

# Učinci prihrane pčelinjih zajednica (*Apis mellifera*) probiotičkim kulturama

---

Zrnić, Vladimir

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:338402>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-18**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

„Biotehnologija u medicini“

Vladimir Zrnić

Učinci prihrane pčelinjih zajednica (*Apis mellifera*) probiotičkim kulturama

Diplomski rad

Rijeka, 2020. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

„Biotehnologija u medicini“

Vladimir Zrnić

Učinci prihrane pčelinjih zajednica (*Apis mellifera*) probiotičkim kulturama

Diplomski rad

Rijeka, 2020. godina

Mentor: prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

Komentor: doc. dr. sc. Željka Maglica

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
University Graduate Programme  
Biotechnology in Medicine

Vladimir Zrnić

*Effects of additional feeding of honey bee colonies (*Apis mellifera*) with  
probiotic cultures*

Master's Thesis

Rijeka, 2020

Diplomski rad obranjen je 31.01.2020. u 10:00h pred povjerenstvom:

1. doc. dr. sc. Rozi Andrečić-Waldowski, predsjednica
2. izv. prof. dr. sc. Mladenka Malenica, član
3. prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger, mentor
4. doc. dr. sc. Željka Maglica, komentor

Rad ima 40 stranica, 15 slika, 1 tablicu i 40 literaturnih navoda.

## Sažetak

Zajednice medonosne pčele (*Apis mellifera* L.) smatraju se ekonomski najvrjednijim oprašivačima biljaka te na taj način izravno utječu na proizvodnju voća i povrća za prehranu ljudi. U novije vrijeme zdravlje pčela sve je više narušeno, što se vidi po učestalim uginućima pčelinjih zajednica. Uzroci ugibanja pčelinjih zajednica mogu biti različiti, a najviše se spominju bolesti i nepovoljni utjecaj primjene pesticida u intenzivnoj poljoprivrednoj proizvodnji. Razvojem modernih molekularnih metoda upoznat je sastav i važnost crijevne mikrobiote za imunitet i zdravlje pčela. Uočeno je da pčele koje su u stanju „stresa“ ili pate od neke bolesti ujedno imaju narušen sastav crjevne mikrobiote. Zbog korelacije između sastava mikrobiote i zdravlja pčelinjih zajednica, počelo se istraživati potencijalne probiotičke bakterije na pčelama. Nekoliko prethodnih istraživanja su pokazala kako se pomoću bakterija roda *Lactobacillus* dodanih u prehranu može postići povoljan utjecaj na zdravlje pčelinje zajednice.

Iz probavnog sustava pčela izolirane su kulture bakterija iz roda *Lactobacillus*. Izolirane bakterije umnožene su u MRS tekućem hranjivom mediju, a zatim su u obliku probiotičkog šećernog sirupa dodane pčelinjim zajednicama. Mjerenjem površine pčelinjeg legla na saću u različitim terminima uočeno je kako su pčelinje zajednice tretirane probioticima u usporedbi s kontrolnim brže napredovale. Brojanjem spora *Nosema spp.* u crijevima uzorkovanih pčela svjetlosnim mikroskopom utvrđeno je da su zajednice tretirane probioticima imale smanjeni stupanj invazije nozemozom tijekom pčelarske sezone. *In vitro* pokusima pokazali smo kako probiotičke bakterije usporavaju rast bakterije *Paenibacillus larvae* koja je uzročnik jedne od najopasnijih bolesti pčelinjih zajednica – američka gnjiloća medonosne pčele. Inhibicija rasta *P. larvae in vitro* ukazuje kako probiotičke bakterije izlučuju metabolite koji sprječavaju rast patogenih mikroorganizama. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju

neke od prethodno objavljenih rezultata, no za bolje razumijevanje mehanizama djelovanja probiotika na pčele potrebno je provesti *in vitro* pokuse i na drugim uzročnicima bolesti koji nisu bili predmet ovog istraživanja. Za potrebe razvoja i kliničkih istraživanja probiotika za pčele potrebno je provesti pokuse sa više sojeva bakterija i na većem broju pčelinjih zajednica.

**Ključne riječi:** *Apis mellifera*, probiotici, *Lactobacillus*, nozemoza, američka gnjiloća

## Summary

The honey bee (*Apis mellifera* L.) is considered to be the most economically valuable pollinator of plants and thus directly affecting the production of fruits and vegetables for human consumption. In recent times, the health of bees has been increasingly impaired, as can be seen by the frequent deaths of the honeybee colonies. The causes of bee community deaths may vary, with the greatest mention of diseases and the adverse impact of pesticide use in intensive agricultural production. With the development of modern molecular methods, the composition and importance of the intestinal microbiota on the immunity and health of the honey bees are introduced. It has been observed that bees that are in a state of "stress" or suffering from a disease also have impaired composition of the gut microbiota. Because of the correlation between microbiota composition and health of the honey bees, an investigation of potential probiotic bacteria has been started. Several previous studies have shown that bacteria from the genus *Lactobacillus* added to the diet can have a beneficial effect on the health of the honeybee colony.

Bacteria from the genus *Lactobacillus* were isolated from the digestive system of the honey bees. Isolated bacteria were multiplied in MRS broth and then added to bee colonies in the form of a probiotic sugar syrup. By measuring the surface of brood in different terms, it was observed that the honeybee colonies treated with probiotics progressed faster compared to controls. By counting the *Nosema* spp. spores in the intestines of sampled bees with optic microscope, it was found that probiotic-treated colonies had a reduced degree of nosemosis invasion during the beekeeping season. *In vitro* experiments have shown that probiotic bacteria slow down the growth of *Paenibacillus* larvae, which is cause of one of the most dangerous diseases of the honeybee colonies – American foulbrood. Inhibition of the growth of *P. Larvae* indicates that probiotic bacteria excrete metabolites which prevent growth of pathogen



microorganisms. The results of this study confirm some of the previously reported results. In order to gain a better understanding of the mechanisms of action of probiotics on the honey bees, in vitro experiments with more honey bee pathogens need to be done. In order to conduct clinical studies and develop probiotic for the honey bees, experiments with more bacterial strains and on more honeybee colonies need to be conducted.

**Key words:** *Apis mellifera*, probiotics, *Lactobacillus* spp., nosemosis  
American foulbrood

## Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Pčelinja zajednica .....	1
1.2. Nestanak pčelinjih zajednica .....	1
1.3. Nozemoza tipa - C.....	2
1.4. Američka gnjiloća medonosne pčele .....	4
1.5. Mikrobiota medonosne pčele .....	5
1.5.1. Sastav zdrave crijevne flore.....	5
1.5.2. Disbioza crijevne flore .....	6
1.6. Probiotici u pčelarstvu .....	7
1.6.1. Laboratorijski pokusi.....	7
1.6.2. Pokusi na pčelinjim zajednicama.....	8
2. Cilj rada .....	9
3. Materijali i metode .....	10
3.1. Bakterijske kulture .....	10
3.2. Prihrana pčelinjih zajednica.....	11
3.3. Procjena jačine pčelinjih zajednica .....	11
3.4. Podaci o pčelinjaku .....	12
3.5. Test difuzije u agaru .....	12
3.6. Turbidimetrijski testovi.....	13
3.7. Klimatski podaci .....	14
3.8. Pretrage na nozemozu.....	14
3.9. Statistička obrada rezultata .....	15
4. Rezultati .....	16
4.1. Identifikacija izoliranih bakterija .....	16

4.2. Procjena količine pčelinjeg legla .....	21
4.3. Pretrage na nozemozu.....	22
4.4. Test difuzije u agaru .....	23
4.5. Turbidimetrijski testovi.....	24
5. Rasprava.....	28
6. Zaključak .....	32
7. Literatura .....	33
8. Životopis .....	37

# 1. Uvod

## 1.1. Pčelinja zajednica

Pčelinju zajednicu čini mnoštvo pojedinačnih pčela koje organiziranim načinom života djeluju kao jedinstven superorganizam. Rod pčela (lat. *Apis*) obuhvaća oko 20 000 različitih vrsta, a najraširenija vrsta u svijetu je europska medonosna pčela (*Apis mellifera* L.) (1). Europska pčela živi u zajednicama koje se sastoje od nekoliko desetaka tisuća sterilnih radilica, nekoliko stotina spolno zrelih mužjaka - trutova i jedne spolno zrele ženke - matice. U pčelinjoj zajednici prisutan je raspored i redosljed obavljanja poslova kućnih pčela koje obavljaju ovisno o dobi (2).

## 1.2. Nestanak pčelinjih zajednica

U novije vrijeme u svijetu se sve više izvještava o masovnim uginućima pčelinjih zajednica, a uzrok se može pripisati kombinaciji više čimbenika. Moderna intenzivna poljoprivreda zbog ekonomske isplativosti temelji se na uzgoju biljnih kultura na velikim monokulturnim površinama. Cvjetni pelud s biljaka uzgajanih u monokulturama često nije dovoljan izvor hranjivih tvari, posebice aminokiselina, esencijalnih za biološki razvoj pčele (3–5). U modernoj poljoprivredi kemijska sredstva primjenjuju se nekoliko puta godišnje, a veliki dio tretiranih biljnih kultura posjećuju pčele. Europska unija (EU) je u travnju 2018. godine zabranila upotrebu neonicotinoida na otvorenim poljoprivrednim površinama, što se nadovezalo na odluku iz 2013. godine kada je zabranjena primjena neonicotinoida na kulturama koje oprašuju kukci (uljana repica, suncokret, kukuruz i pamuk) (6). Neonicotinoidi su samo jedna od mnogih vrsta pesticida koje na pčele mogu djelovati toksično. Osim toksičnog

djelovanja pesticida dokazana je i pozitivna korelacija s pojavnošću pčelinjih bolesti (5,7). Mehanizmi koji utječu na učestaliju pojavu pčelinjih bolesti uslijed izlaganja pesticidima su: supresija imunološkog sustava pčele, smanjenje kognitivnih sposobnosti, gubitak memorije, dezorijentiranost te narušavanje prirodnog sastava probavne mikrobiote (5,7–10).

