

# Utjecaj prihranjivanja pčela (*A. mellifera*) EM probiotikom na koncentracije vitelogenina u hemolimfi

---

Šoštarić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:360782>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**VETERINARSKI FAKULTET**

**PETRA ŠOŠTARIĆ**

**Utjecaj prihranjivanja pčela (*A. mellifera*) EM® probiotikom  
na koncentracije vitelogenina u hemolimfi**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2019.**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Veterinarski fakultet**

**Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela**

**O. d. PREDSTOJNIKA ZAVODA:**

Izv. prof. dr. sc. Emil Gjurčević

**MENTORI:**

Prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

Dr. sc. Josipa Vlanić

**Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:**

1. Prof. dr. sc. Srebrenka Nejedli
2. Dr. sc. Josipa Vlanić
3. Prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

*Rad je izrađen na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dio istraživanja proveden je u laboratoriju na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“, Zagreb.*

## **ZAHVALE**

*Zahvaljujem mentoricama prof. dr. sc. Ivani Tlak Gajger i Dr. sc. Josipi Vlanić na pruženoj mogućnosti za izradu rada, stručnosti te ukazanom povjerenju, strpljenju i susretljivošću.*

*Također od srca zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci, strpljenju i motivaciji tijekom studiranja.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. Imunos ni sustav medonosne pčele</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2. Vitelogenin</b> .....	<b>5</b>
2.2.1. <i>Struktura vitelogenina</i> .....	6
2.2.2. <i>Uloga vitelogenina u pčela kao modelu istraživanja</i> .....	7
2.2.3. <i>Uloga vitelogenina u imunosti pčela</i> .....	7
<b>2.3. Probavni trakt medonosne pčele</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4. Mikrobiom crijeva medonosne pčele i njegova uloga</b> .....	<b>10</b>
2.4.1. <i>Crijevni mikrobiom odraslih pčela</i> .....	11
2.4.2. <i>Uloga crijevne mikroflore kod pčela</i> .....	11
2.4.3. <i>Utjecaj sastava mikrobioma na imunitet</i> .....	13
<b>2.5. EM tehnologija</b> .....	<b>14</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1. Prihranjivanje pčelinjih zajednica EM® probiotikom</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2. Uzorkovanje</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3. Laboratorijske pretrage</b> .....	<b>18</b>
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>21</b>
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>26</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>29</b>
<b>7. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>30</b>
<b>8. SAŽETAK</b> .....	<b>37</b>
<b>9. SUMMARY</b> .....	<b>38</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>39</b>

## Popis slika, tablica i grafikona

**Slika 1.** Model strukture vitelogenina (SAMELA i sur., 2016.).

**Slika 2 a, b.** Priprema pokusnih kavezića s odraslim pčelama za utvrđivanje utjecaja prihranjivanja s EM® probiotikom za pčele u kontroliranim laboratorijskim uvjetima (Tlak Gajger, 2018.).

**Slika 3.** Uzorkovanje hemolimfe nakon uklanjanja ticala kod medonosne pčele (Tlak Gajger, 2018.).

**Slika 4 a, b.** Prikaz potrošnog materijala i reagensa za MyBioSource test i jažica ispunjenih uzorcima hemolimfe tijekom određivanja koncentracija vitelogenina.

**Tablica 1.** Prikaz srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracija vitelogenina u hemolimfi odraslih pčela, uzorkovanih 11. i 15. dan nakon početka primjene EM® probiotika.

**Tablica 2.** Prikaz vrijednosti koncentracija vitelogenina u hemolimfi odraslih pčela uzorkovanih 13. dan nakon početka prihranjivanja.

**Tablica 3.** Prikaz vrijednosti koncentracija vitelogenina u hemolimfi odraslih pčela uzorkovanih 22. dan nakon početka prihranjivanja. Razlike između vrijednosti pojedinih skupina nisu statistički značajne.

**Grafikon 1.** Grafički prikaz vrijednosti koncentracija vitelogenina u uzorcima hemolimfe odraslih pčela, uzorkovane 11. dan nakon početka prihranjivanja 2,5%-tnim i 5%-tnim EM® probiotikom. (K1 – kontrolna skupina odraslih pčela hranjenih šećernim sirupom bez dodataka, KK1 - kontrola kontrole hranjena šećernim sirupom, A1 - pčele hranjene 2,5% EM® probiotikom, B1 - pčele hranjene 5% EM® probiotikom).

**Grafikon 2.** Grafički prikaz vrijednosti koncentracija vitelogenina u uzorcima hemolimfe odraslih pčela uzorkovanih 15. dan nakon početka prihranjivanja 2,5%-tnim i 5%-tnim EM® probiotikom za pčele. (K2 - kontrolna skupina hranjena šećernim sirupom, KK2 - kontrola kontrole hranjena šećernim sirupom, A2 - pčele hranjene 2,5% EM® probiotikom, B2 - pčele hranjene 5% EM® probiotikom).

**Grafikon 3.** Grafički prikaz vrijednosti koncentracije vitelogenina u uzorcima hemolimfe odraslih pčela uzorkovanih 13. dan nakon početka prihranjivanja 2,5%, 5% te 10% EM® probiotikom za pčele.

**Grafikon 4.** Grafički prikaz vrijednosti koncentracija vitelogenina u uzorcima hemolimfe odraslih pčela uzorkovanih 22. dana nakon početka prihranjivanja s 2,5%, 5% i 10% EM® probiotikom za pčele.

## 1. UVOD

Pčelarstvo kao tradicionalna poljoprivredna grana u Republici Hrvatskoj ima veliki gospodarski značaj. Pčelinji proizvodi upotrebljavaju se kao hrana i dodatak prehrani zbog svojih funkcionalnih svojstava, no medonosna pčela (*A. mellifera*), odgovorna je i za jednu od najvažnijih uloga koju kukci imaju, a to je oprašivanje. Pčela je stoga, ekološki i ekonomski značajan kukac, čija je gospodarska korist i značaj od oprašivanja biljaka daleko veća od vrijednosti samih pčelinjih proizvoda (MORSE i CALDERONE, 2000.). Smatra se da pčele oprašuju oko jednu trećinu svih kultura diljem svijeta (ISAACS i TUELL, 2007.), no posljednjih godina došlo je do prijave značajnih gubitaka u pčelarstvu, a uzroka je mnogo. Razni biotički i abiotički stresni čimbenici pogoduju razvoju bolesti u pčelinjoj zajednici, te padu njenog imunološkog statusa. Činjenica je da su različiti stresni čimbenici, kao što su utjecaj nametnika i patogenih mikroorganizma, nedostatna prehrana i nepovoljan učinak pesticida uzročnici imunosupresije kod pojedinačnih pčela i cijelih pčelinjih zajednica (ANTUNEZ i sur., 2009.; ALAUX i sur., 2010.; DI PRISCO i sur., 2013.). Također, kao mogući uzrok imunodepresije navodi se višekratna i/ili nepravilna primjena akaricida pri suzbijanju grinje *Varroa destructor*.

Grinja *V. destructor* te mikrosporidija *Nosema ceranae* preneseni su s prirodnog azijskog nosioca – azijske medonosne pčele (*Apis cerana*) na europsku medonosnu pčelu, u kojoj su kao novom osjetljivijem nosiocu pronašli povoljne uvjete za razvoj (HIGES i sur., 2010.; ROSENKRANZ i sur., 2010.). *N. ceranae* uzročnik je nametničke bolesti odraslih pčela, nozemoze tipa C (ANON., 2009.). Nozemoza tipa C bolest je kroničnog tijeka s dugim inkubacijskim razdobljem, a najčešće prolazi asimptomatski ili je praćena nespecifičnim simptomima poput postepenog slabljenja pčelinjih zajednica, povećanih jesenskih i zimskih gubitaka pčela i smanjene proizvodnje meda (FRIES i sur., 2006.; HIGES i sur., 2010.). Odrasle pčele se invadiraju unosom zrelih spora *Nosema* sp. onečišćenom hranom i vodom, prilikom izmjene hrane s rilca na rilce te kada se nalaze u stadiju čistačica, uklanjajući ostatke fecesa ili bolesnih i uginulih pčela iz košnice.

Grinja *V. destructor* uzrokuje varoozu, zbog koje pčela slabi pojedinačno i kao cijela zajednica, te ima imunosupresivno djelovanje čime otvara vrata drugim sekundarnim bolestima i nametnicima te sudjeluje kao prijenosnik i rezervoar za uzročnike drugih bolesti. S



obzirom na to da je *A. mellifera* manje otporan nosioc, prisutnost *V. destructor* u svakoj zajednici čini znatan učinak na poremećeno zdravlje pčela (LE CONTE i sur., 2010.).

Budući da dva glavna nametnika medonosne pčele, *V. destructor* i *N. ceranae* djeluju imunosupresivno na svog nosioca, u održavanju zdravlja zajednica, nužna je primjena imunomodulatornih dodataka hrani. Zabrana primjene antibiotika u Europskoj Uniji (EU) u borbi protiv patogenih uzročnika bolesti potaknula je potrebu pretraživanja alternativnih načina tretiranja pčelinjih zajednica prirodnim pripravcima. Sve veće znanje o sastavu i funkcijama mikrobioma crijeva pčela te poveznica između uravnoteženog crijevnog mikrobioma i zdravstvenog statusa pčele, ohrabrilo je istraživanje upotrebe crijevnih mikroorganizama s ciljem poboljšanja zdravlja pčela. Crijevni mikrobiom pčele prikazuje visoki afinitet prema većem broju bakterijskih simbiota koji naseljavaju određene niše u crijevu (od mednog mjehura do rektuma), a predstavljaju prilagođene vrste pridonoseći u obrani nosioca i to nutritivno, te sudjelujući u fiziološkim promjenama i odgovorima. Međudjelovanja između pčele nosioca i mikroorganizama potječe iz dugog koevolucijskog procesa koji je kod kukaca izravno povezan s podjelom rada, različitim stadijima razvoja i socijalnim prijenosom hrane i informacija. Iz navedenih razloga, kao što je u kralježaka, tako bi uspješna simbiotska zajednica u crijevima trebala biti smatrana značajnom za život pčele.

EM 1 efektivni mikroorganizmi kombinacija su različitih vrsta korisnih mikroorganizama, koji su svoju primjenu našli u različitim područjima vezanim uz stočarstvo. Kod farmskih životinja, komercijalni probiotik EM® koristi se kao dodatak hrani za regulaciju funkcije crijeva, stabilizirajući i održavajući ravnotežu između patogenih i korisnih mikroorganizama. Kao novitet u terapiji, smatramo da EM® probiotik za pčele namijenjen uporabi u pčelarstvu može imati važnu imunomodulacijsku ulogu u poticanju sinteze vitelogenina, koji pak ima ulogu u imunološkim odgovorima i obrani organizma od utjecaja patogenih uzročnika bolesti, i to u pčele individualno, ali i na razini pčelinje zajednice. Glavne sastavine spomenutog dodatka hrani čini nekoliko vrsta bakterija mliječne kiseline (*Lactobacillus spp.*), fotosintetske bakterije (npr., *Rhodospseudomonas palustris*), kvasci (npr., *Saccharomyces cerevisiae*) te niz drugih korisnih mikroorganizama.

Vitelogenin je protein uključen u mehanizme tolerancije na stres, ponašanje i funkcioniranje imunskog sustava radilica. Do nedavno se smatralo da je njegova uloga ograničena primarno na razmnožavanje, no tijekom zadnjih 15 - tak godina provedena istraživanja proširila su poznavanje funkcija vitelogenina, što se tumači njegovom sposobnošću

da na sebe veže brojne molekule, uključujući lipide, ugljikohidrate, metale, bakterije, gljivice, ali i makrofage.

