

Sveučilište u Zagrebu

Agronomski fakultet

Ana Knežić

**Kemijska karakterizacija i antimikrobno djelovanje
korisne mikrobiote pčelinjeg kruha na patogene bakterije**

Zagreb, 2025.

Ovaj rad izrađen je na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju (na pokusnom pčelinjaku i u Laboratoriju za analizu pčelinjih proizvoda i biologiju pčela) i Zavodu za mikrobiologiju (u Laboratoriju za mikrobiologiju namirnica), pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Lidije Svečnjak i prof. dr. sc. Mirne Mrkonjić Fuka te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2024./2025. Rad je izrađen u okviru projekta Agencije za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju „Kemijsko, molekularno i antimikrobno profiliranje pčelinje peludi, pčelinjeg kruha i propolisa (Bee-PROfiling)“ (2024. – 2025.) voditeljice izv. prof. dr. sc. Lidije Svečnjak.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Hipoteze i cilj rada	2
2. Pregled literature	3
2.1. Pčelinji kruh	3
2.1.1. Sastav i svojstva pčelinjeg kruha	7
2.1.2. Fermentacija pčelinje peludi u stanicama saća – nastajanje pčelinjeg kruha	9
2.1.3. Bakterije mliječne kiseline (BMK)	10
2.1.4. Fruktofilne bakterije mliječne kiseline (FBMK)	11
2.1.5. <i>Apilactobacillus kunkeei</i> kao predstavnik FBMK	11
2.1.6. Antimikrobno djelovanje pčelinjeg kruha.....	13
2.2. Glavne karakteristike patogenih bakterija rodova <i>Salmonella</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Listeria</i> i <i>Staphylococcus</i>	15
2.3. Antagonizam između bakterijskih vrsta.....	19
2.4. Metode utvrđivanja antimikrobnog djelovanja	21
2.5. MALDI-TOF MS i rep- PCR u identifikaciji bakterija	23
3. Materijali i metode.....	26
3.1. Pokusni dizajn i uzorkovanje pčelinjeg kruha	26
3.2. Kemijska karakterizacija metodom FTIR-ATR spektroskopije.....	28
3.3. Izolacija bakterija mliječne kiseline iz pčelinjeg kruha	30
3.3.1. Priprema fiziološke otopine i hranjivih podloga potrebnih za mikorbiološku analizu	30

3.3.3. Brojanje i izolacija kolonija	32
3.3.4. Statistička obrada podataka	32
3.3.5. Identifikacija korisne mikrobiote do razine vrste MALDI-TOF masenim spektrometrom	33
3.3.6. DNA ekstrakcija.....	34
3.3.7. Genotipizacija i identifikacija do razine soja rep-PCR metodom.....	34
3.4. Biotehnološka karakterizacija korisnih izolata	36
3.4.1. Antibiotička rezistencija sojeva FBMK.....	36
3.4.2. Enzimatska aktivnost sojeva FBMK.....	38
3.4.3. Antimikrobno djelovanje sojeva FBMK izoliranih iz pčelinjeg kruha.....	40
4. Rezultati i rasprava	43
4.1. Rezultati spektralne (FTIR-ATR) analize pčelinjeg kruha	43
4.2. Brojnost bakterija u pčelinjem kruhu.....	48
4.3. Identifikacija bakterija MALDI-TOF metodom	49
4.4. Rep-PCR analiza izolata	51
4.5. Antibiotička rezistencija fruktofilnih sojeva BMK.....	54
4.6. Enzimatska aktivnost fruktofilnih sojeva BMK	57
4.7. Antibakterijsko djelovanje fruktofilnih sojeva na odabrane patogene sojeve	59
5. Zaključak.....	62
6. Zahvale.....	64
7. Popis literature	65
8. Sažetak	76
9. Summary	78
Životopis	80

1. Uvod

Pčelinji proizvodi predstavljaju jedinstvene prirodne proizvode, a zbog specifičnog sastava i brojnih bioaktivnih tvari, ovim se proizvodima pripisuju različita ljekovita svojstva. Antimikrobno djelovanje je jedno od važnih svojstava većine pčelinjih proizvoda (meda, propolisa, matične mliječi, pčelinjeg otrova, pčelinje peludi i pčelinjeg kruha), no po tom su pitanju potrebna sustavna istraživanja. Med, propolis i matična mliječ su najistraženiji i najpoznatiji pčelinji proizvodi sa širokom primjenom u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, a posljednje se desetljeće, radi blagotvornog učinka na ljudsko zdravlje, intenzivno istražuju i pčelinja pelud (engl. bee pollen) te pčelinji kruh (engl. bee bread). Pčelinja pelud i pčelinji kruh predstavljaju specifične proizvode koji nastaju kao rezultat sinergije biljaka i pčela. Naime, pčele prikupljaju velik broj peludnih zrnaca s različitih biljnih vrsta te ih aglomerirana u formi granula na goljenicama stražnjih nogu (pčelinja pelud) unose u košnicu (u stanice saća) gdje je pčelinja pelud podvrgnuta daljnim procesima s ciljem njenog konzerviranja i očuvanja nutritivne vrijednosti. Naime, iako je pčelinja pelud dobro uravnotežena hrana za pčelinju zajednicu, njezin sastav čini ju podložnom brzom kvarenju u uvjetima u košnici ($34,5 \pm 1,5$ °C). Zbog toga su pčele razvile mehanizme kojima sprečavaju degradaciju pčelinje peludi na način da ju konzerviraju, odnosno pretvore u pčelinji kruh. Pčelinji kruh ustvari predstavlja konzerviranu (fermentiranu) pčelinju pelud jer nastaje kao posljedica složenih biokemijskih procesa, uključujući proces mliječno-kisele fermentacije za koji su ključne bakterije mliječne kiseline. Fermentirani prirodni proizvodi, pa tako i pčelinji kruh, potencijalni su izvor korisne mikrobiote koja ima brojna korisna svojstva, a jedno od njih je sposobnost inhibicije patogenih mikroorganizama koji izazivaju bolesti u ljudi. Budući da su patogene bakterije iz godine u godinu sve više rezistentne na postojeće antibiotike, uvelike je otežano liječenje bolesti koje izazivaju te je sve veći interes za pronalaskom komplementarnih načina inhibicije njihovog rasta. Istraživanje pčelinjeg kruha i njegovog antimikrobnog djelovanja popularizirano je tek unazad nekoliko godina. Međutim, ostaje puno nepoznanica vezano uz kemijsku i mikrobiološku karakterizaciju pčelinjeg kruha, a mali broj postojećih istraživanja nije konzistentan. Stoga je nužno provesti daljnje analize kako bi se detaljno istražili kemijski i mikrobiološki mehanizmi povezani sa svojstvima pčelinjeg kruha, njegov antimikrobni potencijal, kao i uloga bakterija mliječne kiseline kao korisne mikrobiote.

1.1. Hipoteze i cilj rada

Ovim su radom definirane sljedeće hipoteze:

1. FTIR-ATR spektroskopija pruža informaciju o glavnim sastavnicama pčelinjeg kruha temeljem specifičnih spektralnih značajki / profila
2. Pčelinji kruh predstavlja važan izvor korisnih bakterija koje se potencijalno mogu primijeniti u farmaceutskoj i/ili prehrambenoj industriji
3. Korisna mikrobiota pčelinjeg kruha značajno doprinosi njegovom antimikrobnom djelovanju

Cilj je ovog rada provesti kemijsku karakterizaciju (FTIR-ATR kemijski *fingerprinting*) pčelinjeg kruha prikupljenog iz pokusnih pčelinjih zajednica, izolirati korisne bakterije mikrobioma prikupljenih uzoraka pčelinjeg kruha te istražiti njihovu enzimatsku aktivnost i antimikrobno djelovanje prema najznačajnijim patogenim bakterijama koje se prenose hranom i uzrokuju bolesti kod ljudi - *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*.

Navedeni cilj obuhvaća sljedeće specifične ciljeve:

1. Utvrditi kemijski *fingerprint* (FTIR-ATR spektralni profil) pčelinjeg kruha
2. Izolirati, identificirati i genotipizirati fruktofilne bakterije mliječne kiseline (FBMK) iz pčelinjeg kruha
3. Istražiti antibiotsku rezistenciju sojeva FBMK izoliranih iz pčelinjeg kruha
4. Utvrditi enzimatsku aktivnost sojeva FBMK izoliranih iz pčelinjeg kruha
5. Utvrditi antimikrobno djelovanje sojeva FBMK izoliranih iz pčelinjeg kruha na patogene bakterije *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*

2. Pregled literature

2.1. Pčelinji kruh

Najpoznatiji proizvod medonosnih pčela (*Apis mellifera* L.) jest med. Međutim, one proizvode i mnoge druge proizvode, kao što su pčelinja pelud, pčelinji kruh, propolis, pčelinji vosak, matična mliječ i pčelinji otrov (Giampieri i sur., 2022.). Pčelinja pelud i pčelinji kruh se radi brojnih bioaktivnih sastavnica i blagotvornog učinka na ljudsko zdravlje, intenzivno istražuju posljednje desetljeće (Bakour i sur., 2022.; Mărgăoan i sur., 2020.; Bakour i sur., 2019.; Janashia i sur., 2018.; Kieliszek i sur., 2017.). Pčelinja pelud i pčelinji kruh ujedno predstavljaju jedinstvene proizvode koji nastaju kao rezultat sinergije biljaka i pčela.

Medonosne pčele skupljaju pelud i nektar s biljaka kako bi prehranile i uspješno održavale svoje zajednice (Mayda i sur., 2020.). Pelud, točnije peludna zrnca, predstavljaju biljne muške spolne stanice (gametofiti) koje se nalaze u prašnicima (anterama) biljaka koje cvjetaju. Pelud se prenosi do njuške tučka u procesu koji nazivamo oprašivanje, a koje se najčešće provodi vjetrom ili pomoću kukaca, uključujući medonosne pčele koje ujedno predstavljaju najvažnije i najbrojnije oprašivače (Hung i sur., 2018.). Ovojnica peludnog zrnca građena je od vanjske (eksina) i unutarnje stijenke (intine) koje omeđuju citoplazmu peludnog zrnca u kojoj se nalaze vegetativne i generativna stanica s dvije jezgre (Bogdanov, 2016.).

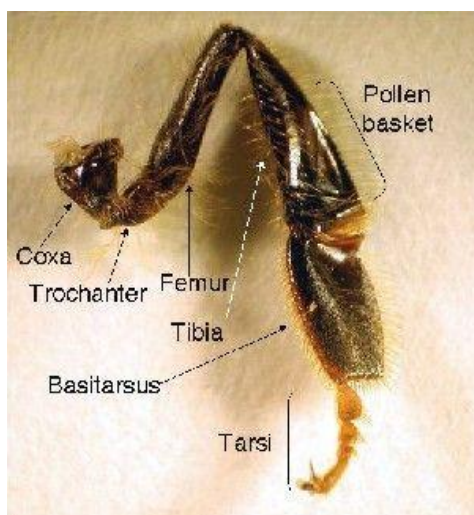
Tijekom oprašivanja brojnih biljnih vrsta, pčele radilice (skupljačice) posjećuju cvjetove biljaka prilikom čega svojim tijelom dodiruju prašnike i bivaju prekrivene peludnim zrnima. Tijelo medonosne pčele prekriveno je milijunima dlačica na koje se akumuliraju peludna zrnca (Amador i sur., 2017.).