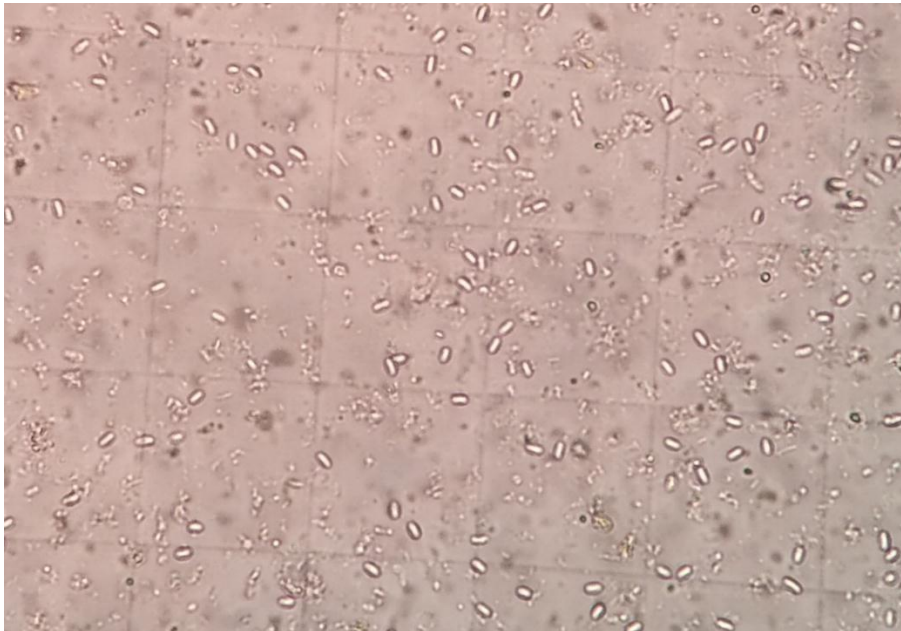
U pčelinjoj košnici prisutna je relativno topla (35 °C) i vlažna (60-70% RV) mikroklima. Ovakvi mikroklimatski uvjeti uz obilje hrane u obliku meda i peluda pogoduju razvoju velikog broja mikroorganizama i nametnika. Pčele mogu biti inficirane različitim skupinama uzročnika bolesti kao što su: virusi, bakterije, gljivice, mikoplazme. Također mogu biti invadirane nametnicima i/ili štetnicima kao što su: praživotinje, grinje i kornjaši.

### 1.3. Nozemoza tipa - C

Nozemoza je nametnička bolest uzrokovana sporogenom mikrosporidijom iz roda *Nosema*. Prilikom invadiranja epitelnih stanica srednjeg crijeva pčele vegetativni oblici te nametničke gljivice koriste resurse nosioca pri čemu se stvara velik broj novih spora (slika 1.). Stanice crijevnog epitela nakon invazije gube fiziološku funkciju, pčele postaju neuhranjene i skraćuje im se životni vijek. Dugi niz godina u Europi je bio prisutan samo uzročnik *N. apis*. Situacija je danas drugačija te je prema novijim istraživanjima u Hrvatskoj kao i u ostatku Europe dominantno prisutan uzročnik *N. ceranae* (11). *N. ceranae* uspješno je prešla s azijske medonosne pčele (*Apis ceranae*) na europsku medonosnu pčelu.

Za utvrđivanje bolesti rutinski se rade mikroskopske pretrage sadržaja probavnog sustava uzorkovanih pčela tako da se pod povećanjem 400x utvrdi prisutnost i procjeni broj spora po pčeli.

Kontroliranje bolesti temelji se na primjeni preventivnih mjera dobre pčelarske prakse, a sve češće primjenjuje se i odabir matica s izraženim higijenskim ponašanjem. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) se za liječenje nozemoze masovno koristio komercijalni antibiotik Fumagilin-B. Od 01.01.2017. u SAD-u antibiotici u pčelarstvu se mogu koristiti samo uz recept ovlaštenog veterinara. Sve više studija ukazuje kako fumagilin nije dugoročno učinkovit protiv novog uzročnika – *N. ceranae*, te da se nakon par mjeseci bolest javlja u još virulentnijem obliku (12–14). U Europi korištenje antibiotika u pčelarstvu je strogo zabranjeno više od dvadeset godina (15,16).



**Slika 1. Prikaz spora *Nosema spp.* pod svjetlosnim mikroskopom, povećanje 400x (Olympus BX41, Japan).** Pčele za pretrage na nozemozu prikupljene su na ulazu košnice. Sadržaj crijeva uzorkovanih pčela filtriran je i pregledan na hemocitološkoj komori.

## 1.4. Američka gnjiloća medonosne pčele

Američka gnjiloća je zarazna bolest pčelinjeg legla uzrokovana gram pozitivnom, štapićastom, sporogenom bakterijom *Paenibacillus larvae*. Smatra se jednom od najtežih pčelinjih bolesti iz razloga što spore uzročnika mogu ostati sposobne za zarazu pčelinjih ličinkama više desetljeća, a zaražena zajednica u konačnici ugiba (17). Uzročnik razgrađuje tkivo pčelinje ličinke koja s vremenom postaje smeđa, rastezljiva, homogena masa (slika 2.). Tijekom infekcije i kolonizacije crijeva nosioca stvaraju se nove infektivne spore uzročnika. Zaražena ličinka može stvoriti do 2,5 milijardi spora, a samo 10 spora je dovoljno da zarazi novu prijemčivu ličinku (18).

*P. larvae* se može svrstati u četiri skupine genotipa: ERIC – I do IV,. U zajednicama s vidljivom kliničkom slikom najčešće je utvrđen genotip ERIC – I, pa zatim ERIC – II. Preostala dva genotipa nalaze se vrlo rijetko. Različiti genotipovi imaju i različita svojstva virulencije. ERIC – II u usporedbi s ERIC – I brže usmrti zaražene ličinke i stoga pčele čistačice ranije uoče promijenjenu ličinku i uklone je. ERIC – I ima najdulje vrijeme usmrćivanja ličinke (12 dana), odnosno ličinka ugine tek nakon poklapanja voštanim poklopcem. Zaražena pčelinja ličinka ispod poklopca se pretvara u rastezljivu bezobličnu masu prepunu novostvorenih zaraznih spora uzročnika (19,20).



**Slika 2. Karakteristična klinička slika američke gnjiloće medonosne pčele<sup>1</sup>.**

## 1.5. Mikrobiota medonosne pčele

### 1.5.1. Sastav zdrave crijevne flore

U novije vrijeme sve se više spoznaje o važnostima crijevne mikrobiote za normalno funkcioniranje mnogih organizama pa tako i medonosne pčele. Sastav mikrobiote medonosne pčele pojedinog geografskog područja može se svrstati u minimalno 8 taksonomskih razreda, a ukupno se može pronaći 10 razreda (Alpha1, Alpha2, Beta, Bifido, Gamma1, Gamma 2, Gamma3, Gamma4, Firm4, Firm5) (21).

Mnogi od navedenih razreda bakterija imaju ulogu u sintezi enzima potrebnih za razgradnju pektina peludnih zrnaca. Veliki broj sojeva sudjeluje u razgradnji šećera primjerice ksiloze arabinoze, ramnoze koji su toksični za pčele i dovode do skraćenja životnog vijeka (22). Bakterije rodova *Snodgrassella* (Beta) i *Gilliamella* (Gamma1) formiraju biofilm na

---

<sup>1</sup> Slika preuzeta sa: <https://www.agric.wa.gov.au/bees/preventing-spread-american-foulbrood-disease> (zadnji pristup 27.12.2019.)



stjenkama crijeva koji ima zaštitnu ulogu protiv uzročnika bolesti probavnog sustava (23). Bakterije roda *Lactobacillus* (Firm4 i Firm5) konzerviraju skladišteni cvjetni pelud u tzv. „pčelinji kruh“ ili pergu na način da izlučuju mliječnu kiselinu. Mliječna kiselina snižava pH smjese meda i peluda i onemogućuje rast patogenim mikroorganizmima (24).

Dobre bakterije nastanjuju probavni sustav pčele već u razvojnom stadiju ličinke oralnim prijenosom s pčela hraniteljica. U razvojnom stadiju ličinke velika je važnost crijevne mikrobiote što je dokazano pokusima na ličinkama uzgojenima u sterilnim laboratorijskim uvjetima. Ličinke koje su hranjene sadržajem crijeva odraslih pčela imale su 82% veći porast tjelesne mase za razliku od ličinki hranjenih sa steriliziranim sadržajem crijeva (25).

### 1.5.2. Disbioza crijevne flore

Disbioza crijevne flore je stanje narušene ravnoteže mikroorganizama u crijevima. Disbioza može nastati tako da se promijeni ravnotežni omjer bakterija mikrobiote ili da se u većim količinama umnože patogene bakterije. Do disbioze crijevne flore pčela može doći djelovanjem više čimbenika. Nekvalitetna prehrana jedan je od glavnih uzroka disbioze. Pčele hranjene dugo skladištenim peludom imaju veću stopu smrtnosti i veću prisutnost nametnika *Nosema spp.* od pčela hranjenih svježim peludom (26).

Antibiotici koji su se desetljećima koristili u pčelarstvu, a posebice njihova višekratna primjena, dovodi do disbioze crijevne flore. Izlaganje pčelinjih zajednica antibioticima (tetraciklini) dovodi do smanjenja raznolikosti crijevnog mikrobioma pčela, a najznačajnije smanjenje populacije uočeno je kod rodova *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* i *Snodgrassella*. U istom pokusu pčele izložene antibiotiku pa zatim oportunističkom patogenom mikroorganizmu (*Serratia kz11*) imale su

veću stopu smrtnosti nego pčele izložene samo patogenom mikroorganizmu. S druge strane patogene bakterije (*P. larvae*) razvile su gene (*tetL*) koji im omogućuju rezistenciju na korištene antibiotike (27).

Osim antibiotika koji se upotrebljavaju u pčelarstvu, pčele mogu biti izložene i antibioticima koji se koriste u svrhu zaštite biljaka. Kada su u pokusima pčele bile izložene penicilinu i streptomycinu došlo je do narušenja prirodnog stanja mikrobioma i pčele su bile podložnije nozemozi (28)

## 1.6. Probiotici u pčelarstvu

Probiotici su živi organizmi koji u odgovarajućim količinama imaju povoljne učinke na zdravlje domaćina. Kako bi se bakterije dostavile u probavni sustav pčela potrebno ih je dodati u šećerni sirup ili šećernu pogaču. Da bi se neka bakterija smatrala probiotikom potrebno je dokazati da ima povoljno djelovanje na organizam.

### 1.6.1. Laboratorijski pokusi

Laboratorijski pokusi s probiotičkim bakterijama provode se kako bi se predvidjelo i simuliralo djelovanje na pčele. Pokusi se najčešće svode na primjenu mikrobioloških metoda i praćenje inhibicije pčelinjih patogenih mikroorganizama probiotičkim bakterijama. Pomoću bakterija roda *Lactobacillus* i *Bifidobacteria* izoliranih iz probavnog sustava pčela u Švedskoj postignuta je apsolutna inhibicija rasta uzročnika američke gnjiloće pčelinjeg legla – *Paenibacillus larvae* na agaru (29). Ista institucija naknadno je provela istraživanje s filtriranim i sterilnim supernatantom prethodno korištenih bakterija te je zabilježena zona inhibicije od 3 do 4 mm na agaru. Navedeno upućuje da probiotičke

bakterije proizvode stabilne antimikrobne metabolite koji onemogućuju rast patogenih mikroorganizama (30).

