	29
5.3	Výsledky nárastov jednotlivých bakteriálnych druhov.....	30
5.4	Stanovenie zloženia fermentovaného srvátkového média.....	31
5.5	Prežívanie baktérii proces lyofilizácie.....	33
5.5.1	Lyofilizácia s kryoprotektívnym roztokom glukózy a sacharózy.....	33
5.5.2	Lyofilizácia bez kryoprotektantu, s kryoprotektívnym 5% roztokom glukózy alebo 5% roztokom sacharózy.....	34
5.6	Prežívanie lyofilizovaných baktérii v medocukrovom ceste po 5 mesiacoch od prípravy.....	34

6 Diskusia	35
6.1 Izolácia zástupcov včelieho „core microbiome“	35
6.2 Príprava srvátkového média a stanovenie aktivity laktázy	35
6.3 Nárasty bakteriálnej biomasy v srvátkovom médiu.....	36
6.3.1 Využívanie substrátov a produkcia metabolitov jednotlivých druhov	36
6.4 Lyofilizácia bakteriálnej biomasy	37
6.5 Stanovenie prežívajúcich buniek v medo cukrovom ceste po 5 mesiacoch od prípravy	38
7 Záver	40
8 Literatúra	41
Zoznam obrázkov, grafov a tabuliek.....	48

1 Úvod

Pre väčšinu populácie včely predstavujú hlavne zisk rozmanitých včelích produktov. Ich najväčší význam však spočíva v opeľovacej a krajinotvornej činnosti. Zaujímavú rolu môžu hrať aj v potravnom reťazci niektorých predátorov.

Z času na čas sa však vplyvom ochorení, často prenášaných roztočom *Varroa destructor*, vyskytnú mohutné zimné straty hlavne v nedostatočne preliečených rodinách (Gray a kol. 2019). V neliečených včelstvách v dôsledku oslabenia imunity dochádza k zmenám bakteriálnych pomerov a zvyšuje sa tak aj tlak patogénov. Negatívnym faktom by v dnešnej dobe mohla byť aj častá pozícia úľu, v až príliš jednostranne orientovanej poľnohospodárskej krajine s nedostatkom rozmanitej včelej potravy počas celého roka.

Domnievame sa, že jednou z možností ovplyvnenia včelej imunity by mohla byť podobne ako pri iných živočíšnych druhoch suplementácia ich potravy prirodzenými črevnými baktériami. Konkrétne sa jedná o zástupcov skupín laktobacilov a bifidobaktérii, ktoré sa aj pri iných živočíšnych druhoch preukázateľne považujú za jedny z najvýraznejšie pôsobiacich modulátorov imunity.

Kultivácia spomenutých bakteriálnych skupín na overených kultivačných médiách nieje problémom. Veľmi zaujímavou alternatívou sa však javí kultivácia izolovaných bakteriálnych druhov na modifikovaných potravinárskych médiách, konkrétne srvátke. Srvátka je ako odpadový produkt z výroby syra veľmi lacný materiál s relatívne vhodným zložením na bakteriálne kultivácie. Fermentovaná srvátka by sa navyše po oddelení bakteriálnej biomasy mohla ďalej uplatniť na trhu s fermentovanými kyslomliečnymi nápojmi.

2 Ciele práce

Cieľom diplomovej práce bolo izolovať a klasifikovať, čo najrozmanitejšie zastúpenie laktobacilov a bifidobaktérii z tráviacich traktov včiel *Apis mellifera*, patriacich do takzvaného včelieho „core microbiome“ (Kwong a Moran 2016). Konkrétne sem patria zástupcovia skupín Firm-4 (*L. mellifer*, *L. mellis*), Firm-5 (*L. apis*, *L. helsingborgensis*, *L. melliventris*, *L. kimbladii*, *L. kullabergensis*) a v menšom zastúpení bifidobaktérie (*B. asteroides*, *B. indicum* (syn. *B. coryneforme*). Predpokladá sa, že uvedené skupiny baktérii môžu mať na svojho hostiteľa výrazne priaznivý účinok, ktorý by sa vďaka nožnej fortifikácii včelej potravy bakteriálnymi lyofilizátmi dal ešte umocniť, a ovplyvniť tak ich imunitu.

Druhým cieľom bolo overiť kultivačné vlastnosti izolátov na srvátkovom médiu a optimalizovať proces získania a následnej lyofilizácie bakteriálnej biomasy s cieľom zachovania, čo najvyššej životaschopnosti buniek.

3 Literárna rešerš

3.1 Význam včiel v ekosystéme

3.1.1 Opeľovanie

Pravdepodobne najdôležitejšou funkciou včiel v ekosystéme je opeľovanie rastlín. Opeľovaciu činnosť samozrejme nemajú na starosti iba „domestifikované“ včely *Apis mellifera* ale aj ostatní zástupcovia a príbuzní. Avšak, vzhľadom k technike chovu tohoto druhu je momentálne vzťah medzi chovanými včelami a rastlinami najintenzívnejší. Vzťahy medzi rastlinami a opeľovačmi môžu byť jednými z ekologicky najdôležitejších interakcií medzi živočíchmi a rastlinami: bez opeľovačov by mnohé rastliny nemohli vytvoriť semená a rozmnožovať sa, a bez rastlín, ktoré by poskytovali peľ, nektár a iné odmeny, by mnohé populácie zvierat klesli s následnými vedľajšími účinkami pre iné druhy. Okrem toho sa biotické opeľovanie považuje za kľúčový faktor pri diverzifikácii niektorých veľkých skupín rastlín a živočíchov (Ollerton a kol. 2011).

Hoci plodiny s najvyšším objemom produkcie na svete (ryža, kukurica a pšenica) nie sú závislé od opeľovania zvieratami, viac ako tretina rastlinnej produkcie závisí od opeľovačov a približne 75 % všetkých druhov plodín v rôznej miere z opeľovania profituje, vrátane väčšiny zeleniny, ovocia a korenín. V prípade obzvlášť cenných plodín, ako je vanilka alebo kakao, sa ručné opelenie používa na nahradenie prirodzených ekosystémových služieb. Potreba manuálneho opelenia je vyvolaná absenciou vhodných opeľovačov mimo pôvodného prostredia (Lautenbach a kol. 2012).

Do akej miery sa plodiny závislé od opelenia spoliehajú na hmyzích opeľovačov sa značne líši, napríklad výnos repky olejnej (*Brassica napus*) sa môže zvýšiť o 18 %, pri jahodách sa môže výnos zvýšiť o viac ako 70 %, a výťažok makadámiových orechov (*Macadamia integrifolia*) dokonca až o 185 % po opelení hmyzom. Plody, ktoré boli pri jablkách odrody Gala opelené hmyzom mali väčšinou kvalitnejšiu konzumnú časť a obsahovali v jadrovníku viac semien (Weber a kol. 2020).

Podľa Juríka (1979) jedna včela navštívi a opelí v priebehu jedného dňa asi 720 kvetov, pri dobrých poveternostných a vzdialenostných podmienkach. Pri 3700 lietavkách v jednom včelstve (jarné obdobie) ide o denný výkon 2,6 milióna kvetov.

3.1.2 Krajinotvorba

Včely a včelie úle sú súčasťou tuzemskej histórie od nepamäti. Prvé historické písomné správy o chove včiel, vosku a medovine na našom území sú z Priscovej správy pre Atillu z 5. storočia n. l., ďalej cestopisy arabských obchodníkov z 9. až 10. storočia, ktorí píše o chove včiel u Slovanov, Rafelstettský colný tarif zmieňujúci vývoz vosku z Čiech z 10. storočia, alebo donačné listiny z obdobia 11. až 13. storočia. Od 10. storočia sa chov včiel na území ČR značne rozširoval (Veselý a kol., 1985).

V uplynulých desaťročiach bola poľnohospodárska krajina využívaná hlavne na maximálnu produkciu obilnín a iných veľkoplošne pestovaných monokultúr. Tieto systémy so sebou priniesli aj značné potlačenie biodiverzity a redukciu prítomných zástupcov živočíšnej aj rastlinnej ríše (Dudley a Alexander 2017).

Aj vďaka včelám sa v posledných rokoch vytvára priestor a podpora pre vytváranie tzv. biopásov, ktoré majú na veľkých parcelách tvoriť útočisko a byť zdrojom potravy pre rôzne druhy hmyzu. Veľmi dôležitá rola včiel spočíva aj v ich zaradení v potravinovom reťazci pre včelích predátorov akými sú napríklad pestrofarebné jedince včelárika zlatého (*Merops apiaster*) (Arbeiter a kol. 2014). V neposlednom rade sú včely silnou inšpiráciou a edukatívnym prvkom pre deti, u ktorých môže práve kontakt s takýmto superorganizmom vzbudiť záujem o biologické vedy a zlepšovanie svojho životného prostredia.

3.2 Včelia mikrobiota

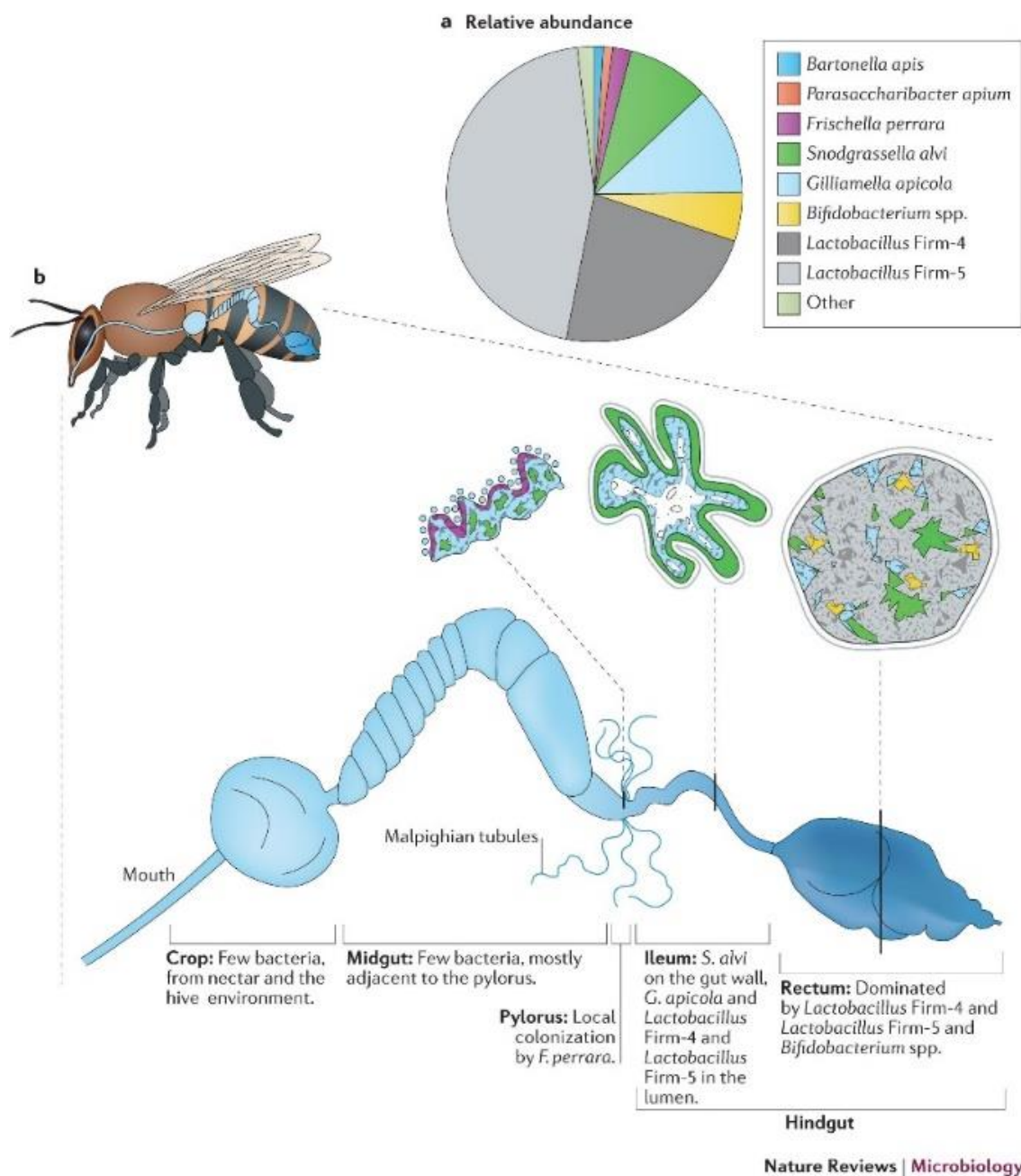
Tak ako aj pri iných organizmoch, tak aj pri voľne žijúcich včelách, je ich život neodmysliteľne spätý s prítomnosťou rôznych bakteriálnych druhov vyskytujúcich sa, či už na povrchu ich tiel alebo v tráviacej sústave. Väčšina týchto organizmov v živote včiel zohráva určitú úlohu, či už v kladnom alebo negatívnom zmysle. Unikátnym faktom je, že jednotlivé včely patriace do rovnakých kást majú v rámci rodiny v podstate rovnaké mikrobiálne osídlenie, čo je spojené s veľmi tesnými väzbami v kolónii. Rozdiely boli medzi kastami zaznamenané hlavne v pomernom zastúpení jednotlivých bakteriálnych skupín (Kapheim a kol. 2015).