Slika 1. Pčela prekrivena peludnim zrnima

izvor: <https://i.pinimg.com/736x/aa/7a/50/aa7a50ecd6b0130279bf410322252983.jpg>

Medonosne pčele zatim skupljaju pelud s tijela vlastitim nogama, prilikom čega ju vlaže sekretima žlijezda slinovnica i nektarom iz mednog mjehura (Svečnjak i sur., 2023.; Bogdanov, 2016.). Radilica prvo skuplja pelud pomoću prednjih nogu, zatim prebacuje pelud s prednjih nogu na srednje te sa srednjih na stražnje noge, prilikom čega se slijepljena, vlažna pelud miješa sa svježom, suhom peludi i utiskuje u specijalizirane organe na goljenici (*tibia*) stražnjih nogu pčele, takozvane košarice (*corbicula*, engl. pollen basket) (Kezić i sur., 2014.). Na taj način nastaju granule (kuglice) peludi, koje nazivamo peludni teret (engl. pollen load), odnosno pčelinja pelud (engl. bee pollen). Peludni teret može biti veličine između 1,4 i 4 mm i može sadržavati od nekoliko stotina do nekoliko tisuća peludnih zrnaca (Saavedra i sur., 2013.). Kako bi prikupila jedan peludni teret, koji prosječno teži 8 mg, pčela mora posjetiti oko 200 cvjetova. Prilikom povoljnih vremenskih uvjeta pčele u košnicu unesu 50 000 peludnih tereta dnevno (Bogdanov, 2016.).



Slika 2. Građa stražnje noge medonosne pčele s prikazom košarice na goljenici (*tibia*)

izvor: <https://i.pinimg.com/736x/66/17/fa/6617fa25575613aa8be3962c6cd20eb9.jpg>



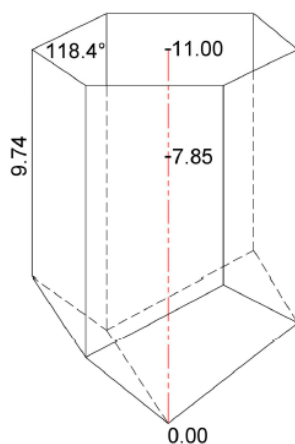
Slika 3. Radilica s pčelinjom peludi u košaricama stražnjih nogu

izvor: <https://www.pinterest.com/pin/biology-of-bees-her-pollen-pants-loaded--290482244700431436/>

Proizvodnja pčelinje peludi, i posljedično pčelinjeg kruha, kompleksan je biološki proces koji počinje jedinstvenim oblikom sinergije biljaka i medonosnih pčela (Svečnjak i sur., 2023.). Po povratku u košnicu, radilice skidaju peludni teret sa stražnjih nogu, utiskuju ga u stanice saća te miješaju s malom količinom meda, nakon čega se pelud podvrgava procesu fermentacije radi konzerviranja i očuvanja hranjive vrijednosti (Herbert i Shimanuki, 1978.). Pojednostavljeno, pčelinji kruh ustvari predstavlja fermentiranu pčelinju pelud.

Saće predstavlja prirodni medij u kojem se događa pretvorba pčelinje peludi u pčelinji kruh. U literaturi se uobičajeno navodi kako pčele skladište pelud u stanice saća do 3/4 dubine stanice (Barene i sur., 2015.; Ivanišová, 2015.) ili 2/3 dubine stanice (Quinby, 2008.). Međutim, u istraživanju koje su proveli Svečnjak i sur. (2023.) utvrđeno je da prosječna dubina stanica saća

koje je izgradila *A. mellifera carnica* iznosi 11 mm te da radilice skladište pčelinju pelud do prosječno 7,85 mm dubine stanice, što zauzima 71,4% stanice saća (između 2/3 i 3/4 kako se navodi u literaturi, odnosno 17/24).



Slika 4. Trodimenzionalni prikaz stanice saća s ukupnom prosječnom dubinom stanice (11 mm) i dubinom stanice do koje pčele skladište pčelinji kruh (7,85 mm) u saću koje je izgradila *A. m. carnica*, uz dodatne podatke (prosječne vrijednosti najmanje dužine stranice i kut heksagonalne stanice saća)

izvor: Svečnjak i sur., 2023.

Pčelinja pelud, a posljedično i pčelinji kruh, ima važnu ulogu u pčelinjoj zajednici jer predstavlja glavni izvor proteina, lipida, vitamina i minerala za pčele. S druge strane, prikupljeni nektar, koji pčele u košnici (stanicama saća) pretvaraju u med, koriste kao glavni izvor ugljikohidrata (Gilliam, 1979.). Pčelinji kruh pčele skladište u blizini legla, upravo zato što pčele hraniteljice njime hrane leglo (Quinby, 2008.). Tijekom zime i ranog proljeća, pčelinji kruh i med jedini su izvor hrane u pčelinjoj zajednici. Štoviše, pčele hraniteljice konzumiraju pčelinji kruh da bi razvile podždrijelnu žlijezdu (Haydak, 1970.) važnu za proizvodnju matične mliječi kojom hrane leglo i maticu (Giampieri i sur., 2022.; Aylanc i sur., 2021.). Dakle, veće količine uskladištene peludi (pčelinjeg kruha) potrebne su mladim pčelama kako bi se normalno razvijale (Crailsheim, 1992.).

2.1.1. Sastav i svojstva pčelinjeg kruha

Kemijski sastav pčelinjeg kruha ovisi o izvoru materijala (vrsti biljaka s koje su pčele skupile pelud) kao i fizikalno-kemijskim i mikrobiološkim procesima (Giampieri i sur., 2022; Herbert i Shimanuki, 1978.).

Pčelinja pelud sadrži prosječno 54,22 % ugljikohidrata, 21,30 % proteina, 5,31 % lipida, 8,75 % vlakana te ostalih sastojaka u manjim količinama (minerali, vitamini, polifenoli), dok je pH vrijednost varirala između 3,49 i 6,33, što znači da ima blago kiselu reakciju. Glavni monosaharidi u pčelinjoj peludi su fruktoza, glukoza i saharoza, a uz njih, u pčelinjoj peludi možemo pronaći i disaharide turanozu, maltozu, trehalozu i erlozu. Svježa pčelinja pelud može sadržavati između 7 % i 30 % vode (Thakur i Nanda, 2020.). Pčelinji kruh ima niži pH od pčelinje peludi te ona može varirati između 3,8 i 4,3. Uz navedeno, pčelinji kruh sadrži manje masti i proteina, ali više ugljikohidrata (uz promijenjeni profil šećerne frakcije) i mliječne kiseline (Ivanišová i sur., 2015.; Barene i sur., 2015.). Bakour i sur. (2019.) u svome su istraživanju utvrdili da pčelinji kruh sadrži $74,82 \% \pm 0,04 \%$ ugljikohidrata, $19,96 \% \pm 0,08 \%$ proteina i $1,90 \% \pm 0,086 \%$ masti, dok je pH vrijednost iznosila $4,37 \pm 0,02$. Analizom slobodnih šećera, utvrdili su da je fruktoza najzastupljenija ($11,8 \% \pm 0,6 \%$), zatim slijede glukoza ($5,7 \% \pm 0,4 \%$) i trehaloza ($0,92 \% \pm 0,01 \%$), dok se saharoza pojavljuje u malim količinama jer ju mikroorganizmi iskorištavaju tijekom fermentacije. Udio se saharoze u pčelinjoj peludi kreće od 5,87 % do 22,04 % (Prđun i sur., 2021.) dok u pčelinjoj peludi dolazi gotovo u tragovima (0,845 % do 1,49 % (Giampieri i sur., 2022.)).

Pčelinji kruh izvrstan je prirodni izvor bioaktivnih spojeva i ima visoku nutritivnu vrijednost. Sadrži različite fenolne spojeve, od kojih su najzastupljeniji flavonoidi i fenolne kiseline (Ilie i sur., 2024.). Biokemijski sastav pčelinjeg kruha načelno je sličan sastavu pčelinje peludi iz koje nastaje, ali nije isti zbog enzima koji su sadržani u pčelinjem kruhu, razgradnje peludnih zrnaca (Kieliszek i sur., 2017.), kao i promjena u sastavu kao posljedice fermentativnih procesa. Enzimi koji se mogu pronaći u pčelinjem kruhu su amilaza, fosfataza i glukoza oksidaza. Također, sadrži različite aminokisline, od kojih su kao pokazatelj svježine najvažniji glutaminska kiselina i prolin (Urcan i sur., 2017.). Dakle, pčele koriste pčelinji kruh kao glavni izvor proteina iz hrane. Ujedno iz njega dobivaju i esencijalne kiseline koje ne mogu same sintetizirati (arginin, histidin, lizin, triptofan, fenilalanin, metionin, teonin, leucin, izoleucin, valin) (Mayda i sur., 2020.).

Analitičke metode koje se primjenjuju za istraživanja pčelinje peludi uglavnom se upotrebljavaju i za istraživanja pčelinjeg kruha, a standardizirane su i opisane u znanstvenoj knjizi The COLOSS BEEBOOK - Volume III: Standard methods for *Apis mellifera* hive product research, u članku „Standard methods for pollen research“ (Campos i sur., 2021.). Klasične fizikalno-kemijske metode koriste se za određivanje različitih fizikalnih i kemijskih parametara pčelinje peludi, odnosno pčelinjeg kruha. Opisane su metode utvrđivanja botaničkog podrijetla pčelinje peludi (melisopalinološka analiza) koristeći tehnike mikroskopiranja kako bi se utvrdilo koja se vrsta peludnih zrnaca nalazi u uzorku, te Kjeldahlova metoda za utvrđivanje sadržaja proteina. Također se upotrebljavaju različite instrumentalne analitičke metode poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s diodnim detektorom (engl. high performance liquid chromatography-diode array detector, HPLC/DAD), tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom indeksa loma (engl. high performance liquid chromatography-refractive index detector, HPLC-RID), tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti s masenom spektrometrijom visoke rezolucije (engl. ultra-high performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry, UHPLC-HRMS) i tekućinske kromatografije-masene spektrometrije (engl. liquid chromatography-mass spectrometry, LC/MS). Za istraživanja kemijskih profila isparljivih spojeva primjenjuje se plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. gass chromatography- mass spectrometry, GC-MS).