Pokusi se mogu provoditi i na maloj skupini odraslih pčela (do 100 jedinki) koje se mogu držati u kavezima u laboratoriju. Kavezi se drže u inkubatoru na 33 do 35 °C sa 65% relativne vlažnosti kako bi se simulirali mikroklimatski uvjeti u košnici. U ovakvim uvjetima uočeno je da odrasle pčele koje su tretirane probiotičkim bakterijama imaju manje spora *Nosema spp.* u crijevima. Pokus je bio podijeljen na prvu skupinu pčela koje su prirodno inficirane sporama i drugu skupinu kojoj su u prehranu dodane spore uzročnika nozemoze. U obje skupine je zamijećen manji broj spora *Nosema spp.* kada su pčele konzumirale probiotičke bakterije (31). Upotrebom soja *Parasaccharibacter apium* izoliranog iz pčelinje ličinke postignuta je veća otpornost pčela na nozemozu. Pčele koje su tretirane probiotikom pa zatim inficirane sporama *Nosema spp.* ( $10^4$  spora po pčeli), 10 dana nakon infekcije imale su 73% manje spora uzročnika u probavnom traktu od kontrolne skupine (32).

### 1.6.2. Pokusi na pčelinjim zajednicama

Pokusi praćenja utjecaja probiotika na pčelinjim zajednicama provedeni su u različitim dijelovima svijeta na raznim vrstama i pasminama pčela. U okolici Bologne u istraživanju na 18 pčelinjih zajednica testirano je djelovanje probiotičkih bakterija rodova *Bifidobacteria* (*B. asteroides*, *B. coryneforme*, *B. indicum*) i *Lactobacillus* (*L. kunkeei*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*) te su zabilježeni su slijedeći povoljni rezultati: povećana količina legla za 46,2% 30. dan nakon tretiranja probiotikom, povećane zalihe cvjetnog peluda za 53,4% i meda za 59,2% 60. dan nakon tretiranja (33). U Argentini je upotrebom soja *Lactobacillus johnsonii* CRL1647 postignuto povećanje broja pčela za 36% i zaliha meda za 21% u tretiranim zajednicama (34).

## 2. Cilj rada

Cilj ovog diplomskog rada je izolirati potencijalne probiotičke bakterije iz probavnog sustava medonosne pčele i testirati njihova probiotička svojstva.

Kako bi se ispitalo djelovanje probiotskog djelovanja izoliranih bakterija roda *Lactobacillus* na vitalnost pčelinjih zajednica usporedit će se količina legla zajednica tretiranih probiotikom i kontrolnih zajednica. Iz istih pčelinjih zajednica će se uzorkovati odrasle pčele za mikroskopske pretrage sadržaja crijeva na nozemozu kako bi se provjerilo ima li razlike u stupnju invazije između tretiranih i kontrolnih zajednica.

Učinak probiotičkih bakterija na patogen *P. larvae* će se u tekućem hranjivom mediju mjeriti spektrofotometrijski, a na krutom hranjivom mediju će se mjeriti promjer zone inhibicije.

## 3. Materijali i metode

### 3.1. Bakterijske kulture

Probiotičke bakterije korištene u pokusima izolirane su iz crijeva odraslih medonosnih pčela u dobi oko 25 dana. Pčele su prikupljene na letu košnice bez vidljivih znakova bolesti, a zatim su nakon 2 sata u laboratoriju usmrćene zamrzavanjem. Pčele su izvana poprskane 70%-tnim etanolom, a zatim isprane destiliranom vodom kako bi se isključila mogućnost nasađivanja bakterija s vanjske površine tijela pčele. Sterilnom pincetom sa zadnjim kolutićem zatka izvučena su crijeva iz ukupno 10 pčela i zatim homogenizirana u epruveti s 5 ml fiziološke otopine. Otopina sadržaja crijeva (100 µL) je zatim nasađena na dvije ploče hranjivih podloga selektivnih za bakterije roda *Lactobacillus* (MRS Agar, Biolife, Italija). Ploče su stavljene na inkubaciju u aerobnim uvjetima tijekom 48 h pri 37 °C. Kako bi se izolirali mikroaerofilni sojevi bakterija, sadržaj crijeva je nasađen i u tekuću hranjivu podlogu (MRS bujon, Biolife, Italija) u inkubacijskoj tresilici (IKA 4000, IKA – Njemačka) na 37 °C, pri mikroaerofilnim uvjetima i 150 RPM.

Pojedine bakterijske kolonije na temelju morfološki različitih obilježja odabrane su i nasađene na pojedinačne ploče i u pojedinačne tekuće podloge. Ukupno je uzgojeno 17 kolonija mikroorganizama na pojedinačnim podlogama koje su kasnije s dodatkom 20% glicerola pohranjene na -20 °C. Identifikacija bakterija provedena je pomoću MALDI BioTyper sustava (Bruker, Njemačka) na Institutu Ruđer Bošković, Laboratorij za spektrometriju masa i funkcionalnu proteomiku. Prema rezultatima BioTypera odabrane su samo bakterije roda *Lactobacillus* (5 izolata) i njima su tretirane pčelinje zajednice.

### 3.2. Prihrana pčelinjih zajednica

Pokusne pčelinje zajednice podijeljene su nasumično u dvije skupine. Zajednice su u razdoblju tijekom pet tjedana prihranjene dva puta sa po 150 mL šećernog sirupa pripremljenog u omjeru 2:1 (vodovodna voda : šećer). Tretirana skupina (4 zajednice) je prihranjena šećernim sirupom sa probiotičkim bakterijama, a kontrolna skupina (3 zajednice) je dobila samo šećerni sirup. Bakterije za probiotički sirup prethodno su umnožene u 3 litre MRS bujona. Bakterijska suspenzija je u tubama volumena 50 mL (Falcon, Corning, SAD) centrifugirana na 4000 x g (Eppendorf 5929 R, Njemačka) kako bi se dobio pelet bakterija. Peleti bakterija su zatim resuspendirani šećernim sirupom i dodani u bocu sirupa za prihranu. Probiotički sirup sadržavao je koncentraciju bakterija  $10^7$ - $10^8$  CFU/ml. Koncentracija bakterija određena je nasađivanjem serijskih razrjeđenja sirupa na ploče MRS agara.

### 3.3. Procjena jačine pčelinjih zajednica

Kako bi se procijenila količina pčelinjeg legla prije i poslije tretmana probioticima svaki okvir saća (7 okvira po zajednici) je fotografiran s obje strane, a fotografije su pohranjene za naknadnu analizu. Pomoću računalnog programa za analizu fotografija (Image J – Fiji, National Institutes of Health, SAD) izmjerena je površina pčelinjeg legla izražena u  $\text{cm}^2$ . Prema fotografiji legla na okviru saća, određena je pozicija i veličina elipse tako da se površina elipse dobivena u programu odnosi na površinu legla. Budući da u jedan  $\text{cm}^2$  stanu četiri stanice legla, dobivena površina se množi sa 4 kako bi se dobio broj stanica legla po okviru. Okviri saća fotografirani su prije tretmana (T0), 4 tjedna nakon tretmana (T1) i 7 tjedana nakon tretmana (T2).

### 3.4. Podaci o pčelinjaku

Pčelinjak na kojem su se provodili pokusi nalazi se u Karlovačkoj županiji, Općina Ogulin, naselje Drežnica. Pčelinjak se nalazi na 490 m nadmorske visine, a geografske koordinate pčelinjaka su: 45° 8' 31,6" N, 15° 6' 13,10" E. Tip košnica na kojima se provodio pokus je Alberti-Žnideršićeva standard (AŽ) košnica (Obrt Mellifera, Novi Grad, Bosna i Hercegovina). Iz jedne nasumično odabrane košnice bez vidljivih znakova bolesti, uzorkovane su pčele za izolaciju probiotičkih bakterija. Pokus sa probioticima je proveden na 14 pčelinjih zajednica podijeljenih na probiotičku (8) i kontrolnu skupinu (6). Sve pokusne zajednice prirodno su bile invadirane sporama *Nosema spp.* Pokusi na zajednicama provedeni su u svibnju i lipnju 2019. godine. Za vrijeme pokusa zajednice nisu tretirane drugim dodacima prehrani i veterinarsko-medicinskim proizvodima.

Pčelinjak se nalazi u brdsko planinskom području, a u blizini se nalazi nekoliko kršnih polja (Drežničko polje) čije livade su glavni izvor pčelinje paše. Biljne vrste koje se u razdoblju medenja mogu naći u većim količinama su krkavina (trušljika, lat. *Rhamnus frangula*), djeteline (lat. *Trifolium*), svib (lat. *Cornus sanguinea*). Na teritoriju pčelinjaka periodično se javlja i ne-nektarna paša - medna rosa crnogorice.

### 3.5. Test difuzije u agaru

Test difuzije izveden je na čvrstim hranjivim podlogama pojedinačno nasađenim sojevima *P. larvae* ERIC-I i ERIC-II (Swedish Culture Collection, University of Gothenburg, Švedska), na MYPGP hranjivom mediju. Hranjivi medij pripremljen je sa 15 g ekstrakta kvasca (Oxoid, UK), 10 g Muller Hinton (Oxoid, UK), 3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Oxoid, UK), 1 g piruvata (Oxoid, UK), 10 mL 20% autoklavirane vodene otopine glukoze (Oxoid, UK) i 16 g agara (Oxoid, UK)

U svaku Petrijevu zdjelicu izliveno je 15 mL još toplog i tekućeg agara s prethodno dodanih 150  $\mu$ L suspenzije *P. larvae* optičke gustoće  $OD_{600}=0,1$ . (Gynesys 20, Thermo Spectronic, SAD) Nakon što se agar ohladio i stvrdnuo sterilnom slamkom u sredini je izbušena jažica promjera 5 mm. U svaku jažicu je dodano 20  $\mu$ L sterilnog supernatanta probiotičkih bakterija u stacionarnoj fazi rasta ( $t=24$  h). Supernatant je prije dodavanja u jažice profiltriran kroz 0,2  $\mu$ m filter (Sarstedt, Njemačka) kako bi se osiguralo da ne sadrži žive bakterijske stanice, već samo potencijalne antimirobne metabolite. Ploče su inkubirane na 35 °C s dodatkom 5% CO<sub>2</sub> (mikroaerofilni uvjeti, Thermo Scientific Heracell 240i). Pokus je izveden u triplikatima, s 5 izolata probiotičkih bakterija (rod *Lactobacillus*), a jedna skupina sadržavala je supernatant kokulture svih 5 izolata. Zona inhibicije mjerena je ravnalom od ruba jažice.

### 3.6. Turbidimetrijski testovi

Turbidimetrijski testovi izvedeni su s tekućim suspenzijama *P. larvae* u MYPGP tekućem hranjivom mediju. Pokus je podijeljen na tri eksperimentalne skupine staklenih epruveta u kojima je mjerena optička gustoća. Prva skupina (kontrolna) sadržavala je samo MYPGP hranjivi medij. Druga skupina sadržavala je 95% MYPGP hranjivog medija i 5% sterilnog supernatanta kokulture 5 izolata probiotičkih bakterija. Treća skupina sadržavala je 90% MYPGP hranjivog medija i 10% supernatanta. Svaka skupina epruveta inokulirana je s jednakom količinom *P. larvae* ERIC-I ili ERIC-II (20  $\mu$ L,  $OD_{600}=0,1$ ). Ukupni volumen suspenzije iznosio je 4 mL, a optička gustoća ( $OD_{600}$ ) mjerena je nakon 24 h, 48 h i 72 h. Pokus je izveden u triplikatu.