Organizmy žijúce v živočíšných tráviacich sústavách sa podieľajú na trávení potravy, detoxikácii škodlivých molekúl (Rothman a kol. 2019), svojim pôsobením môžu sprístupňovať, premieňať, alebo poskytovať esenciálne živiny, pôsobiť antagonisticky na patogény a parazity a podieľať sa na vývoji imunity jedinca (Kwong a Moran 2016). Črevným spoločenstvám dominujú zástupcovia baktérii ale prítomný bývajú aj zástupcovia skupín archea, vírusov,

prvkov a húb. Narušenie podielu jednotlivých charakteristických zástupcov môže vyústiť až do narušenia homeostázy a následnej zmeny zdravotného stavu hostiteľa. Pochopenie príčin zmien črevnej dysbiózy by mohlo viesť k pochopeniu vzniku niektorých ochorení. Zatiaľ čo rozmanité črevné spoločenstvá cicavcov obsahujú funkčnú redundanciu, ktorá môže tmiť posuny v zložení, hmyz má zvyčajne oveľa nižšiu diverzitu mikrobov, a preto môže byť oveľa ľahšie postihnutý (Schwartz a kol. 2016). Takáto úzka mikrobiálna diverzita bola spôsobená pravdepodobne veľmi vysokou výživovou špecifikáciou včiel, čo umožnilo prispôbenie týchto pár hlavných bakteriálnych skupín (Bonilla-Rosso a kol. 2018).

Včelíu črevnú mikrobiotu tvorí 5 hlavných bakteriálnych skupín a 4 menej zastúpené bakteriálne druhy, ktoré sa súhrnne nazývajú „core microbiome“. Tieto baktérie u takmer všetkých včelích jedincov *Apis mellifera* 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* (Kwong a Moran 2016).

Jednotlivé baktérie ale nie sú v tráviacom trakte rovnomerne rozmiestené. Vzhľadom k tomu, že tieto skupiny sú špecificky prispôbené na život s ich včelími hostiteľmi, a každý zástupca má menej alebo viac odlišné nároky na prostredie, je ich možné nachádzať len v prene charakteristických častiach tráviaceho traktu, viď obr.1. (Kwong a Moran 2016).



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

Ďalej uvádzajú, že spomínaný bakteriálny predstavitelia patria medzi fakultatívne anaeróbne alebo mikroaerofilné bakteriálne skupiny a ich výskyt mimo včelí tráviaci trakt nie je skoro vôbec zaznamenaný. Na veľmi úzke a silne previazané sociálne interakcie vo včelej kolónii je naviazaný aj generačný prenos „core microbiome“.

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

Najmenej predvídateľnou časťou tráviacej sústavy je hneď jej začiatok. Konkrétne sa jedná o medový vačok (crop), žalúdok (midgut) a zúženinu nazývanú pylorus. Medový vačok je orgán, v ktorom včely skladujú a prepravujú nazbieraný nektár do úľa, kde ho odovzdávajú ďalším sestrám, ktoré ho ďalej spracovávajú. 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). Z medového vačku bývajú izolované len menšie množstvá baktérii aj to väčšinou iných druhov ako tvorí včelí „core microbiome“. Vzhľadom k tomu, že sa jedná o prvú časť tráviaceho traktu, tak sa tu často vyskytujú rôzne oportunitné organizmy, bežne sa nachádzajúce vo vonkajšom prostredí, na peľových zrnách alebo na stenách úľa.

Identifikovaný boli zástupcovia skupiny *Enterobacteriaceae*, ďalej *Lactobacillus kunkei* a *Parasaccharibacter apium*, ktorý môžu byť kultivovaný pri atmosférických koncentráciach kyslíka. Príčinou vysokej premenlivosti bakteriálneho zastúpenia v oblasti môže byť neustála výmena substrátu, ktorá neumožňuje trvalé osídlenie medového vačku a oblasti midgut, ktorá primárne slúži na vstrebávanie živín a je tvorená neustále sa obnovujúcou chitinóznou štruktúrou tzv. peritrophic matrix.

Pylorus je zúženina spájajúca oblasť žalúdka a čreva. V tejto oblasti sa v najvyššom počte vyskytuje *Frischella perrara*, ktorá sa už ale medzi „core microbiome“ zaraďuje (Kwong a Moran 2016).

3.2.2 Mikrobióm čreva (hindgut)

Črevo je pokryté stabilnou vrstvou kutikuly a poskytuje vhodné prostredie pre najväčšie množstvo baktérii. Tento úsek je rozdelený na 2 samostatné časti, ileum (tenké črevo) a rectum (výkalový vak), vid' Obr. 1. (Kwong a Moran 2016, Raymann a Moran, 2018). Aj u väčšiny ostatných živočíchov sa väčšina bakteriálnej biomasy nachádza v poslednej časti čreva. Látky, ktoré hostiteľ nestrávi (polysacharidy), sa hromadia v týchto oblastiach a stávajú sa hlavnými zdrojmi energie, uhlíka a dusíka, ktoré sú dostupné pre prítomnú mikrobiotu.

Hindgut včely medonosnej je domovom jednoduchého, no vysoko špecializovaného bakteriálneho spoločenstva. Skladá sa z piatich základných členov (*Gilliamella apicola*, laktobacily Firm-4 a Firm-5, *Snodgrassella alvi* a *Bifidobacterium asteroides*), ktorý sú typicky prítomný v každej včelej robotnici na celom svete a sú rozdielne distribuované medzi ileum a rectum. Tieto baktérie sa nachádzajú aj u príbuzných včiel, ale zriedkavo boli zistené aj v iných prostrediach, čo naznačuje dlhodobé a špecializované symbiotické asociácie so včelým hostiteľom (Bonnilla-Rosso a kol. 2018). Veľmi podobné informácie uvádza aj

Corby-Harris a kol. (2014), ktorým sa podarilo zachytiť bifidobaktérie u 21 z 23 jedincov. V črevách lietaviek extrahovaných na jar a na jeseň boli zaznamenané minimálne zmeny a vyššie spomenuté bakteriálne skupiny reprezentovalo 94 % až 99 % izolovaných sekvencií.

3.2.2.1 Ileum

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 zastupci skupín lactobacilov. *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 aeróbnú 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 (Kwong a Moran 2016).

3.2.2.2 Rectum

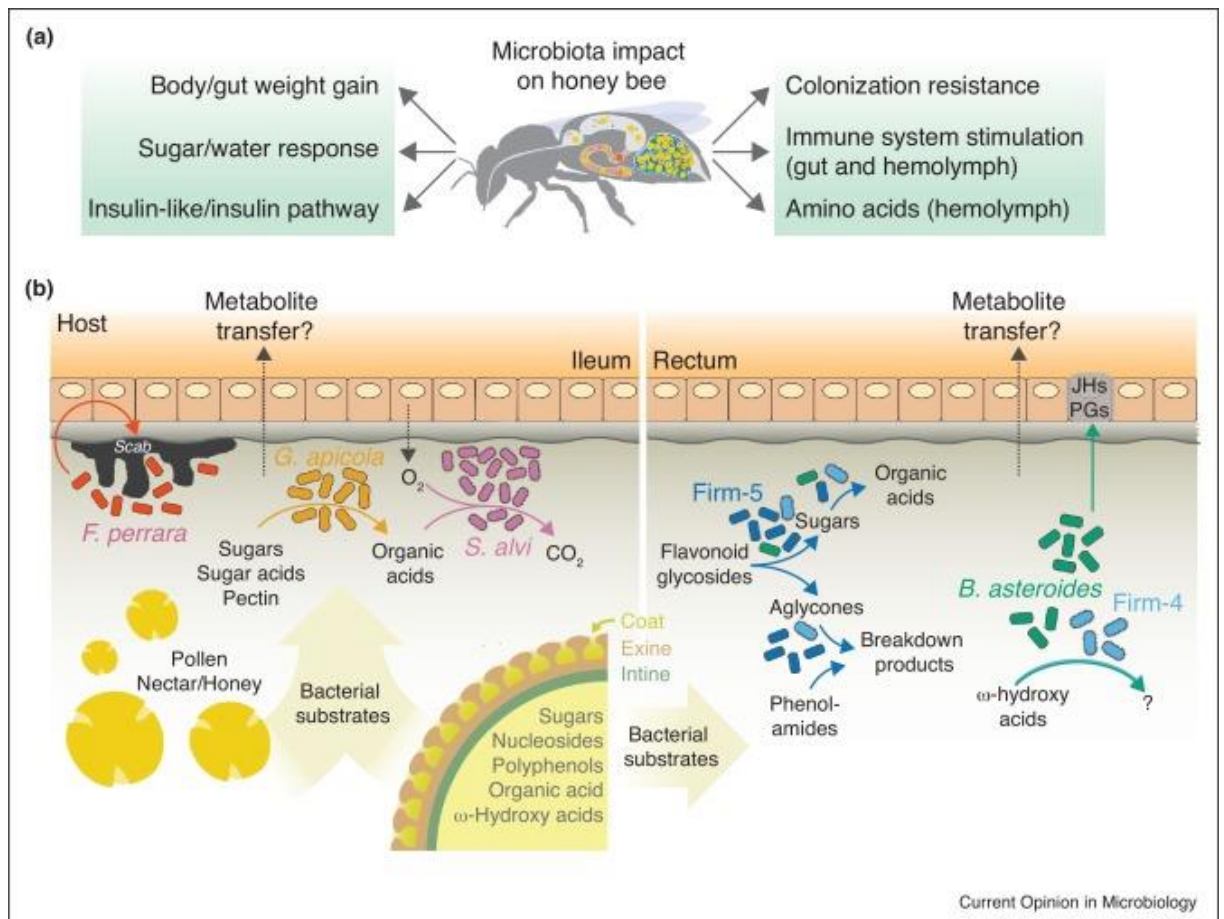
Výkalový vak (rectum) je miesto, kde sa pred defekáciou skladujú nestrávené zložky potravy a dochádza k resorpcii vody a minerálov. V tejto oblasti dominujú fermentatívne G+ baktérie zo skupín *Lactobacillus Firm-4*, *Lactobacillus Firm-5* a *Bifidobacterium asteroides* (Kwong a Moran 2016).

3.2.3 Význam a pôsobenie včelej mikrobioty

Záujem o funkcie a účinky mikrobioty tráviaceho traktu sa v poslednej dobe výrazne tlačí do popredia. Je to práve tým, že zdravá črevná bakteriálna populácia sa podieľa na veľkom množstve metabolických pochodov organizmov a všetky jej účinky doteraz niesú dostatočne pochopené. Ľudský črevný mikrobióm má veľmi dôležitú funkciu v hostiteľovej fyziológii, výžive, modifikuje imunitu, správanie, psychický stav a tvorí bariéru pôsobiacu proti patogénom. Včelia črevná mikrobiota je ale oproti ľudskej veľmi úzko špecializovaná ale jej vlastnosti sú často podobné (prenos sociálnym kontaktom, lokalizácia v tráviacom trakte, využívanie komplexných sacharidov, antagonista patogénov) (Raymann a Moran 2018).

Baktérie tráviaceho traktu sa zúčastňujú zneškodňovania prijatých toxínov, biosyntézy esenciálnych živín alebo trávení niektorých zložiek potravy. Niektoré druhy *Giliamella apicola* sú geneticky vybavené na rozklad pektínov obsiahnutých v bunkových stenách peľových zrn, a to vedie k uvoľneniu v nich obsiahnutých živín. Rozklad pektínu je pre *Apis mellifera* dôležitý aj preto, že je pre ne toxický (Engel a kol.2012). Dokonca sa spomína aj možnosť rozkladu lignínu nachádzajúceho sa tiež v peľových zrnách (Rokop a kol. 2015). Mnohé ďalšie, hlavne enzýmy produkované baktériami mliečneho kvasenia, ako sú celulázy, hemicelulázy a glykozidové hydrolázy, môžu včelám umožniť lepšie využívať energiu v ich strave (Romero a kol. 2019).