Uz navedeno, za analizu pčelinjih proizvoda (uključujući pčelinju pelud i pčelinji kruh) posebno korisnom pokazala se metoda infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (engl. Fourier transfrom infrared spectroscopy, FTIR spectroscopy), u kombinaciji s prigušenom totalnom refleksijom (engl. attenuated total reflectance – ATR) (Svečnjak i sur., 2023; Campos i sur., 2021.; Prđun i sur., 2021.). IR spektar predstavlja jedinstveni kemijski otisak prsta (engl. fingerprint) uzorka koji se lako razlikuje od apsorpcijskih uzoraka svih drugih spojeva jer samo optički izomeri apsorbiraju IR zračenje na potpuno isti način (Skoog i Leary, 1992.). Interakcija vibracija svih atoma, odnosno vibracija funkcionalnih skupina svih molekula u uzorku rezultira izuzetno složenom, ali vrlo karakterističnom apsorpcijom IR zračenja koja se očituje u karakterističnom IR spektru uzorka u vidu jedinstvenog položaja i intenziteta apsorpcijskih vrpce (signala). Intenzivni signali u IR spektru, kao i oni slabiji, ukazuju na prisutnost funkcionalnih skupina povezanih s određenim molekulama u analiziranom uzorku (Svečnjak i sur., 2019.).

2.1.2. Fermentacija pčelinje peludi u stanicama saća – nastajanje pčelinjeg kruha

Iako je pčelinja pelud dobro uravnotežena hrana za pčelinju zajednicu, njezin sastav čini ju podložnom brzom kvarenju u uvjetima u košnici. Zbog toga su pčele razvile mehanizme kojima sprečavaju degradaciju pčelinje peludi na način da ju konzerviraju, odnosno pretvore u pčelinji kruh (Svečnjak i sur., 2023.).

Kako je prethodno spomenuto, radilice utiskuju pčelinju pelud u stanice saća te ju zatim prekrivaju slojem meda. Na taj način zaštićuju pelud od kisika i stvaraju anaerobne uvjete, povoljne za odvijanje procesa fermentacije (Barene i sur., 2014.). S obzirom da pčele održavaju konstantnu temperaturu u košnici između 33 i 36 °C (Seeley, 1985.), točnije $34,5 \pm 1,5$ °C (Jones i sur., 2005.), za potrebe razvoja legla, ondje vladaju idealni uvjeti za rast mikroorganizama. Dakle, pretvorba pčelinje peludi u pčelinji kruh rezultat je mikrobne aktivnosti, pretežno mliječno kisele fermentacije koju provode bakterije i kvasci (Mărgăoan i sur., 2020.; Vásquez i Olofsson, 2009.). Sam proces transformacije pčelinje peludi u pčelinji kruh može se podijeliti u nekoliko koraka. Prvi korak traje 12 sati i uključuje rast heterogene skupine mikroorganizama, u kojoj dominira rod *Pseudomonas* koji troši kisik prisutan u peludi. Potrošnja kisika stvara anaerobne uvjete, čime započinje sljedeći korak fermentacije te dolazi do pojave i izmjene anaerobnih bakterija mliječne kiseline (BMK, engl. lactic acid bacteria - LAB) rodova *Lactobacillus* i *Streptococcus*, koje uzrokuju snižavanje pH trošenjem nutrijenata nastalih u prethodnom koraku što rezultira proizvodnjom mliječne kiseline. Posljednji korak započinje rastom kvasaca, koji asimiliraju preostale ugljikohidrate i pokreću završnu fermentaciju peludi u pčelinji kruh. Nakon približno 15 dana završava mikrobna transformacija u pčelinji kruh postizanjem pH vrijednosti koja prosječno iznosi 4 (Smati, 2021.; Khalifa i sur., 2019.). Kao i drugi fermentirani proizvodi, po završetku procesa fermentacije, visoka koncentracija mliječne kiseline i drugih metabolita konzerviraju pčelinji kruh te sprečavaju njegovo kvarenje (Vásquez i Olofsson, 2009.). Rodovi BMK, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, dominantna su mikrobiota u pčelinjem kruhu, dok kvasci (*Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Zygosaccharomyces*) i plijesni (*Penicillium*, *Mucorales*, *Aspergilli*) predstavljaju drugu važnu skupinu mikroorganizama (Kieliszek i sur., 2021.; Nogueira i sur., 2012.; Gilliam i sur., 1989.). Najzastupljenija vrsta bakterija u pčelinjem kruhu je *Apilactobacillus* (bazonim: *Lactobacillus kunkeei*) *kunkeei*, koja pripada skupini fruktofilnih BMK (FBMK) (Kieliszek i i sur., 2017.; Endo i Salminen, 2013.).

Fermentacijom pčelinje peludi u pčelinji kruh dolazi do djelomične razgradnje stijenke peludnih zrnaca te zbog toga pčelinji kruh predstavlja nutritivniji, biodostupniji i probavljiviji proizvod. Također, dolazi do djelomične razgradnje proteina do aminokiselina, razgradnje masti i povećanja sadržaja ugljikohidrata i mliječne kiseline (Barene i sur., 2015.) čime postaju pristupačniji i lakši za asimilaciju (Anderson i sur., 2014.). Uz navedeno, pčelinji kruh sadrži specifičnu korisnu mikrobiotu koja ga dodatno oplemenjuje.

2.1.3. Bakterije mliječne kiseline (BMK)

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su Gram-pozitivni, nesporogeni, katalaza-negativni, aerotolerantni, organotrofni štapići ili koki, čiji je glavni produkt u procesu fermentacije mliječna kiselina (Orla-Jensen, 1919.). Uglavnom se pojavljuju na staništima koja su bogata hranjivim tvarima pa ih se može pronaći u mliječnim proizvodima, fermentiranom mesu, ribi i povrću, silaži, napitcima, biljkama, vodi, sokovima, kanalizaciji, na materijalu koji je u procesu raspadanja i mukoznim šupljinama (usta, genitalije, instestinalni i respiratorni sustav) ljudi i životinja (König i Fröhlich, 2009.). BMK se može podijeliti u dvije skupine ovisno o tome koji su im krajnji produkti tijekom fermentacije ugljikohidrata – homofermentativne i heterofermentativne. Homofermentativne BMK uglavnom proizvode mliječnu kiselinu, dok heterofermentativne BMK uz mliječnu kiselinu proizvode i octenu kiselinu ili alkohol te ugljikov dioksid (Gottschalk, 1979.). Neke vrste i sojevi BMK imaju sposobnost spriječiti rast patogena, razgraditi mikotoksine i druge tvari te imaju probiotička svojstva (Mokoena i sur., 2021.; Filannino i sur., 2018.). Mnogi sojevi BMK, koji se mogu pronaći u hrani, proizvode bakteriocine ili antibakterijske proteine koji su vrlo učinkoviti protiv patogena koji se prenose hranom (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 i *Clostridium botulinum*) (Darbandi i sur., 2021.). BMK proizvode tvari (mliječna kiselina, octena kiselina, diacetil, vodikov peroksid, enzimi i bakteriocini) koje mogu sudjelovati u očuvanju hrane i inhibirati umnažanje nepoželjnih mikroorganizama. Također, dio BMK prepoznat je i odobren kao probiotici (Cancella i sur., 2024.). Probiotici su živi mikroorganizmi koji, kada se konzumiraju u adekvatnim količinama, mogu djelovati pozitivno na zdravlje domaćina te se mogu umnažati u GI traktu domaćina (FAO/WHO, 2001.). Međutim, kako bi neka vrsta mogla biti korištena kao probiotik, ona mora biti nepatogena i netoksična. Uz navedeno, probiotik mora preživjeti prelazak u željenu nišu i tamo perzistirati, kako bi zaštitio domaćina od infekcija patogenih

mikroorganizama (Klaenhammer i Kullen, 1999.). Također, takvi mikroorganizmi ne smiju biti rezistentni na klinički upotrebljavane lijekove (antibiotici) (FAO/WHO, 2001.). Međutim, većina *Lactobacillus* vrsta intrinzično je rezistentna na aminoglikozide (gentamicin, kanamicin, streptomycin, neomicin), ciprofloksacin i trimetoprim, a osjetljive su na penicilin i β -laktame, kloramfenikol, tetraciklin, eritromicin, linezolid i kvinupristin-dalfopristin (Campedelli i sur., 2018.) te vankomicin (Gueimonde i sur., 2013.).

Unutar skupine BMK nalazi se podskupina fruktofilnih bakterija mliječne kiseline (FBMK) koje su relativno nedavno opisane (Endo i Okada, 2008.).

2.1.4. Fruktofilne bakterije mliječne kiseline (FBMK)

Fruktofilne bakterije mliječne kiseline (FBMK, engl. fructophilic lactic acid bacteria, FLAB) su heterofermentativne bakterije mliječne kiseline koje koriste fruktozu, umjesto glukoze, kao izvor ugljika (Filannino i sur., 2018.). Mogu se podijeliti u dvije skupine, obligatne FBMK i fakultativne FBMK. Obligatne FBMK dobro rastu na mediju koji sadrži fruktozu, ali isto tako mogu rasti u mediju s glukozom ukoliko je medij obogaćen piruvatom ili fruktozom ili se inkubiraju u aerobnim uvjetima (Endo i sur., 2018.). Dakle, u mediju u kojem je pretežno dostupna glukoza kao izvor ugljika, potrebni su im dodatni elektron akceptori (fruktoza, piruvat, kisik) (Maeno i sur., 2021.). Fakultativne FBMK mogu rasti na mediju s glukozom, ali puno sporije nego na mediju s fruktozom ili mediju s glukozom obogaćenom elektron akceptorima (Endo i sur., 2009.). FBMK proizvode velike količine acetata i laktata, a acetat je poznat po tome da ima snažno antibakterijsko djelovanje na patogene bakterije koje se prenose hranom i bakterije koje uzrokuju kvarenje. Također su poznate po tome da tijekom metaboliziranja fruktoze proizvode velike količine manitola (Endo i sur., 2018.). Glavni predstavnici FBMK su *Fructobacillus* spp. i *Apilactobacillus kunkeei*. FBMK se mogu pronaći u gastrointestinalnom (GI) traktu različitih insekata, uključujući pčela, čija je hrana bogata fruktozom (Endo i Salminen, 2013.).

2.1.5. *Apilactobacillus kunkeei* kao predstavnik FBMK

Vrsta *Apilactobacillus kunkeei*, prethodno nazvana *Lactobacillus kunkeei*, fakultativni je anaerobni mikroorganizam, koji je prvi put izoliran tijekom fermentacije vina, ali ju se pretežno povezuje s medonosnim pčelama (Zheng i sur., 2020.), zbog čega je i promijenjen naziv roda

kako bi se istaknula specifična prilagodba pčelama (Vergalito i sur., 2020.). Sojevi izolirani s cvijeća, pokazali su karakteristike fruktofila te ih se svrstava u skupinu obligatnih FBMK (Endo i sur., 2012.; Endo i sur., 2009.).