### 3.7. Klimatski podaci

Meteorološki i hidrološki podaci za područje Ogulina prikupljeni su na internet stranici Državnog hidrometeorološkog zavoda (DHMZ, adresa: <https://meteo.hr/index.php>). Prikupljeni su podaci za trajanje sijanja Sunca, padaline i prosječne dnevne temperature za svibanj 2019. godine kada su se odvijali pokusi na pčelinjaku.

### 3.8. Pretrage na nozemozu

Prvo uzorkovanje odraslih pčela provedeno je dan prije početka tretiranja. Tri naknadna uzorkovanja bila su svakih 10 dana nakon prvog uzorkovanja. Starije odrasle pčele prikupljene su s medišnih okvira lijevkom u čaše volumena 100 mL. Pčele su zatim prebačene u prethodno označene plastične vrećice i do analize pohranjene na -20 °C. Iz svake vrećice nasumično je izvučeno 10 pčela, a zatim su im pincetama odvojeni zatci. Na 10 zadaka u čašu je dodano 10 mL destilirane vode, a zatci su zgnječeni plastičnim štapićem. Otopina sa sadržajem crijeva je pročišćena kroz filter papir i pipetom nanescna na hemocitometarsku komoricu (Marienfeld, Njemačka).

Nativni homogenat pčelinjih crijeva pregledan je svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem 400x. Aritmetička sredina broja spora izbrojenih u 5 kvadrata predstavlja broj spora po pčeli u milijunima. Postupak homogenizacije i prebrojavanja ponovljen je tri puta za svaki uzorak.

### 3.9. Statistička obrada rezultata

Statistički testovi provedeni su u programu SPSS Statistics 21 (IBM, SAD). Za usporedbu količine pčelinjeg legla, apsorbncija u turbidimetrijskim testovima inhibicije *P. larvae* i broja spora *Nosema* spp. unutar iste skupine u različitim terminima korišten je jednosmjerni ANOVA test. Za usporedbu količine pčelinjeg legla i broja spora *Nosema* spp. po pčeli između tretirane i kontrolne skupine korišten je Mann Whitney-U test. U svim testovima razina statističke značajnosti je  $\alpha=0,05$ .

## 4. Rezultati

### 4.1. Identifikacija izoliranih bakterija

Prema dosadašnjim saznanjima bakterije roda *Lactobacillus* pomažu u procesu probave i razvoju imuniteta pčela. Izolacija bakterija iz pčelinjih crijeva u ovom radu provodila se na MRS hranjivom mediju koji je selektivni medij za bakterije iz roda *Lactobacillus* (slika 3.). MRS hranjivi medij je relativno kompleksan, bogat nutrijentima te spada u skupinu manje selektivnih pa na njemu mogu narasti i drugi mikroorganizmi.

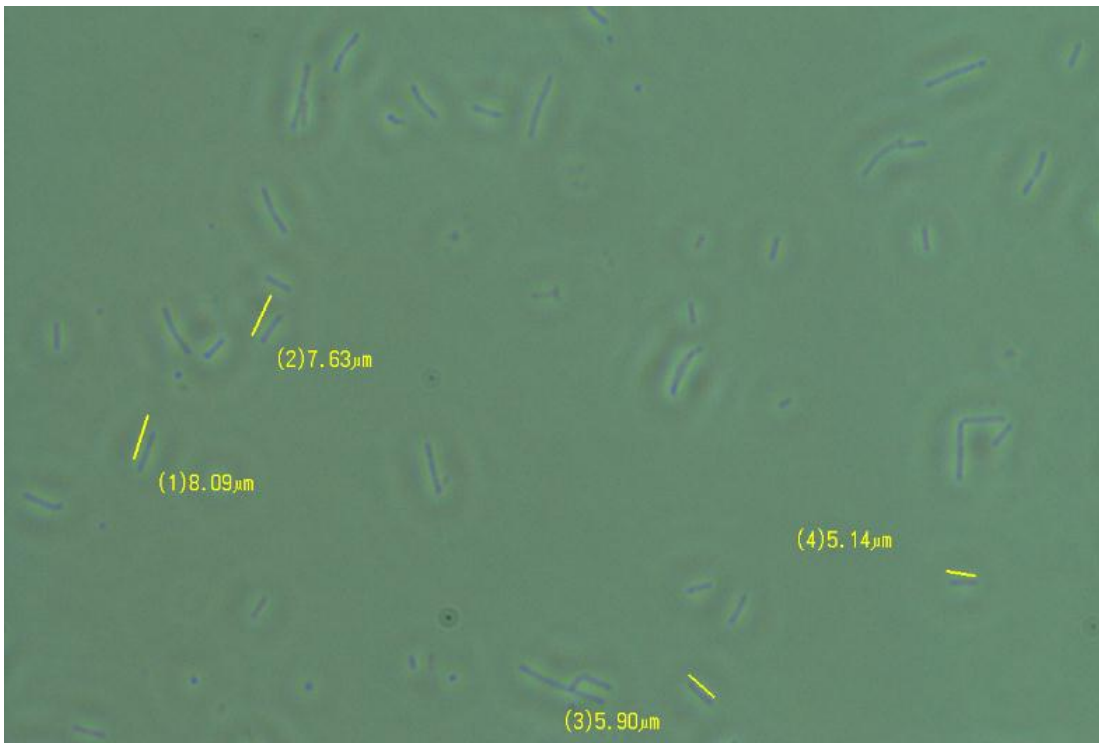


**Slika 3. Kolonije mikroorganizama nakon nasađivanja sadržaja pčelinjih crijeva na MRS hranjivu podlogu.**

Za identifikaciju izoliranih mikroorganizama je pripremljeno 17 nasumično izabranih monokultura. Rezultati su pokazali da od 17 analiziranih kultura 6 spada u rod *Lactobacillus*, 1 spada u rod kvasaca (*Saccharomyces*), a ostalih 10 kultura nije ostvarilo rezultat podudaranja na razini roda s podacima u proteinskoj bazi podataka.

Najbliži rodovi s kojima se podudaraju su *Pseudomonas* (8), *Acidovorax* (1) i *Providencia* (1). Identifikacija na razini vrste zahtijeva faktor podudaranja preko 2,000 no takav rezultat nije dobiven niti za jedan analizirani uzorak.

Faktor podudaranja za bakterije koje izrođa *Lactobacillus* iznosio je između 1,547 i 1,811, a vrsta s kojom se analizirane kulture najviše podudaraju je *L. kunkeei*. Fotografija bakterijskih stanica roda *Lactobacillus* pod svjetlosnim mikroskopom pri povećanju 600x prikazana je na slici 4.



**Slika 4. Fotografija bakterija roda *Lactobacillus* pod svjetlosnim mikroskopom, pri povećanju 600x (Nikon Ni -U).**

Vrsta s kojom se najviše podudara kultura kvasca je *Saccharomyces cerevisiae* uz faktor podudaranja 1,89. Ostale kulture imaju faktor podudaranja između 1,197 i 1,364. Svi rezultati podudaranja s proteinskom bazom podataka prikazani su u Tablici 1.

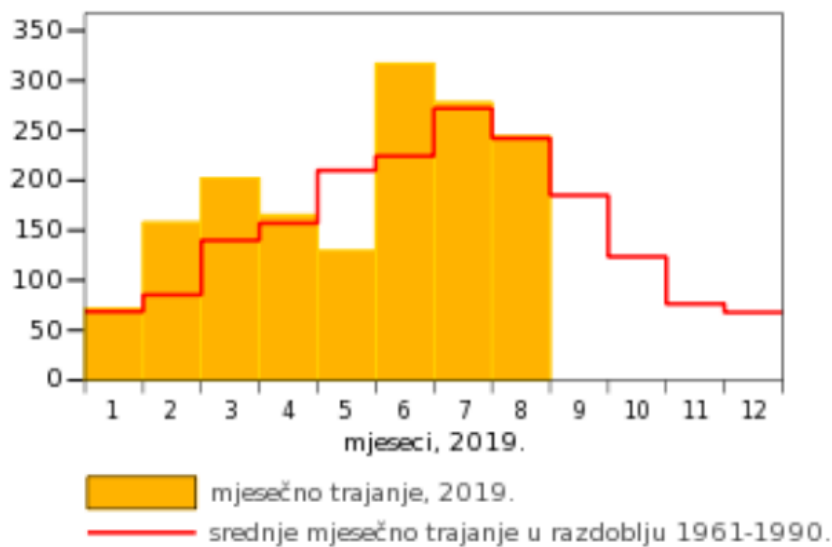
**Tablica 1. Rezultati identifikacije izoliranih mikroorganizama s pripadajućim faktorom podudaranja**

	<b>Najsličniji organizam</b>	<b>Faktor</b>
<b>B 1</b>	Nije sigurna identifikacija ( <i>Lactobacillus kunkeei</i> )	<b>1,668</b>
<b>B 2</b>	Nije sigurna identifikacija ( <i>Lactobacillus kunkeei</i> )	<b>1,547</b>
<b>A 1</b>	Nije sigurna identifikacija	<b>1,279</b>
<b>A 2</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<b>1,89</b>
<b>A 3</b>	Nije sigurna identifikacija	<b>1,233</b>
<b>A 4</b>	Nije sigurna identifikacija	<b>1,212</b>
<b>A 5</b>	Nije sigurna identifikacija	<b>1,223</b>
<b>A 6</b>	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	<b>1,811</b>
<b>A 7</b>	Nije sigurna identifikacija	<b>1,336</b>
<b>A 8</b>	Nije sigurna identifikacija	<b>1,197</b>
<b>A 9</b>	Nije sigurna identifikacija ( <i>Lactobacillus kunkeei</i> )	<b>1,678</b>
<b>A 10</b>	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	<b>1,79</b>
<b>A 11</b>	Nije sigurna identifikacija	<b>1,139</b>
<b>A 12</b>	Nije sigurna identifikacija	<b>1,364</b>
<b>A 13</b>	Nije sigurna identifikacija	<b>1,199</b>
<b>A 14</b>	Nije sigurna identifikacija	<b>1,282</b>
<b>A 15</b>	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	<b>1,764</b>

<b>2,000-3,000</b>	Sigurna identifikacija roda, vjerojatna identifikacija vrste
<b>1,700-1,999</b>	Vjerojatna identifikacija roda
<b>0,000-1,699</b>	Nije sigurna identifikacija

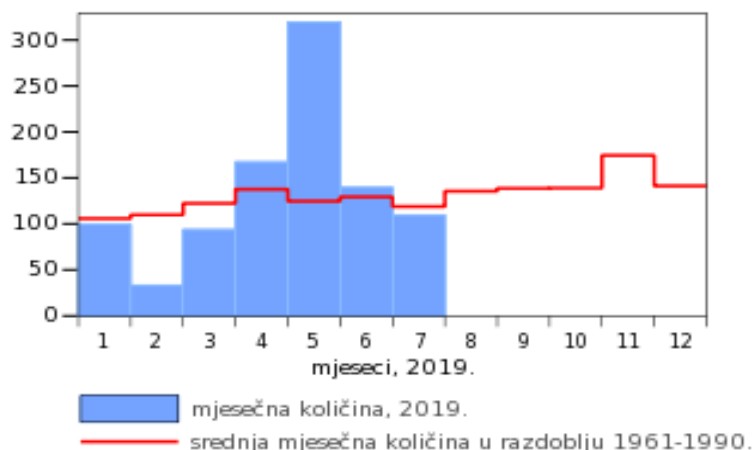
## 4.2. Klimatski podaci

Kako bi se utvrdila korelacija između stupnja invazije nozemozom pčelinjih zajednica i vremenskih prilika, analizirani su klimatski podaci za vrijeme odvijanja pokusa na pčelinjaku. Prema podacima Državnog hidrometeorološkog zavoda oborinske prilike za svibanj 2019. godine na području Ogulina opisane su pod kategorijom – ekstremno kišno. Najveća dnevna količina oborine u Hrvatskoj u svibnju 2019. izmjerena je 13.05. u Ogulinu i iznosila je 93,7 mm. U svibnju je kumulativno palo više od 300 mm kiše dok prosječna vrijednost za svibanj 125 mm (slika 6.). Trajanje sijanja Sunca u svibnju bilo je 120 sati dok je prosječna vrijednost 200 sati (slika 5.). Srednja dnevna temperatura sredinom svibnja na području Ogulina bila je 6 °C dok je višegodišnja prosječna vrijednost 15 °C (slika 7.)