Pri viacerých 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), opačný názor však vyjadril Zheng a kol. (2017). Metabolity produkované mikroflórou, ako sú mastné kyseliny s krátkym reťazcom (obr. 2), môžu fungovať ako hlavný zdroj energie pre včely a ako neuroaktívne zlúčeniny, ktoré môžu ovplyvniť funkciu nervového systému.



Obrázok 2. Substráty využívané jednotlivými skupinami baktérii (Bonilla-Rosso a Engel 2018)

Bonilla-Rosso a Engel (2018) uvádzajú, že novovyliahnuté včely normálne kolonizované prirodzenou včelou mikrobiotou vykazovali oveľa lepšie váhové prírastky a nadobudli aj väčšiu hmotnosť ako ich sterilné náprotivky, bez toho aby bol zaznamenaný nejaký rozdiel v prežívaní. Včely s baktériami tiež vykazovali vyššiu afinitu na krmivo cukrovým roztokom a mali aj zvýšenú koncentráciu peptidu podobného inzulínu a vitelogenínu. Práve tieto 2 látky ovplyvňujú životnosť včiel a ich správanie pri hľadaní potravy. Právě príčiny zväčšenia včiel treba ešte objasniť, ale výsledky naznačujú, že mikrobióm reguluje včelý apetít prostredníctvom „inzulínovej signalizácie“.

Vysoké koncentrácie organických kyselín (sukcinát, acetát, propionát) v tráviacom trakte včiel potvrdzujú, že fermentácia je hlavnou metabolickou aktivitou prítomných organizmov. U druhu *Drosophila melanogaster* je dokázané prepojenie zvýšenej koncentrácie acetátu v tráviacom trakte a zvýšenej koncentrácie látky podobnej inzulínu stimulujúcej jedinca ku konzumácii potravy a rastu.

3.2.4 Faktory ovplyvňujúce veľkosť a diverzitu včelieho mikrobiómu

Včelia črevná mikrobiota je ovplyvňovaná mnohými faktormi ako sú stres, imunitné reakcie, vek jedinca, úlohy v kolónii, potravinové zdroje 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 včelieho antioxidantného činidla (Raymann a Moran 2018).

Antibiotiká sa pri včelách podobne ako aj pri iných živočíchoch používajú na potlačenie bakteriálnych patogénov. Sprievodným javom je ale aj vyhubenie prospěšných symbiotických bakteriálnych kmeňov, akumulácia génov rezistencie a zvýšenie počtu jedincov rezistentných na dané liečivo (Tian a kol. 2012). Liečba moru včelieho plodu spôsobeného patogénom *Paenibacillus larvae* je v niektorých krajinách už desaťročia realizovaná podávaním tetracyklínu a u niektorých kmeňov patogénu už bol zaznamenaný vznik rezistencie. Typickým príkladom sú Spojené štáty Americké, kde sa tetracyklím používa vo väčších dávkach (Raymann a Moran 2018). 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).

Expozícia včiel pesticídmi je v našich podmienkach ťažko oddeliteľným faktorom, ovplyvňujúcim zloženie včelieho mikrobiómu. Motta a kol. (2018) uvádza, že jeden z najznámejších pesticídov na celosvetovom trhu, herbicíd glyfosát, ovplyvňuje zloženie včelej mikrobioty. Zaujímavé je, že potláča len určitú časť bakteriálnej komunity. Najväčší vplyv má na populáciu druhu *S. alvi*, ktorý patrí medzi „core microbiome“. Narušenie normálnych bakteriálnych proporcií ale viedlo k zvýšenej náchylnosti na prepuknutie ochorenia. Podobné výsledky zaznamenal aj Kakamanu a kol. (2016), ktorý včelám podával peľ s obsahom fungicídu chlorthalonilu, čo sa prejavilo trojnásobným zvýšením prevalence nosematózy.

Cenná bakteriálna symbióza však môže byť narušená aj oveľa jednoduchším faktorom, ktorým je aj nedostatočná potravinová diverzita v letovom perimetri kolónie. Často sa stáva, že je kolónia obkľúčená len žltými hektármi repky olejnej, ktorá je sice výborným zdrojom nektáru a peľu avšak len pár týždňov v roku. Každý druh peľu má mierne odlišné živinové zloženie,

ktoré ale môže kľúčovo ovplyvňovať bakteriálne proporcie. Preto je pre včely dôležité zbierať peľ z čo najviac rozmanitých druhov rastlín počas celej sezóny (Mattila a kol. 2012).

Samostatnou kapitolou pri hmyze, žijúcom v kolónii je aj kastové zaradenie jedincov konzumujúcich mierne odlišnú potravu a plniacich odlišné funkcie. Kapheim a kol. (2015) skúmali vzťah medzi proporciami symbiontov v oblasti výkalového vaku a sociálnym správaním naprieč rôznymi kastami včiel (matky, trúdy, mladušky-kfmičky, lietavky). U matiek sa ukázalo vysoké zastúpenie baktérie *Parasaccharibacter apium* v porovnaní s ostatnými členmi. Medzi ostatnými kastami boli identifikované rovnaké bakteriálne skupiny avšak bolo zaznamenané ich mierne odlišné zastúpenie.

3.3 Včelie probiotiká

S vývojom včelárskeho výskumu, sa stále častejšie spomína využitie prirodzených včelích črevných bakteriálnych druhov v podobe probiotík. Cieľom takejto suplementácie by v prvom rade mala byť podpora imunity včelstva s cieľom zlepšenia jeho zdravotného stavu a homeostázy a následne aj zvýšenie produktivity (Maryam 2019).

Lamei a kol. (2020) testovali vplyv bakteriálnej zmesi obsahujúcej druhy *Lactobacillus kunkeei* Fhon2N, *Lactobacillus apinorum* Fhon13N, *Lactobacillus mellis* Hon2N, *Lactobacillus mellifer* Bin4N, *Lactobacillus apis* Hma11N, *Lactobacillus helsingborgensis* Bma5N, *Lactobacillus melliventris* Hma8N, *Lactobacillus kimbladii* Hma2N, *Lactobacillus kullabergensis* Biut2N, *Bifidobacterium asteroides* Bin2N, *B. asteroides* Bin7N, *B. asteroides* Hma3N a *Bifidobacterium coryneforme* Bma6N na množstvo spór patogéna *P. larvae* pri jednotlivcoch. Výsledky ukázali, že vyššie uvedené druhy včelích črevných baktérii voči patogénu pôsobia antagonisticky minimálne v prípade jednotlivcov. Zároveň však uvádza, že vzhľadom k výsokej špecifite a komplikovanej sociálnej interakcii včelieho superorganizmu, ktorým celá kolónia je, nieje možné dané výsledky preniesť na celé včelstvo, pri ktorom sa takýto jasný výsledok jednoznačne nepreukázal.

Viac ako dobré in vitro výsledky potvrdzuje aj štúdia Forsgren a kol. (2010), ktorá bola tiež zameraná na potlačenie testovanie antagonizmu medzi veľmi podobnými baktériami mliečneho kvasenie z tráviaceho traktu včiel a patogénom *P. larvae*.

Štúdie, ktoré by dokázali jednoznačne posúdiť vplyv probiotík na vitalitu včelstva však celkovo dosť absentujú, pravdepodobne z dôvodu veľmi náročného posúdenia zmien vo včelstve. Aj napriek absencii jednoznačných dôkazov z praxe je možné na trhu nájsť niekoľko produktov deklarujúcich obsah živých probiotických baktérii, ktorých druh však nieje bližšie

špecifikovaný. Jedná sa napríklad o produkt EM-KIN, probiotikum pre včely. Dostupné na: <https://bit.ly/3tQBnLl>

3.4 Využitie a kultivácia mikroorganizmov v potravinárskych technológiách

Fermentované potraviny majú veľký význam, pretože poskytujú a konzervujú obrovské množstvá potravín širokej škály chutí, vôní a textúr obohacujúcich ľudskú stravu. Fermentované potraviny sú tu s nami už od prvej existencie človeka na planéte. Pravdepodobne tu s nami budú aj v ďalekej budúcnosti, pretože medzi ne patria rôzne produkty, ktoré sú súčasťou každodenného života. Patria sem skupiny jako octy, nakladaná zelenina, údeniny, syry, jogurty, rastlinné fermentované omáčky plné aminokyselín, pečivo z kváskového cesta, alkoholické nápoje a ďalšie. Zatiaľ čo západný svet si môže dovoliť fortifikovať potraviny syntetickými vitamínmi a konzervovať napr. mrazením, rozvojový svet sa musí spoliehať skôr na biologický spôsob konzervácie zabezpečený fermentáciou (Steinkraus 1997).

V potravinárskych systémoch zameraných na fermentačné procesy a technológie sa využívajú najčastejšie kvasinky, baktérie mliečneho kvasenia a v niektorých prípadoch plesne. Význam kvasiniek je hlavne v procesoch výroby alkoholických nápojoch a pekárenských technológiách.

Baktérie mliečneho kvasenia zasa bývajú najčastejšie spájané s produkciou fermentovaných mliečnych výrobkov a syrov, fermentovanej zeleniny, fermentáciou kávy a ďalších. Medzi najvýznamnejších zástupcov patria baktérie zo skupiny *Lactobacillus*, *Lactococcus* a *Streptococcus*. Pri fermentácii zameranej na produkciu kys. citrónovej, alebo sójovej omáčky sa používajú plesne rodu *Aspergillus*. Zaujímavou skupinou sú bifidobaktérie, ktoré sa označujú za symbiotické mikroorganizmy poskytujúce hostiteľovi značné výhody. Ich použitie je ale vzhľadom na ich relatívne vyššiu citlivosť na prostredie limitované, a ich prítomnosť napr. v jogurte je zabezpečená priamym prídavkom pripravenej biomasy. V nasledujúcom texte sa budeme venovať hlavne technologickému využitiu laktobacilov a bifidobaktérii v potravinárskych systémoch.

3.4.1 Využitie laktobacilov v potravinárskej biotechnológii

Laktobacily sa už podľa svojho názvu prirodzene spájajú s mliečnymi výrobkami a hlavne s tvorbou kyseliny mliečnej. Vzhľadom k rozširovaniu rôznych potravinových intolerancií a alergií na zložky mlieka, nachádzajú svoje uplatnenie aj pri fermentácii iných rastlinných substrátov alebo odpadových produktov napr. zo syrárskeho priemyslu, za účelom

zhodnotenia týchto materiálov na potraviny so zaujímavým nutričným a senzorickým potenciálom.

3.4.1.1 Fermentácia rastlinných substrátov

Karovičová a kol. (2020) testovali možnosť fermentácie a konzumentskú prijateľnosť nápoja pripraveného z múky merlíku čílskeho a vody. Na fermentáciu bola použitá komerčná zmesná kultúra obsahujúca baktérie *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus acidophilus*, a *Streptococcus thermophilus*. Po 6 hodinách fermentácie boli vzorky skladované 21 dní v chladničke. Senzorické testy však nepotvrdili dostatočne dobrú konzumentskú prijateľnosť, zlepšenie nastalo až pri podaní vzorky ochutenej malinovým sirupom. Prežívanie baktérii sa pohybovalo na úrovni 10^6 KTJ/ml a bolo zaznamenané zvýšenie antioxidačnej aktivity nápoja, ktorý by mohol tvoriť zaujímavý artikel pre ľudí trpiacich celiakiou alebo laktózovou intoleranciou.

Angelescu a kol. (2019) izolovali baktérie z tradičného rumunského fermentovaného nápoja nazývaného braga a vodného kefíru. Braga je fermentovaný nápoj pripravený z prosa, pšeničných otrúb alebo kukuřičného šrotu. Podarilo sa vyizolovať *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, a *Lactobacillus delbrueckii*. Z vodného kefíru boli izolované druhy *Lactobacillus satsumensis*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus ghanensis*, *Lactobacillus harbinensis*, *Lactobacillus plantarum*. Pri porovnaní vlastností uvedených druhov bola väčšina schopná inhibovať niektoré G+ aj G- patogény (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, a *Salmonella enterica*). Na základe ich antimikrobiálnej aktivity a dobrej odolnosti voči nízkemu pH a vysokým koncentráciám žlčových solí, ako aj na základe ich dobrého prežívania v podmienkach simulujúcich prechod gastro-intestinálneho traktu sa laktobacily izolované z vodného kefíru zdajú byť sľubnými kandidátmi na výrobu probiotických produktov. Konkrétne sa jednalo o *L. plantarum* BR9, izolovaný z bragy, a *L. plantarum* CR1 z kefíru.

Podobný prístup využili aj Luana a kol. (2014), ktorý pripravili suspenziu ovsených vločiek a vody fermentovanú *L. plantarum* LP09, ktorá mala charakteristiky podobné jogurtu. Podobné výrobky, napríklad aj z vločiek naklíčeného ovsa, sa výrazne pretláčajú do popredia aj na českom trhu.