Cilj rada bio je utvrditi koncentracije vitelogenina u uzorcima hemolimfe odraslih pčela koje su prihranjivane u laboratorijski kontroliranim uvjetima čime se posredno može zaključiti o utjecajima na modulaciju imunosnog sustava.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

### 2.1. Imunosni sustav medonosne pčele

Tijekom evolucijske povijesti, kukci, a time i pčele su razvili snažan i učinkovit imunosni sustav koji se razlikuje od imunosnog sustava kralježnjaka. Kukci posjeduju različite mehanizme koji im pomažu u borbi protiv patogenih uzročnika bolesti. Ako usporedimo genom pčele s genom vinske mušice (*Drosophila melanogaster*), pčela posjeduje samo jednu trećinu gena povezanih s imunosnim odgovorom. Pretpostavlja se, da takav reduciran broj gena odgovornih za imunosni odgovor predstavlja ili snažne socijalne zapreke za patogene uzročnike bolesti ili da je takav ograničen set gena koevoluirao s uzročnicima bolesti. Kralježnjaci imaju razvijenu urođenu imunost i adaptivnu imunost s mogućnošću imunološkog pamćenja, no kukci nemaju sposobnost da proizvedu protutijela koja bi im to omogućila. Iako im nedostaje antigenska imunost kao takva, pčele posjeduju urođenu imunost koju karakteriziraju nespecifične imunosne reakcije protiv invadirajućih patogena. Osim urođene imunosti, pčele odlikuje posjedovanje i socijalne imunosti koja je vrlo važna kao prevencija nastanka i razvoja bolesti unutar košnice. Ona uključuje higijensko ponašanje pčela, koje je klasičan primjer socijalne obrane gdje pčele radilice identificiraju te zatim uklanjaju promijenjene ličinke iz zdravog legla (SPIVAK i REUTER, 2001.). Druge vrste socijalne imunosti uključuju gradnju saća iz materijala i pohranu pčelinjih proizvoda – hrane s poznatim antimikrobnim svojstvima (CHRISTE i sur., 2003.), podizanje legla u sterilnom okolišu (BURGETT, 1997.), podizanje temperature u košnici tzv. „socijalna vrućica“, kao odgovor na bolesti te mehanizme prijenosa imunosti izmjenom hrane s rilca na rilce.

Urođenu imunost pčela čine tri glavna načina obrane od patogenih mikroorganizama, u koju spadaju specijalizirane stanice, zatim humoralna imunost te interferencija ribonukleinske kiseline (RNA). Specijalizirane stanice čine podtipovi hemocita koji se nalaze u hemolimfi pčela, čiji je optok otvoren i kao takav on oplahuje organe unutar trbušne i prsne šupljine pčela. Različiti tipovi hemocita imaju bitnu ulogu u obrani pčela od patogenih uzročnika bolesti, pa tako lamelociti/plazmatociti na patogene reagiraju enkapsulacijom i melanizacijom. Enkapsulacijom hemociti okruže i pokriju patogen, dok ga melanizacijom zatvore unutar polimerične melaninske ljuske. Oenociti ili kristalne stanice služe za pohranu kristala portoporfirinogen IX oksidaza (PPO), dok plazmatociti i granulociti imaju ulogu kod fagocitoze (slične onoj koju vrše makrofagi).

Humoralni odgovor u pčela je izvanstanični, te u njemu sudjeluju antimikrobni peptidi (AMPs), lizozimi, lektini i citokini te oksidansi (reaktivne vrste kisika i dušika - ROS, RNS). Sinteza AMP-a odvija se manjim dijelom u hemocitima, te većim djelom u masno bjelanjčevinastom tijelu koje je po ulozi analogno jetri kod kralježnjaka. Postoje tri kategorije AMP-a (bogati cisteinom, bogati glicinom/prolinom te A-heliks uzvojnica), a cilj su im gram pozitivne i gram - negativne bakterije te gljivice. U pčela je utvrđeno šest različitih AMP-a. Defenzin 1 i defenzin 2 prisutni su u različitim vrsta kukaca, dok su apisimin i hymenoptaecin potvrđeni jedino u tijelu pčele. Lizozimi su peptidoglikani hidrolaze te djeluju uglavnom protiv gram pozitivnih bakterija. Citokini i lektini sudjeluju u modulaciji upale, dinamici populacije hemocita, regrutiraju fagocitne hemocite te sudjeluju u ekspresiji imunskih gena. Oksidacija također ima ulogu u imunosti pčela, pa tako redoks reakcija (prijenos elektrona) ima imunsku funkciju gdje oksidativno oštećenje dovodi do oštećenja deoksiribonukleinske kiseline (DNA) i lize stanica, čime posredno uzrokuje preraspodjelu hemocita i dovodi do potrebe za reakcijom melanizacije.

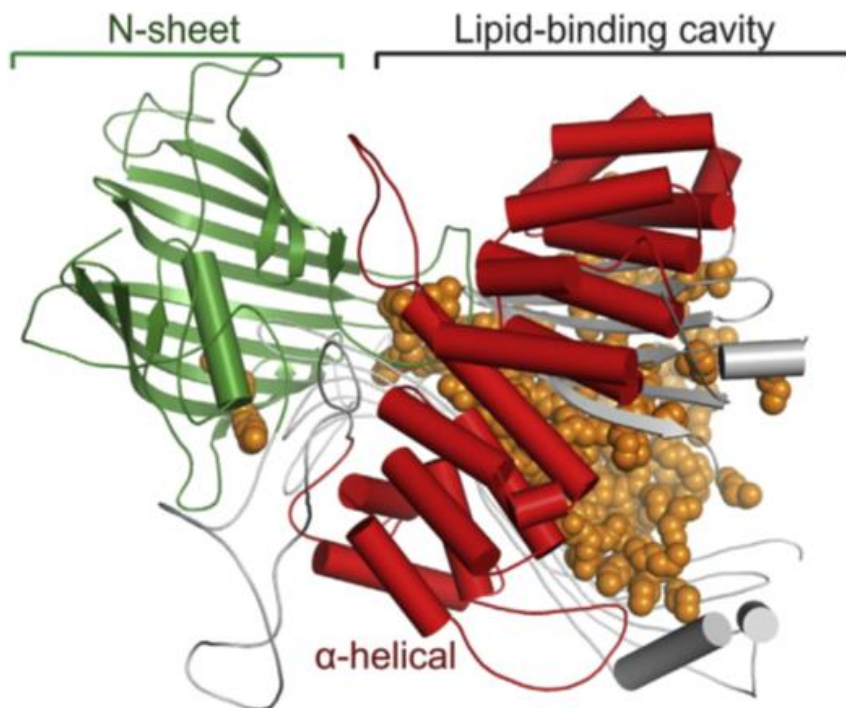
## 2.2. Vitelogenin

Vitelogenin je fosfolipoprotein (WHEELER i KAWOOYA, 1990.) i primarni prekursor žumanjčanog proteina u svim oviparnim životinjama. Primarna funkcija vitelogenina je da na sebe veže lipide, ugljikohidrate, metale (Mg, Ca i Zn) i fosfor te ih zatim prenosi do oocite (FALCHUK i MONTORZI, 2001.), gdje endocitozom ulazi u tkivo pomoću receptora (TUFAIL i TAKEDA, 2008.). Time osigurava sintezu tvari potrebne za embriogenezu. Pripada superobitelji gena, poznatih kao proteini koji prenose velike lipide (LLTPs) (BAKER, 1988.), u koje spadaju i ključni transportni proteini sisavaca, (BABIN i sur., 1999.), te apolipoprotein B čija je uloga transport kolesterola (apoB-100) (AVARE i sur., 2007.; BABIN i GIBBONS, 2009.). LLTPs također imaju ulogu u supresiji upale, imunomodulaciji te u zgrušavanju krvi. Ova superobitelj gena je veoma stara, datira barem 700 milijuna godina unazad, a vjeruje se da je vitelogenin najstariji iz navedene grupe proteina (HAYWARD i sur., 2010.). S obzirom na svoju primarnu ulogu u razmnožavanju, ekspresija gena vitelogenina, sinteza proteina, uloga jajnika te brojne fiziološke funkcije bile su tema istraživanja u različitim vrstama, uključujući prijenosnike uzročnika bolesti *Aedes aegypti* (SPIETH i sur., 1991.) u kokoši (CHO i RAIKHEL, 2001.), ali i vrstama koje su često uzete kao primjer istraživačkog sustava kao što su

*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* i *Xenopus* (FOLLETL i REDSHAW, 2012.) te različitim vrstama riba i kukaca (TUFAIL i TAKEDA, 2008.; ZHANG i sur., 2013.).

### 2.2.1. Struktura vitelogenina

Funkcija vitelogenina kao transportnog proteina, proizlazi iz njegove sposobnosti da na sebe veže lipide i brojne ligande, a to sve zahvaljujući svojoj biokemijskoj strukturi. Protein je odcijepljen na raznim mjestima ovisno o vrsti, a nekoliko strukturnih domena je dobro očuvano (na strukturnoj, kao i razini sekvence), preko taksonomske grupe (MANN i sur., 1999.). Jedna takva domena je N-kraj  $\beta$ -konformacije (N-sheet), koji nosi mjesto vezanja receptora (ROTH i sur., 2013.; HAVUKAINEN i sur., 2011.) (Slika 1.). Druga je  $\alpha$ -heliks domena koja se sastoji od lipofilične udubine koja služi za vezanje na razne ligande. Vjeruje se da  $\alpha$ -heliks domena olakšava protuupalne funkcije vitelogenina (HAVUKAINEN i sur., 2011.; SALMELA i sur., 2016.).



**Slika 1.** Model strukture vitelogenina (SAMELA i sur., 2016.).

### 2.2.2. Uloga vitelogenina u pčela kao modelu istraživanja

Kod kukaca, vitelogenin sintetiziraju jajnici i masno - bjelančevinasto tijelo, koje je odgovorno za homeostazu, imunost, sintezu proteina i pohranu nutrijenata. Masno - bjelančevinasto tijelo je smješteno u zatku kukaca, te je po funkciji analogno jetri i masnom tkivu u kralježaka. Danas se tematika istraživanja vitelogenina proširila daleko izvan njegove uloge vezane uz razvoj jaja i transport proteina.

Za strukturu vitelogenina u pčele, isprva se smatralo da je monomer težine 180 kDa (WHEELER i KAWOOYA, 1990.), no danas je poznato da se sastoji od jedinice težine 150-kDa i subjedinice težine 40 kDa (HAVUKAINEN i sur., 2011.), koja sadrži N-kraj i strukturu za prihvata receptora, te se većinom nalazi u masno - bjelančevinastom tijelu. Preostala jedinica od 150 kDa sadrži  $\alpha$ -heliks domenu te je utvrđena u hemolimfi i jajnicima matice (SEEHUS i sur., 2007.) te u hipofaringealnim žlijezdama radilica (AMDAM i sur., 2003.). Kao i u solitarnih kukaca, sinteza vitelogenina u pčele korelira s nutritivnim statusom te dostupnosti i kvalitetom peluda (BITONDI i SIMÕES, 1996.). S obzirom na primarnu ulogu u razmnožavanju, ne čudi što nalazimo visoke koncentracije vitelogenina u hemolimfi matice, no zanimljivo je što se visoke koncentracije može utvrditi i u sterilnih radilica i trutova (ENGELS i sur., 1990).

Titar cirkulirajućeg vitelogenina je nizak kod trutova (100 do 1000 puta niži nego u matice), no razina titra može biti izuzetno visoka u radilica (čak i doseći iste razine koje nalazimo u hemolimfi matice). Radilice imaju zakržljale jajnike, te u tom slučaju mogu iznijeti samo određenu količinu neoplođenih jaja, no zbog učinka feromona koje luči matica i prisutnog legla, aktivnost jajnika radilica je suprimirana (WINSTON, 1987.).

### 2.2.3. Uloga vitelogenina u imunosti pčela

Pojedini članovi pčelinje zajednice (matica, radilice, trut) obavljaju različite funkcije u zajednici i žive različito dugo što je usklađeno s različitim razinama vitelogenina. Umjesto da bude odraz uloge vitelogenina u skladištenju hranjivih sastojaka AMDAM i OMHOLT (2002.), AMDAM i suradnici (2004b.) su doveli do zaključka da vitelogenin zapravo pruža fiziološku zaštitu od starenja u organizmu. U novije vrijeme se istraživanje vitelogenina proširilo na proučavanje njegove uloge u borbi protiv oksidativnog stresa, u imunološkim odgovorima te borbi protiv uzročnika bolesti, oboje individualno te na razini zajednice.