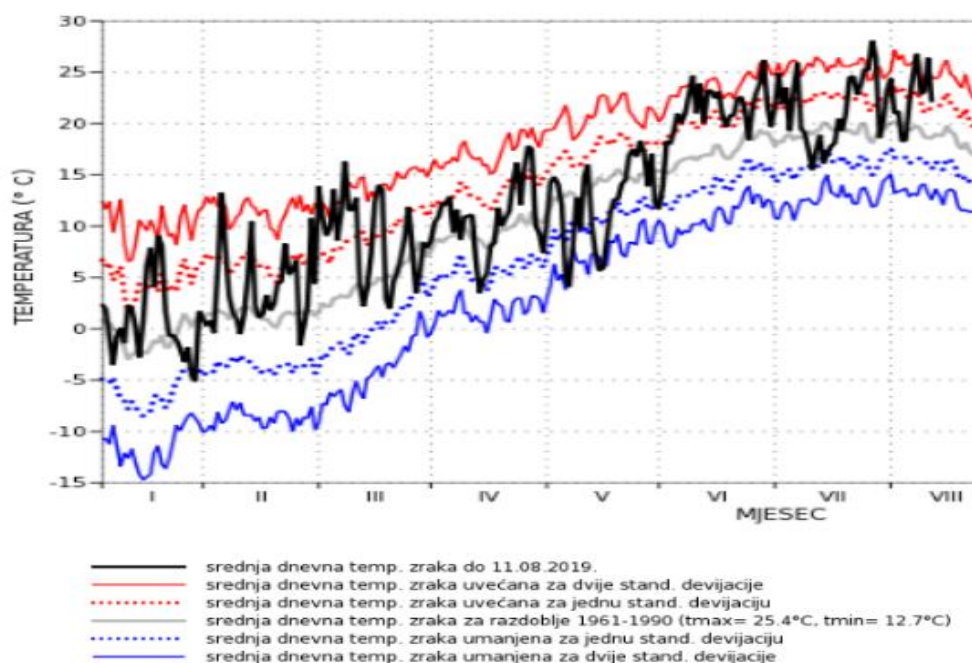


**Slika 5. Trajanje sijanja Sunca na području Ogulina tijekom svibnja bilo je manje od višegodišnjeg prosjeka <sup>2</sup>. Žuti stupovi označavaju mjesečno trajanje sijanja Sunca u satima, a crvene linije označavaju srednje mjesečno trajanje u razdoblju od 1961. - 1990. godine**

<sup>2</sup> Slika preuzeta sa: <https://meteo.hr/> (zadnji pristup 27.12.2019.)



**Slika 6. Mjesečna količina padalina za svibanj u području Ogulina iznosila je 310 mm<sup>3</sup>. Plavi stupovi označavaju mjesečnu količinu padalina u milimetrima, a crvene linije označavaju srednje mjesečne količine padalina u razdoblju 1961. – 1990. godine.**



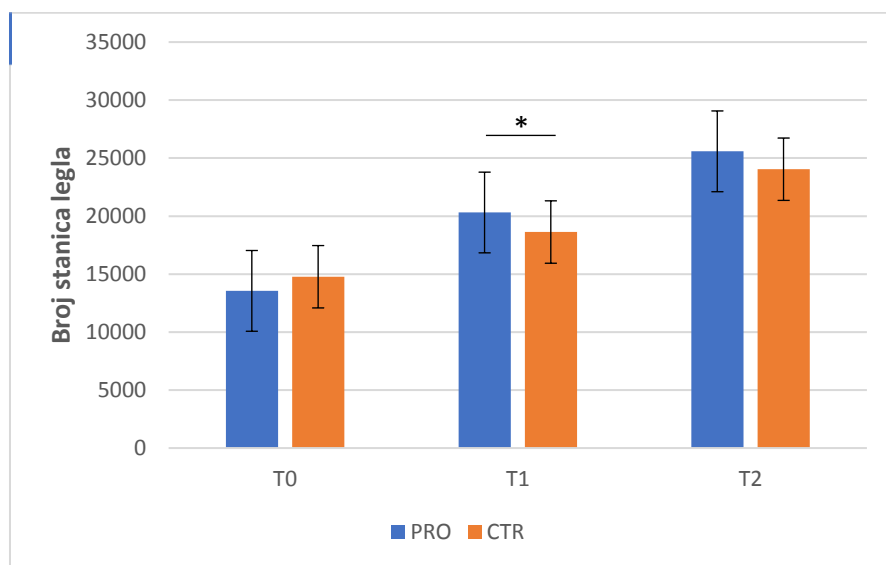
**Slika 7. Srednja dnevna temperatura u sredini svibnja na području Ogulina bila je 6 °C<sup>4</sup>. Crna linija označava srednje dnevne temperature, a siva linija predstavlja srednje vrijednosti temperatura za razdoblje 1961. – 1990. godine.**

<sup>3</sup> Slika preuzeta sa: <https://meteo.hr/> (zadnji pristup 27.12.2019.)

<sup>4</sup> [https://meteo.hr/klima.php?section=klima\\_pracenje&param=srednja\\_temperatura&Grad=og\\_sred &Godina=2019](https://meteo.hr/klima.php?section=klima_pracenje&param=srednja_temperatura&Grad=og_sred &Godina=2019) (zadnji pristup 27.12.2019.)

## 1.1. Procjena količine pčelinjeg legla

Kako bi se provjerio utjecaj probiotičkih bakterija na snagu i vitalnost pčelinje zajednice mjerena je površina legla pokusnih i kontrolnih pčelinjih zajednica u tri termina s vremenskim razmakom. Površina legla dobivena u cm<sup>2</sup> preračunata je u broj stanica s leglom tako da je broj u cm<sup>2</sup> pomnožen s 4. Rezultati broja stanica legla svih mjerenja prikazani su na slici 8. Prosječno povećanje legla u drugom mjerenju u skupini s probioticima (PRO) je iznosilo 49,9% naspram kontrolne (CTR) skupine sa 26,1% ( $p=0,046$ ). Primjer mjerenja pčelinjeg legla jedne od tretiranih zajednica u programu Image J prikazan je na slici 9.



**Slika 8. Probiotičke bakterije utječu na razvoj legla pčelinjih zajednica.** Površina legla dobivena je analizom fotografija okvira saća sa leglom u programu Image J (National Institutes of Health, SAD). Povećanje legla u skupini zajednica hranjenih probioticima (PRO) veće je nego kod kontrolnih (CTR) zajednica u drugom mjerenju (T1) ( $p<0,05$ ,  $p=0,046$ ).

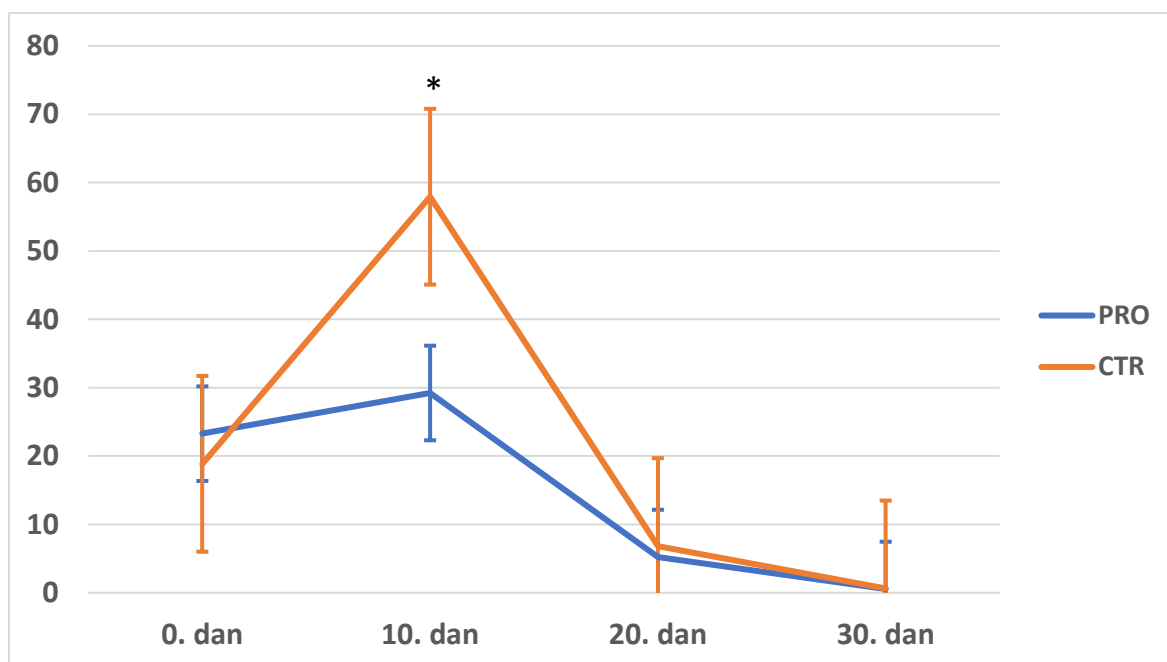




**Slika 9. Mjerenje površine pčelinjeg legla u programu Image J.**

## 1.2. Pretrage na nozemozu

Svjetlosnim mikroskopom je utvrđen broj spora *Nosema spp.* po pčeli kako bi se utvrdilo postoji li razlika između kontrolne i tretirane skupine sa probioticima. U drugom brojanju spora (10 dana od početka tretiranja) u kontrolnoj skupini statistički značajno je veći broj spora *Nosema spp.* nego u tretiranoj (57,9 milijuna po pčeli naspram 29,2 milijuna,  $p=0,002$ , prikazano na slici 11).