Okrem spomínaných substrátov a produktov boli laktobacili izolované aj napríklad v nápoji „boza“ vyrobeného z prosa pôvodom z oblasti Albánska a Rumunska. V oblasti Egypta a Sýrie sa nachádzajú napríklad v nápoji „busa“ z prosa alebo ryže. V Thajsku sa

podobný nápoj z ryže nazýva „khanomjeem“ a mnohé ďalšie zo substrátov tradične dostupných v rôznych častiach sveta (Blandino a kol. 2003).

3.4.1.2 Fermentácia živočišných substrátov

Zo živočišných substrátov má najväčší potenciál a podiel na fermentácii laktobacilmi určite mlieko. Laktobacili sa využívajú aj pri výrobe trvanlivých tepelne neošetrených fermentovaných mäsových výrobkov za cieľom predĺžiť ich udržnosť znížením pH sprevádzaným charakterickými senzorickými vlastnosťami.

Obrovský potenciál ale nesie srvátka ako lacný odpadový produkt z výroby syra. Srvátka predstavuje asi 85-90 % objemu mlieka, použitého pri výrobe syrov. 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). Na trhu však v podstate neexistuje výrobok založený na fermentácii srvátky. Veľmi obmedzene dostupné sú aj nefermentované srvátkové nápoje.

Shukla a kol. (2013) testovali kombinácie srvátky a ananásového džúsu, s baktériou *Lactobacillus acidophilus*. V konzumentskom teste sa najlepšie ukázal pomer srvátky a džúsu 65:35 fermentovaný 5 hodín. Dobrá životaschopnosť baktérii sa potvrdila aj po 28 dňoch skladovania pri 5 °C. Nursiwi a kol. (2017) testovali fermentáciu srvátky s 5-15% prídavkom rajčinového džúsu. Na fermentáciu prebiehajúcu 18 hodín využili *L. acidophilus* a *L. plantarum*. Senzorické testy ukázali, že najlepší konzumentský potenciál mala varianta s 5% obsahom štavu, počas fermentácie sa zvýšil aj obsah polyfenolov v nápoji.

3.4.1.3 Malolaktická fermentácia

Menej známym využitím laktobacilov je proces malolaktickej fermentácie prebiehajúcej najčastejšie v červených vínach alebo niektorých cideroch s vysokým obsahom kyseliny jablčnej s cieľom jej premeny na kyselinu mliečnu, ktorá má prijateľnejší senzorický profil. Výroba vína bežne zahŕňa dva hlavné fermentačné procesy: alkoholovú fermentáciu vykonávanú kvasinkami a malolaktickú fermentáciu (MLF), ktorá prebieha v réžii baktérii mliečneho kvasenia (LAB). MLF je nevyhnutná pre takmer všetky červené vína a niektoré biele vína, najmä tie, ktoré zrejú v sude alebo vo fľaši. MLF zlepšuje kvalitu a stabilitu týchto vín. LAB vo víne nerastie v rovnakom čase ako kvasinky, ale začína sa množiť až po fáze

alkoholového kvasenia. MLF vyvoláva dramatickú zmenu v organoleptickej kvalite vín vplyvom odkysenia spôsobeného premenou kyseliny jablčnej (Lonvaud-Funel 1995).

Najbežnejšie používanou štartovacou kultúrou MLF je *Oenococcus oeni* používaný v komerčne dostupnej štartovacej kultúre. Existuje ale aj minimálne 17 zástupcov laktobacilov, ktoré sú spojené s niektorým procesom výroby vína. Štúdie za najlepšie enologické laktobacily svojou aktivitou podobné *O. oeni* považujú *L. plantarum* a *L. hilgardii* (Du-Toit a kol. 2010), (Krieger-Weber a kol. 2020).

3.4.2 Využitie bifidobaktérii v potravinárskej biotechnológii

Bifidobaktérie sú dôležitou skupinou probiotických kultúr bežne sa využívajúcich vo fermentovaných mliečnych výrobkoch. Skupina bifidobaktérii tvorí veľkú časť baktérií nachádzajúcich sa v ľudskom tráviacom trakte. Predpokladá sa, že svojim hosťiteľom prináša množstvo benefitov, akými sú zlepšenie stráviteľnosti laktózy, rôzne antikancerogénne účinky, produkcia vitamínov skupiny B, alebo zníženie hladiny cholesterolu.

V porovnaní s baktériami mliečneho kvasenia, však majú často horšie behaviorálne charakteristiky, čo ich použitie mierne obmedzuje. Bežne majú veľmi pomalý rast, čo predlžuje fermentačnú dobu, vyžadujú striktné anaeróbne podmienky a nízky redoxný potenciál (Prasanna a kol. 2014). Vzhľadom k tomu, že bifidobaktérie majú heterofermentatívny metabolizmus, okrem kyseliny mliečnej produkujú aj kyselinu octovú, je vhodné ich do výrobku primiešať vo forme dopredu pripravenej živej biomasy aby bola minimalizovaná koncentrácia nežiadúcej kyseliny octovej vo finálnom výrobku.

Najbežnejšie používanými druhmi sú *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. breve* a *B. longum* biotyp *infantis* a *longum* (Masco a kol. 2005). Štandardným parametrom výrobkov s obsahom bifidobaktérii je minimálny obsah živých baktérii na konci dátumu spotreby v množstve minimálne 10^7 KTJ v grame alebo mililitri výrobku.

4 Metodika

4.1 Odber včiel a izolácia obsahu čreva

Na izoláciu boli odobraté včely druhu *Apis mellifera* zo štyroch lokalít zo širšieho okolia Prahy (Dol, Postřižín, Kralupy nad Vltavou a Větrušice). Včely boli transportované v klietkach (Príloha 1), s medocukrovým cestom a ihneď po transporte do LAM (Laborať Anaerobní Mikrobiologie) ÚŽFG (Ústavu živočišné fyziologie a genetiky) AV ČR, v.v.i. omráčené CO₂ a usmrtené. 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, GB) obsahujúcej 1,8 mL sterilného, modifikovaného anaeróbného 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 × 6 H₂O; 0,2 cystein × 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 robotníč homogenizované a alikvotne nariadené desiatkovým systémom sústavou skúmaviek, ktoré obsahovali zhodný objem bujónu. Nariadené vzorky o objeme 0,2 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, GB), modifikovaného TPY agaru (Killer a kol., 2011) a Rogosa agaru (Oxoid, GB) so zložením: trypton 10 g/L, kvasničný extrakt 5 g/L, glukóza 20 g/L, KH₂PO₄ 6 g/L, citrát amonný 2 g/L, acetát sodný 17 g/L, MgSO₄ 0.6 g/L, MnSO₄ 0,12 g/L, agar 15 g/L, za anaeróbných podmienok (vyvíjač anaeróbnej atmosféry AnaeroGen™ 3.5L; Oxoid, GB) v 3,5L anaerostatu (Anaerobic jar, Oxoid, GB) 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 95 izolátov bolo vyselektovaných pre účely klasifikácie 42 z nich, u ktorých bola preukázaná čistota a zároveň morfológia typická pre laktobacily (zjednodušene pravidelné tyčinky vyskytujúce sa jednotlivo, v dvojiciach či krátkych reťazkách) a bifidobaktérie

(nepravidelné kratšie či dlhšie, občas vetvené tyčinky dosahujúce najčastejšie kyjovitý tvar a tvary pripomínajúce písmená Y a X; taxóny obývajúce tráviaci trakt opel'ovačov navyiac často tvoria v tekutých rastových médiách viacmenej rozsiahle zhluky buniek – tzv. autoagregáty).

4.2 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, GB) 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– 630R, konkrétne PCR podmienky: (94 °C/5 min) 1×, (94°C/45 s, 52°C/1 min, 72°C/90 s) 32×, (72 °C/5 min) 1× a fD1 – rP2, konkrétne podmienky: : (94 °C/5 min) 1×, (94°C/45 s, 52°C/1 min, 72°C/90 s) 33×, (72 °C/7 min) boli použité pre amplifikáciu takmer kompletnej sekvencie 16S rRNA génu.

PCR reakcie v objeme 30 µL pozostávali z 1× 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, CZ), 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 Monarch PCR & DNA Cleanup Kit 250 preps. (New England BioLabs Inc., GB) podľa inštrukcií výrobcu a sekvenované z oboch strán, tj. pomocou oboch primérov, v spoločnosti SEQme company (CZ). Kompletné sekvencie boli rutinne zostavené v programe Geneious version 7.1.7 software (Biomatters, NZ). Výsledné sekvencie boli vložené do databázy EzBioCloud volne 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.

4.3 Príprava srvátkového média

Na kultiváciu bola použitá sladká srvátka fortifikovaná srvátkovým proteínom Impact whey protein (MyProtein, GB) v koncentrácii 5 g/L. V srvátke bol pomocou enzýmu beta-

galaktosidázy MAXILACT® LGI 5000 (DSM, FR), s obsahom 5000 laktázových jednotiek na ml prípravku, znížený obsah laktózy pod 1 g/L. V takto pripravenej srvátke boli následne zaistené anaeróbne podmienky vytesnením atmosférického O₂ pomocou CO₂ z tlakovej fľaše. Srvátka bola následne v autokláve vystretilovaná (107 °C/ 50 minút) v plastových kónických skúmavkách.

4.3.1 Stanovenie aktivity laktázy

Vzhľadom k nedostupnosti informácií o aktuálnej aktivite laktázy MAXILACT® LGI 5000 (DSM, FR) bolo potrebné stanoviť jej aktivitu. Do vzoriek bol pridaný enzým v koncentrácii 1 ml/L a pretrepávaný v termostate pri 37 °C. Jednotlivé vzorky boli následne po 30, 60, 120 a 240 minútach povarené (10 min/ 100 °C), s cieľom inaktívácie enzýmu a reziduálny obsah laktózy bol stanovený pomocou ¹H nukleárnej magnetickej rezonancie (1H NMR).

¹H NMR analýza zloženia bola vykonaná 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 tlmáč, 1.5M, pH 4.0, 0.2 % NaN₃ and 5 mM TSP). Spektrá boli snímané 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 (Chenomx Inc., CAN), ktorý bol tiež použitý na kvantifikáciu metabolitov.

4.4 Testovanie rastového potenciálu vybraných bakteriálnych druhov

Pre testovanie schopností množiť sa v pripravenom srvátkovom médiu bolo vybraných 7 klasifikovaných taxónov, väčšinou patriacich medzi tzv. core microbiome včely medonosnej (Kwong a Moran 2016). Jednalo sa o izoláty *Lactobacillus kimbladii* (KT3), *Bifidobacterium asteroides* (P1/TP2), *Bifidobacterium asteroides* (D1/TP1), *Bifidobacterium coryneforme* (D1/TP5), *Lactobacillus apis* (P1/MR10), *Lactobacillus melliventris* (P1/MR11), *Lactobacillus helsingborgensis* (KR10).

Po zaočkovaní 1 ml dobre narastenej kultúry do 9 ml syrovátkového média boli skúmavky ponechané v termostate pri 37 °C po dobu 46 hodín. Zároveň počas očkovania srvátkového média prebehlo aj stanovenie počtu životaschopných baktérií v očkovanej dávke doskovou kultivačnou metódou uvedenej v kapitole 4.1. Po ukončení fermentácie bol doskovou kultivačnou metódou opätovne stanovený počet životaschopných buniek. Srvátkové média boli

po odstredení bakteriálnej biomasy (10000 otáčiek/ 10 min.) podrobené stanoveniu zloženia pomocou ^1H NMR analýzy s cieľom identifikovať primárne metabolity.

4.5 Testovanie možností lyofilizácie bakteriálnej biomasy

Po fermentácii boli skúmavky centrifugované za účelom vytvorenia bakteriálnej pelety (viď. Prílohu 2). Vzhľadom k maximalizácii prežívania bakteriálnych buniek proces lyofilizácie bolo potrebné k biomase pridať kryoprotektant.

Ako kryoprotektanty boli testované sterilné cukorné roztoky glukózy (5 %) a sacharózy (5 %) alebo ich kombinácia (15% glukóza + 10% sacharóza) prebubláné CO_2 , ktoré boli pridávané približne v množstve dvojnásobku hmotnosti bakteriálnej pelety. Peleta bola následne asepticky resuspendovaná a vytvorená suspenzia bola zmrazená pri $-80\text{ }^\circ\text{C}$, po dobu minimálne 4 hodín. Po vytiahnutí z mrazničky boli skúmavky úrychlene otvorené a vložené na noc (18 hodín) do lyofilizéra. Nakoniec boli v lyofilizátoch (príloha 3) stanovené počty životaschopných buniek pomocou riediacej rady a doskovej kultivačnej metódy v MRS agare uvedenej v kapitole 4.1.