Oksidativna modifikacija unutarstaničnih proteina veliki je odraz starenja organizma, a gubitak otpornosti na oksidativni stres je jedan od biomarkera starenja u nematoda, muhe i miša (MUNICH i sur., 2008.). SEEHUUS i suradnici (2006.) prvi su prikazali kako prirodne varijacije vitelogenina koje su se javile u hemolimfi radilica koreliraju s njihovom otpornošću na oksidativni stres, a inducirane kemijskom parakvatom. Podaci iz različitih istraživanja (SEEHUUS i sur., 2006.; NELSON i sur. 2007.; CORONA i sur. 2007.) pokazali su kako se vitelogenin pčela ponaša kao čistač slobodnih radikala, te barem djelomično objašnjava zašto općenito životni vijek pčela korelira s razinom vitelogenina.

Pozitivan učinak vitelogenina na dužinu životnog vijeka, ne proizlazi samo iz njegove funkcije antioksidansa, već se pretpostavlja da vitelogenin sudjeluje u modulaciji upalnih odgovora kod pčela. HAVUKAINEN i suradnici (2013.) otkrili su da se vitelogenin može vezati na hidrofobne površine, uključujući stanične membrane. Istraživanje je pokazalo da vitelogenin ima tendenciju vezanja na membrane s promijenjenim lipidima, membrane mrtvih stanica i stanica koje pokazuju znakove rane apoptoze. Također, ozlijeđene radilice reagiraju na ozljedu povišenjem genske ekspresije za vitelogenin (SALMELA i sur., neobjavljeno). Vezanje za oštećene stanice i akutni odgovor na upalu je tipično ponašanje za protuupalne lipoproteine, koji su pak bolje proučeni kod sisavaca. Promijenjeni lipidi na membranama oštećenih stanica izazivaju upalu, te prikriivanjem takvih mjesta na stanici, omogućuje se držanje upale pod kontrolom (CHO i SEONG, 2009.; SEONG i MATZINGER, 2004.).

Vitelogenin također štiti pčelu od utjecaja patogenih uzročnika bolesti, izravno i neizravno. Kod urođenog imunskog sustava kukaca, hemociti su uključeni u inkapsulaciju, nodulaciju i fagocitozu stranih tvari, te se ispravna funkcija hemocita oslanja na adekvatnu količinu cinka u hemolimfi. Vitelogenin je primarni protein koji na sebe veže cink, te titar vitelogenina u hemolimfi blisko korelira, ne samo s titrom cinka već i s količinom funkcionalnih hemocita (AMDAM i sur., 2004.). Nadalje, vitelogenin se može izravno vezati na bakterije (gram - pozitivne i gram - negativne), te makrofage i gljivice (LI i sur., 2008.). Zapravo, vitelogenin prepoznaje nekoliko molekularnih puteva vezanih uz patogene mikroorganizme (PAMPS) utvrđene u staničnim stjenkama uključujući polisaharide (LPS), peptidoglikane (PGN), lipoteihoična kiselina (LTA) i glukan (LI i sur., 2008.). Dokazano je kako se vitelogenin veže na površinu bakterija (SALMELA i sur., 2015.), te je moguće kako vitelogenin signalizira fagocitnim imunskim stanicama o prisutnosti patogenih mikroorganizama na isti način kako to rade i drugi proteini koji imaju ulogu medijatora urođene imunosti (MOGENSEN, 2009.). No uloga vitelogenina u borbi protiv patogena, prisutna je osim individualno i na razini

zajednice, u obliku socijalne imunosti. Njegovo vezanje za patogene ovdje je usko vezano uz njegovu ulogu u formaciji žumanjka jaja kod matice. Nakon što se veže na PAMPS, vitelogenin prenosi ove imunosno signalne površinske molekule na razvojna jajašca u jajnicima matice (SALMELA i sur., 2015.). Ovaj mehanizam omogućuje matici da pripremi potomstvo na različite poremećaje u košnici. Fenomen je nazvan transgeneracijski imunosni prijenos, a čini se kako je vitelogenin glavni imunosni prijenosnik u tom mehanizmu. Sličan mehanizam prisutan je i u zrakoperka (ZHANG i sur., 2013.).

### **2.3. Probavni trakt medonosne pčele**

Probavni sustav medonosne pčele sastoji se od usnog aparata, probavne cijevi koju čine prednje, srednje i zadnje crijevo, te od žlijezda koje su u vezi s prednjim crijevom.

U pčela je usni aparat prilagođen za grizenje i sisanje. Smješten je na donjem dijelu glave i građen od prednjeg i stražnjeg dijela. Prednji dio čini gornja usna (labrum) i gornja vilica (mandibula), a stražnji dio je građen od donje vilice (maxilla), donje usne (labium) i rila (proboscis) pomoću kojeg pčele sišu hranu (BELČIĆ i sur., 1982.). Na usni aparat nastavlja se ždrijelo (pharinx), jednjak (oesophagus) i medni mjehur. Ždrijelo je kanal koji povezuje usta s jednjakom. Kroz njega prolazi hrana dalje u probavni sustav. Jednjak je mišićna cijev čija stijenka svojim kontrakcijama potiskuje hranu u rastezljiv medni mjehur, koji služi za skladištenje nektara. Medni mjehur je privremeno skladište za slatku tekuću hranu (najčešće nektar), zapremine više od 50 mm<sup>3</sup> (SNODGRASS i ERICKSON, 1992.). U njemu se ne odvija probava hrane, jer ne izlučuje probavne sokove. Pčela tijekom skupljanja nektara, dio hrane propušta kroz medni mjehur u srednje crijevo radi potrebe organizma, a ostali dio pohranjuje u saće u košnici gdje daljnjom preradom zrije u konačni proizvod – med. Pomoću međucrijeva, medni mjehur je povezan sa srednjim crijevom (TOMAŠEC, 1949.). Prednja cijev se dalje nastavlja na srednje crijevo u kojem se odvija probava hrane i apsorpcija osnovnih hranjivih tvari (CHAPMAN, 1978.; SNODGRASS i ERICKSON, 1992.; CRUZ - LANDIM i sur., 1996.). Srednje crijevo je nalik na naboranu cijev dužine 19 mm kod truta, matice 13 mm i radilice do 12 mm (BELČIĆ i sur., 1982.). Stijenka srednjeg crijeva građena je od mišićnog sloja, bazalne membrane i sloja epitelnih cilindričnih stanica, iz kojih se luče probavni enzimi i pomažu pri razgradnji masti (lipaze), bjelančevina (proteaze) i šećera (karbohidraze). Zadnje crijevo se sastoji od tankog crijeva i rektuma i ima odvodnu funkciju (TOMAŠEC, 1949.)



Tanko crijevo se nastavlja na srednje crijevo. Na ulazu u tanko crijevo uljevaju se nitaste tvorevine, Malpighijeve cjevčice čija je funkcija uklanjanje otpadnih tvari metabolizma, dušičnih tvari i soli iz hemolimfe (SNODGRASS i ERICKSON, 1992.). Ove štetne tvari prvo prolaze kroz tanko crijevo i zatim zajedno s izmetom izlaze u okolinu. Zadnje crijevo prekriveno je vrlo tankom i propustljivom intimom, a završava proširenim dijelom ili rektumom. Stijenka rektuma je naborana i elastična, stoga se šupljina rektuma može povećati nekoliko puta. To je iznimno važno u zimskom razdoblju kada pčele ne mogu izlijetati na pročišne letove (SNODGRASS i ERICKSON, 1992.).

#### **2.4. Mikrobiom crijeva medonosne pčele i njegova uloga**

Međudjelovanja između pčele nosioca i mikroorganizama potječe iz dugog koevolucijskog procesa koji je kod kukaca izravno povezan s podjelom rada, različitim stadijima razvoja i socijalnim prijenosom hrane i informacija. Iznenadujuće, većina crijevnog mikrobioma je održavana horizontalnim prijenosom (osim kod matice) te međudjelovanjem s okolišem košnice što omogućuje obavljanje jedinstvenih funkcija povezanih s pohranom i zrenjem hrane. Otkriće, da genom pčele ima manje imunskih gena nego što je očekivano, dovelo je do rasprava oko doprinosa gena crijevnih endosimbionata kao potpore imuniteta pčelama. Kod vinske mušice crijevni mikroorganizmi sudjeluju u potpori imunskog sustava, utjecaja na epitelnu homeostazu, produžetka životnog vijeka, rasta ličinaka u uvjetima nestašice hrane te utjecaju na uspješnost parenja nosioca.

Dapače, sve veće znanje o sastavu i funkcijama mikroflore crijeva pčela te poveznica između uravnotežene mikroflore crijeva i cjelokupnog zdravstvenog stanja pčela, ohrabrilu je više istraživačkih timova na istraživanja učinkovitosti upotrebe „korisnih“ crijevnih mikroorganizama s ciljem poboljšanja zdravlja pčela. Na neki način pokrenuta je rasprava o primjeni „koncepta probiotika“ u znanosti o pčelama.

#### 2.4.1. Crijevni mikrobiom odraslih pčela

U zadnjem desetljeću, dostupne su nove molekularne metode primjenom kojih je znanstvenicima bilo omogućeno da istraže crijevne simbiote, odnosno, mikroorganizme koji obitavaju u organizmu nosioca gdje za njega obavljaju neku korisnu funkciju, s naglaskom na funkcionalni aspekt međudjelovanja između simbionta i njegovog nosioca odrasle pčele. Metoda tzv. sekvencioniranja nove generacije (NGS) omogućila je identifikaciju karakteristične crijevne mikroflore, koja se sastoji od osam dominantnih skupina i sadrži preko 95% cijelog mikrobioma. Gram negativne bakterije *Gilliamella apicola* i *Frischella perrara* dominiraju u srednjem crijevu pčele. Rektum je većinom naseljen različitim *Lactobacillus* vrstama i vrstama iz roda *Bifidobacterium*. Sastav crijevne mikroflore pčele povećava se i vrsno proširuje pred izlazak iz razvojnog stadija kukuljice, a svoj potpuni sastav dostiže tijekom prvih tri do pet dana života odrasle pčele kad kao kućna pčela obavlja zadatke čistačice. Smatra se da je više sojeva roda *Lactobacillus* prisutno unutar košnice te da su uz čišćenje saća i košnice, i obavljanje drugih kućnih zadataka i specifičnog ponašanja iz stanica saća novoizašlih pčela, kao međusobno čišćenje i hranjenje te njegovanje legla, ključni za oblikovanje crijevne mikroflore starijih odraslih pčela.

Glavninu bakterijske mikroflore čine fakultativno anaerobne i mikroaerofilne bakterije koje su strogo povezane s funkcijama epitelnih stanica crijeva svoga nosioca. Zanimljivo je naglasiti kako je nekoliko bakterijskih vrsta tek nedavno izdvojeno i identificirano te je istraživanje njihove uloge i međudjelovanja s nosiocem na samom početku. U crijevu pčele mogu biti utvrđene razlike u sastavu njenog mikrobioma koje su povezane s funkcijama u zajednici i s vanjskim okolišnim čimbenicima – zemljopisnim i pašnim prilikama. Naime, vrsta prirodne hrane može utjecati na konačni sastav i razvoj crijevne mikroflore.