Vrsta *Apilactobacillus kunkeei* su Gram-pozitivni, nepokretni štapići koji rastu pojedinačno, u parovima ili u lancima. Fakultativno su anaerobni i katalaza negativni, osim u prisutnosti hema u podlozi kada imaju blagu katalaznu aktivnost. Vrsta spada u obligatne FBMK te su im potrebni dodatni elektron akceptori za rast u mediju koji sadržava glukozu. Sojevi proizvode gotovo ekvimolarne količine mliječne i octene kiseline te vrlo malo etanola. Stanice uglavnom rastu u kiselom do neutralnom mediju (pH 4,5 – 6,8) na temperaturi od 30 °C, a formiraju bijele i glatke kolonije veličine približno 1-2 mm u aerobnim uvjetima i 0,1-0,2 mm u anaerobnim uvjetima na MRS agaru. U tekućem mediju s glukozom sporo rastu, dok je rast u tekućem mediju s fruktozom iznimno brz (Endo i sur., 2012.).

Ispitivanje probiotičke aktivnosti ove vrste pokazuje kako su sojevi (n=3) rezistentni na kiselinu, enzime i žučne soli te imaju dobru stopu preživljavanja tijekom 24 h, te kako nisu rezistentni na antibiotike (nistatin, spektinomycin, cikloheksimid, kanamicin, ciprofloksacin, streptomycin), što ukazuje na potencijal u upotrebi ove vrste kao probiotika. Također ispitivana je antimikrobna aktivnost na patogene bakterije (*Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus thuringiensis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* i *Serratia marcescens*) te je utvrđeno kako sojevi nemaju antimikrobno djelovanje, osim jednog soja (od 3) na bakteriju *Proteus vulgaris* (Usta i sur., 2025.).

Edwards i sur. (1998.) prvi put su izolirali i opisali vrstu *Apilactobacillus kunkeei*. Međutim, vrsta tada nije dobro biokemijski karakterizirana, a fruktofilne karakteristike vrste nisu spomenute (Endo i sur., 2012.).

Vergalito i sur. (2020.) proveli su istraživanje na tri soja vrste *Apilactobacillus kunkeei* koji su izolirani iz pčelinjeg kruha i GI trakta medonosnih pčela. Pokazalo se kako sojevi imaju slične enzimatske profile te da sojevi proizvode korisne enzime leucin arilamidazu, β -galaktozidazu i β -glukozidazu (osim jednog soja). Također, pokazalo se kako sojevi imaju nisku stopu rezistentnosti na antibiotike, uz iznimku rezistencije na kloramfenikol, ampicilin i kanamicin. Uz to su ispitivali i djelovanje na patogene bakterije *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*,

Pseudomonas aeruginosa i *Enterococcus faecalis*, gdje se pokazalo kako sojevi *Apilactobacillus kunkeei* inhibitorno djeluju na vrstu *P. aeruginosa* i *E. faecalis*.

Olmos i sur. (2014.) genotipizirali su soj ove vrste te su pronašli gene za kloramfenikol acetiltransferazu, enzim koji je odgovoran za otpornost na kloramfenikol. Pregledom nekoliko istraživanja koja su se bavila genotipizacijom DNA vrste *A. kunkeei*, Vergalito i sur. (2020.) navode kako je antibiotska rezistencija kodirana jednim, stabilnim genom u kromosomu.

2.1.6. Antimikrobno djelovanje pčelinjeg kruha

Pretragom relevantnih znanstvenih baza podataka mogu se pronaći brojni članci koji istražuju antimikrobno djelovanje pčelinjih proizvoda, gdje se uglavnom radi o propolisu, medu, matičnoj mliječi i pčelinjoj peludi. Međutim, antimikrobno djelovanje pčelinjeg kruha tek je nedavno zadobilo pozornost znanstvene zajednice.

Bakour i sur. (2019.) proveli su istraživanje gdje su opisali nutritivni i kemijski sastav te antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost jednog uzorka pčelinjeg kruha. Antimikrobna aktivnost ispitana je na Gram-pozitivnim bakterijama (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*), Gram-negativnim bakterijama (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*) i mikroskopskim gljivama (*Aspergillus fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *Penicillium funiculosum*, *P. ochrochloron*, *P. verrucosum* var. *cyclopium*). Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) hidrometanolnog ekstrakta pčelinjeg kruha za sve bakterijske vrste kretala se između 0,04 mg/ml i 0,175 mg/ml, dok se minimalna baktericidna koncentracija (MBK) kretala između 0,08 mg/ml i 0,35 mg/ml.

U radu Didaras i sur. (2021.) istraženo je antimikrobno djelovanje 18 uzoraka pčelinjeg kruha prema patogenim bakterijskim vrstama *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* i *Klebsiella pneumoniae*. Svi uzorci pčelinjeg kruha pokazali su bakteriostatsku aktivnost (zaustavljaju mikrobnog rast) dok su MIK i MBK u većini slučajeva imale jednake vrijednosti, što bi značilo da uzorci pčelinjeg kruha uglavnom imaju baktericidno djelovanje (ubijaju mikroorganizme) pri određenim MIK vrijednostima. Svi uzorci pokazali su baktericidno djelovanje, osim uzorka 1 koji nije imao inhibitorno djelovanje na patogen *S. typhimurium*, te uzoraka 1, 6, 16, 17 i 18 koji nisu inhibitorno djelovali na patogen *K. pneumoniae*.

Elsayed i sur. (2021.) ispitali su djelovanje jednog uzorka pčelinjeg kruha na patogene *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *A. niger*, *Candida albicans* i *K. pneumoniae*. Uzorci pčelinjeg kruha nisu pokazali antimikrobno djelovanje na mikroskopsku gljivu *A. niger*, dok su Gram-pozitivne bakterije (*S. aureus*, *B. subtilis*) bile osjetljivije na uzorke pčelinjeg kruha od Gram-negativnih bakterija (*E. coli*, *K. pneumoniae*). Kao pozitivnu kontrolu koristili su antibiotik gentamicin, a rezultati su sumirani u tablici 1. te ukazuju na to da je antibiotik uglavnom bio djelotvorniji od uzorka pčelinjeg kruha.

Tablica 1. Rezultati provedenog istraživanja antimikrobnog djelovanja uzorka pčelinjeg kruha na patogene bakterije i mikroskopske gljive (istraživanje proveli Elsayed i sur., 2021.)

Patogena vrsta	Zona inhibicije uzorka pčelinjeg kruha (mm)	Zona inhibicije gentamicina (mm)
<i>S. aureus</i>	26	15
<i>E. coli</i>	18	17
<i>B. subtilis</i>	24	25
<i>K. pneumoniae</i>	12	22
<i>A. niger</i>	0	15
<i>C. albicans</i>	15	21

Sawicki i sur. (2022.) proučavali su antimikrobno djelovanje više pčelinjih proizvoda (med, pčelinja pelud, pčelinji kruh i pčelinji vosak) metodom difuzije kroz agar u bunarima pri koncentracijama 35%, 45%, 50%, 70% i 90%. Pokazalo se kako pčelinji kruh ima najjaču antimikrobnu aktivnost od svih uzoraka svih ispitivanih pčelinjih proizvoda. Antimikrobna aktivnost uzorka pčelinjeg kruha (i drugih proizvoda) ispitivana je na bakterijskim vrstama *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. typhimurium*. Svi patogeni sojevi inhibirani su pri 35%-tnoj koncentraciji uzorka, osim za *E. faecalis* (inhibirana na 45%-tnoj koncentraciji). MIK za bakterije *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* iznosila je 20%, a za *E. coli* između 15 i 20%.

Uzorak pčelinjeg kruha pripremljen je kao otopina u destiliranoj vodi, 70%-tnom etanolu i metanolu te je ispitivana antimikrobna aktivnost (Sonmez i sur., 2023.) na Gram-pozitivnim (*S. aureus*, *B. subtilis*, *Bacillus sp.*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*), Gram-negativnim bakterijskim vrstama (*K. pneumoniae* subs. *Pneumoniae*, *E. coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*,

Vibrio sp., *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *P. aeruginosa*) i mikroskopskim gljivama (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *C. albicans*). Zona inhibicije za metanolni ekstrakt pčelinjeg kruha povećavala se kako se povećavala koncentracija metanolnog ekstrakta. U slučaju vodenog ekstrakta, nije došlo do inhibicije ispitivanih vrsta. Etanolni ekstrakt više je inhibirao Gram-negativne bakterije i mikroskopske gljive (osim *C. tropicalis*), od Gram-pozitivnih.

Ilie i sur. (2024.) ispitivali su antimikrobno djelovanje dvanaest etanolnih (70%) ekstrakata pčelinjeg kruha na Gram-pozitivnim bakterijama (*E. faecalis*, *S. aureus*, *B. subtilis*), Gram-negativnim bakterijama (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi*) te mikroskopskim gljivama (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr* i *C. krusei*). Šest uzoraka pčelinjeg kruha pokazalo je inhibitorno djelovanje prema Gram-pozitivnim bakterijama, dok ih četiri pokazalo inhibitorno djelovanje prema Gram-negativnim bakterijama, a svega dva uzorka prema mikroskopskim gljivama.

Kabacki i sur. (2024.) proveli su istraživanje u kojem su uspoređivali biološku aktivnost uzoraka pčelinjeg kruha i propolisa te je između ostalog ispitana antimikrobna aktivnost na patogenim bakterijama *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio Anguillarum* i *Lactococcus garvieae*. Uzorci pčelinjeg kruha za sve ispitivane parametre imali su niže rezultate od uzoraka propolisa. Uz to pčelinji kruh nije pokazao da sprječava rast izabranih patogenih vrsta bakterija.

2.2. Glavne karakteristike patogenih bakterija rodova *Salmonella*, *Escherichia*, *Listeria* i *Staphylococcus*

Vrste rodova *Salmonella*, *Escherichia*, *Listeria* i *Staphylococcus* bakterije su koje možemo pronaći gotovo svugdje oko nas, a mogu izazvati bolesti koje se prenose hranom (engl. foodborne illness). Kontaminacija hrane najčešće je uzrokovana lošom higijenom pa se zbog toga primjenjuju prakse koje bi ograničile radnicima da kontaminiraju hranu, kao što je pranje ruku, nošenje rukavica ili zabrana rada radnicima koji su bolesni i imaju specifične simptome. Međutim, pridržavanje ovakvih propisa najčešće je dobrovoljno i ovisi o zakonskoj regulaciji unutar države (MMWR, 2023.). Ovi rodovi uključuju bakterije rezistentne na antibiotike što danas predstavlja iznimno velik problem kod liječenja infekcija i uzrokuje velik broj smrti. Zbog značajnog povećanja broja takvih bakterija provode se zakonodavne mjere koje bi trebale

smanjiti upotrebu antibiotika. Široka rasprostranjenost antibiotski rezistentnih sojeva bakterija u okolišu olakšava prijenos gena za rezistenciju između različitih bakterijskih vrsta, primjerice između komenzalističke mikrobiote i patogena koji se prenose hranom (*E. coli*, *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp.), što uzrokuje brzo širenje takvih svojstava među bakterijama (Urban-Chmiel i sur., 2022.).