**Slika 10. Probiotici smanjuju stupanj invazije sporama *Nosema spp.*** Plava linija označava broj spora *Nosema spp.* po pčeli (u milijunima) u tretiranim zajednicama, a narančasta linija označava broj spora u kontrolnoj skupini. Brojanje spora bilo je neposredno prije, 10, 20 i 30 dana nakon tretmana probioticima. Razlika u broju spora 10. dan je statistički značajna,  $p=0,002$ .

#### 4.4. Test difuzije u agaru

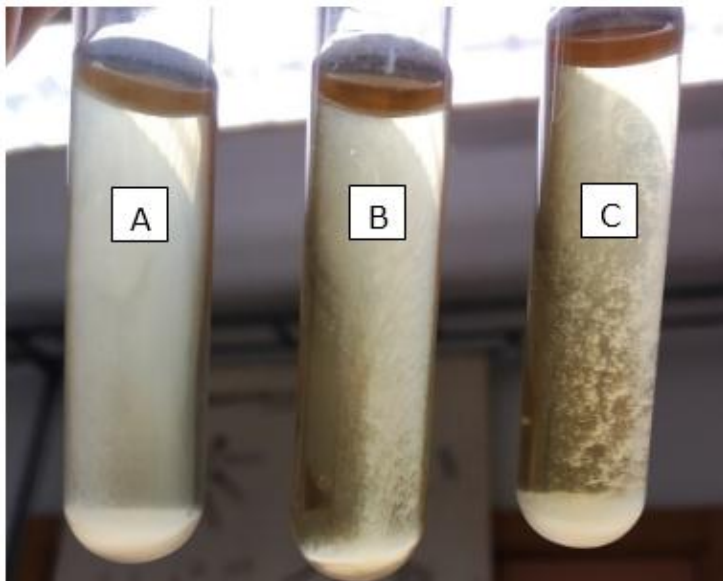
Kako bi se provjerila potencijalna antimikrobna svojstva metabolita probiotičkih bakterija izvedeni su pokusi difuzije u jažicama agara i turbidimetrijski testovi na bakteriji *P. larvae* ERIC-I i ERIC-II. Zona inhibicije kod soja ERIC-I iznosila je 3 do 4 mm u svim skupinama, bilo sa supernatantom iz pojedinačnih kultura bakterija iz roda *Lactobacillus* ili kokulture 5 izolata. Primjer inhibicije soja ERIC - I prikazan je na slici 11. Upotrebom supernatanta iz kokulture svih 5 izolata nije postignuta veća zona inhibicije od supernatanta pojedinačnih kultura. Kod soja ERIC-II nije uočena zona inhibicije niti u jednom slučaju.



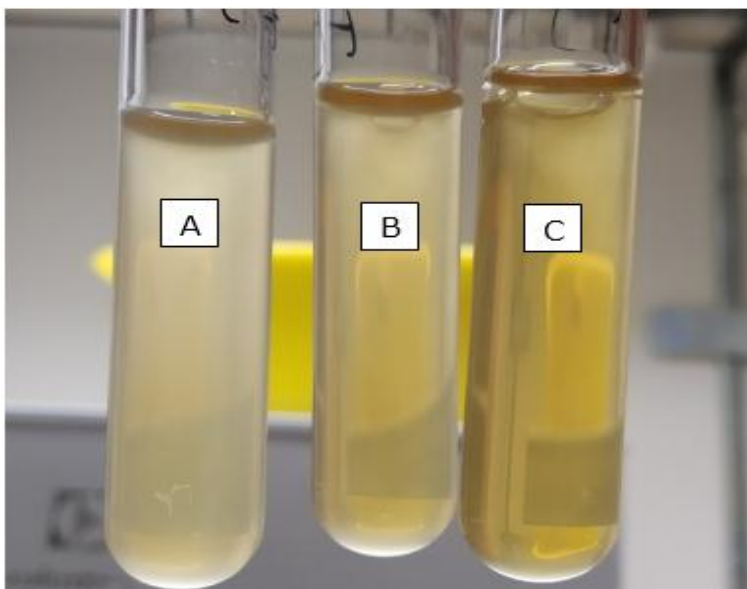
**Slika 11. Supernatant probiotičkih bakterija inhibira rast bakterije *P. Larvae* na čvrstoj hranjivoj podlozi.** Slika prikazuje zonu inhibicije *P. Larvae* ERIC-I pomoću supernatanta jednog od izolata probiotičkih bakterija (A9). *P. Larvae* ERIC-I nasađen je na MYPGP agar, a u jažicu je dodano 20  $\mu$ L supernatanta. Udaljenost od ruba jažice do linije rasta bakterija iznosila je 3-4 mm za sve korištene probiotičke sojeve.

#### 4.5. Turbidimetrijski testovi

Turbidimetrijski testovi provedeni su kako bi se simulirali uvjeti u probavnom sustavu pčele nakon konzumacije veće količine probiotičkih bakterija. Na slici 12. može se vidjeti kako je epruveta A najviše zamućena, a epruveta C najbistrija. Iako je epruveta C optički najbistrija, u njoj se mogu vidjeti agregirane bakterije. Nakon vorteksiranja (slika 13.) izmjerene su apsorbancije.

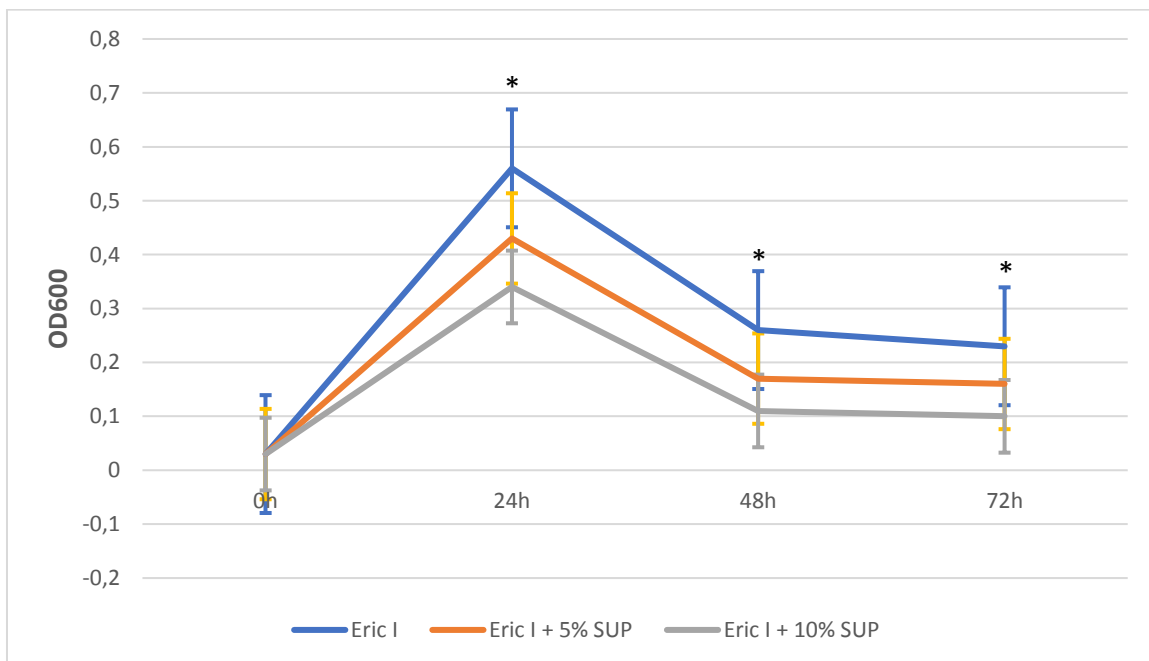


**Slika 12. Supernatant probiotičkih bakterija inhibira rast *P. larvae* u suspenziji.** Epruvete s hranjivim medijom MYPGP + *P. Larvae* 24 h nakon inokulacije. S lijeva na desno: A - MYPGP tekući medij, B - MYPGP + 5% supernatanta probiotičkih bakterija, C - MYPGP + 10% supernatanta.



**Slika 13. Supernatant probiotičkih bakterija inhibira rast *P.larvae* u suspenziji.** Epruvete s hranjivim medijom MYPGP + *P. Larvae* 24 h nakon inokulacije, vorteksirane. S lijeva na desno: A - MYPGP tekući medij, B - MYPGP + 5% supernatanta probiotičkih bakterija, C - MYPGP + 10% supernatanta.

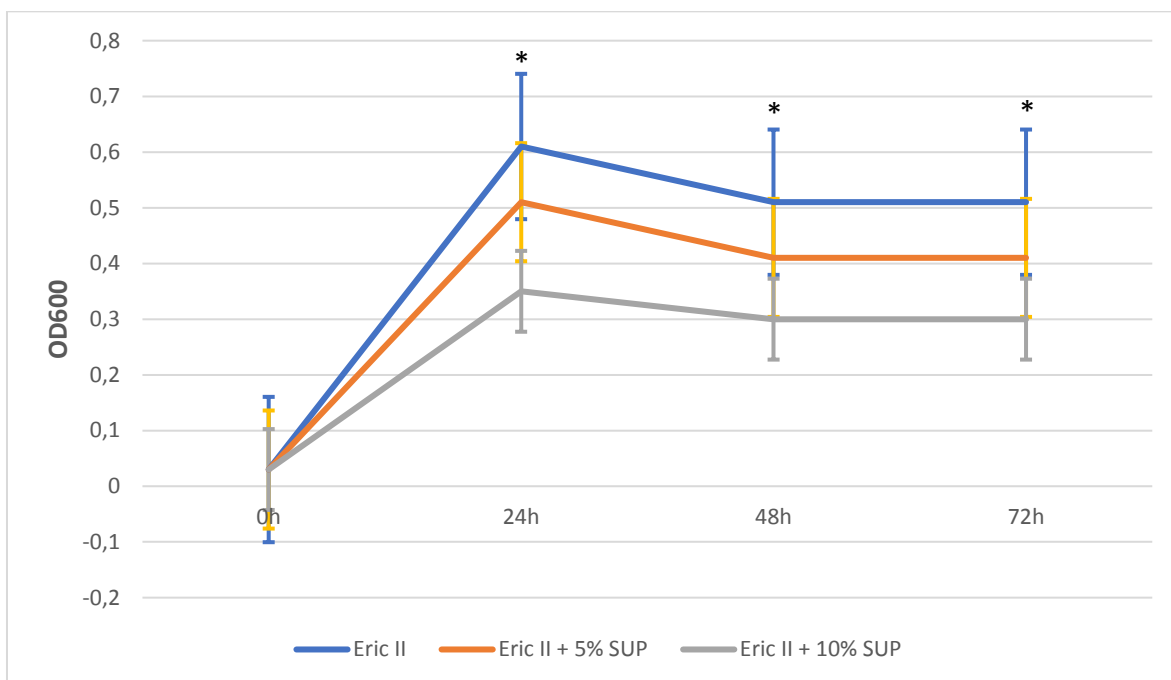
Kod soja ERIC-I 24 h nakon dodatka 5% supernatanta došlo je do smanjenja apsorbancije za 23,2% ( $p=0,029$ ), a s dodatkom 10% supernatanta za 39,3% ( $p=0,002$ ) u usporedbi s kontrolnom skupinom. U trenutku  $t=48$  h bakterije su počele sa sporulacijom te je u kontrolnoj skupini došlo do smanjenja apsorbancije za 53,6% ( $p=0,001$ ) u odnosu na  $t=24$  h. U skupini s 5% supernatanta apsorbancija se u  $t=48$  h smanjila za 60,5% ( $p=0,014$ ) u odnosu na  $t=24$  h. U skupini s 10% supernatanta u trenutku  $t=48$  h došlo je do smanjenja apsorbancije za 67,6% ( $p=0,001$ ) u odnosu na  $t=24$  h. Srednje vrijednosti apsorbancija za soj ERIC – I prikazane su na slici 14.