#### 2.4.2. Uloga crijevne mikroflore kod pčela

Medonosne pčele su socijalni kukci koji posjeduju crijevne simbiotske mikroorganizme, a njihovo se zajedničko djelovanje očituje činjenicom da posjeduju gene koji kodiraju enzimatsku aktivnost (npr. celulaze, hemicelulaze i lignaze) bitnu za dobivanje energije iz hrane bazirane na biljkama. Štoviše, crijevna mikroflora odgovorna je za proizvodnju i/ili razgradnju masnih kiselina, aminokiselina i drugih potrebnih hranjivih tvari i metabolita. Pčelama su također potrebni i vitamini, uključujući i vitamine B kompleksa čiji bitan izvor bi mogle biti upravo crijevne bakterije. Utvrđeno je da bakterije vrste *Fructobacillus* izdvojene iz fermentiranog peluda, stanica saća s pčelinjim leglom i crijeva pčelinjih ličinki, iskorištavaju

složenu biljnu molekulu lignin koja je sastavina peluda, te na taj način započinju njegovu razgradnju kao izvora hrane bogatog bjelančevinama. U nedavnom istraživanju utvrđene su bakterijske vrste koje se svrstavaju u porodice *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes* i *Bifidobacteriaceae* koje posjeduju enzimatske sustave odgovorne za razgradnju i iskorištavanje šećera. Zanimljivo je da se za dobivanje energije bakterija *Betaproteobacterium salvi* oslanja na aerobnu oksidaciju proizvoda u procesu fermentacije (citrata, malata, acetata i mliječne kiseline), te na taj način izbjegava svako moguće natjecanje za iskorištavanje hranjivih tvari s drugim bakterijskim vrstama. Ovaj komentar predstavlja mali primjer koevolucije unutar iste niše. Aktivnost razgradnje pektina vrstom *Gilliamella apicola* dolazi do razgradnje stijenke peludnog zrnca te na taj način čini unutrašnje bjelančevine dostupne za daljnju razgradnju pčelama. Iz ovih istraživanja se može jasno zaključiti da među mikrobnim simbiotima može biti pronađen visok stupanj genetske raznolikosti koji sugerira visoku prilagodljivost mikroorganizama unutar iste niše na metaboličke potrebe pčele kao nosioca. Katabolički put laktobacila (bakterije mliječne kiseline) i bifidobakterija dobro su poznate s obzirom da su ove dvije mikrobne skupine umiješane u brojne fermentacijske procese te imaju dugačku povijest u sigurnoj upotrebi kao probiotici i protektivni mikroorganizmi. Važnost bakterija mliječne kiseline također je naglašena i radi njihove ekološke rasprostranjenosti, koja nije ograničena samo na crijeva odrasle pčele, već su utvrđene i u crijevima ličinki te u mednom mješuru odraslih pčela koji je druga bitna mikrobna niša povezana s privremenom pohranom hrane i prijenosom tekućina (voda, nektar i matična mliječ). Štoviše, laktobacili su dominantni u skladištenoj hrani u stanicama saća u košnicama.

Neke vrste bifidobakterija izdvojenih iz socijalnih kukaca posjeduju kompletni put razgradnje trehaloze, koji je odsutan u većine drugih bifidobakterija. Trehaloza je prirodni složeni šećer koji kod mnogih kukaca, pa tako i kod pčele, služi kao zaliha ugljikohidrata u hemolimfi. Utvrđivanjem slijeda odsječaka genoma *Bifidobacterium asteroides* je potvrđena prisutnost kompletnog biosintetskog puta za folate (vitamin B9), no ne i za ostale vitamine B skupine. Bifidobakterije su prepoznate kao obvezno anaerobni mikroorganizmi, no spomenuta *B. asteroides* naseljava stražnje crijevo pčele, te posjeduje gene koji joj omogućavaju da se prilagodi na kisikom bogati okoliš pčelinjeg crijeva.

### 2.4.3. Utjecaj sastava mikrobioma na imunitet

Zaštita zdravlja nosioca je drugi važan aspekt koji je često povezan s balansiranim crijevnim mikrobiomom. Činjenica je da različiti stresni čimbenici, kao što su nametnici i bolesti, nedostatna prehrana i utjecaj pesticida, mogu uzrokovati imunosupresiju kod pojedinačnih pčela ali i cjelokupne zajednice. Pčele imaju jednostavniji imunski sustav u usporedbi s drugim vrstama kukaca, koji uključuje strategiju socijalne obrane koje kombiniraju profilaktičke i aktivne odgovore cijele zajednice, te ujedno i mehanizme ponašanja te fiziološke i prostorne obrambene mehanizme. Značajan doprinos zaštiti nosioca osiguran je putem antagonističke aktivnosti crijevnog mikrobioma i njenog međudjelovanja s imunskim sustavom. Poremećaji u sastavu mikrobioma mogli bi posljedično predstavljati kompromis za pčelinje obrambene mehanizme. Uglavnom, moguća je uloga mikroorganizama u zaštiti pčele kao nosioca u izravnom stimuliranju imunskog sustava te inhibirajući razvoj patogenih uzročnika bolesti stvaranjem antimikrobnih tvari. Uzimajući u obzir da su individualni i socijalni obrambeni mehanizmi raznoliki i složeni, jedan od glavnih efektoru urođene imunosti pčela su antimikrobni peptidi. Pčele posjeduju šest vrsta navedenih peptida većinom aktivnih na epitelnim površinama i nakon izlaganja Gram pozitivnim bakterijama: abaecin, himenoptaecin, apidaecin, defensin-1, defensin-2 i apisimin. Antimikrobnu aktivnost većinom postižu izmjenom osobina mikrobni membrana i unutarstaničnih metaboličkih procesa. Postoji snažna pozitivna korelacija između ukupne količine bakterija crijevu pčele i razine defenzina-1 i apidaecina. Hipoteza kojom crijevni mikroorganizmi utječu na bazalni imunski odgovor kojim kontroliraju svoju proliferaciju i posljedično umnažanje patogenih mikroorganizama preko sinteze antimikrobnih peptida još uvijek nije istražena kod pčela, no u postoje rezultati istraživanja kod vinske mušice i komarcima iz roda *Anopheles*. Nedavna analiza genoma laktobacilusa, izolirana iz pčelinjeg legla, otkrila je da većina njih proizvodi izvan stanične bjelančevine poznate ili nepoznate funkcije povezane s antimikrobnom aktivnosti, interakcijom s nosiocem ili formacijom biofilma.

## 2.5. EM tehnologija

EM\* je prijateljski i ekološki siguran proizvod Organizacije za istraživanje okolišnih mikroorganizama (EMRO) koji postiže sinergističke učinke kombinacijom korisnih mikroorganizama koji inače postoje u prirodi, kao što su mliječna kiselina, kvasci fototrofične bakterije. Razvio ju je profesor Teruo Higa 1982. godine. EM\* aktivira lokalne i prirodne mikroorganizme koji žive u zemlji i vodi te maksimizira njihovu prirodnu snagu. EM\* brend predstavlja liniju mikrobnih proizvoda koji se koriste u brojnim područjima, poljoprivredi, stočarstvu, pročišćivanju okoliša i zdravstvenoj njezi u više od 100 država cijelog svijeta. Razlog zbog kojeg se EM može primijeniti na toliko područja je taj što EM obnavlja zdravu ravnotežu mikroorganizama u ekosustavu, time povećavajući njegovu sposobnost samopročišćenja.

Poznato je kako se u zemlji nalazi velika količina bakterija. Jedan gram zemlje sadrži i do nekoliko bilijuna mikroorganizama. Mikroorganizmi čine temeljni sastav ekosustava te olakšavaju njegovo funkcioniranje time što razlažu organske tvari i cirkulirajuće nutrijente. Smanjena količina korisnih mikroorganizama u zemlji ili poremećaj u njihovoj ravnoteži, ima negativan utjecaj na druge žive organizme, poput zemljanih crva te će time zemlja postati osiromašena. Raznolikost mikroorganizama koji se nalaze u EM-u te metaboliti koje oni stvaraju, povećati će broj i raznolikost mikroorganizama u zemlji. Aktivnost mikroorganizama pozitivno utječe na viši broj praživotinja i većih organizama poput crva te će time rezultati zdravijim ekosustavom. Time zemlja s mikroflorom veće raznolikosti lakše će inhibirati rast specifično patogenih bakterija, te rast onih koje sprečavaju propast usjeva.

Bakterije mliječne kiseline, kvasac te fototrofične bakterije koje čine sastav EM-a, imaju sposobnost fermentacije organske tvari te time sprječavaju truljenje. Tako primjerice, kada se EM koristi za izradu gnojiva, truležne bakterije će biti potisnute te će time gnojivo biti bogatijeg aminokiselinskog sastava te će sadržavati više polisaharida s obzirom na gnojivo proizvedeno uobičajenom metodom. EM sprječava nastanak amonijaka tijekom razlaganja proteina, metabolizirajući proteine tako da su njihov krajnji proizvod aminokiseline, koje biljke mogu izravno apsorbirati. U normalnim uvjetima, kao razgradni proizvod celuloze, stvara se ugljični dioksid, no s obzirom na fermentacijska svojstva EM-a, nastat će nisko molekularni polisaharidi koje će apsorbirati drugi mikroorganizmi i biljke. Opće poznato je da se proteini mogu sintetizirati iz dušika, no ako biljke mogu izravno apsorbirati aminokiseline iz zemlje preko

korijena, tada mogu preusmjeriti energiju koju bi inače potrošili na stvaranje proteina i aminokiselina, te time proizvesti voće s više šećera.

Radi navedenog EM se često koristi u organskoj proizvodnji i na organskim farmama, jer ubrzava inače spori proces postizanja plodnosti zemlje i biološke raznolikosti u organskoj proizvodnji, te time olakšava takvu vrstu proizvodnje što na kraju rezultira i kvalitetnijim proizvodima.

Posljednjih godina, mnogi znanstvenici smanjili su svoj fokus s aktivnosti pojedinačnih sojeva mikroorganizama, te ga usmjerili na agregate mikroorganizama zvane mikrobiomi. Istraživanja na mikrobiomima pokazala su da kvadrilijuni mikroorganizama žive na i unutar ljudskog tijela te da ovi mikroorganizmi čine značajnu razliku u zdravlju ljudi. Mnogi od njih žive u crijevu čovjeka te utječu na čovjekovo fizičko zdravlje, kao i na njegovo mentalno stanje. Vodeći se time, korisni mikroorganizmi našli su svoju primjenu u obliku probiotika i u životinja.

Danas postoje EM otopine različita sastava, no EM • 1 je originalna, autentična, otopina efektivnih mikroorganizama. Trenutno EM • 1 se proizvodi u više od 50 zemalja.

Vezano uz opisanu tematiku na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u posljednje dvije godine provode se istraživanja vezana uz učinkovitost primjene dodatka prihrani pčelinjih zajednica pod komercijalnim nazivom EM® probiotik za pčele, proizvođača EMRO Japan.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Prihranjivanje pčelinjih zajednica EM® probiotikom

Prihranjivanje pčela provedeno je u dva navrata s različitim koncentracijama i različitim sastavom EM® probiotika. Sastav EM® probiotika korištenog u prvom pokusu, čini nekoliko vrsta bakterija mliječne kiseline (*Lactobacillus* spp.), fotosintetske bakterije (npr., *Rhodospseudomonas palustris*), kvasci (npr., *Saccharomyces cerevisiae*) te niz drugih korisnih mikroorganizma. U drugom pokusu uporabljen je EM® probiotik za pčele, čiji sastav je obogaćen i prilagođen prehranbenim potrebama pčela.

U prvom pokusu, osnovano je deset skupina odraslih pčela (po 50 jedinki) uzorkovanih iz plodišta košnice neposredno po njihovu izlasku iz stanica saća. Pčele su se po dopremi u laboratorij stavljene u pokusne kaveziće, a oni u inkubator na uobičajene mikroklimatske uvjete košnice (34° C i 30% vlažnost zraka). S primjenom probiotika krenuli smo 3. dana starosti pčela, a do 3. dana pčele su bile hranjene samo šećernom otopinom. Pokusne skupine činilo je: (1) 8 kavezića s pčelama koje su bile prihranjivane s šećernim sirupom (omjer šećer:sirup = 1:1) s dodatkom 2,5% EM® probiotika, (2) osam kavezića s pčelama koje su bile prihranjivane s šećernim sirupom (omjer šećer:sirup = 1:1) s dodatkom 5% EM® probiotika, te (3) četiri kavezića s pčelama koje su bile prihranjivane s šećernim sirupom (omjer šećer:sirup = 1:1) kao kontrolna skupina. Hrana i voda bili su cijelo vrijeme dostupni *ad libitum*.