4.6 Testovanie životaschopnosti lyofilizátu pridaného do medocukrového cesta podávaného včelám po 5 mesiacoch od prípravy

Pripravené lyofilizované bakteriálne pelety boli primiešané do sterilného medocukrového cesta, ktoré bolo následne v ďalších experimentoch podávané včelám. Nespotrebované vzorky tohoto cesta boli skladované približne 5 mesiacoch v mrazáku pri $-18\text{ }^\circ\text{C}$ a boli podrobené kultivačnému doskovému stanoveniu počtu preživších baktérií v MRS agare, spôsobom uvedeným v kapitole 4.1.

5 Výsledky

5.1 Klasifikácie izolátov na základe komparatívnej analýzy 16S rRNA génu

Z 95 izolátov bolo vyselektovaných pre účely klasifikácie 42 z nich. Jednotlivé izoláty boli poslané do spoločnosti SEQme company (CZ), na sekvenáciu 16s rRNA génu, kódujúcu ribozomálnu RNA malej podjednotky ribozómu. Podarilo sa získať 35 sekvencií 16s rRNA génu (vid'. Tabuľka1). Podarilo sa izolovať dostatočne široké spektrum baktérii včelej mikrobioty a väčšinu zátupcov skupiny „core microbiome“ (Kwong a Moran 2016). Ako pre nás najzaujímavejšie izoláty boli pre ďalšie pokusy vybrané bakteriálne kmene *L. kimbladii* (KT3), *B. asteroides* (P1/TP2), *B. asteroides* (D1/TP1), *B. coryneforme* (syn. *B. indicum*) (D1/TP5), *L. apis* (P1/MR10), *L. melliventris* (P1/MR11) a *L. helsingborgensis* (KR10).

Tabuľka 1. Zoznam klasifikovaných bakteriálnych izolátov s pravdepodobnosťou prislúšnosti k danému taxónu

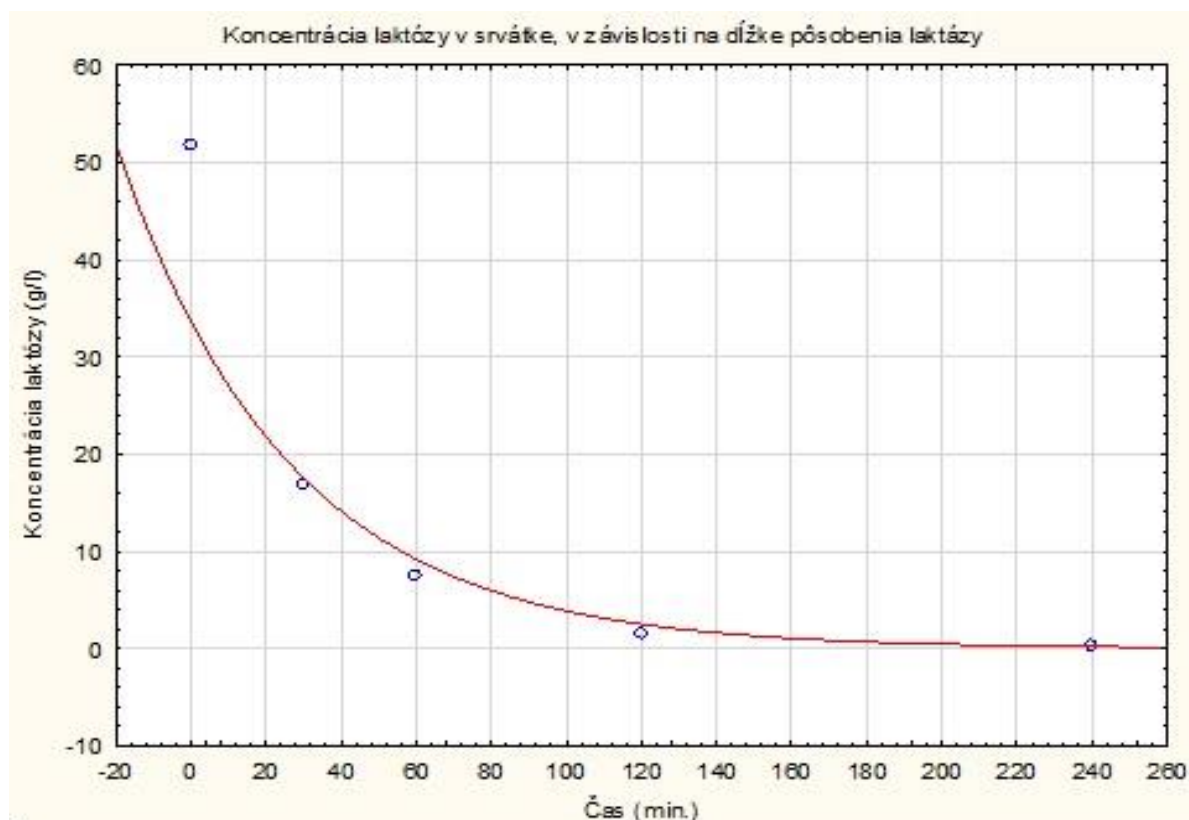
Ozn.	Primer	16S rRNA klasifikace
VT9	fD1	<i>L. melliventris</i> 99.78%
KT3	fD1	<i>L. kimbladii</i> 99.50%
KT8	fD1	<i>L. melliventris</i> 99.41%
KM1	fD1	<i>L. kimbladii</i> 99.86%
VM1	fD1	<i>Staphylococcus caprae</i> 99.82%
VM9	fD1	<i>B. asteroides</i> 99.27%
VM10	fD1	<i>B. asteroides</i> 99.13%
VM11	fD1	<i>B. asteroides</i> 98.15%
KR1	fD1	<i>L. melliventris</i> 99.72%
KR2	fD1	<i>L. melliventris</i> 99.93%
KR5	fD1	<i>L. helsingborgensis</i> 99.84%
KR7	fD1	<i>L. melliventris</i> 99.86%
KR8	fD1	<i>L. helsingborgensis</i> 99.79%
KR9	fD1	<i>L. helsingborgensis</i> 99.88%
KR10	fD1	<i>L. helsingborgensis</i> 100%
VR5	fD1	<i>L. helsingborgensis</i> 99.56%
VR8	fD1	<i>L. helsingborgensis</i> 99.93%
VR9	fD1	<i>L. melliventris</i> 99.65%
D1/TP1	616V	<i>B. asteroides</i> 97.75%
D1/TP2	616V	<i>B. asteroides</i> 99.20%
D1/TP4	616V	<i>B. indicum</i> 97.34%
D1/TP5	616V	<i>B. indicum</i> 99.93%
D1/TP6	616V	<i>B. asteroides</i> 99.0%
P1/TP1	616V	<i>B. asteroides</i> (98.26%
P1/TP2	616V	<i>B. asteroides</i> 98.87%
P1/TP3	616V	<i>B. asteroides</i> 99.41%
D1/MR11	fD1	<i>Lactobacillus kullabergensis</i> 99.43%
D1/MR12	fD1	<i>Lactobacillus melliventris</i> 99.20%

Ozn.	Primer	16S rRNA klasifikace
P1/TP8	fD1	<i>B. asteroides</i> 98.52%
P1/TP11	fD1	<i>B. asteroides</i> 98.30%
P1/MR10	fD1	<i>L. apis</i> 99.78%
P1/MR11	fD1	<i>L. melliventris</i> 99.85%
D1/TP7	fD1	<i>B. asteroides</i> 100%
D1/TP9	fD1	<i>B. asteroides</i> 97.64%
D1/TP12	fD1	<i>B. asteroides</i> 99.33%

5.2 Stanovenie aktivity laktázy

Pomocou ¹H-NMR boli stanovené reziduálne množstvá laktózy v našom srvátkovom médiu. Zo získaných hodnôt sme vytvorili graf (viď. Obrázok 3), odkadľujúci závislosť obsahu laktózy v médiu na čase pôsobenia enzýmu.

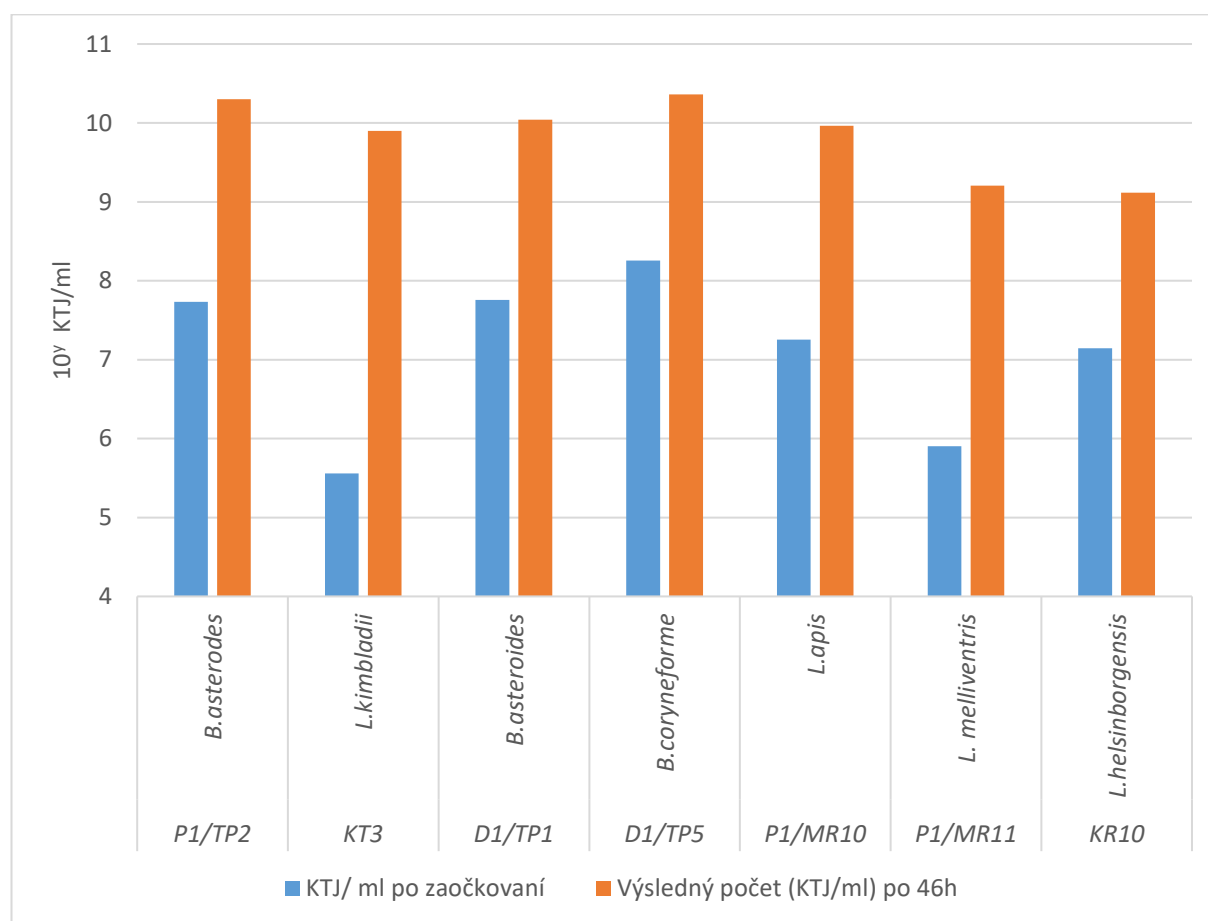
Pri pôsobení enzýmu 120 minút bol obsah reziduálnej laktózy na úrovni 1,5 g/L. Pri pôsobení enzýmu 240 minút, sme namerali reziduum laktózy 0,25 g/L srvátky. Pre naše potreby (znížiť obsah laktózy v srvátke pod 1 g/L) bol zvolený ako najvhodnejší čas pôsobenia enzýmu, 180 minút.



Obrázok 3. Graf závislosti obsahu laktózy na dĺžke pôsobenia enzýmu

5.3 Výsledky nárastov jednotlivých bakteriálnych druhov

Na overenie rastového potenciálu baktérii v srvátkovom médiu sme vybrali 7 bakteriálnych kmeňov, prevažne patriacich medzi tzv. core microbiome (Kwong a Moran 2016). Pripravené kónické skúmavky s 9 ml srvátkového média boli očkované 1 ml bakteriálnej suspenzie so stanoveným množstvom životaschopných baktérii. Následne boli 46 hodín kultivované v termostate pri 37 °C. Počty životaschopných baktérii *L. kimbladii* (KT3), *B. asteroides* (P1/TP2), *B. asteroides* (D1/TP1), *B. coryneforme* (syn. *B. indicum*) (D1/TP5), *L. apis* (P1/MR10), *L. melliventris* (P1/MR11) a *L. helsingborgensis* (KR10) boli stanovené doskovou kultivačnou metódou na MRS agare, a získané hodnoty sme porovnali v grafe, vid' Obrázok 4.