**Slika 14. Dodatak supernatanta probiotičkih bakterija inhibira rast *P. Larvae ERIC – I*.** Grafički prikaz vrijednosti apsorbancija soja *P. larvae ERIC-I* tri skupine epruveta: Kontrolna (samo MYPGP medij, označeno plavo), MYPGP medij + 5% supernatanta probiotičkih bakterija, označeno narančasto, MYPGP medij + 10% supernatanta, označeno sivo. Inhibicija rasta značajna je u svim trenucima nakon dodatka supernatanta  $t=24$  h,  $t=48$  h i  $t=72$  h.

Kod soja ERIC-II u trenutku t=24 h s dodatkom 5% supernatanta došlo je do smanjenja apsorbancije za 16,4% (p=0,012), a s dodatkom 10% supernatanta za 42,6% (p=0,001) u usporedbi s kontrolnom skupinom. U trenutku t=48 h bakterije su počele sa sporulacijom te je u kontrolnoj skupini došlo do smanjenja apsorbancije za 16,4% (p=0,012) u odnosu na t=24 h. U skupini s 5% supernatanta apsorbancija se u t=48 h smanjila za 19,6% (p=0,001) u odnosu na t=24 h. U skupini s 10% supernatanta u trenutku t=48 h došlo je do smanjenja apsorbancije za 14,3% (p= 0,001) u odnosu na t=24 h.

Srednje vrijednosti apsorbancija za soj ERIC - II prikazane su grafički na slici 15.



**Slika 15. Dodatak supernatanta probiotičkih bakterija inhibira rast *P. Larvae ERIC – II*.** Grafički prikaz vrijednosti apsorbancija soja *P. larvae ERIC-II* tri skupine epruveta: Kontrolna (samo MYPGP medij, označeno plavo), MYPGP medij + 5% supernatanta probiotičkih bakterija, označeno narančasto, MYPGP medij + 10% supernatanta, označeno sivo. Inhibicija rasta značajna je u svim trenucima nakon dodatka supernatanta t=24 h, t=48 h i t=72 h.

## 5. Rasprava

Cilj ovog istraživačkog rada bio je izolirati i testirati probiotičke bakterije iz medonosne pčele (*Apis mellifera*). Dobiveni rezultati potvrđuju povoljno djelovanje dodatka probiotičkih bakterija izoliranih iz probavnog sustava medonosne pčele na zdravlje i vitalnost socijalnih pčelinjih zajednica. Prethodna istraživanja provedena su u brojnim državama svijeta, no ovo je prvo istraživanje koje je provedeno s bakterijama iz roda *Lactobacillus* izoliranim iz pčela u Hrvatskoj. Jedino istraživanje koje je do sada provedeno u Hrvatskoj bila je primjenom komercijalnog probiotika (EM® probiotik za pčele, EMRO Japan). Rezultati navedenog istraživanja pokazali su povećanje koncentracije vitelogenina u hemolimfi pčela koje su konzumirale probiotik u odnosu na kontrolnu skupinu (35). Vitelogenin je protein koji kod pčela sudjeluje u modulaciji imunskog sustava te ima ulogu antioksidansa (36). Opisani dio istraživanja proveden je u laboratorijski kontroliranim uvjetima na poznatom broju mladih odraslih pčela u kavezićima, dok je istražen i utjecaj primjene istog probiotika na stupanj prirodne invazije nozemozom u terenskim uvjetima na komercijalnom pčelinjaku. Primjena EM® probiotika dovela je do smanjenja invazije nozemozom.

Mikroorganizmi koji su izolirani iz probavnog sustava pčela u ovom radu prema proteinskoj bazi uređaja BioTyper najbliži se poklapaju s rodovima *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Providencia*, *Acidovorax* i *Saccharomyces*. Bakterije roda *Lactobacillus* dominantno su prisutne u probavnom sustavu pčela i imaju široku paletu povoljnog djelovanja na probavu i zdravlje pčela (23-25, 30, 31). Mnogo je različitih vrsta iz roda *Lactobacillus* pronađeno u crijevima svih do sada proučavanih vrsta pčela, no nije potpuno poznato porijeklo tih bakterija (21, 23, 25). Pojedine vrste iz rodova *Lactobacillus* i *Saccharomyces* pronađene su u nektaru cvjetova te nije jasno jesu li na taj način kolonizirale probavni sustav i proizvode pčela ili se hranom i oralnim kontaktom prenose s generacije na

generaciju (21). Bakterije rodova *Pseudomonas*, *Providencia* i *Aciovorax* do sada nemaju određenu i opisanu probiotičku ulogu u pčela te su u crijeva pčele dospjele vjerojatno putem vode iz okoliša (37). Bakterije iz roda *Pseudomonas* često se nalaze u tlu i vodama (rijeke, lokve, rosa) te ih pčele vrlo lako mogu unijeti u organizam dok piju vodu (38).

Prethodno je dokazano da probiotičke bakterije rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacteria* izolirane iz pčela imaju djelovanje protiv bolesti nozemoze u kaveznim zajednicama u laboratoriju (31). Jedan od ciljeva ovog rada bio je ispitati djelovanje probiotičkih bakterija (rod *Lactobacillus*) u terenskim uvjetima na pčelinjaku. Jedna skupina (8 zajednica) dobila je u maloj količini šećernog sirupa s  $10^8$  do  $10^9$  živih bakterija, dok je druga skupina (6 zajednica) dobila samo šećerni sirup. Sve zajednice su u početku pokusa bile prirodno invadirane sporama *Nosema spp* ( $\approx 20$  milijuna po pčeli). Nakon prihrane zajednica početkom svibnja 2018. godine došlo je do zahlađenja. Sredinom svibnja prosječna dnevna temperatura u Ogulinu bila je 6 °C što je inače karakteristična vrijednost za ožujak (slika 7.). Svibanj je također imao nadprosječno više padalina (1,5 puta više od prosjeka) i ispodprosječan broj sati sunčanih sati (40% manje) (slika 6. i slika 5.). Sve navedeno imalo je za posljedicu smanjenu mogućnost izlaska pčela iz košnica. Pčele pri takvim temperaturama ne samo da ne mogu prikupljati nektar, nego ne mogu imati ni tzv. pročisne letove. Na pročisnim letovima pčele defeciraju i rješavaju se potencijalno zaraznog sadržaja u crijevima (39). Kod izostanka pročisnih letova zarazni sadržaj dulje se zadržava u crijevima i takvi uvjeti povoljni su širenje nozemoze i povećanje broja spora uzročnika u crijevima. Upravo to se moglo uočiti iz rezultata pretraga na nozemozu u svim zajednicama (slika 10.). Sredinom svibnja (drugo brojanje spora) došlo je do povećanja broja spora u obje skupine, ali ipak značajno više u kontrolnoj skupini (57,9 milijuna po pčeli) nego u pokusnoj (29,2 milijuna po pčeli). Krajem svibnja došlo je do poboljšanja vremenskih prilika i pčele su imale nagli razvoj. Brzom



smjenom s generacijom mladih pčela došlo je do značajnog smanjenja stupnja invazije sporama *Nosema spp.* (5,2 milijuna spora u probiotičkoj skupini i 6,8 milijuna u kontrolnoj, slika 10.). Na istim zajednicama provedeno je mjerenje površine legla u nekoliko vremenskih intervala. U prethodnim studijama u Italiji i Argentini pokazano je da zajednice s probiotičkim bakterijama brže napreduju po pitanju količine legla i brojnosti pčela naspram kontrolnih zajednica (33, 34). Prema rezultatima mjerenja 4 tjedna nakon tretiranja povećanje legla zajednica s probioticima je iznosilo 49,9% naspram kontrolne skupine s 26,1% ( $p=0,046$ , slika 8.).

Kako bi se dodatno provjerilo djelovanje izoliranih probiotičkih bakterija na pčelinje patogene uzročnike bolesti provedeni su *in vitro* pokusi na bakteriji *P. larvae*. *In vitro* pokusi pokazali su slične rezultate kao u prethodnim studijama (29, 30). Testom difuzije u agaru pomoću supernatanta probiotičkih bakterija postignuta je inhibicija rasta u zoni 3 do 4 mm od ruba jažice za soj ERIC – I (slika 11.). Soj ERIC – II nije imao vidljivu zonu inhibicije što je donekle i bilo očekivano budući da ima znatno brži rast od soja ERIC – I. Za očekivati je bilo kako će supernatant kokulture svih 5 probiotičkih sojeva imati nešto veću zonu inhibicije od pojedinačnih, no to nije bio slučaj. Mogući razlog izostanka veće zone inhibicije kod upotrebe kokulture 5 izolata od pojedinačnih je taj da korišteni izolati jedan te isti soj bakterija.

U turbidimetrijskim testovima korišten je tekući MYPGP hranjivi medij za *P. larvae* u kontrolnoj grupi, a dvije pokusne sadržavale su osim MYPGP medija dodatak od 5% i 10% supernatanta probiotičkih bakterija. Bila je očekivana inhibicija rasta *P. larvae* u epruvetama s dodatkom supernatanta. Kod soja ERIC – I nakon 24 h optička gustoća u epruvetama s 10% supernatanta bila je 39,3% manja nego u kontrolnim (slika 14.). Kod soja ERIC – II u istom slučaju bilo je 42,6% manje nego u kontrolnim (slika 15.). Razlika u zamućenju se kod oba soja mogla vidjeti i golim okom, a moglo se i vidjeti kako bakterije agregiraju (slika 12.). Do

agregiranja bakterija dolazi vjerojatno iz razloga što u suspenziji vladaju relativno nepovoljni uvjeti (40). Bakterije se na taj način nastoje međusobno zaštititi od djelovanja metabolita probiotičkih bakterija. Soj ERIC – II kod testa difuzije u agaru nije imao zonu inhibicije rasta, no u slučaju s turbidimetrijskim testovima jest. Jedan od mogućih razloga je što je u testovima na agaru korištena relativno mala količina supernatanta (20  $\mu$ L). Iako dobiveni rezultati upućuju kako probiotičke bakterije usporavaju rast patogena *P. Larvae in vitro*, nije potpuno sigurno da će se isto dogoditi u terenskim uvjetima na pčelinjaku. Pčelinja zajednica je složen sustav te je potrebno provesti istraživanja kako bi se utvrdilo djelovanje probiotika na američku gnjiloću u terenskim uvjetima.