U drugom pokusu, pokusne i kontrolne skupine pčela uspostavljene su na jednak način kao i u prvom pokusu. Pokusne skupine činilo je: (1a) 8 kavezića s pčelama koje su bile prihranjivane s šećernim sirupom (omjer šećer:sirup = 1:1) s dodatkom 2,5% EM® probiotika za pčele, (2a) osam kavezića s pčelama koje su bile prihranjivane s šećernim sirupom (omjer šećer:sirup = 1:1) s dodatkom 5% EM® probiotika za pčele, (3a) osam kavezića s pčelama koje su bile prihranjivane s dodatkom 10% EM® probiotika te (3) četiri kavezića s pčelama koje su bile prihranjivane sa šećernim sirupom (omjer šećer:sirup = 1:1), kao kontrolna skupina. Hrana i voda bili su cijelo vrijeme dostupni *ad libitum*.



a.



b.

**Slika 2 a, b.** Priprema pokusnih kavezića s odraslim pčelama za utvrđivanje utjecaja prihranjivanja s EM® probiotikom za pčele u kontroliranim laboratorijskim uvjetima (Tlak Gajger, 2018.).

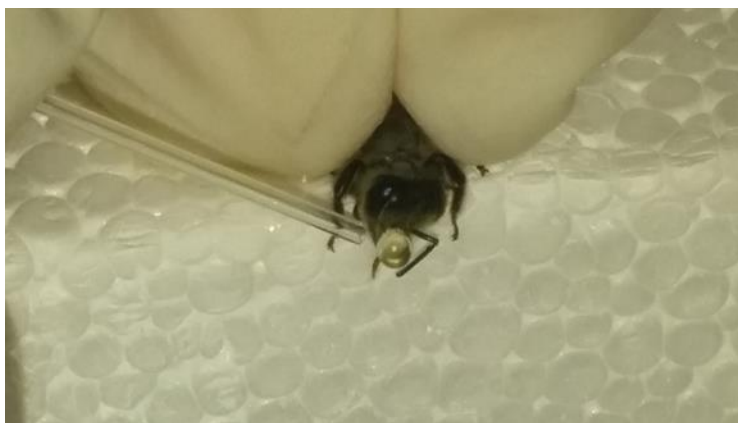
### 3.2. Uzorkovanje

U prvom pokusu, 11. i 15. dana nakon početka prihranjivanja u kontroliranim laboratorijskim uvjetima pčelama su izvađeni skupni uzorci hemolimfe. Uzorci su uzimani na način da je iz svake zasebne skupine izdvojeno 30 do 50 pčela. Pčele su blago pothlađene da bi njima lakše rukovali tijekom postupka vađenja. Jedna po jedna pčela stavljena je na rub debljeg



komada stiropora, gdje joj je entomološkom pincetom iščupano ticalo. Zatim je primjenom mikrotitarske cjevčice prikupljena hemolimfa te pohranjena u specijalnim staklenim vialama u zamrzivač na  $-80^{\circ}\text{C}$  do daljnih analiza.

U drugom pokusu, 13. i 22. dana nakon početka prihranjivanja u kontroliranim laboratorijskim uvjetima odraslim pčelama su izvađeni skupni uzorci hemolimfe na isti način kao i u prvom pokusu.



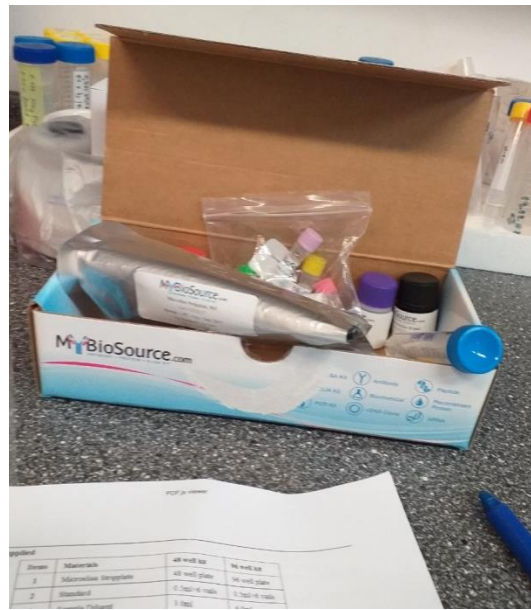
**Slika 3.** Uzorkovanje hemolimfe nakon uklanjanja ticala kod medonosne pčele (Tlak Gajger, 2018.).

### **3.3. Laboratorijske pretrage**

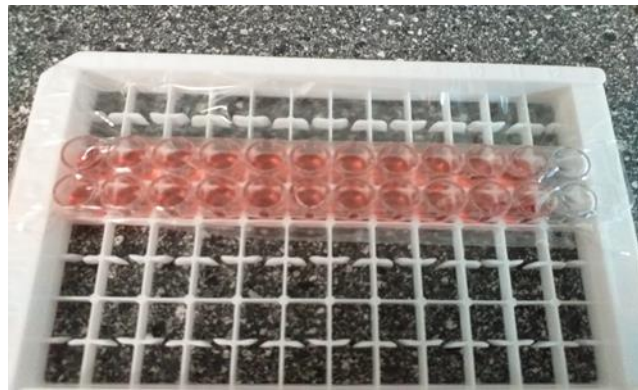
Za oba pokusa koncentracije vitelogenina u uzorcima hemolimfe određene su pomoću MyBioSource elisa kit testa prema uputama proizvođača i očitavanjem na spektrofotometru. Statističke analize određenih vrijednosti prikazane su pomoću GraphPad Prism software (USA).

Uzorci hemolimfe odraslih pčela pohranjeni su u staklenim vijalama, u kojima se nalazilo  $4\ \mu\text{l}$  hemolimfe u  $200\ \text{ml}$  miliQ vode. Pretraga je obavljena u duplikatu. Na mikrotitarskoj pločici su označena mjesta jažica s pojedinim uzorkom, zatim one sa standardom, te na kraju one u kojima se nalazi tzv. slijepa proba. U prvom koraku analize utvrđivanja koncentracije vitelogenina iz svake vijale automatskom pipetom uzeto je  $5\ \mu\text{l}$  uzorka u pojedinu jažicu te razrijeđeno s  $45\ \mu\text{l}$  miliQ vode čime je dobiveno potrebnih  $50\ \mu\text{l}$  u svakoj jažici s uzorkom.

U prvu jažicu sa standardom stavljeno je 50  $\mu\text{l}$ , u drugu 25  $\mu\text{l}$ , u treću 12,5  $\mu\text{l}$ , a u četvrtu 6,25  $\mu\text{l}$  standarda. Zatim je dodana potrebnu količinu miliQ vode na način da je na kraju u svakoj od njih bilo 50  $\mu\text{l}$  standarda. U svaku jažicu s uzorkom i standardom dodano je 100  $\mu\text{l}$  konjugata reagensa peroksidaze iz hrena (HRP) zatim je pločica pokrivena s folijom i zaštitom od svjetla te stavljena u inkubator na 37° C. Nakon 60 min, sve jažice su isprane WASH otopinom četiri puta, nakon čega je u svaku jažicu dodano 50  $\mu\text{l}$  Kromogen otopine A, te nakon nje 50  $\mu\text{l}$  Kromogen otopine B (uključujući i slijepu probu). Lagano je zanjihana pločica te je ponovno pokrivena folijom i zaštitom od svjetla, prije inkubacije. Nakon 15 minuta pločicu je izvađena iz inkubatora te je u sadržaj jažica dodana STOP otopina. Optička gustoća je očitana na valnoj duljini 450 nm pomoću spektrofotometra.



a.



b.

**Slika 4 a, b.** Prikaz potrošnog materijala i reagensa za MyBioSource test i jažica ispunjenih uzorcima hemolimfe tijekom određivanja koncentracija vitelogenina.

## 4. REZULTATI

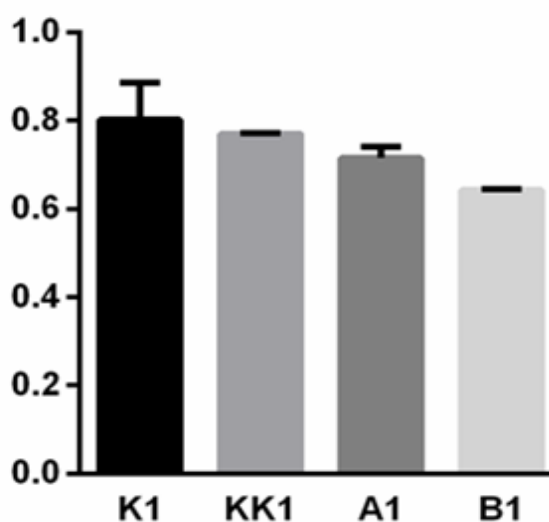
Utvrđene su koncentracije vitelogenina u uzorcima hemolimfe odraslih pčela koje su prihranjivane u dva navrata, različitim koncentracijama i različitog sastava EM® probiotika čime se posredno može zaključiti o utjecajima na modulaciju imunskog sustava.

Dobiveni rezultati koncentracija vitelogenina određeni uporabom MyBioSource elisa kita i spektrofotometra u uzorcima hemolimfe odraslih pčela, uzetih 11. i 15. dana nakon početka prihranjivanja dodatka komercijalnog naziva EM® probiotik, prikazani su u grafikonima 1. i 2., te tablici 1. Utvrđene vrijednosti koncentracija vitelogenina iz hemolimfe odraslih pčela prikazane kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Uzorci hemolimfe kontrolne skupine i kontrola kontrole (KK1 i KK2) razlikuju se pH vrijednošću hemolimfe, gdje pH skupina kontrole iznosi 6,2. Ph vrijednost KK1 iznosi 6,2 dok KK2 iznosi 4,5. Kontrolna skupina odraslih pčela hranjena samo šećernim sirupom uspoređena je s koncentracijama pokusnih skupina pčela prihranjenih 2,5 %-tnim i 5%-tnim EM® probiotikom. Analizom podataka utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između skupine K1 (kontrola uzorkovana 11. dan) i A2 (pčele prihranjivane 2,5% EM® probiotikom, uzorkovane 15. dan), dok između skupina K1, A1 (pčele prihranjivane 2,5% EM® probiotikom uzorkovane 11. dan) i B1 (pčele prihranjivane 5% EM® probiotikom uzorkovane 11. dan) i B2 (pčele prihranjivane 5% EM® probiotikom uzorkovane 15. dan) nije utvrđena statistički značajna razlika. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) utvrđena je između skupine K2 (kontrolna skupina uzorkovana 15. dan) i A2, ali također i između skupine K2 i B1.

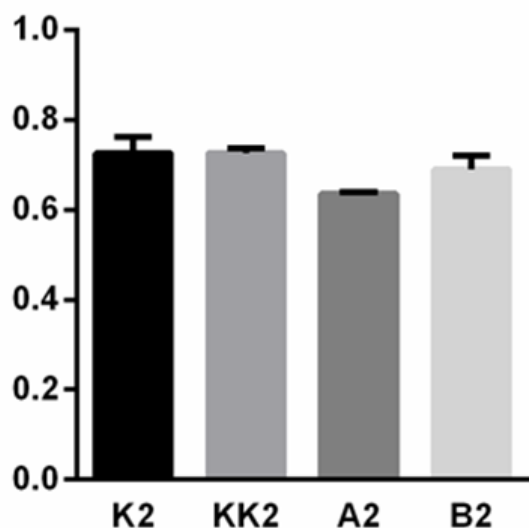
**Tablica 1.** Prikaz srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracija vitelogenina u hemolimfi odraslih pčela, uzorkovanih 11. i 15. dan nakon početka primjene EM® probiotika.

	K1	K2	A1	A2	B1	B2
<b>Srednja vrijednost</b>	0,802*	0,725 <sup>α,β</sup>	0,715	0,025 <sup>α,*</sup>	0,6430 <sup>β,*</sup>	0,6895
<b>Standardna devijacija</b>	0,083*	0,0370 <sup>α,β</sup>	0,63	0,0045 <sup>α,*</sup>	0,001414 <sup>β,*</sup>	0,03150

Jednaka oznaka (\*, α, β) označava statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) između označenih vrijednosti.