Porodica *Enterobacteriaceae* obuhvaća bakterije koje su česti ljudski patogeni, a ujedno neke od njih koloniziraju ljudski GI trakt (Baran i Aksu, 2016.). Porodica *Enterobacteriaceae* je heterogena skupina gamaproteobakterija. To su štapićasti, nesporulirajući, fakultativni anaerobi koji se mogu ili ne mogu kretati, ovisno o tome imaju li peritrihalne flagele. Ujedno su oksidaza-negativni, katalaza-pozitivni, reduciraju nitrate u nitrite, fermentiraju glukozu prilikom čega proizvode različite krajnje produkte. Uglavnom su 2-4 µm dugački i 0,4-0,6 µm široki, sa zaobljenim rubovima, a generativni ciklus im traje između 20 i 30 minuta (Morales-López i sur., 2019.). Neki od rodova koji pripadaju ovoj porodici su *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pseudocitrobacter*, *Pseudoescherichia* i drugi (Morales-López i sur., 2019.).

Rod *Salmonella* su Gram-negativni, štapićasti, fakultativno anaerobni ubikvisti koji mogu biti ljudski i animalni patogeni (Giannella R.A., 1996.). Vrste roda *Salmonella* uzrokuju širok raspon poznatih bolesti kod ljudi, koje variraju od asimptomatskih do fatalnih tifoidalnih groznica, a pripadaju porodici *Enterobacteriaceae* (Dekker i Frank, 2015.). Vrsta *Salmonella enterica* sadrži više od 2500 serovara, od kojih je približno 80 povezano s uzrokovanjem bolesti vezanih uz infekciju salmonelom koje se nazivaju salmoneloze. Većina vrsta posjeduje različite gene za virulenciju, a većina takvih gena nalazi se na kromosomu ili na plazmidima (Abatcha i sur., 2020.). Rod *Salmonella* uzrokuje bolest nazvanu salmonelozu, koja uglavnom nastaje zbog konzumacije kontaminirane hrane (Jajere, 2019.). U svom genomu posjeduju određene regije koje im omogućuju prilagodbu različitim uvjetima okoliša, posebice prilikom ulaska u domaćina, čime se povećava virulentnost (Alenazy, 2022.). Genetske regije konzerviranih gena koje se mogu pronaći u genomu roda *Salmonella* smatraju se osnovama za evoluciju roda jer posjeduju brojne prednosti za domaćina, koje se ispoljavaju putem virulentnosti i otpornosti na više klasa antibiotika. Tako jedna od genetskih regija nosi gene za otpornost na streptomycin, spektinomycin, sulfonamid, kloramfenikol, florfenikol, tetraciklin i β-laktam (Castro-Vargas i sur., 2020.). Vrste roda *Salmonella* pokazuju visoku rezistentnost na širok spektar antibiotika,

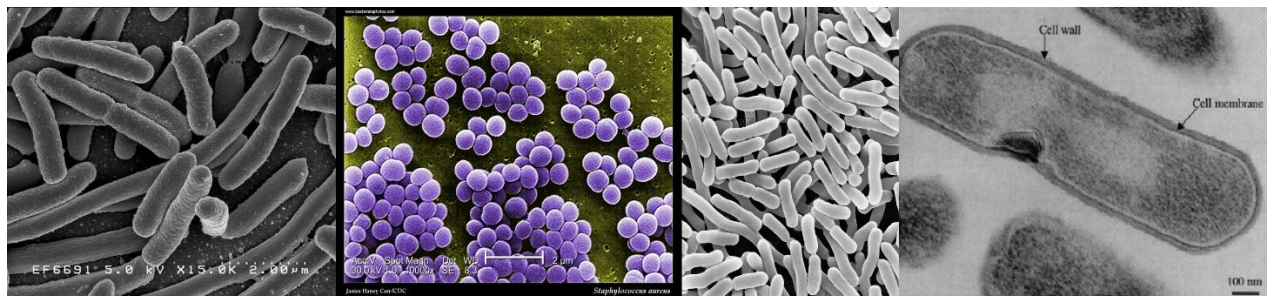
primjerice tetraciklin, ampicilin i streptomycin, čime se ograničavaju terapijske mogućnosti za kliničke slučajeve koji zahtijevaju antimikrobnu terapiju (Abatcha i sur., 2020.).

Rod *Escherichia* obuhvaća nekoliko vrsta od kojih je najistraživanija i najpoznatija vrsta *E. coli*. *E. coli* prva je izolirana vrsta te je i razlog zbog kojeg je uspostavljen rod *Escherichia*. Ostale vrste ovog roda tek su relativno nedavno karakterizirane (Yu i sur., 2021.). *E. coli* su Gram-negativni, fakultativno anaerobni, nesporogeni, nepokretni, katalaza-pozitivni, oksidaza-negativni štapići koji rastu u mezofilnim uvjetima (optimum: 37 °C). Ovisno o serološkim svojstvima ili prisutnosti faktora virulencije, grupirane su u nekoliko podskupina, između kojih četiri, koje uzrokuju ozbiljne infekcije kod ljudi, treba posebno istaknuti: enteropatogenu (EPEC), enteroinvazivnu (EIEC), enterotoksigenu (ETEC) i enterohemoragičnu (EHEC) (Pandey i sur., 2000.). Međutim, *E. coli* se i prirodno nalazi u GI traktu čovjeka te je jedna od prvih bakterija koje koloniziraju GI trakt novorođenčadi, održava anaerobne uvjete u GIT-u, proizvodi vitamine koje čovjek sam ne može proizvesti te štiti sustav od infekcija patogenih mikroorganizama (Moreira de Gouveia i sur., 2024.). *E. coli* jedna je od najproučavanijih bakterija zbog kratkog generacijskog vremena i mogućnosti horizontalnog transfera gena, a samim time čini rezervoar gena koji se lako mogu prenijeti na druge bakterije. Ova vrsta posjeduje gene za rezistenciju na gotovo sve veće vrste antibiotika (β -laktam, aminoglikozid, tetraciklin, sulfonamid, diaminopirimidin, fenikol, fluorokvinolon, nitrofurantoin, nitroimidazol), što predstavlja veliki problem u cijelom svijetu (Kerek i sur., 2025.).

Vrste roda *Staphylococcus* su Gram-pozitivni, katalaza-pozitivni koki koji formiraju grozdaste nakupine (Cebeci i Kirmusaoglu, 2020.). Jedna od glavnih vrsta ovog roda je *Staphylococcus aureus*, koja je ujedno komenzalni organizam i oportunistički patogen (Touaitia i sur., 2025.). Nastanjuje mukozne površine te proizvodi mnoge faktore virulencije uključujući stafilokoagulaze (SC), protein A, stafilokokne enterotoksine (SE) i leukotoksine. *S. aureus* ima genomske i elemente izvan kromosoma koji mu omogućuju rezistenciju na važne i često korištene antibiotike poput β -laktama, tetraciklina i meticilina (engl. Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) (Cebeci i Kirmusaoglu, 2020.). Sojevi ove vrste koji su otporni na meticilin (MRSA), uglavnom su rezistentni i na druge klase antibiotika (Michalik i sur., 2025.).

Vrste roda *Listeria* su Gram-pozitivni, fakultativno anaerobni, katalaza-pozitivni, mobilni ubikvisti koji mogu živjeti u okolišu (tlo, voda i biljni materijal) duži vremenski period i mogu rasti na širokom rasponu temperatura. *L. ivanovii* i *L. monocytogenes* su najvažnije vrste koje

uzrokuju bolesti kod ljudi i životinja koje se nazivaju listerioza (Dufailu i sur., 2021.; Kaszoni-Rückerl i sur., 2020.). Listerije mogu preživjeti u okolišu s visokim koncentracijama soli, kiselom okolišu i na vrlo niskim temperaturama (temperature zamrzavanja) (Jahan i Holley, 2016.). Svojstva patogenosti patogenih vrsta listerija mogu se pronaći i u „nepatogenim“ vrstama listerija, u koje ubrajamo *L. innocua*, *L. seeligeri* i *L. welshimeri* (Troxler i sur., 2000.). Iako se prethodno smatralo kako *L. innocua* nije opasna za zdravlje, novija istraživanja pokazuju kako sojevi ove vrste posjeduju određene genetske regije koje sadrže gene za patogenost te se pretpostavlja kako je horizontalni transfer gena uzrok ovoj pojavi (Kaszoni-Rückerl i sur., 2020.). Vrste roda *Listeria* prirodno nisu otporne na penicilin, aminoglikozide, tetracikline, makrolide, vankomicin, fluorokvinolone i trimetoprim. Također, pokazuju smanjenu osjetljivost ili rezistentnost na sulfometoksazole, cefalosporine i starije kvinolone (Troxler i sur., 2000.). Jahan i Holley (2016.) proučavali su mogućnost *in vitro* prijenosa gena za antibiotsku rezistenciju s enterokoka na *Listeria* spp. Utvrdili su kako su dva od osam sojeva stekla otpornost na antibiotike tetraciklin i streptomycin. *L. monocytogenes* u svom genomu imala je ugrađene nove gene za rezistenciju, dok za *L. innocua* genetička baza nije potvrđena postala je rezistentnija na tetraciklin. Zaključili su kako su enterokoki vjerojatno prenijeli gene za rezistenciju putem mobilnog genetičkog materijala poput transpozona.



Slika 5. Prikaz pod mikroskopom: *E. coli* (krajnje lijevo), *S. aureus* (druga s lijeva), *S. enterica* (druga s desna), *L. innocua* (krajnje desno)

izvor: <https://www.pinterest.com/pin/420382946483333848/>; <https://www.pinterest.com/pin/106608716163990219/>;
<https://media.sciencephoto.com/c0/37/01/56/c0370156-800px-wm.jpg>; [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00071-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00071-9)

2.3. Antagonizam između bakterijskih vrsta

Sposobnost mikroorganizama da inhibiraju ili u potpunosti unište drugi mikroorganizam ima velik značaj od pronalaska prvog antibiotika (Peterson i sur., 2020.). Primjerice, antimikrobna aktivnost probiotika važno je svojstvo kojim utječu na patogene bakterije. Svojstvo mogu ispoljavati na način da luče nespecifične antimikrobne tvari (kratkolančane masne kiseline), vodikov peroksid te bakteriocine i tvari slične bakteriocinima (Gillor i sur., 2008.). Također mogu proizvoditi tvari kojima vežu esencijalne elemente iz okoliša, čineći ih nedostupnima drugim mikroorganizmima, primjerice siderofore (Ahmed i Homström, 2014.). Prema FAO/WHO (2001.), mehanizmi djelovanja probiotika u kontroli patogena uključuju proizvodnju antimikrobnih tvari, kompeticiju s patogenom za mjesto vezanja u GI traktu, kompeticiju za hranjive tvari te modulaciju imunološkog sustava, a ovdje će u nastavku detaljnije biti opisani neki od glavnih mehanizama inhibicije.