## 6. Zaključak

Prema dosadašnjim saznanjima najveći udio u sastavu mikrobiote medonosnih pčela imaju bakterije roda *Lactobacillus*. Zbog toga je analiziran njihov učinak na razvoj legla i na stupanj invazije bolesti nozemoze. Dobiveni rezultati nakon tretiranja pčelinjih zajednica probiotikom poklapaju se sa prethodnim istraživanjima iz drugih dijelova svijeta. Zabilježen je brži razvoj pčelinjih zajednica tretiranih sa probioticima, a iste zajednice imale su i manji stupanj invazije sporama uzročnika *Nosema spp.*

Dodatno je istražena mogućnost inhibicije bakterije *P. larvae* pomoću supernatanta suspenzije probiotičkih bakterija *in vitro*. Uočena je inhibicija rasta bakterije *P. larvae*, osobito soja ERIC – I. *P. larvae* uzročnik je jedne od najtežih bolesti medonosne pčele, no nije potpuno sigurno da se rezultati *in vitro* pokusa inhibicije mogu preslikati na terenske uvjete pčelinjaka te je potrebno provesti dodatne pokuse.

Navedeni rezultati predstavljaju temelje za daljnja istraživanja djelovanja probiotika za pčele. U budućim istraživanjima potrebno je provesti pokuse na većem broju pčelinjih zajednica. Također bi bilo potrebno izolirati još potencijalnih kandidata probiotičkih bakterija iz različitih dijelova Hrvatske i u različitim trenutcima pčelarske sezone. Za potrebe razvoja potencijalnog dodatka prehrani potrebno je ispitati i djelovanje različitih koncentracija bakterija te utvrditi optimalnu djelotvornu koncentraciju.

## 7. Literatura

1. Seeley Thomas. Honeybee Democracy. New Jersey: Princeton University Press; 2010.
2. Giovanni G, Eisenhardt D, Giurfa M. Honeybee Neurobiology and Behavior. Heidelberg, London, New York: Springer; 2012.
3. . Dolezal AG, Toth AL. Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. *Current Opinion in Insect Science*. 2018;26.
4. Schmidt LS, Schmidt JO, Rao H, Wang W, Xu L. Feeding Preference and Survival of Young Worker Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Fed Rape, Sesame, and Sunflower Pollen. *Journal of Economic Entomology*.
5. Goulson D, Nicholls E, Botias C, Rotheray EL. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*. 2015;
6. EFSA. Neonicotinoids: risks to bees confirmed. 2018 Feb 28;
7. Sánchez-Bayo F, Goulson D, Pennacchio F, Nazzi F, Goka K, Desneux N. Are bee diseases linked to pesticides? — A brief review. *Environment International*. 2016;
8. Dai P, Yan Z, Ma S, Yang Y, Wang Q, Hou C, et al. The Herbicide Glyphosate Negatively Affects Midgut Bacterial Communities and Survival of Honey Bee during Larvae Reared in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;
9. Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D, Varricchio P, Caprio E, Nazzi F, et al. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;
10. Motta EVS, Raymann K, Moran NA. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;
11. Tlak Gajger I. Raširenost *Nosema ceranae* na pčelinjacima u Koprivničko-križevačkoj županiji. *Veterinarska stanica*. 2011;
12. Van den Heever JP, Thompson TS, Otto SJG, Curtis JM, Ibrahim A, Pernal SF. The effect of dicyclohexylamine and fumagillin on *Nosema ceranae*-infected honey bee (*Apis mellifera*) mortality in cage trial assays. *Apidologie*. 2016;

13. Burnham AJ. Scientific Advances in Controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) Infections in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Frontiers in Veterinary Science*. 2019;
14. Williams GR, Sampson MA, Shutler D, Rogers REL. Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Invertebrate Pathology*. 2008;
15. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. (470):72.
16. Bilandžić N, Solomun Kolanović B, Tlak Gajger I, Buljan P, Krpan M, Hruškar M. Kontrola antimikrobnih lijekova u medu. *Hrvatski časopis za prehranbenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*. 2018;
17. Genersch E. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010;
18. D Evans J, Armstrong T-N. Inhibition of the American foulbrood bacterium, *Paenibacillus larvae larvae* , by bacteria isolated from honey bees. *Journal of Apicultural Research*. 2005;
19. Genersch E. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2006;
20. Tlak Gajger I, Tomljanović Z i Vugrek O. Osobitosti pojedinih genotipova bakterije *Paenibacillus larvae*. *Veterinarska stanica* 2015.
21. Moran NA, Hansen AK, Powell JE, Sabree ZL. Distinctive Gut Microbiota of Honey Bees Assessed Using Deep Sampling from Individual Worker Bees. Smagghe G, editor. *PLoS ONE*. 2012;
22. Zheng H, Nishida A, Kwong WK, Koch H, Engel P, Steele MI, et al. Metabolism of Toxic Sugars by Strains of the Bee Gut Symbiont *Gilliamella apicola*. *mBio*. 2016;
23. Engel P, Martinson VG, Moran NA. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;
24. Lee FJ, Rusch DB, Stewart FJ, Mattila HR, Newton ILG. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome: Fermentation by honey bee gut microbes. *Environmental Microbiology*. 2015;

25. Zheng H, Powell JE, Steele MI, Dietrich C, Moran NA. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;
26. Maes PW, Rodrigues PAP, Oliver R, Mott BM, Anderson KE. Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and *Nosema* disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology*. 2016;
27. Raymann K, Shaffer Z, Moran NA. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. Gore J, editor. *PLOS Biology*. 2017;
28. Li JH, Evans JD, Li WF, Zhao YZ, DeGrandi-Hoffman G, Huang SK, et al. New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to *Nosema* infection. Rueppell O, editor. *PLOS ONE*. 2017;
29. Forsgren E, Olofsson TC, Vásquez A, Fries I. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie*. 2010;
30. Lamei S, Stephan JG, Riesbeck K, Vasquez A, Olofsson T, Nilson B, et al. The secretome of honey bee-specific lactic acid bacteria inhibits *Paenibacillus larvae* growth. *Journal of Apicultural Research*. 2019;
31. Baffoni L, Gaggìa F, Alberoni D, Cabbri R, Nanetti A, Biavati B, et al. Effect of dietary supplementation of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains in *Apis mellifera* L. against *Nosema ceranae*. *Beneficial Microbes*. 2016;
32. Corby-Harris V, Snyder L, Meador CAD, Naldo R, Mott B, Anderson KE. *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov., Improves Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Resistance to *Nosema*. *Journal of Economic Entomology*. 2016;
33. Alberoni D, Baffoni L, Gaggìa F, Ryan PM, Murphy K, Ross PR, et al. Impact of beneficial bacteria supplementation on the gut microbiota, colony development and productivity of *Apis mellifera* L. *Beneficial Microbes*. 2018;
34. Audisio M, Benítez-Ahrendts M. *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. *Beneficial Microbes*. 2011;
35. Tlak Gajger, Ivana, Šoštarić P. Primjena mikroorganizama u prihrani pčelinjih zajednica. *Hrvatska Pčela*. 09/2019.

36. Harwood G, Amdam G, Freitak D. The role of Vitellogenin in the transfer of immune elicitors from gut to hypopharyngeal glands in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*. 2019;
37. Pal D, Kaur N, Sudan SK, Bisht B, Krishnamurthi S, Mayilraj S. *Acidovorax kalamii* sp. nov., isolated from a water sample of the river Ganges. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018;
38. Jan Sørensen, Ole Nybroe. *Pseudomonas in the Soil Environment*. Springer, Boston, MA; 2004.
39. Smith ML. The Honey Bee Parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via Food Exchange? Martin SJ, editor. *PLoS ONE*. 2012;
40. Trunk T, S. Khalil H, C. Leo J. Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiology*. 2018;

## 8. Životopis

### OSOBN INFORMACIJE



Zrnić Vladimir

📍 Seočani 33a, 47300 Drežnica, Ogulin (Hrvatska)

📞 0995034717

✉ vladimir4zrnic@gmail.com

### OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

---

09/2017–01/2020

**Biotehnologija u medicini**

Mag. biotech.  
in med.

Odjel za Biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Rijeka

09/2014–09/2017

**Biotehnologija i istraživanje lijekova**

Univ. bacc. et  
pharm.inv

Odjel za Biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

09/2010–06/2014

Gimnazija Andrije Mohorovičića, Rijeka (Hrvatska)

### RADNO ISKUSTVO

---

**Erasmus - stručna praksa**

Swedish University of Agricultural Sciences - SLU, Uppsala  
(Švedska)

Dijagnostika pčelinjih bolesti mikrobiološkim metodama  
Mikrobiologija, sekvencioniranje DNA, PCR, bioinformatika



## Stručna praksa

Jadran galenski laboratorij d.d. Rijeka

Stručna praksa na odjelu proizvodnje

## Rad na računalu

N.E.K. d.o.o, Rijeka (Hrvatska)

Priprema dokumentacije za EU fondove energetske obnove višestambenih zgrada.

## Pčelar

OPG Zrnić, Drežnica, Ogulin

Pčelar u obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu.

## OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C1	C1	C1	C1	C1
ruski	A1	A1	A1	A1	A1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik  
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine  
Prezentiranje na startup natjecanjima u Hrvatskoj i inozemstvu

**Organizacijske / rukovoditeljske vještine** Voditelj tima ZUS BeeOtics na startup natjecanjima i plasman na USWC- svjetsko natjecanje startup-ova u Kopenhagenu 2018.

**Ostale vještine** Osnove programiranja  
Dizajn i izrada web stranica - Wordpress

**Vozačka dozvola** AM, B

## DODATNE INFORMACIJE

---

**Konferencije** Prezentiranje na konferenciji: "Budućnost i perspektiva studija - Biotehnologija i istraživanje lijekova"

Sudjelovanje na konferenciji "High Tech Summit" u Kopenhagenu sa starup timom ZUS BeeOtics

**Projekti** Voditelj tima ZUS BeeOtics - razvoj probiotika za pčele.

Voditelj projekta "Analiza kvalitete i patvorenosti meda na policama" - određivanje hidrosimetilfurfurala u medu. (Samostalni studentski istraživački projekt)

## Priznanja i nagrade

- 2. mjesto u programu poduzetničkog inkubatora (Grad Rijeka) i osvojena nagrada 50.000 kn - ZUS BeeOtics (2019. godina)
- 2. mjesto na nacionalnom natjecanju sveučilišnih startup-ova (2018. godina)
- Sudjelovanje na svjetskom natjecanju sveučilišnih startup-ova u Kopenhagenu 2018.
- "Smartup" studentsko start-up natjecanje, finale, Zagreb 2018,
- Algebra boot camp" start-up natjecanje, finale, Zagreb 2018.