**Grafikon 1.** Grafički prikaz vrijednosti koncentracija vitelogenina u uzorcima hemolimfe odraslih pčela, uzorkovane 11. dan nakon početka prihranjivanja 2,5%-tnim i 5%-tnim EM® probiotikom. (K1 – kontrolna skupina odraslih pčela hranjenih šećernim sirupom bez dodataka, KK1 - kontrola kontrole hranjena šećernim sirupom, A1 - pčele hranjene 2,5% EM® probiotikom, B1 - pčele hranjene 5% EM® probiotikom).



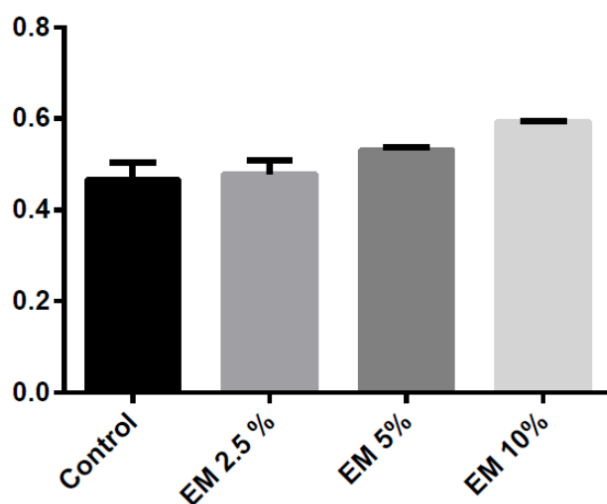
**Grafikon 2.** Grafički prikaz vrijednosti koncentracija vitelogenina u uzorcima hemolimfe odraslih pčela uzorkovanih 15. dan nakon početka prihranjivanja 2,5%-tnim i 5%-tnim EM® probiotikom za pčele. (K2 - kontrolna skupina hranjena šećernim sirupom, KK2 - kontrola kontrole hranjena šećernim sirupom, A2 - pčele hranjene 2,5% EM® probiotikom, B2 - pčele hranjene 5% EM® probiotikom).

Rezultati utvrđenih koncentracija vitelogenina u uzorcima hemolimfe uzete odraslim pčelama 13. i 22. dana nakon početka prihranjivanja dodatka hrani komercijalnog naziva EM® probiotik za pčele, prikazani su u grafikonima 3. i 4, te tablici 2.

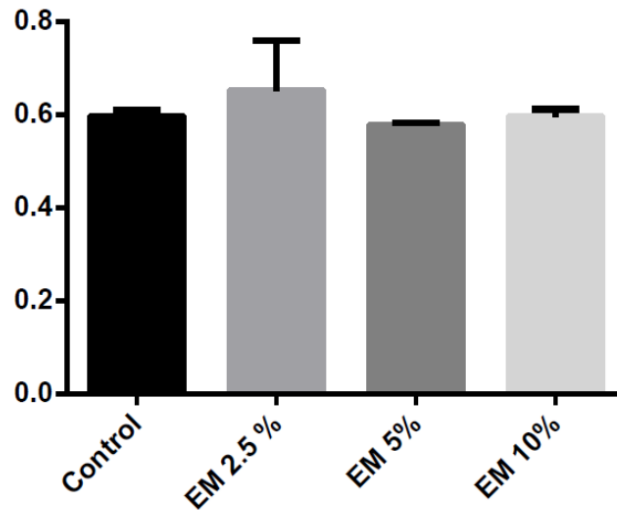
**Tablica 2.** Prikaz vrijednosti koncentracija vitelogenina u hemolimfi odraslih pčela uzorkovanih 13. dan nakon početka prihranjivanja.

	Kontrola	EM® 2,5%	EM® 5%	EM® 10%
Srednja vrijednost	0,4651	0,4786	0,5306	0,5931
Standardna devijacija	0,0386	0,02887	0,005773	0,001732

U tablici 2. prikazane su vrijednosti koncentracija vitelogenina u hemolimfi odraslih pčela uzorkovanih 13. dan. Odredili smo standardnu devijaciju i srednju vrijednost uzoraka te ih usporedili s kontrolnom skupinom pčela i pčela koje su bile prihranjivane 2,5%, 5% i 10% EM® probiotikom za pčele. Usporedbom dobivenih rezultata kontrolne skupine sa skupinom pčela prihranjenih 5% i 10% EM® probiotikom, utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ). Usporedbom kontrolne skupine sa skupinom pčela hranjenih 2,5% EM® probiotikom za pčele, statistički značajna razlika nije utvrđena. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) utvrđena je uspoređujući skupine pčela hranjenih 2,5% EM® probiotikom sa skupinom pčela hranjenih 5% te 10% EM® probiotikom, dok je statistička značajnost primjećena i međusobnom usporedbom skupina pčela hranjenih 5% i 10% EM® probiotikom.



**Grafikon 3.** Grafički prikaz vrijednosti koncentracije vitelogenina u uzorcima hemolimfe odraslih pčela uzorkovanih 13. dan nakon početka prihranjivanja 2,5%, 5% te 10% EM® probiotikom za pčele.



**Grafikon 4.** Grafički prikaz vrijednosti koncentracija vitelogenina u uzorcima hemolimfe odraslih pčela uzorkovanih 22. dana nakon početka prihranjivanja s 2,5%, 5% i 10% EM® probiotikom za pčele.

**Tablica 3.** Prikaz vrijednosti koncentracija vitelogenina u hemolimfi odraslih pčela uzorkovanih 22. dan nakon početka prihranjivanja. Razlike između vrijednosti pojedinih skupina nisu statistički značajne.

	Kontrola	2,5% EM®	5% EM®	10% EM®
Srednja vrijednost	0,5956	0,6521	0,5791	0,5961
Standardna devijacija	0,0138	0,1080	0,0040	0,0155



## 5. RASPRAVA

U današnje vrijeme pčelinje zajednice izložene su djelovanju stresa putem nepovoljnog utjecaja različitih biotičkih i abiotičkih okolišnih čimbenika. Oni, naravno, mogu značajno utjecati na stupanj ukupne proizvodnosti pčelinjih zajednica. Dodamo li tome utjecaj patogenih uzročnika specifičnih bolesti, pesticida i nedostatak prirodne hrane, klimatske promjene, gubitak prirodnih staništa te unošenje invazivnih vrsta na nova zemljopisna područja, govorimo o vanjskim čimbenicima čije djelovanje značajno utječe na preživljavanje pčelinjih zajednica. Stres pčelinje zajednice čini osjetljivijima te prijemljivijima na pojavnost primarno tzv. uvjetovanih bolesti, što je povezano s bitno narušenim imunskim sustavom pčela koji se javlja kao odgovor na navedeni stres. Osim strategija sanacije i suzbijanja bolesti, dobra pčelarska praksa trebala bi sadržavati i primjenu dodatka hrani prihranjivanjem pčelinjih zajednica u svrhu poboljšanja njihova zdravlja. Tome u prilog ide i činjenica da je upotreba veterinarsko medicinskih proizvoda (VMP) bitno ograničena u pčelarstvu, zbog velike zabrinutosti oko mogućnosti stjecanja rezistencije na primijenjene kemoterapeutike i mogućnosti utvrđivanja njihovih rezidua u pčelinjim proizvodima, te u manjoj mjeri i zbog rizika od narušavanja crijevnog mikrobioma pčela. Često je podcijenjena ugroženost zdravlja pčela pod utjecajem različitih stresora, a može negativno utjecati i na aktivnosti uravnotežene i zdrave crijevne mikroflore. Tako je potaknuta potraga za prirodnim alternativama s naglaskom na mikrobiološke simbiozite crijeva odraslih pčela.

Mikroorganizmi i njihovi metaboliti korišteni su u brojnim istraživanjima u svrhu boljeg razumijevanja njihove uloge u borbi protiv patogena pčela i imunomodulacijske uloge kao probiotika. Rezultati dobiveni u prijašnjim istraživanjima uglavnom pokazuju blagotvorne učinke primijenjenih sojeva mikroorganizama na sveukupno zdravlje i proizvodnost pčelinjih zajednica (PATRUICA i sur., 2012.; AUDISIO i sur., 2015.; ALBERONI i sur., 2016.; CORBY-HARRIS i sur., 2016.) osobito ako su korišteni sojevi izdvojeni iz probavnog sustava odraslih pčela. Uravnotežen mikrobiom crijeva je bitno povezan sa zdravljem pčela, a obzirom da osigurava značajnu enzimsku aktivnost koja osigurava razgradnju kompleksnih šećera koji čine osnovu prehrane pčela. COX-FOSTER i suradnici (2007.), zabilježili su smanjenje *Lactobacillus* sojeva i octenih bakterija (AAB) u bolesnih pčela, dok su BAFFONI i suradnici (2016.) uočili značajno smanjenje spora *N. ceranae* kod zaraženih pčela, koje su prihranjivane mješavinom *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* sojeva. Pokus je proveden na pčelama u laboratorijskim uvjetima, koje su držane u kavezu, te je bitno navesti kako su pčele bile

inficirane visokim brojem spora, čak i nakon što se broj spora smanjio, ipak su uginule. Hipotetski ako bi pčele bile inficirane manjim brojem spora, mogli bi očekivati preventivan učinak primjene navedenih sojeva. ALBERONI i suradnici (2015.) također su analizirali promjene u mikrobiomu crijeva te je uočen bitan porast *Acetobacteriaceae* i *Bifidobacteria*, koji je zabilježen nakon primjene *Lactobacilla* i *Bifidobacteria*. Obje grupe bakterija su važni endosimbionti crijeva pčele te imaju značajne fiziološke, nutritivne i zaštitne uloge.

Bolji razvoj stanica voskovne žlijezde uočili su PATRUICA i suradnici (2012.) kod pčela prihranjivanih dodatkom organskih kiselina i probiotičkog proizvoda koji je sadržavao *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterius* spp. Obje skupine bakterija pozitivno su djelovale primjenjene individualno i u kombianciji na broj, morfologiju i promjer voskovnih stanica. Bitno je naglasiti kako su ANDREARCZYK i suradnici (2014.) zabilježili porast invazije sporama *Nosema* spp. kod zimskih i ljetnih pčela, koristeći probiotik preporučen za životinje, dok su PTASZYNSKA i suradnici (2016.) uočili viši mortalitet u pčela inficiranih *Nosemom* spp., a prethodno prihranjivanih probiotikom namijenjenim za ljudsku upotrebu, *Lactobacillus rhamnosus*, uporabljenim u preventivne i terapijske svrhe.

Veliki broj istraživanja proveden je i s EM® formulom. PINOARGOTE i suradnici (2018.) uočili su kod škampa s akutnom hepatopankreasnom nekrozom, da su uzgajane skupine prihranjivane EM® probiotikom imale 11,7% do 73,3% viši postotak preživljavanja u usporedbi s pokusnim skupinama prihranjivane s *Lactobacillus casei*, *L. casei* i *Rhodopseudomonas palustris*, *L. casei*, *Saccharomyces cerevisiae* i *R. palustris*. S obzirom na svojstva EM® probiotika, koja uključuju i smanjenje nastanka amonijaka, HADIR i suradnici (2016.), primjetili su znatan pad koncentracije amonijaka kod brancina (*Dicentrarchus labrax*) uzgajanog uz dodavanje EM® probiotika u vodu. Bolji prirast kokoši prihranjivanih EM® probiotikom primjetili su WONDMENEH i suradnici (2011.).