Antibiotici su tvari koje sprječavaju bakterijski rast te se široko upotrebljavaju. Njihova proizvodnja od strane bakterija važna je jer predstavlja potencijalno nove lijekove. Tako su aktinomicete (bakterije tla) poznate po proizvodnji širokog raspona antibiotika. Antibiotici mikroorganizmima mogu služiti kao „oružje“ ili zaštita od drugih mikroorganizama, a kako će utjecati ovisi o njihovoj koncentraciji – mogu služiti kao inhibitori (visoke koncentracije) ili posrednici u komunikaciji (niske koncentracije) (Ranpariya i Tarpara, 2023.).

Kratkolančane masne kiseline (mravlja, octena, propionska, maslačna i mliječna) proizvode se tijekom anaerobnog metaboliziranja ugljikohidrata te imaju važnu ulogu u snižavanju pH. Inhibiraju mikrobni rast zbog mogućnosti ulaska u stanicu kroz staničnu membranu, disocijacije u lužnatijem okolišu (unutrašnjost stanice) te zakiseljavanju citoplazme i uzrokovanju osmotskog stresa (Gillor i sur., 2008.).

Veliki broj bakterija i arheja imaju sposobnost proizvodnje bakteriocina. Bakteriocini su peptidi koje proizvode bakterije kako bi inhibirale rast drugih bakterija, a mogu djelovati kao kolonizacijski peptidi (omogućavaju dominaciju u već naseljenoj niši), antimikrobni peptidi (inhibiraju kompeticijske sojeve ili patogene) ili signalne molekule (komunikacija) (Dobson i sur., 2011.). Bakteriocini uglavnom dobivaju naziv prema rodu ili vrsti koja ih proizvodi. Primjerice, lakticin i nizin proizvode vrste roda *Lactococcus*, enterocin vrste roda *Enterococcus*, pediocin vrste roda *Pediococcus*, leukocin vrste roda *Leuconostoc* i slično

(Darbandi i sur., 2021.). Bakteriocini koje proizvode BMK inhibiraju rast bakterija kvarenja i patogenih bakterija koje se prenose hranom (*Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) (de Vuyst i Vandamme, 1994.). Zendo i sur. (2020.) opisali su bakteriocin koji proizvodi vrsta *A. kunkeei*, naziva kunkecin A, te su ispitali antimikrobnu aktivnost pročišćenog kunkecina A na indikatorskim sojevima (*Lactobacillus apis*, *L. kullabergensis*, *Bombilactobacillus mellis*, *Bifidobacterium asteroides*, *Apilactobacillus apinorum*, *Bombilactobacillus mellifer*, *Lactobacillus melliventiris*, *Escherichia coli*, *A. kunkeei* FF30-6, *L. lactis* subsp. *lactis*) bakterija, gdje su nakon inkubacije uočene jasne zone inhibicije na pločama.

Jedan od glavnih elemenata potrebnih za normalno funkcioniranje mikrobne stanice (sinteza DNA i proteina) jest željezo, a uz to sudjeluje i u virulenciji patogenih bakterija, točnije sintezi čimbenika virulencije (pr. šiga toksin). U uvjetima kada nema dovoljno željeza bakterije proizvode siderofore kako bi priskrbile željezo iz okoliša za svoje potrebe, čime dolazi do kompeticije s drugim mikroorganizmima u staništu (Khasheii i sur., 2021.).

2.4. Metode utvrđivanja antimikrobnog djelovanja

Utvrđivanje inhibitornog učinka neke djelatne tvari može se provesti metodom disk difuzije, odnosno Kirby-Bauerovim postupkom (Hudzicki, 2009.). Pomoću sterilnog vatenog štapića inokulira se bakterijska kultura najčešće na Mueller-Hinton agar, nakon čega se na površinu postave celulozni diskovi natopljeni antimikrobnom tvari. Djelatna tvar difuzijom prelazi s diska u hranjivu podlogu te se oko mikroorganizma koji je osjetljiv, nakon inkubacije (~24 h), pojavljuje zona inhibicije. Očitava se promjer inhibicije (uključujući i promjer diska) te se rezultati prikazuju prema parametrima koje je odredio Institut za kliničke i laboratorijske standarde (engl. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) (CLSI, 2016.; CLSI, 2012.). Na ovaj način može se utvrditi rezistentnost nekog mikroorganizma na ispitivanu djelatnu tvar.

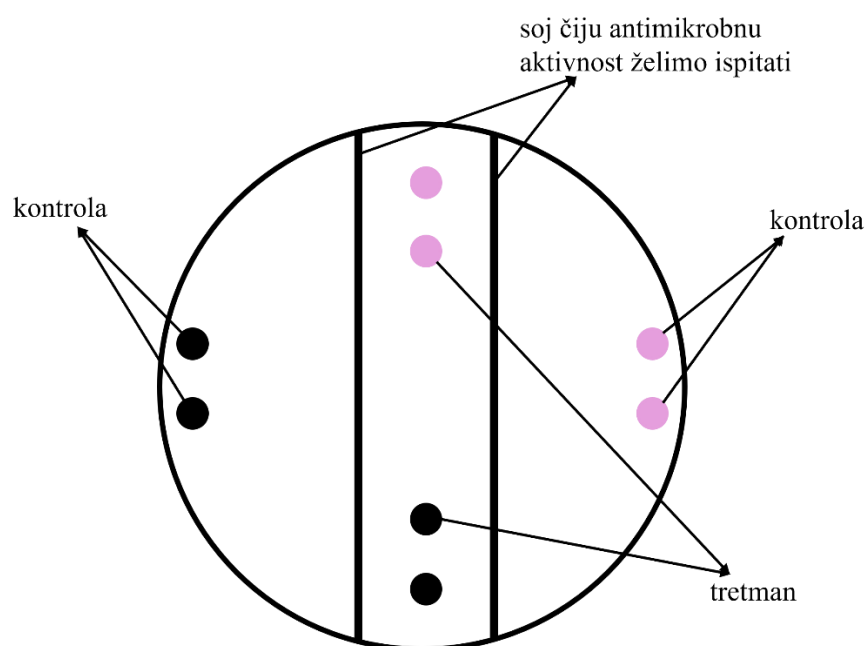


Slika 6. Metoda disk difuzije (Kirby-Bauer postupak): celulozni disokvi natopljeni djelatnom tvari koja inhibira (očituje se pojavom zone inhibicije oko diska) ili ne inhibira (nema zone inhibicije oko diska) mikrobni rast

Metoda se provodi i na alternativan način da se u agaru izbuše bunari u koje se doda antimikrobna djelatna tvar. Tvar difundira u hranjivu podlogu, kao i u slučaju s celuloznim diskovima (Balouiri i sur., 2016.). Kvantitativna analiza podataka zahtijeva određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije. MIK je minimalna vrijednost antimikrobne tvari pri kojoj se inhibira vidljivi rast mikroorganizama, dok

je MBK minimalna vrijednost antimikrobne tvari pri kojoj mikroorganizmi umiru, a najčešće se izražavaju u mg/ml ili mg/l (Balouiri i sur., 2016.; CLSI, 1999.). Za određivanje MIK i MBK vrijednosti koriste se metode makrodilucije (provodi se u testnim tubicama) i mikrodilucije (provodi se u mikrotitarskim pločama) (CLSI, 1999.).

Metoda dvojnih kultura u agaru još je jedna od metoda koje služe za ispitivanje antimikrobnog djelovanja, najčešće jednog mikroorganizma na drugi mikroorganizam. Provodi se prema metodologiji koju su opisali Domig i sur. (2014.).



Slika 7. Shematski prikaz metode dvojnih kultura u agaru

Metodom dvojnih kultura sterilnom ezom se apliciraju prekonoćne tekuće kulture vrste/soja čija se antimikrobna aktivnost želi ispitati, u obliku dviju paralelnih linija na sredinu odabrane hranjive podloge na Petrijevoj zdjelici. Razmak između dviju paralelnih linija nanesenog inokuluma (vrste/soja čiju antimikrobnu aktivnost želimo ispitati) bi trebao biti oko 2 cm, a kako je to prikazano na slici 7. Nakon inkubacije (24 h) ploče se inokuliraju s 5 μ l prekonoćne tekuće kulture indikatorskih mikroorganizama koji se apliciraju između paralelnih linija (tretman) i uz rubove ploča (kontrola). Na ovaj način na jednu ploču mogu se inokulirati dva indikatorska mikroorganizma. Ploče se zatim stavljaju na inkubaciju 48 h nakon čega se očitavaju rezultati testa (ima li ili nema rasta između dviju linija te gustoća poraslih kolonija u odnosu na kontrolu).

2.5. MALDI-TOF MS i rep- PCR u identifikaciji bakterija

MALDI-TOF masena spektrometrija (engl. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) analitička je metoda mikrobne identifikacije i karakterizacije temeljene na brzom i preciznom procjeni mase ioniziranih molekula uzorka, kratkim, pulsirajućim laserom (UV-ultraljubičasti/IR-infracrveni) nakon kokristalizacije uzorka s organskom kiselinom niske molekularne mase (matriksa) (Sivanesan i sur, 2023.; Calderaro i Chezzi, 2024.). Metoda se bazira na analizi proteoma kako bi se identificirale bakterije i mikroskopske gljive do razine vrste. Tijekom analize važno je koristiti matriks (prethodno pripremljena mješavina koja se dodaje uzroku), kako bi se uzorak zaštitio od uništenja zrakama lasera, a ujedno matriks potpomaže isparavanju i ionizaciji uzorka (Clark i sur., 2013.). Metoda je postala popularna zbog toga što je brza, precizna i jednostavna, te daje precizne informacije o molekulama analita (Sivanesan i sur., 2023.). Ranija istraživanja bila su ograničena opsegom i nedostatkom baza podataka, standardiziranih reagensa te protokola za analizu bakterijskih stanica. Danas se rutinska analiza obavlja koristeći komercijalne MALDI-TOF MS sustave baza podataka (Clark i sur., 2013.), na način da se maseni spektri dobiveni u analizi uspoređuju s postojećim spektrima u bazama podataka kako bi se pronašlo najbliže podudaranje (Kassim i sur., 2017.).

Meaning of Score Values

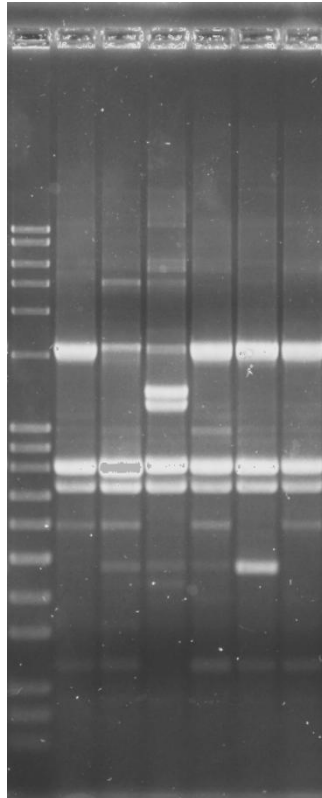
Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Slika 8. Interpretacija rezultata dobivenih MALDI-TOF MS analizom vrši se svrstavanjem dobivenih vrijednosti rezultata u raspone navedene u tablici na slici.