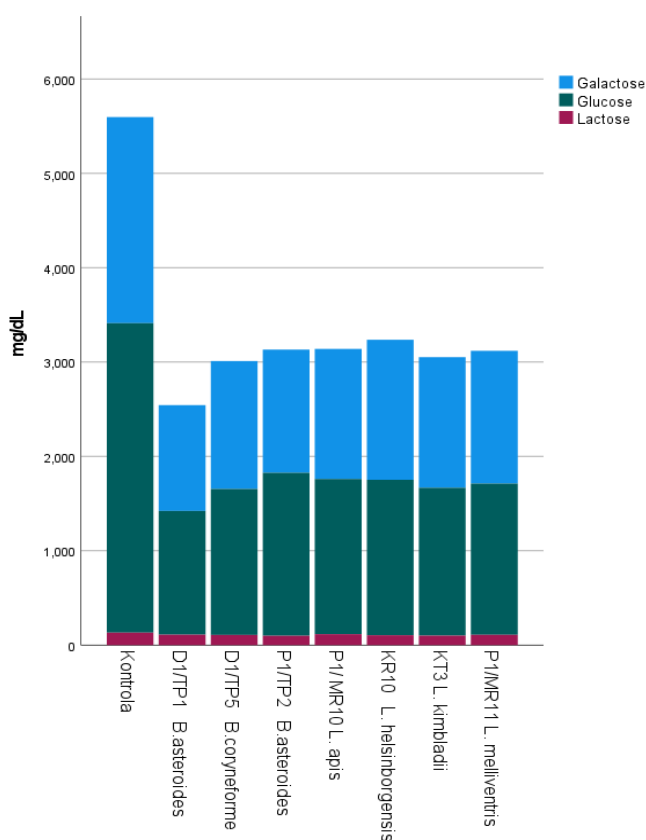
Obrázok 4. Nárast počtu životaschopných baktérii v srvátkovom médiu po 46 hodinách kultivácie

Pri všetkých testovaných druhoch bol zaznamenaný nárast počtu živých buniek o minimálne 2 rády. Všetky vzorky po 46 hodinách kultivácie zároveň prekonalí hranicu 10^9 životaschopných buniek v 1 ml média. Najlepší nárast bol zaznamenaný pri druhu *L. kimbladii*, kde bol zaznamenaný nárast počtu živých buniek o takmer 4 rády.

5.4 Stanovenie zloženia fermentovaného srvátkového média

Srvátkové média boli po odstredení bakteriálnej biomasy podrobené stanoveniu zloženia pomocou $^1\text{H NMR}$ analýzy s cieľom identifikovať primárne metabolity jednotlivých taxónov a odsledovať využívanie rôznych substrátov. Zo získaných hodnôt boli vytvorené grafy odzrkadľujúce využívanie sacharidov (Obrázok 5), zmeny v koncentrácii primárnych metabolitov a ďalších identifikovaných látkach sme spracovali do obrázku č.6 a č.7.

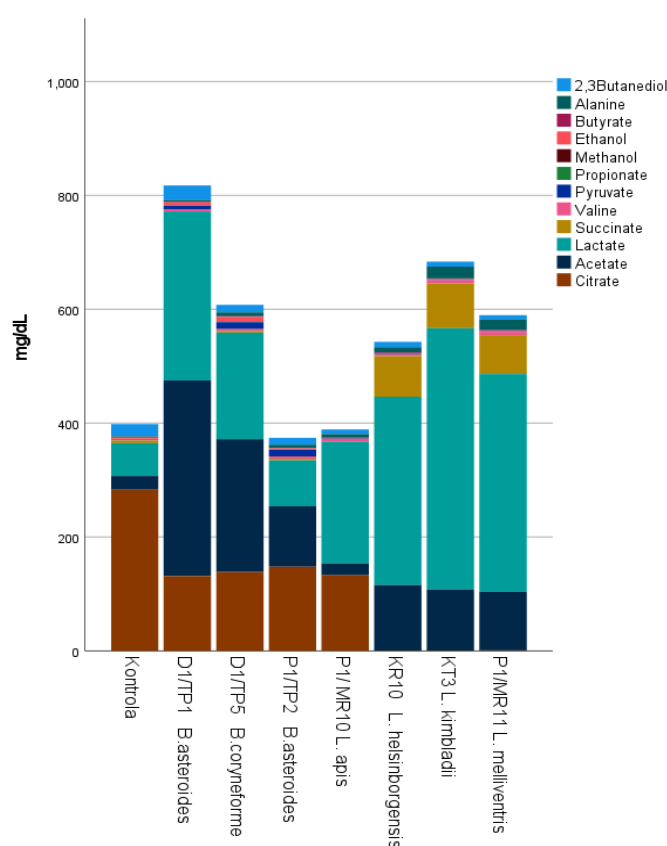
Zo získaných hodnôt na obrázku č.5 vyplýva, že všetky baktérie v najväčšej miere využívali ako zdroj energie glukózu, ktorej celkový obsah klesol o približne 50 % pri všetkých druhoch. Zaujímavou informáciou však je to, že v menšom rozsahu boli schopné využívať aj galaktózu z rozštepenej laktózy, ktorej množstvo kleslo o približne 30 % pri všetkých druhoch. Galaktózu bol najlepšie schopný využívať druh *B. asteroides* (D1/TP1). Koncentrácia reziduálnej laktózy zostala v podstate nezmenená a v drobné rozdiely boli pravdepodobne spôsobené len nepresnosťou merania a vyhodnocovania spektier.



Obrázok 5. Spotreba sacharidov počas fermentácie

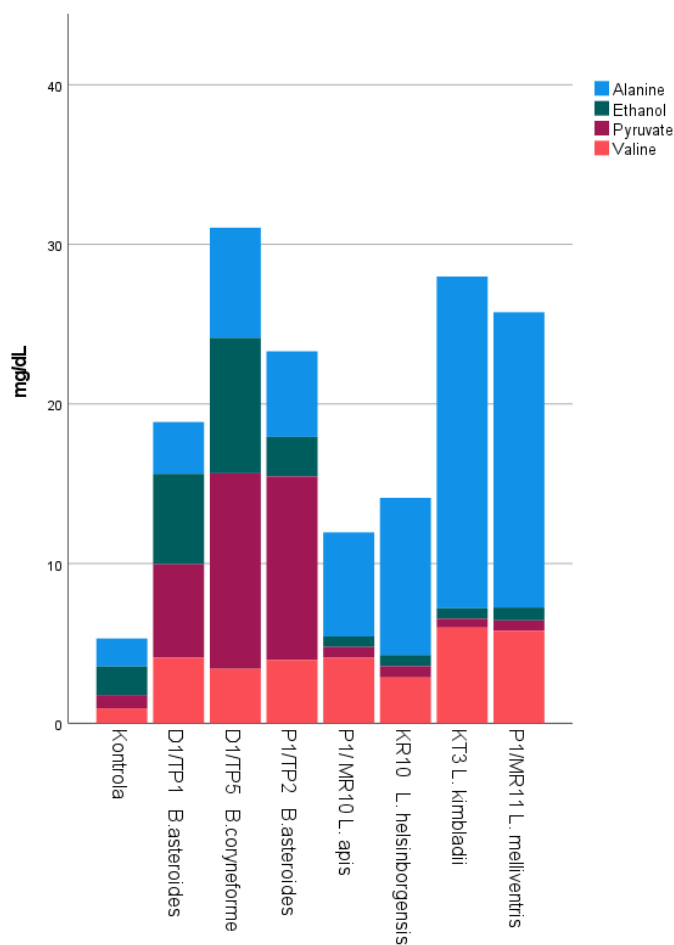
Pri bližšom pohľade na zmeny zaznamenané v koncentráciách látok sa najvýraznejšie prejavilo zvýšenie koncentrácie laktátu, ktorý je typickým metabolitom testovaných druhov. Okrem vzorky fermentovanej druhom *L. apis*, sme zaznamenali aj výrazné zvýšenie množstva kyseliny octovej, ktoré bolo najvýraznejšie pri vzorkách bifidobaktérii, vid' obr. 6.

Citrát sa ukázal ako žiadaný substrát, keďže pri všetkých testovaných druhoch jeho koncentrácia poklesla. Pri druhoch *L. helsinborgensis*, *L. kimbladii* a *L. melliventris* dokonca baktérie všetok citrát spotrebovali a zároveň sa vo vzorkách objavil výrazný nárast koncentrácie sukcinátu.



Obrázok 6. Zmeny koncentrácií primárnych metabolitov

Boli zaznamenané aj mierne nárasty niektorých ďalších látok (obr. 7), vzhľadom k ich stopovým koncentráciám ich ale z nášho pohľadu považujeme za zanedbateľné. Vyplýva z nich však jasný rozdiel medzi jednotlivými bakteriálnymi skupinami. Bifidobaktérie boli schopné produkovať pyruvát a malé množstvo etanolu narozdiel od laktobacilov. Naopak laktobacili produkovali vyššie množstvá aminokyseliny alanínu.



Obrázok 7. Zmeny v koncentrácii ďalších identifikovaných látok

5.5 Prežívanie baktérii proces lyofilizácie

Pred samotnou lyofilizáciou bolo potrebné zabezpečiť ochranu baktérii, ktorých bunky by sa vplyvom kryštalizácie okolitej vody mohli porušiť a znehodnotiť. Ako kryoprotektanty boli testované sterilné roztoky glukózy, sacharózy alebo ich kombinácia v množstve približne dvojnásobku hmotnosti bakteriálnej pelety.

5.5.1 Lyofilizácia s kryoprotektívnym roztokom glukózy a sacharózy

Pri prvej verzii lyofilizácie bol pridaný roztok o hmotnosti dvojnásobku váhy pelety s 15 % glukózy a 10 % sacharózy (celkovo 25 % cukrov). Pre tento pilotný experiment boli použité 3 bakteriálne kmene, konkrétne *L. kimbladii* (KT3), *L. apis* (P1/MR10), *L. helsingborgensis* (KR10). Tesne pred, a po lyofilizácii bolo urobené doskové kultivačné stanovenie počtu životaschopných baktérii (Tabuľka.2).

Výsledná peleta mala žuvačkovitú, lepkavú konzistenciu, nevhodnú pre homogénne primiešanie do medocukrového cesta potrebného pre ďalšie experimenty so včelami. Prežívanie baktérií však bolo na dostatočne vysokej úrovni.

Tabuľka 2. Prežívanie baktérii s kryoprotektantom 15% glukózy a 10% sacharózy

		KTJ/ml, pred lyof.	KTJ/ml, po lyof.	Prežívanie
KT3	<i>L.kimbladii</i>	$1,9 \times 10^{10}$	$3,3 \times 10^{10}$	100%
P1/MR10	<i>L.apis</i>	$9,2 \times 10^9$	$3,3 \times 10^{10}$	100%
KR10	<i>L.helsinborgensis</i>	$1,5 \times 10^{10}$	$4,3 \times 10^9$	29%

5.5.2 Lyofilizácia bez kryoprotektantu, s kryoprotektívnym 5% roztokom glukózy alebo 5% roztokom sacharózy

Pri druhom pokuse o prípravu pelety bol testovaný 1 zástupca bifidobaktérii, *B. coryneforme* (syn. *B. indicum*) (D1/TP5) a 1 zástupca laktobacilov, *L. helsinborgensis* (KR10). Každá baktéria bola lyofilizovaná vo verzii bez kryoprotektantu, s 5% roztokom glukózy ako kryoprotektantu o hmotnosti dvojnásobku hmotnosti bakteriálnej pelety alebo s 5% roztokom sacharózy ako kryoprotektantu o hmotnosti dvojnásobku hmotnosti bakteriálnej pelety. Výsledná peleta mala vhodnú rozpadavú konzistenciu, potvrdilo sa aj dobré prežívanie (v podstate 100% buniek), takto pripravených lyofilizátov (viď. Tabuľka 3).

Tabuľka 3. Počty životaschopných baktérii v lyofilizáte

	Kryoprotektant	KTJ/g lyofilizátu	KTJ/ml srvátky
<i>L.helsinborgensis</i>	Kontrola	$1,9 \times 10^8$	$3,0 \times 10^6$
<i>L.helsinborgensis</i>	Glukóza 5 %	$1,6 \times 10^{13}$	$3,2 \times 10^{11}$
<i>L.helsinborgensis</i>	Sacharóza 5 %	$1,4 \times 10^{12}$	$5,2 \times 10^{10}$
<i>B. coryneforme</i>	Kontrola	0	0
<i>B. coryneforme</i>	Glukóza 5 %	0	0
<i>B. coryneforme</i>	Sacharóza 5 %	$1,2 \times 10^{14}$	$2,9 \times 10^{12}$

5.6 Prežívanie lyofilizovaných baktérii v medocukrovom ceste po 5 mesiacoch od prípravy

Po piatich mesiacoch od zapracovania bakteriálnych lyofilizátov do medocukrového cesta, ktoré bolo počas tejto doby skladované pri $-18\text{ }^\circ\text{C}$, bolo vykonané doskové kultivačné stanovenie prežívajúcich buniek. Na doskách však nebol pozorovaný žiadny nárast.