Jedan od noviteta u upotrebi dodataka prehrani u pčelarskoj praksi je EM® probiotik za pčele. U ovom istraživanju fokusirali smo se na imunomodulacijski utjecaj EM® probiotika na koncentracije vitelogenina, koji ima bitnu ulogu u imunosnom sustavu pčela na individualnoj razini, ali i razini zajednice, te što je također značajno, odgovoran je za njihovu dugoživost. Rezultati su pokazali statistički višu koncentraciju vitelogenina u hemolimfi skupina pčela prihranjivanih s EM® probiotikom s obzirom na kontrolne skupine. Osobito je visoka statistička značajnost uočena između skupina pčela uzorkovanih 13. dan, prihranjivanih 5% i 10% EM® probiotikom prilagođenog sastava za pčele, uspoređujući ih s kontrolnom skupinom,

uzorkovanom na isti dan. Statistički bitna značajnost uočena je i kod skupine pčela uzorkovanih 15. dan, prihranjivane s 2,5% i 5% EM® probiotikom prvobitnog sastava, s obzirom na kontrolnu skupinu, uzorkovanu 11. i 15. dan.

Skupine pčela uzorkovane 11. dan, prihranjivane 2,5% i 5% EM® probiotikom prvobitnog sastava te skupine prihranjivane 2,5%, 5% i 10% EM® probiotikom prilagođenog sastava za pčele, uzorkovane 22. dan, nisu pokazale statistički značajno visoke koncentracije vitelogenina u hemolimfi s obzirom na kontrolnu skupinu, uzorkovanu na isti dan. Bitno je navesti kako u rezultatima zabilježena statistički viša koncentracija vitelogenina korelira s koncentracijom EM® probiotika prilagođenog sastava, kojim su pčele prihranjene. Tako je statistička značajna razlika zabilježena u skupinama pčela uzorkovanih 13. dan, a prihranjivanih s 5% EM® probiotikom, naspram onih prihranjivanih s 2,5% EM® probiotikom. Sukladno navedenome, također je zabilježena viša koncentracija vitelogenina u hemolimfi pčela prihranjivanih 10% EM® probiotikom, s obzirom na pčele prihranjivane 5% i 2,5% EM® probiotikom, uzorkovanih 15. dan.

Ukoliko s navedenim rezultatima povežemo pozitivne rezultate učinka primjene EM® probiotika za pčele na smanjenje broja spora *N. ceranae* u poljskim uvjetima (ŠOŠTARIĆ i sur., 2019., neobjavljeni rezultati), a poznato je da navedeni uzročnik negativno utječe na koncentracije vitelogenina u invadiranih pčela, može se zaključiti da je primjenjeni dodatak hrani ima imunomodularni učinak.

Uzimajući u obzir navedene rezultate, možemo preporučiti dodatna istraživanja s EM® probiotikom prilagođenog sastava za pčele, čiji utjecaj na koncentraciju vitelogenina u hemolimfi pčela se pokazao boljim, te statistički značajnijim u odnosu na EM® probiotik. S obzirom na pozitivna iskustva s primjenom ovog probiotika kod hrvatskih pčelara, na čiju inicijativu su i poslani upiti o mogućem provođenju ispitivanja utjecaja primjene navedenog dodatka prihrani na različite aspekte pčelarenja, a posebice utjecaja na profilaksu, kontroliranje ili suzbijanje pojedinih bolesti pčelinjih zajednica, te pozitivnih i obećavajućih rezultata koje smo zabilježili prihranjivajući pčele u laboratorijskim uvjetima, možemo zaključiti kako EM® probiotik za pčele, ima pozitivan utjecaj na imunski sustav pčela radilica, te kako možemo govoriti o njegovoj posrednoj ulozi u modulaciji imunskog sustava. No uzimajući u obzir da su pčele bile prihranjivane u laboratorijski kontroliranim uvjetima, smatramo kako su za bolji uvid u imunomodulacijska svojstva probiotika, potrebna daljnja istraživanja, osobito ona provedena u prirodnim uvjetima koje nudi pčelinjak.

## 6. ZAKLJUČCI

- Utvrđena je statistički viša koncentracija vitelogenina u hemolimfi odraslih pčela prihranjivanih s EM® probiotikom za pčele u usporedbi s kontrolnom skupinom pčela.
- Statistički viša koncentracija vitelogenina u hemolimfi prihranjenih pčela pozitivno korelira s primjenjenom višom koncentracijom EM® probiotika prilagođenog sastava za uporabu u pčelarstvu.
- Učinak EM® probiotika za pčele s obogaćenim i prilagođenim sastavom za uporabu u pčelarstvu pokazao se učinkovitijim, odnosno izazvao je povećanje koncentracija vitelogenina u prihranjivanih skupina pčela u usporedbi s primjenom EM® probiotika.

## 7. POPIS LITERATURE

1. ALAUX, C., F. DUCLOZ, D. CRAUSER, Y. LE CONTE (2010): Diet effect on honeybee immunocompetence. *Bio. Lett.* 6, 562-565.
2. ALBERONI, D., L. BAFFONI, F. GAGGIA, P. RYAN, K. MURPHY, R. P. ROSS, B. BIAVATI, C. STANTON, D. DI GIOIA (2015): Administration of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* on *Apis mellifera* L. beehives to increase health of the bee super-organism. U:Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety (Di Giogia, D., B. Biavati, ur.). Springer, Switzerland, str. 107–108.
3. ALBERONI, D., F. GAGGIA, L. BAFFONI, D. DI GIOIA (2016): Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9469–9482.
4. ALBERONI, D., L. BAFFONI, F. GAGGIA, P. M. RYAN, K. MURPHY, P. R. ROSS, C. STANTON, D. DI GIOIA (2018): Impact of beneficial bacteria supplementation on the gut microbiota, colony development and productivity of *Apis mellifera*. L. *Beneficial Microbes*, 9, 269-278.
5. ALY, H. A., M. M. ABDEL RAHIM, A. M. LOTFY, B. S. ABDELATY, G. R. SALLAM (2016): The Applicability of Activated Carbon, Natural Zeolites, and Probiotics (EM®) and Its Effects on Ammonia Removal Efficiency and Fry Performance of European Seabass *Dicentrarchus labrax*. *J Aquac Res Development*, 7, 11.
6. AMDAM, G. V., S. W. OMHOLT (2002): The regulatory anatomy of honey bee lifespan. *J. Theor. Biol.* 216, 209–228.
7. AMDAM, G. V., S. W. OMHOLT (2003): The hive bee to forager transition in honey bee colonies: the double repressor hypothesis. *J. Theor. Biol.* 223, 451–464.
8. AMDAM, G. V., Z. L. SIMÕES, A. HAGEN, K. NORBERG, K. SCHRØDER, Ø. MIKKELSEN, T. B. KIRKWOOD, S. W. OMHOLT (2004): Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honey bees. *Exp. Gerontol.* 39, 767–773.
9. ANDREARCZYK, S, M. J. KADHIM, S. KNAGA (2014): Influence of a probiotic on the mortality, sugar syrup ingestion and infection of honeybees with *Nosema spp.* under laboratory assessment. *Med. Weter* 70, 762–765.

10. ANON (2009): COLOSS workshop – Conclusions, Workshop „Nosema disease: lack of knowledge and work standardization“ (COST Action FA0803) Guadalajara, [https://coloss.org/proceedings/Nosema\\_Workshop](https://coloss.org/proceedings/Nosema_Workshop).
11. ANTUNEZ, K., R. MARTIN-HERNANDEZ, L. PRIETO, A. MEANA, A. ZUNINO, M. HIGES (2009): Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ. Microbiol.* 11, 9, 2284-2290.
12. AUDISIO, M. C., D. C. SABATÉ, M. R. BENÍTEZ-AHRENDTS (2015): Effect of CRL1647 on different parameters of honeybee colonies and bacterial populations of the bee gut. *Benef Microbes* 6, 687–695.
13. BABIN, P. J., J. BOGERD, F. P. KOOIMAN, W. J., A. VAN MARREWIJK, D. J. VAN DER HORST (1999): Apolipophorin II/I, apolipoprotein B, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor. *J. Mol. Evol.* 49, 150–160.
14. BABIN, P. J., G. F. GIBBONS (2009): The evolution of plasma cholesterol: direct utility or a “spandrel” of hepatic lipid metabolism? *Prog. Lipid Res.* 48, 73–91.
15. BAFFONI, L., F. GAGGIÀ, D. ALBERONI, R. CABBRI, A. NANETTI, B. BIAVATI, D. DI GIOIA (2016): Effect of dietary supplementation of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains in *Apis mellifera* L. against *Nosema ceranae*. *Benef. Microbes* 7, 45–51.
16. BAKER, M. (1988): Is vitellogenin an ancestor of apolipoprotein B-100 of human lowdensity lipoprotein and human lipoprotein lipase? *Biochem. J.* 255, 1057–1060.
17. BELČIĆ, J., J. KATALINIĆ, D. LOC, S. LONČAREVIĆ, L. PERADIN, F. ŠIMIĆ, I. TOMAŠEC (1982): *Pčelarstvo*. Nakladni zavod, Znanje, Zagreb.
18. BITONDI, M., M. G. SIMÕES, Z. L. P. (1996): The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titres in Africanized *Apis mellifera* workers. *J. Apic. Res.* 35, 27–36.
19. BURGETT, D. M. (1997): Antibiotic system in honey, nectar, and pollen. U: *Honey Bee Pest, Predators, and Diseases* (Morse, R., K. Flottum, ur.). A.I. Root Company, Medina, Ohio, USA, str. 455-468.
20. CHAPMAN, R. F. (1978): *The insects structure and function*. Engl. Press. Ltd, London, England, 819.
21. CHO, K. H., A. S. RAIKHEL (2001): Organization and developmental expression of the mosquito vitellogenin receptor gene. *Insect Mol. Biol.* 10, 465–474.

22. CHO, N. H., S. Y. SEONG (2009): Apolipoproteins inhibit the innate immunity activated by necrotic cells or bacterial endotoxin. *Immunology* 128, 479–486.
23. CHRISTE, P., M. S. GIORGI, P. VOGEL, R. ARLETTAZ (2003): Differential species-specific ectoparasitic mite intensities in two intimately coexisting sibling bat species: resource-mediated host attractiveness or parasite specialization? *J. Animal Ecol.* 72, 866-872.
24. CORBY-HARRIS, V., L. SNYDER, C. A. D. MEADOR, R. NALDO, B. MOTT, K. E. ANDERSON (2016): *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov., Improves Honey Bee (*Hymenoptera: Apidae*) Resistance to *Nosema*. *J. Econ. Entomol.* 1–7.
25. CORONA, M., R. A. VELARDE, S. REMOLINA, A. MORAN-LAUTER, Y. WANG, K. A. HUGHES, G. E. ROBINSON (2007): Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 7128–7133.
26. COX-FOSTER, D. L., S. CONLAN, E. C. HOLMES, G. PALACIOS, J. D. EVANS, N. A. MORAN, P. L. QUAN, T. BRIESE, M. HORNIG, D. M. GEISER, V. MARTINSON, D. VANENGELSDORP, A. L. KALKSTEIN, A. DRYSDALE, J. HUI, J. ZHAI, L. CUI, S. K. HUTCHISON, J. F. SIMONS, M. EGHOLM, J. S. PETTIS, W. I. LIPKIN (2007): A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283–287.
27. CRUZ-LANDIM, C., R. L. SILVA-DE-MORAES, J. E. SERRAO (1996): Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult workern bees (*Hymenoptera, Apidae*). *J. Comput. Biol.* 1, 29, 40.
28. DI PRISCO, G., V. CAVALIERE, D. ANNOSCIA, P. VARRICCHIO, E. CAPRIO, F. NAZZI, G. GARGIULO, F. PENNACCHIO (2013): Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *PNAS* 110, 18466-18471.
29. ENGELS, W., H. KAATZ, A. ZILLIKENS, Z. L. P. SIMÕES, A. TRUBE, R. BRAUN, F. DITTRICH (1990): Honey bee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. U: *Advances in Invertebrate Reproduction* (Hoshi, M., O. Yamashita, ur.). Elsevier, Amsterdam, str. 495–502.
30. EVANS, J. D., K. ARONSTEIN, Y., P. CHEN, C. HETRU, J., L. IMLER, H. JIANG, M. KANOST, G. J. THOMPSON, Z. ZOU, D. HULTMARK (2006): Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* 15, 645-656.