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
D9 (+++)(A)	D9 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.13	Apilactobacillus kunkeei	1.74
F9 (-)(C)	F9 (Standard)	No Organism Identification Possible	1.30	No Organism Identification Possible	1.27
F10 (+)(B)	F10 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	1.99	No Organism Identification Possible	1.68

Slika 9. Rezultati dobiveni MALDI-TOF analizom: zeleno označena identifikacija visoke točnosti, žuto označena identifikacija niske točnosti, a crveno označena nemogućnost identifikacije

REP-PCR (engl. Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction) je metoda koja koristi primere komplementarne repetitivnim sekvencama unutar DNA koje omogućavaju amplifikaciju DNA različitih veličina. Upravo zbog različitih veličina PCR produkata, ovom metodom dobivaju se jedinstveni obrasci DNA (engl. fingerprint) koji su specifični za neki soj te se metoda široko primjenjuje za određivanje unutarvrstne raznolikosti i selekciju bakterijskih izolata (Spigaglia i Mastrantonio, 2003.). Za vizualizaciju rep-PCR produkata koristi se metoda gel elektroforeze pri čemu se priprema agarozni gel u koji se dodaju rep-PCR produkti. Zbog djelovanja električnog polja, negativno nabijena DNA molekula, putuje prema pozitivnom polu gela, te ovisno o veličini produkta, putuje određenom brzinom u gelu. Nakon određenog vremena, elektroforeza se zaustavi te se gel oboja, kako bi ga bilo lakše vizualizirati. Daljnja analiza dobivenog obrasca odvija se u nekom od programa za analizu, poput BioNumeric paketa (Lee i sur., 2012.).



Slika 10. Vizualizacija PCR produkata gel elektroforezom: bijele crte u stupcima označavaju pojedini PCR produkt. Prvi stupac označava marker (već poznati uzorak parova baza) koji služi za usporedbu s nepoznatim uzrocima.

3. Materijali i metode

3.1. Pokusni dizajn i uzorkovanje pčelinjeg kruha

Na pokusnom pčelinjaku Zavoda za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu tijekom lipnja 2024. godine prikupljeni su skupni uzorci pčelinjeg kruha, iz tri pokusne pčelinje zajednice (K1, K2, K3) sive pčele (*Apis mellifera carnica* Pollman 1879.), koje su bile smještene u Langstroth-Roothove (LR) košnice (Slika 11.). U pokusne pčelinje zajednice su umetnuti okviri s praznim stanicama saća kako bi se pčelama omogućilo dovoljno slobodnog prostora za pohranu prikupljene peludi te su nakon 2,5 tjedna (nakon procesa fermentacije pčelinje peludi) iz ispunjenih stanica saća prikupljeni uzorci pčelinjeg kruha. Pokus je proveden u kontroliranim uvjetima kako bi se osiguralo prikupljanje autentičnih uzoraka pčelinjeg kruha poznate starosti, odnosno svježih uzoraka pčelinjeg kruha odmah nakon završetka procesa fermentacije.



Slika 11. Pokusne pčelinje zajednice (košnice K1, K2 i K3) na pčelinjaku Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Skupni uzorci pčelinjeg kruha (PK1, PK2, PK3) prikupljeni su izravno iz stanica saća pokusnih zajednica K1, K2 i K3 pomoću pribora (cijevi) za vađenje pčelinjeg kruha (tzv. „zumba“). Uzorci su pohranjeni u prikladnu ambalažu (staklenke 25 ml) te čuvani na 4 °C do daljnjih analiza. Proces uzorkovanja prikazan je na Slikama 12-15.



Slika 12. Pčelinji kruh uskladišten u stanicama saća



Slika 13. Saće iz pokusne zajednice tijekom uzorkovanje pčelinjeg kruha



Slika 14. Pčelinji kruh ekstrahiran iz stanice saća



Slika 15. Prikupljeni uzorci pčelinjeg kruha (PK) iz pokusnih zajednica / košnica K1, K2 i K3 (uzorci PK1, PK2 i PK3)

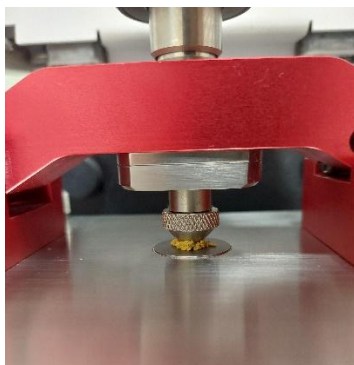
3.2. Kemijska karakterizacija metodom FTIR-ATR spektroskopije

Infracrveni spektri prikupljenih uzoraka pčelinjeg kruha snimljeni su metodom FTIR-ATR spektroskopije, odnosno spektroskopije u srednjem infracrvenom dijelu spektra (spektralno područje $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) s Fourierovom transformacijom (FT) i ATR (*Attenuated Total Reflectance*; prigušena totalna refleksija) tehnikom snimanja spektara (Slika 16.). Uzorci su snimljeni u izvornom stanju pomoću infracrvenog (FTIR) spektrometra Cary 660 (Agilent Technologies) s DTGS (deuterirani triglicin sulfat) detektorom, a za snimanje spektara primijenjena je tehnika jednorefleksijske prigušene totalne refleksije (ATR). U tu je svrhu upotrijebljen je Golden Gate ATR instrumentalni dodatak s dijamantom kao internim refleksijskim elementom i ZnSe (cinkov selenid) optičkim komponentama. U svrhu pripreme uzoraka za spektralnu analizu, prikupljeni uzorci pčelinjeg kruha usitnjeni su i homogenizirani pomoću laboratorijskog porculanskog tarionika.

Apsorpcijski spektri uzoraka pčelinjeg kruha snimljeni su na sobnoj temperaturi ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) pri spektralnoj rezoluciji od 4 cm^{-1} . Svaki spektar snimljen je kao razlika spektra uzorka i ATR elementa bez uzorka. Za svaki spektar prikupljeno je 32 snimaka (skenova), a snimljeno je ukupno 4 spektra svakog uzorka koristeći različite alikvote. Uzorci homogenizirane pčelinje peludi su postavljeni na dijamant ATR ploče te pritisnuti dodatnim instrumentalnim dodatkom sa safirnim kristalom kako bi se omogućilo formiranje tankog uniformnog sloja uzorka i snimanje njegovog IR spektra (Slika 17.). Uzorci pčelinje peludi i pčelinjeg kruha su pripremljeni i analizirani na isti način.



Slika 16. Infracrveni (FTIR) spektrometar (lijevo) i analiza uzoraka pčelinjeg kruha FTIR-ATR tehnikom snimanja (desno)



Slika 17. Uzorak homogeniziranog pčelinjeg kruha između dijamantnog i safirnog kristala ATR elementa

Sirovi FTIR-ATR spektri pohranjeni su pomoću softverskog paketa Agilent ResolutionsPro (version 5.3.0, Agilent Technologies). Kvalitativna analiza FTIR-ATR spektara pčelinje peludi i pčelinjeg kruha provedena je s ciljem interpretacije i asignacije apsorpcijskih vrpca odgovarajućim vibracijama funkcionalnih skupina molekula u uzorku, a navedeno je provedeno koristeći softverski paket Spectragryph (version 1.2.16.1.), znanstvenu literaturu i spektralne zbirke. Daljnja obrada spektara provedena je pomoću programskog paketa za analizu i grafički prikaz spektralnih podataka Origin 8.1. (OriginLab, version 8.1.).

3.3. Izolacija bakterija mliječne kiseline iz pčelinjeg kruha

3.3.1. Priprema fiziološke otopine i hranjivih podloga potrebnih za mikrobiološku analizu

Za potrebe vaganja kemikalija i podloga, u svim analizama, korištena je laboratorijska vaga (TE3102S; Santarius AG, Njemačka), a za potrebe sterilizacije kemikalija, preparata i podloga korišten je Autoklav CertoClav Multicontrol 2 (CertoClav, Austrija).

Fiziološka otopina

Kako bi se pripremila fiziološka otopina korišten je natrijev klorid (NaCl; VWR Chemicals, Belgija). Fiziološka otopina pripremljena je na način da je 8,5 g NaCl-a otopljeno u 1000 ml destilirane vode. Otopina je zatim sterilizirana na temperaturi od 121 °C tijekom 15 minuta.

Fiziološka otopina korištena je za seriju razrjeđenja uzoraka pčelinjeg kruha te pripremu McFarland standarda.

De Man-Rogosa-Sharpe kruta podloga – MRS

Za pripremu krute De Man–Rogosa–Sharpe podloge (MRS; Biolife, Italija) korištena je gotova, komercijalno dostupna, dehidrirana hranjiva podloga (De Man–Rogosa–Sharpe agar with Tween 80; Biolife, Italija). Podloga je pripremljena dodavanjem 70,2 g podloge u 1000 ml destilirane vode, zagrijana do ključanja kako bi se otopila te se nakon toga sterilizirana na 121 °C u trajanju od 15 minuta. Nakon toga, ohlađena je do približno 50 °C te nakon toga izlivena u sterilne petrijeve zdjelice. Ova podloga korištena je za izolaciju BMK.

De Man–Rogosa–Sharpe kruta podloga s dodatkom D-fruktoze – FMRS

De Man–Rogosa–Sharpe agar s dodatkom D-fruktoze (HiMedia Laboratories, Njemačka) kruta hranjiva podloga priprema se prema jednakim uputama kao i MRS podloga, osim što se u nju dodaje 10 g D-fruktoze na 1000 ml podloge, zbog čega je za potrebe razlikovanja označena s „FMRS“. Ova podloga korištena je za izolaciju FBMK.

De Man-Rogosa-Sharpe kruta hranjiva podloga s dodatkom vankomicin hidroklorida – LamVab

De Man–Rogosa–Sharpe agar s dodatkom vankomicin hidroklorida (Santa Cruz Biotechnology, SAD) je kruta hranjiva podloga naziva LamVab koja se priprema prema jednakim uputama kao i MRS podloga, osim što se u nju dodaje 10 ml vankomicin hidroklorida u 1000 ml podloge nakon što je pH podloge snižen na 5 pomoću 1 M HCl-a.

Vankomicin hidroklorid priprema se na način da je 2 mg vankomicin hidroklorida otopljeno u 1 ml destilirane vode, sterilizirano filtracijom i dodano u podlogu, u prethodno navedenoj količini, kada se podloga ohladila na 50 °C. Podloga je korištena za izolaciju laktobacila.