6 Diskusia

6.1 Izolácia zástupcov včelieho „core microbiome“

Cieľom izolácie baktérii z včelieho tráviaceho traktu bolo vyizolovať, čo najviac zástupcov baktérii mliečneho kvasenia a bifidobaktérii z tzv. včelieho core microbiome (Kwong a Moran 2016), ktorý v najväčšom počte tvoria skupiny laktobacilov Firm-4 (*L. mellifer*, *L. mellis*), Firm-5 (*L. apis*, *L. helsingborgensis*, *L. melliventris*, *L. kimbladii*, *L. kullabergensis*). V menšom zastúpení bifidobaktérie (*B. asteroides*, *B. indicum* (syn. *B. coryneforme*) (Ellegaard a kol. 2015).

V Tabulke 1 sú uvedené všetky klasifikované izoláty a vyplýva z nej, že okrem skupiny laktobacilov Firm-4 sa nám podarilo izolovať všetkých ostatných bakteriálnych zástupcov, u ktorých sa predpokladá probiotický potenciál pre včely *Apis mellifera*. Zástupcov skupiny Firm-4 sa nepodarilo izolovať pravdepodne kvôli nožnej špecifickej požiadavke na kultivačné médium.

6.2 Príprava srvátkového média a stanovenie aktivity laktázy

Vzhľadom k nízkému obsahu bielkovín v srvátke (0,8g/L) (Božanić a kol. 2014) bola sladká srvátka fortifikovaná srvátkovým proteínovým koncentrátom Impact whey protein (Myprotein, GB) v množstve 5 g/L. Jedným z problémom srvátkového média bol aj vysoký obsah laktózy, ktorá je pre včeliu mikrobiotu nevyužitelná, čo sa potvrdilo aj nám (vid'. Obr. 5) a pre včely dokonca toxická (Sylvester 1979; Barker 1977). Toxicita laktózy by mohla byť fatálna hlavne v prípade, ak by sa probiotický lyofilizát s laktózou dostal do včelstva, kde by mohla spôsobovať kontraproduktívne účinky. Preto bolo potrebné laktózu z média odstrániť, rozštiepením enzýmom na glukózu a galaktózu. Glukóza bola v médiu následne využívaná ako primárny substrát a galaktóza bola v určitej miere baktériami využívaná tiež.

Aktivitu enzýmu bolo potrebné stanoviť a nájsť optimálnu dĺžku pôsobenia, aby sa podarilo znížiť koncentráciu laktózy pod 1 g/L. Zo získaných hodnôt bol vytvorený graf (Obrázok 3), a vyvodený záver, že pre našu potrebu bude ideálna kombinácia koncentrácie enzýmu 1 ml/L a času pôsobenia 180 minút pri 37 °C. Do budúcnosti by však mohlo byť zaujímavé aj zvýšenie koncentrácie enzýmu s cieľom urýchliť štiepenie laktózy a ušetriť tak čas. Otázkou je, ktorá vyrianta by bola reálne ekonomicky výhodnejšia v priemyselnom použití.

6.3 Nárasty bakteriálnej biomasy v srvátkovom médiu

Všetky testované bakteriálne izoláty boli schopné množiť sa v srvátkovom médiu, pričom najlepší nárast, takmer 4 rády, bol zaznamenaný pri druhu *L. kimbladii* (KT3). Okrem toho sa však preukázali dobré rastové potenciály pri všetkých testovaných druhoch (2-3 rády) vid'. Obrázok 4. Všetky vzorky presiahli úroveň 10^9 KTJ/ml životaschopných buniek.

Rozdiely medzi druhmi mohli vzniknúť mierne odlišnými nárokmi na prostredie a živinové zloženie média, vzhľadom k tomu, že aj vo včelom tráviacom trakte sa môžu vyskytovať v mierne odlišných lokalitách a využívať odlišné substráty (Bonilla-Rosso a Engel 2018).

6.3.1 Využívanie substrátov a produkcia metabolitov jednotlivých druhov

Primárnym energetickým substrátom, baktérii sa ukázala byť glukóza. Preferenciu glukózy potvrdzuje aj Lee a kol. (2018) a uvádza, že rovnako dobre je včelími baktériami využívaná aj fruktóza a sacharóza. Nami zaznamenané zníženie koncentrácií galaktózy v porovnaní s nezaočkoványm médiom o približne 30 % pri všetkých druhoch, je taktiež reálne, a menší záujem o tento zdroj uhlíka je v zhode s výsledkami Lee a kol. (2018). Aj napriek tomu, že vo svojom prirodzenom prostredí s týmto monosacharidom testované baktérie neprichádzajú do kontaktu boli schopné jú v nezanedbateľnom množstve využívať. Najväčšie zmeny v koncentracii glukózy a galaktózy boli zaznamenané pri druhu *B. asteroides* (D1/TP1) (vid' obrázok 5) aj napriek tomu, že počet baktérii nebol najvyšší.

Okrem sacharidov sme ale pri všetkých laktobacilov skupiny Firm-5 zaznamenali aj výrazný pokles koncentrácie citrátu. Takmer všetok citrát bol spotrebovaný pri *L. helsinborgensis*, *L. kimbladii* a *L. melliventris*.. Tento fakt potvrdzuje aj Bonilla-Rosso a Engel (2018), ktorý uvádzajú, že citrát je pre skupinu Firm-5 jedným z hlavných substrátov, narozdiel' od *L. apis*, skupiny bifidobaktérii a laktobacilov Firm-4.

Bifidobaktérie a niektoré laktobacili majú heterofermentatívny metabolizmus zameraný na produkciu viacerých primárnych metabolitov, čo sa potvrdilo pri všetkých druhoch okrem *L. apis* (P1/MR10), ktorý produkoval takmer iba kyselinu mliečnu a menšie množstvo voľných amonikyselín. U zvyšných druhov (*Lactobacillus kimbladii* (KT3), *Bifidobacterium asteroides* (P1/TP2), *B. asteroides* (D1/TP1), *B. coryneforme* (syn. *B. indicum*) (D1/TP5), *L. melliventris* (P1/MR11) a *L. helsinborgensis* (KR10)) boli zaznamenané aj výrazné prírastky v koncentracii kyseliny octovej. Zmeny v koncentráciách týchto dvoch metabolitov sú najčastejšie aj podľa

Lee a kol. (2018). Produkcia zvyšných metabolitov sa líši od jedného druhu k druhému a nedá sa zovšeobecniť, pretože aj medzi príbuznými druhmi boli zaznamenané jasné rozdiely. Príkladom je *L. apis* v porovnaní s ostatnými druhmi laktobacilov. *L. apis* pri porovnateľných počtoch KTJ/ml vyprodukoval minimálne množstvo acetátu a zároveň spotreboval len približne polovicu množstva citrátu.

Pri druhoch *Lactobacillus kimbladii* (KT3), *L. melliventris* (P1/MR11) a *L. helsingborgensis* (KR10) sme zachytili výrazne zvýšenie množstva kyseliny jantárovej. Zheng a kol. (2017) uvádza, že sukcinát je tiež jedným z hlavných metabolitov včelej črevnej mikrobioty, pretože pri porovnaní analýz obsahu čriev (konkrétne časti rectum) sterilných včiel nebola zistená jeho prítomnosť, narozdiel od včiel so štandardnou mikroflórou. Jeho produkcia sa však nemusí vyskytovať u všetkých zástupcov včelej črevnej mikrobioty. Rovnaký trend bol zaznamenaný aj v prípade aminokyseliny D-alanínu.

Charakteristickou vlastnosťou pre skupinu bifidobaktérii, ktoré pri bifidobaktériách platí všeobecne Amaretti a kol. (2007), bolo mierne zvýšenie koncentrácie etanolu, v porovnaní so sledovanými laktobacilmi, kde zostali koncentrácie týchto metabolitov nemenné. Ešte výraznejší trend sa prejavil v koncentrácii pyruvátu, pričom sa jeho koncentrácia výrazne zvyšovala iba v prípade vzoriek obsahujúcich bifidobaktérie.

Rozdiely v metabolizme medzi jednotlivými druhmi odzrkadľujú ich jedinečnosť, rôznu pozičný výskyt vo včelom tráviacom trakte a možné odlišné pôsobenie na imunitu včelieho jednotlivca. Všetky výsledky však musíme považovať, vzhľadom na absenciu opakovania pokusu, len za orientačné.

6.4 Lyofilizácia bakteriálnej biomasy

Základným predpokladom pre vytvorený lyofilizát bol vysoký obsah životaschopných baktérii a rozpadavá konzistencia vhodná na jednoduché dávkovanie a homogénne zapracovanie do medocukrového cesta, ktoré sa do budúcnosti javilo ako najvhodnejší nosič pre potenciálny probiotický včelý doplnok.

Pri prvom pokuse o lyofilizáciu resuspendovanej pelety troch bakteriálnych druhov (*L. kimbladii* (KT3), *L. apis* (P1/MR10), *L. helsingborgensis* (KR10)), v cukrovom roztoku (15% glukózy + 10% sacharózy) vznikla lepkavá, žuvačkovitá hmota, ktorú reálne nešlo homogénne zapracovať do medocukrového cesta. Tento fakt znemožnil použitie daného kryoprotektantu do budúcnosti, aj keď sa doskovou kultivačnou metódou podarilo stanoviť vysokú úroveň prežívania bakteriálnych buniek, vid' Tabuľku 2. Vzhľadom k lepkavosti pelety a nízkej

presnosti váhy bol počet životaschopných buniek stanovený veľmi nepresne, avšak napriek tomu potvrdzuje, že baktérie lyofilizáciu prežívali veľmi dobre.

Pri ďalšom pokuse sme sa zamerali, na úpravu konzistencie bakteriálnej pelety. Testované boli 3 verzie kryoprotektantu (voda, 5% roztok glukózy, 5% roztok sacharózy) na jednom zástupcovi laktobacilov (*L. helsingborgensis* KR10) a jednom zástupcovi bifidobaktérii (*B. coryneforme* (*syn. B. indicum*) D1/TP5). Z výsledkov v Tabuľke 3 vyplýva, že aj vo vzorkách bez pridaného cukorného roztoku boli baktérie *L. helsingborgensis* (KR10) v menšom počte schopné prežiť lyofilizáciu, pravdepodobne vďaka proteínovým a cukorným reziduám v srvátkovom médiu, ktoré mohli mať kryoprotektívny účinok. *L. helsingborgensis* (KR10) dobre prežíval v obidvoch cukorných variantách. Pre *B. coryneforme* (*B. indicum*) D1/TP5 boli zaznamenané dobré hodnoty len vo verzii s 5% roztokom sacharózy. Kontrolná vzorka a vzorka s 5% roztokom glukózy mali nulový nárast bakteriálnych kolónii. Táto anomália bola veľmi podozrivá a pripisujeme ju pravdepodobne chybnému kroku pri príprave riediacej rady.

Každopádne sa ale pri obidvoch našich druhoch potvrdil dobrý kryoprotektívny potenciál 5% roztoku sacharózy, v množstve dvojnásobku hmotnosti pelety. Lyofilizát mal krehkú rozpadavú konzistenciu, veľmi vhodnú pre homegénne zapracovanie do medocukrového cesta, čo bol dôležitý faktor pre použitie v ďalších experimentoch na včelách. Sacharóza sa javila jako najlepšia voľba aj preto, že je jednou zo zložiek medocukrového cesta bežne skrmovaného včelám. Výborné kryoprotektívne hodnoty 5% roztoku sacharózy potvrdzuje aj Siaterlis a kol. (2009), ktorí testovali kryoprotektívne účinky roztokov sacharózy, sorbitolu a trehalózy v koncentráciách 1%, 5% a 10%. Najlepšie prežitie baktérii *Lactobacillus rhamnosus* a *Lactobacillus plantarum* sa ukázali práve pri 5% roztoku glukózy. Baktérie prežívali na úrovni 90 %.

Pre pokus na včelách boli pripravené lyofilizáty druhov *L. apis* (P1/MR10), *L. helsingborgensis* (KR10), *B. coryneforme* (D1/TP5), *B. asteroides* (P1/TP2), *L. kimbladii* (KT3), *B. asteroides* (D1, TP1) lyofilizované s 5% roztokom sacharózy ako kryoprotektantom v množstve dvojnásobku hmotnosti bakteriálnej pelety.