31. FALCHUK, K. H., M. MONTORZI (2001): Zinc physiology and biochemistry in oocytes and embryos. *BioMetals*. 14, 385–395.
32. FOLLETL, B. K., M. R. REDSHAW (2012): The physiology of vitellogenesis. In: *Physiology of the Amphibia* (Lofts, B., ur.). Academic Press, New York, str. 219–308.
33. FRIES, I., R. MARTIN, A. MEANA, P. GARCIA-PALENCIA, M. HIGES (2006): Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *J. Apicult. Res.* 45, 3, 230-233.
34. GAGGIÀ, F., L. BAFFONI, D. ALBERONI (2018): Probiotics for Honeybees' Health. U: *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety* (Di Gioia, D., B. Biavati, ur.). Springer International Publishing, Switzerland, str. 219-245.
35. HARWOOD, G. P., K. E. IHLE, H. SALMELA (nee HAVUKAINEN), G. V. AMDAM (2017): Regulation of Honeybee Worker (*Apis mellifera*) Life Histories by Vitellogenin. U: *Hormones, Brain, and Behavior* 3rd edition (Pfaff, D. W., M. Joëls, ur.). Academic Press, United Kingdom, str. 403–420.
36. HAVUKAINEN, H., Ø. HALSKAU, L. SKJAERVEN, B. SMEDAL, G. V. AMDAM, (2011): Deconstructing honeybee vitellogenin: novel 40 kDa fragment assigned to its N terminus. *J. Exp. Biol.* 214, 582–592.
37. HAVUKAINEN, H., D. MUNCH, A. BAUMANN, S. ZHONG, Ø. HALSKAU, M. KROGSGAARD, G. V. AMDAM (2013): Vitellogenin recognizes cell damage through membrane binding and shields living cells from reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 288, 28369–28381.
38. HAYWARD, A. T., T. TAKAHASHI, W. G. BENDENA, S. S. TOBE, J. H. HUI (2010): Comparative genomic and phylogenetic analysis of vitellogenin and other large lipid transfer proteins in metazoans. *FEBS Lett.* 584, 1273–1278.
39. HIGES, M., R. MARTIN-HERNANDEZ, A. MEANA (2010): *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*. 41, 375-392.
40. ISAACS, R., J. TUELL (2007): Conserving Native Bees on Farmland. Michigan State University Extension, Bulletin E-2985, 1-4.
41. JONES, J. C., C. FRUCIANO, F. HILDEBRAND, H. A. TOUFALILIA, N. J. BALFOUR, P. BORK, P. ENGEL, F. L. W. RATNIEKS, W. O. H. HUGHES (2017): Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. *Ecology and Evolution*, 8, 441-451.
42. LE CONTE, Y., M. ELLIS, W. RITTER (2010): Varroa mites and honey bee health: Can Varroa explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41, 353-363.



43. LI, Z., S. ZHANG, Q. LIU (2008): Vitellogenin functions as a multivalent pattern recognition receptor with an opsonic activity. *PLoS ONE* 3, e1940.
44. MANN, C. J., T. A. ANDERSON, J. READ, S. A. CHESTER, B. GEORGINA, B. HARRISON, S. KOCHL, P. J. RITCHIE, P. BRADBURY, F. S. HUSSAIN, J. AMEY, B. VANLOO, M. ROSSENEU, R. INFANTE, J. M. HANCOCK, D. G. LEVITT, L. J. BANASZAK, J. SCOTT, C. C. SHOULDERS (1999): The structure of vitellogenin provides a molecular model for the assembly and secretion of atherogenic lipoproteins. *J. Mol. Biol.* 285, 391–408.
45. MOGENSEN, T. H. (2009): Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 240–273.
46. MORSE, R. A., N. W. CALDERONE (2000): The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. *Bee Culture* 128, 1-15.
47. NELSON, C. M., K. IHLE, G. V. AMDAM, M. K. FONDRK, R. E. PAGE (2007): The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol.* 5, 673–677.
48. PĂTRUICĂ S, G. DUMITRESCU, A. STANCU, M. BURA, I. BĂNĂȚEAN DUNEA (2012): The effect of prebiotic and probiotic feed supplementation on the wax glands of worker bees (*Apis mellifera*). *J. Anim. Sci. Biotech* 45, 268–271
49. PINOARGOTE, G., G. FLORES, K. COOPER, S. RAVISHANKAR (2018): Effects on survival and bacterial community composition of the aquaculture water and gastrointestinal tract of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to probiotic treatments after an induced infection of acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquac. Res* 49, 10.
50. PTASZYŃSKA, A. A., G. BORSUK, A. ZDYBICKA-BARABAS, M. CYTRYŃSKA, W. MAŁEK (2016): Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee noseosis? *Parasitol Res.* 115, 397–406.
51. ROSENKRANZ, P., P. AUMEIER, B. ZIEGELMANN (2010): Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* 103, 96-119.
52. ROTH, Z., S. WEIL, E. D. AFLALO, R. MANOR, A. SAGI, I. KHALAILA (2013): Identification of receptor-interacting regions of vitellogenin within evolutionarily conserved beta-sheet structures by using a peptide array. *Chembiochem* 14, 1116–1122.
53. SALMELA, H., G. V. AMDAM, D. FREITAK (2015): Transfer of immunity from mother to offspring is mediated via egg-yolk protein vitellogenin. *PLoS Pathog.* 7, e1005015.

54. SALMELA, H., T. STARK, D. STUCKI, S. FUCHS, D. FREITAK, A. DEY, C. F. KENT, A. ZAYED, K. DHAYGUDE, H. HOKKANEN, L. SUNDSTRÖM. (2016): Ancient duplications have led to functional divergence of vitellogenin-like genes potentially involved in inflammation and oxidative stress in honey bees. *Genome Biol. Evol.* 8, 495–506.
55. SEEHUUS, S. C., K. NORBERG, U. GIMSA, T. KREKLING, G. V. AMDAM (2006): Reproductive protein protects sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 962–967.
56. SEEHUUS, S. C., K. NORBERG, T. KREKLING, M. K. FONDRK, G. V. AMDAM (2007): Immunogold localization of vitellogenin in the ovaries, hypopharyngeal glands and head fat bodies of honey bee workers, *Apis mellifera*. *J. Insect Sci.* 8, 52.
57. SEONG, S. Y., P. MATZINGER (2004): Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 469–478.
58. SNODGRASS, R. E., E. H. ERICKSON (1992): The anatomy of the honey bee. U: The Hive and the Honey Bee (Graham, J. M., ur.). Dadant and Sons, Hamilton, Illinois, 103-169.
59. SPIETH, J., M. NETTLETON, E. ZUCKERAPRISON, K. LEA, T. BLUMENTHAL (1991): Vitellogenin motifs conserved in nematodes and vertebrates. *J. Mol. Evol.* 32, 429–438.
60. SPIVAK, M. G., S. REUTER (2001): Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* 32, 555-565.
61. ŠOŠTARIĆ P., J. VLAINIĆ, Z. TOMLIJANOVIĆ, I. TLAK GAJGER (2019): Immunomodulation role of EM® probiotic on *Nosema* spp. spores number and concentrations of vitellogenin in hemolymph of honeybee (*Apis mellifera*). Neobjavljeni rezultati.
62. TOMAŠEC, I. (1949): *Biologija pčela*. Nakladni zavod Hrvatske. Zagreb.
63. TUFAIL, M., M. TAKEDA (2008): Molecular characteristics of insect vitellogenins. *J. Insect Physiol.* 54, 1447–1458.
64. WHEELER, D. E., J. K. KAWOOYA (1990): Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 14, 253–267.
65. WINSTON, M. L. (1987): *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge.

66. WONDmeneh, E., T. Getachew, T. Dessie (2011): Effect of Effective Microorganisms EM® on the Growth Parameters of Fayoumi and Horro Chicken. *Int. J. Poult. Sci.* 10, 185-188.
67. Zhang, S., Z. Wang, H. Wang (2013): Maternal immunity in fish. *Dev. Comp Immunol.* 39, 72–78.

## 8. SAŽETAK

Dva glavna nametnika medonosne pčele, *Nosema ceranae* i *Varroa destructor*, djeluju imunosupresivno na svog nosioca – pčelinju zajednicu te konačno mogu dovesti i do njenog uginuća. Kako primjena antibiotika nije dopuštena u pčelarstvu, u borbi protiv patogenih uzročnika bolesti i nametnika te u održavanju zdravlja zajednica nužna je primjena imunomodulatornih dodataka hrani. Kod životinja, komercijalni probiotik EM®, koristi se kao dodatak hrani za regulaciju funkcije crijeva, stabilizirajući i održavajući ravnotežu između patogenih i korisnih mikroorganizama. Kao novitet u terapiji pčelinjih zajednica EM® probiotic for bees, regulira probavnu funkciju utjecajem na sintezu biološki aktivnih tvari. Time bi mogao imati bitnu imunomodulacijsku ulogu u sintezi vitelogenina, proteina uključenog u mehanizme tolerancije na stres, ponašanje i funkcioniranje imunskog sustava radilica. Cilj ovog rada bio je utvrditi koncentracije vitelogenina u uzorcima hemolimfe odraslih pčela koje su prihranjivane u laboratorijski kontroliranim uvjetima, dodatkom hrani pod nazivom EM® probiotic for bees, a rezultatima kojih se posredno može zaključiti o utjecajima na modulaciju imunskog sustava pčela.

**Ključne riječi:** EM® probiotic for bees, dodaci hrani, vitelogenin, imunosupresija, imunomodulatori

## 9. SUMMARY

### THE IMPACT OF EM® PROBIOTIC FOOD SUPPLEMENT ON CONCENTRATIONS OF VITELLOGENIN IN HONEYBEES (*A. mellifera*)

The two main parasites of the honey bee, *Nosema ceranae* and *Varroa destructor*, have an immunosuppressive effect on their host - the honeybee colony and may eventually lead to the death. As antibiotics are not allowed in beekeeping, the use of immunomodulatory food additives is necessary for the fight against pathogens and parasites, but also in maintaining the honeybee colony health. Commercial probiotic EM® is used as a food additive for animals, regulating physiological functions of the gut, stabilizing and maintaining the balance between pathogenic bacteria and microbiota. As a novelty in the treatment of honeybee colonies, EM® probiotic for bees regulates digestive function by influencing the synthesis of biologically active substances. Thus, it could play an essential immunomodulatory role in the synthesis of vitellogenin, a protein involved in the mechanisms of stress tolerance, behavior, and function of the honeybees immune system. The aim of this study was to determine the concentrations of vitellogenin in hemolymph samples of adult bees fed under laboratory controlled conditions, with the addition of food supplement called EM® probiotic for bees, and the results which can be indirectly concluded about the effects on modulation of the immune system.

**Key words:** EM® probiotic for bees, food additives, vitellogenin, immunosuppression, immunomodulators

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 18. lipnja 1994. godine u Koprivnici. Osnovnu školu pohađala sam u Novigradu Podravskom, nakon čega sam upisala srednju školu u Koprivnici - smjer farmaceutski tehničar. 2013. godine upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija pokazala sam interes za znanstveni rad te sukladno tome sudjelovala na raznim kongresima, seminarima te radionicama. Studentski znanstveni rad „Biomarkeri periodontalnih bolesti izdvojeni iz sline pasa“ koji je nastao u suradnji s kolegicom Klarom Marić, 2017. godine je nagrađen je Rektorovom nagradom Sveučilišta u Zagrebu. Rad je kasnije objavljen u časopisu „Veterinar“. Na 7. međunarodnom kongresu „Veterinarska znanost i struka“, održala sam poster prezentaciju „Activity of salivary enzymes and level of salivary urea in gingivitis of dogs“. Tijekom pete i šeste godine studija bila sam demonstrator sam na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela, iz kolegija „Biologija i patologija korisnih kukaca“, te „Biologija i patologija akvatičnih organizama“. 12. semestar u sklopu CEEPUS programa za razmjenu studenata bila sam na CEEPUS ljetnoj školi „Akvakulture“, u Sarajevu. Tijekom školovanja stekla sam znanje engleskog jezika.