6.5 Stanovenie prežívajúcich buniek v medo cukrovom ceste po 5 mesiacoch od prípravy

Pripravené lyofilizáty boli pred pokusom na včelách homogénne zapracované do medocukrového cesta. Po experimente boli zvyšné množstvá skladované v mrazničke pri -20 °C približne 5 mesiacov. Stanovenie preživších baktérii bolo vykonané doskovou

kultivačnou metódou na MRS agare. Bohužiaľ ani v jednej vzorke po troch dňoch v termostate pri 37 °C nebola zaznamenaná ani jedna kolónia.

Otázkou zostáva, v ktorej fáze došlo k úhynu baktérii. Jednou z možností je, že medovocukrové cesto nieje vhodným skladovacím médiom, kvôli antibakteriálnym vlastnostiam medu. Ďalším faktorom mohlo byť aj dlhodobé skladovanie v prostredí s kyslíkom, na ktorý sú používané bakteriálne druhy citlivé.

Jofré a kol. (2015) testovali kombinácie sacharidov a odtučneného mlieka, z ktorých bol nášmu pokusu najpodobnejší kryoprotektant 10% roztoku glukózy. Tesne po lyofilizácii taktiež nebol zaznamenaný žiadny významný pokles životaschopnosti baktérii (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*). Rozdiel sa však objavil už po 5 týždňoch skladovania, počas ktorých sa množstvo životaschopných laktobacilov kleslo len minimálne pri 5 °C, ale o takmer 6 rádov pri 22 °C. Po 20 týždňoch sa znížil počet životaschopných laktobacilov z pôvodných $>10^{10}$ KTJ/g o takmer 2 rády pri 5°C a o 8 rádov při 22°C (Jofré a kol. 2015). Táto štúdia naznačuje, že podobný jav sa mohol uplatniť aj v našom prípade, pričom úlohu mohla zohrať aj prítomnosť kyslíka a vlhkosti, ktorá sa po tak dlhej dobe k otvorenému lyofilizátu mohla dostať. Vzhľadom k vysokej citlivosti našich baktérii na kyslík, mohla byť daná kombináci faktorov pre naše druhy neprekonateľná.

7 Záver

Podarilo sa nám izolovať dostatočne široké spektrum včelích črevných laktobacilov a bifidobaktérií, na ktorých boli testované ich kultivačné vlastnosti. Jedným z úspechov je fakt, že sme pripravili médium na základe sladkej srvátky, s rozšpenou laktózou, v ktorom sa boli schopné množiť všetky izolované kmene. Po odstredení baktérilanej biomasy z média, sme resuspendovanú peletu lyofilizovali s 5% roztokom sacharózy a dosiahli takmer 100 % prežiteľnosť buniek. Experiment celkovo prináša pilotný náhľad na možný technologický postup výroby včelieho probiotického doplnku.

8 Literatúra

Amaretti, A; Bernardi T.; Tamburini E.; Zanoni S.; Lomma M.; Matteuzzi D.; Rossi M. 2007. Kinetics and Metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 Growing on Glucose, Galactose, Lactose, and Galactooligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3637–3644. doi:10.1128/AEM.02914-06

Angelescu I-R, Zamfir M, Stancu M-M, Grosu-Tudor S-S. 2019. Identification and probiotic properties of lactobacilli isolated from two different fermented beverages. *Animals of Microbiology* 69(13), 1557-1565. doi:10.1007/s13213-019-01540-0

Arbeiter S; Schnepel H; Uhlenhaut K; Bloege Y; Schulze M; Hahn S. 2014. Seasonal Shift in the Diet Composition of European Bee-Eaters *Merops apiaster* at the Northern Edge of Distribution. *Ardeola*, 61(1), 161–170. doi:10.13157/arla.61.1.2014.161

Blandino A, Al-Aseeri M E, Pandiella S S, Cantero D, Webb C. 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36(6), 527–543. doi:10.1016/s0963-9969(03)00009-7

Bonilla-Rosso G, Engel P. 2018. Functional roles and metabolic niches in the honey bee gut microbiota. *Current Opinion in Microbiology*, 43, 69–76. doi:10.1016/j.mib.2017.12.009

Božanić R, Barukčić I, Lisak K. 2014. "Possibilities of whey utilisation." *Austin journal of nutrition and food sciences* 2(7) : 7

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). DOI: 10.1371/journal.pone.0095056. ISSN 1932-6203.

Dudley N; Alexander S. 2017. Agriculture and biodiversity: a review. *Biodiversity*, 18(2-3), 45–49. doi:10.1080/14888386.2017.1351892

Du Toit M, Engelbrecht L, Lerm, E, Krieger-Weber S. 2010. Lactobacillus: the Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures—an Overview. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 876–906. doi:10.1007/s11947-010-0448-8

Ellegaard KM; Tamarit D; Javelind E; Olofsson TC; Andersson SGE; Vásquez A. 2015. Extensive intra-phylo-type diversity in lactobacilli and bifidobacteria from the honeybee gut. *BMC Genomics*, 16(1), 1–22. doi:10.1186/s12864-015-1476-6

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. DOI: 10.1073/pnas.1202970109. ISSN 0027-8424.

Forsgren E, Olofsson, TC, Vásquez, A. 2010. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus* larvae in honey bee larvae. *Apidologie* 41, 99–108. <https://doi.org/10.1051/apido/2009065>

Lee FJ, Miller KI, McKinlay JB, Newton ILG. 2018. Differential carbohydrate utilization and organic acid production by honey bee symbionts, *FEMS Microbiology Ecology*, 94(8), f1y 113. <https://doi.org/10.1093/femsec/f1y113>

Gray A; Brodschneider R; Adjlane N; Ballis A; Brusbardis V; Charrière JD; Chlebo R; Coffey FM; Cornelissen B; Amaro da Costa C; Csáki T; Dahle B; Danihlík J; Dražić MM; Evans G; Fedoriak M; Forsythe I; de Graaf D; Gregorc A; Johannesen J; Kauko L; Kristiansen P; Martikkala M; Martín-Hernández R; Medina-Flores CA; Mutinelli F; Patalano S; Petrov P; Raudmets A; Ryzhikov VA.; Simon-Delso N; Stevanovic J; Topolska G; Uzunov A; Vejsnaes F; Williams A; Zammit-Mangion M; Soroker V. 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*, 58(4), 479–485. doi:10.1080/00218839.2019.1615661

Jofré, A.; Aymerich, T.; Garriga, M. 2015. Impact of different cryoprotectants on the survival of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei/paracasei* during long-term storage. *Beneficial Microbes*, 6(3), 381–386. doi:10.3920/bm2014.0038

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) . DOI: 10.1371/journal.pone.0123911. ISSN 1932-6203.

Karovičová J, Kohajdová Z, Minarovičová L, Lauková M, Greifová M, Greif G, Hojerová J. 2020. Utilisation of quinoa for development of fermented beverages. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences* 14, s. 465-472. doi.org/10.5219/1323

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.

Krieger-Weber S, Heras JM, Suarez C. 2020. *Lactobacillus plantarum*, a New Biological Tool to Control Malolactic Fermentation: A Review and an Outlook. *Beverages*, 6(2), 23. doi:10.3390/beverages6020023

Lamei S, Stephan JG, Nilson B. 2020. Feeding Honeybee Colonies with Honeybee-Specific Lactic Acid Bacteria (Hbs-LAB) Does Not Affect Colony-Level Hbs-LAB Composition or *Paenibacillus* larvae Spore Levels, Although American Foulbrood Affected Colonies Harbor a More Diverse Hbs-LAB Community. *Microb Ecol* 79, 743–755. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01434-3>

Lautenbach S, Seppelt R, Liebscher J, Dormann CF. 2012. Spatial and Temporal Trends of Global Pollination Benefit. *PLoS ONE*, 7(4), e35954. doi:10.1371/journal.pone.0035954

Lonvaud-Funel A. 1995. Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiology Letters*, 126(3), 209–214. doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07420.x

Luana N, Rossana C, Curiel JA, Kaisa P, Marco G, Rizzello CG. 2014. Manufacture and characterization of a yogurt-like beverage made with oat flakes fermented by selected lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 17–26. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.004

Masco L, Huys G, De Brandt E, Temmerman R, Swings, J. 2005. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2), 221–230. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.018

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). DOI: 10.1371/journal.pone.0032962. ISSN 1932-6203.

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.

Motta EVS, Raymann K, Moran NA. 2018. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201803880. doi:10.1073/pnas.1803880115

Nursiwi A, Nurhartadi E, Utami R, Sari AM, Laksono PW, Aprilia EN. 2017. Characteristic of Fermented Whey Beverage with Addition of Tomato Juice (*Lycopersicon esculentum*). *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 193, 012009. doi:10.1088/1757-899x/193/1/012009

Ollerton J, Winfree R, Tarrant S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120(3), 321–326. doi:10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x

Pescuma M, Hébert EM, Mozzi F, Font de Valdez G. 2010. Functional fermented wheybased beverage using lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 141(1-2), 73-81. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011. ISSN 01681605.

Prasanna PHP, Grandison AS, Charalampopoulos D. 2014. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. *Food Research International*, 55, 247–262. doi:10.1016/j.foodres.2013.11.013

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. DOI: 10.1016/j.cois.2018.02.012. ISSN 22145745.

Rokop ZP, Horton MA, Newton ILG. 2015. Interactions between co-occurring lactic acid bacteria in honey bee hives. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 7261– 7270.

Romero S, Nastasa A, Chapman A, Kwong WK, Foster LJ. 2019. The Honey Bee Gut Microbiota: Strategies for Study and Characterization. *Insect Molecular Biology*. 28(4), 455-472. doi:10.1111/imb.12567

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. DOI: 10.1128/AEM.01411-19. ISSN 0099-2240.

Barker RJ. 1977. Some Carbohydrates Found in Pollen and Pollen Substitutes are Toxic To Honey Bees, *The Journal of Nutrition*, 107(10), Pages 1859–1862. <https://doi.org/10.1093/jn/107.10.1859>

Maryam R. 2019. Mechanisms of Probiotic Action in the Honeybee. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 29(2), 95–103. doi:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2019025

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

Shukla M, Jha YK, Admassu S. 2013. Development of Probiotic Beverage from Whey and Pineapple Juice. *J Food Process Technol* 4: 206. 1–4. doi:10.4172/2157-7110.1000206

Siaterlis A; Deepika G; Charalampopoulos D. 2009. Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. 48(3), 295–301. doi:10.1111/j.1472-765x.2008.02529.x

Steinkraus KH. 1997. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*, 8(5-6), 311–317. doi:10.1016/s0956-7135(97)00050-9

Sylvester H. 1979. "Honey Bees: Response to Galactose and Lactose Incorporated into Sucrose Syrup." *Journal of Economic Entomology* 72(1): 81-82.

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. DOI: 10.1128/mBio.00377-12. ISSN 2150-7511.

Velíšek J, Hajšlová J. 2009. *Chemie potravin 2. OSSIS – Ing. Václav Šedivý, Tábor.*

Veselý V. *Včelařství. Praha: Státní zemědělské nakladatelství v Praze, 1985.*

Webber SM; Garratt MPD; Lukac M; Bailey A; Huxley T; Potts SG. 2020. Quantifying crop pollinator-dependence and pollination deficits: The effects of experimental scale on yield and quality assessments. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 304, 107106. doi:10.1016/j.agee.2020.107106

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.

Zheng H, Powell JE, Steele MI, Dietrich C, Moran NA. 2017. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 114, 4775–4780.

Zoznam obrázkov, grafov a tabuliek

Obrázok 1. Popis tráviacej sústavy včely a výskytu charakteristickej mikrobioty v jednotlivých úsekoch (Kwong a Moran 2016).....	12
Obrázok 2. Substráty využívané jednotlivými skupinami baktérii (Bonilla-Rosso a Engel 2018).....	16
Tabuľka 4. Zoznam klasifikovaných bakteriálnych izolátov s pravdepodobnosťou prislušnosti k danému taxónu.....	27
Obrázok 3. Graf závislosti obsahu laktózy na dĺžke pôsobenia enzýmu.....	28
Obrázok 4. Nárast počtu životaschopných baktérii v srvátkovom médiu po 46 hodinách kultivácie.....	29
Obrázok 5. Spotreba sacharidov počas fermentácie.....	30
Obrázok 6. Zmeny koncentrácií primárnych metabolitov.....	31
Obrázok 7. Zmeny v koncentrácii ďalších identifikovaných látok.....	32
Tabuľka 5. Prežívanie baktérii s kryoprotektantom 15% glukózy a 10% sacharózy.....	33
Tabuľka 6. Počty životaschopných baktérii v lyofilizáte.....	33