Fructose-Yeast extract-Polypeptone broth – FYP

Fructose-Yeast extract-Polypeptone broth (FYP) je tekuća hranjiva podloga, za čiju je pripremu korišteno 10 g D-fruktoze (HiMedia Laboratories, Njemačka), 10 g kvašćevog ekstrakta (Yeast extract; Biolife, Italija), 5 g polipeptona (Biolife, Italija), 2 g natrijeva acetata (Kemika d.d., Hrvatska), 0,5 g Tween 80 (VWR Chemicals, SAD), 0,2 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (T.T.T. Ltd., Hrvatska), 0,01 g $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck, SAD), 0,01 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (Gram mol, Hrvatska) i 0,01 g natrijeva klorida (NaCl; VWR Chemicals, Belgija). Podloga je sterilizirana na 121 °C tijekom 15 minuta i puštena da se u potpunosti ohladi do upotrebe. Podloga je korištena za uzgoj tekućih kultura FBMK.

3.3.2. Serija razrjeđenja uzoraka pčelinjih kruha, naciepljenje i uzgoj

Kako bi se provela izolacija bakterija, napravljena je serija razrjeđenja uzoraka pčelinjeg kruha (K1, K2, K3) na način da je sterilno odvagano 1 g uzorka pčelinjeg kruha i prebačen u sterilnu vrećicu za homogenizator (Seward, Velika Britanija) u koju je dodano 9 ml sterilne fiziološke otopine sobne temperature. Suspenzija je homogenizirana (Homogenizator Stomacher 400 Circulator; Seward, Velika Britanija) tijekom 2 min na 230 rpm. U sterilne epruvete otpipetirano je po 9 ml sterilne fiziološke otopine sobne temperature. U prvu epruvetu je prebačen 1 ml otopine iz vrećice za homogenizaciju. Otopina je vorteksirana, na Vorteks V-1-plus uređaju (Biosan, Latvija) te je postupak ponovljen do -3. razrjeđenja. Po 0,1 ml svakog razrjeđenja naciepljeno je na prethodno pripremljene hranjive podloge (MRS, FMRS, LamVab) u duplikatima za svaki uzorak pčelinjeg kruha.

Ploče su inkubirane (Sanyo Electric CO. Ltd, Japan) u mikroaerofilnim uvjetima, tijekom 48 h na 30 °C.

3.3.3. Brojanje i izolacija kolonija

Nakon inkubacije na pločama izbrojane su porasle kolonije te je izračunat broj poraslih kolonija po gramu (CFU/g) (jedinice koje formiraju kolonije/g, engl. colony forming units/g) prema formuli:

$$\text{broj kolonija } \left(\frac{\text{CFU}}{\text{g}}\right) = \left(\frac{\text{broj kolonija}}{\text{volumen uzorka}}\right) * \text{recipročna vrijednost razrjeđenja}$$

Brojanje kolonija napravljeno je pomoću brojača kolonija („Colony star“; Funke Gerber, Njemačka).

S ploča su izuzete pojedinačne kolonije te su svi prikupljeni izolati pročišćeni tri puta do čistih kultura metodom iscrpljenja. Sve čiste kulture nacijepijene su u tekuće podloge i, nakon inkubacije kroz 24 h, pohranjene na -20 °C uz dodatak sterilnog 50 %-tnog glicerola (konačna koncentracija glicerola iznosi 25 %).

Za pripremu glicerola (50 %), pomiješan je glicerol (Gram mol, Hrvatska) s destiliranom vodom u omjeru 50:50. Otopina je sterilizana na 121 °C tijekom 15 minuta te je ostavljena da se potpuno ohladi. Glicerol (50 %) je korišten za pripremu i pohranu glicerol kultura.

3.3.4. Statistička obrada podataka

Rezultati brojnosti bakterija su prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama. Za izračun statistički značajnih razlika je korištena jednosmjerna analiza varijance ANOVA (engl. one-way ANOVA). U slučaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$) proveden je post-hoc Bonferroni test. Statističke analize su provedene u računalnom programu Microsoft Excel 2016 pomoću dodatka Analiza podataka.

3.3.5. Identifikacija korisne mikrobiote do razine vrste MALDI-TOF masenim spektrometrom

Identifikacija do razine vrste provedena je MALDI-TOF masenim spektrometrom (Bruker Daltonics, Njemačka) prema uputama proizvođača, odnosno prema protokolu „extended direct transfer procedure“.

Pojedinačna bakterijska kolonija, koja nije starija od 24 h, razmazana je sterilnom čačalicom u tankom sloju na označene pozicije na pločici za MALDI-TOF. Nakon nanošenja izolata isti su prekriveni s 1 μ l 70 %-tne mravlje kiseline (Carl Roth, Njemačka) i ostavljeni da se osuše na sobnoj temperaturi na zraku.

Pripremljen je matriks na način da je 10 mg/ml α -cijano-4-hidroksicimetne kiseline (HCCA; Bruker Daltonics, Njemačka) otopljeno u 50%-tnom acetonitrilu (Bruker Daltonics, Njemačka) i 2,5 %-tnoj trifluorooctenoj kiselini (Bruker Daltonics, Njemačka) te je pločica ponovno ostavljena na sušenje na sobnoj temperaturi.

Na pločicu s izolatima dodan je po 1 μ l matriksa te je ponovno ostavljena da se osuši na sobnoj temperaturi. Pripremljena pločica stavljena je u MALDI-TOF uređaj gdje su snimljeni spektri svakog uzorka pomoću Microflex LT spektrometra masa (Bruker Daltonics, Njemačka) pod kontrolom računalnog programa FlexControl (verzija 3.4; Bruker Daltonics, Njemačka).

Maseni spektri obrađeni su pomoću računalnog programa Biotyper (verzija 4.1.; Bruker Daltonics, Njemačka) i uspoređeni s bazom Biotyper (MBT-Compas) Identifikacija izolata se temelji na sličnosti masenog spektra izolata određenom referentnom spektru te je izražena numeričkim kategorijama gdje vrijednosti variraju od 0,00 do 3,00. Vrijednost $\geq 2,00$ ukazuje da je izolat točno identificiran na razini vrste, vrijednost $\geq 1,70$ i $< 2,00$ da je izolat točno identificiran na razini roda, a vrijednost $< 1,70$ da identifikacija nije moguća ni na razini vrste ni na razini roda.

Kako bi se provjerila valjanost MALDI identifikacije, na pločice je stavljen i bakterijski test standard (BTS, engl. bacterial test standard, *E. coli*) uz matriks.

3.3.6. DNA ekstrakcija

Pripremljena je Chelex otopina na način da je 2,5 g Chelex 100 Resin (Bio-Rad Laboratories Inc., SAD) i 2,5 ml 0,01 M Tris HCl otopljeno u 0,95 ml destilirane vode. Otopina je autoklavirana na 121 °C tijekom 15 minuta.

Otpipetirano je po 500 µl Chelex otopine u 1,5 ml Eppendorf tubice. U svaku tubicu prebačena je veća količina izraslih kolonija čiste kulture sojeva od interesa te je sve vorteksirano. Uzorci su inkubirani 10 minuta na 95 °C uz konstantno miješanje od 300 rpm (ThermoMixer C, Eppendorf AG, Njemačka). Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 30 sekundi na 15000 x g te je 100 µl supernatanta pažljivo prebačeno u nove tubice. Izolirane DNA su smrznute do korištenja.

3.3.7. Genotipizacija i identifikacija do razine soja rep-PCR metodom

Za identifikaciju do razine soja izolati su genotipizirani pomoću rep-PCR metode i početnice GTG5 (5' GTG GTG GTG GTG GTG 3') (Švec i sur., 2005.).

Pripremljena je reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 µl koja je sadržavala 12,5 µl AccuStart II (Quanta Bioscience, SAD), 10,5 µl UHQ, 1 µl GTG5 početnice (Microsynth AG, Microsynth Austria GmbH) te 1 µl DNA.

Amplifikacija je provedena u PCR uređaju Mastercycler Nexus SX1 (Eppendorf AG, Njemačka) pod uvjetima navedenim u tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti amplifikacije.

PCR korak	Temperatura/vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95 °C/7 min	1
Denaturacija	90 °C/30 s	30
Sparivanje početnica	40 °C/1 min	
Produljivanje lanaca	65 °C/8 min	
Završno produljivanje lanaca	65 °C/16 min	1

Nakon amplifikacije, 5 μ l rep-PCR produkata pomiješano je s 1,5 μ l 6x LD boje (Thermo Scientific, SAD) te su uneseni u jažice 2 %-tnog agaroznog gela, zajedno s 4 μ l molekularnog biljega 100 bp-DNA-ladder extended (Carl Roth GmbH, Njemačka). Zatim su PCR produkti razdvojeni horizontalnom gel elektroforezom (SEA 2000®, Elchrom Scientific AG, Švicarska) na 80 V kroz 1 h i 50 minuta pri 19 °C, nakon čega je gel bojan 30 minuta u 0,028 %-tnoj otopini GelRed Nucleic Acid Stain boje (Biotium, SAD). Gel je vizualiziran pomoću uređaja Molecular Imager Gel Doc XR+ s Image Lab Softverom (Bio-Rad Laboratories Inc., SAD). Dobiveni rezultati analizirani su pomoću programa BioNumerics (verzija 7.6.1.; Applied Maths, Belgija). Prilikom izrade dendrograma, korištena je razina tolerancije 1 % i optimizacija 0,5 %.

3.4. Biotehnološka karakterizacija korisnih izolata

3.4.1. Antibiotička rezistencija sojeva FBMK

Za uzgoj prekonoćnih kultura ispitivanih sojeva FBMK korištena je Plate Count Agar (PCA) kruta hranjiva podloga s dodatkom D-fruktoze (HiMedia Laboratories, Njemačka). Za pripremu PCA podloge s dodatkom fruktoze (PCA+F) korištena je gotova, komercijalno dostupna, dehidrirana hranjiva podloga Plate Count Agar (Biolife, Italija).

Kako bi se ispitala antibiotička rezistencija fruktofilnih sojeva izoliranih iz pčelinjeg kruha upotrijebljeni su komercijalno dostupni antibiotici prikazani u Tablici 3.

Tablica 3. Antibiotici korišteni za ispitivanje antibiotičke rezistencije sojeva FBMK

Klasa antibiotika	Antibiotik	Koncentracija	Proizvođač
Amfenikoli	Kloramfenikol	30 µg	BD BBL™ Sensi-Disc™; Becton Dickinson, SAD
Penicilini	Ampicilin	10 µg	BD BBL™ Sensi-Disc™; Becton Dickinson, SAD
Tetraciklini	Tetraciklin	30 µg	BD BBL™ Sensi-Disc™; Becton Dickinson, SAD
Glikopeptidni antibiotici	Vankomicin	5 µg	BD BBL™ Sensi-Disc™; Becton Dickinson, SAD
Aminoglikozidi	Gentamicin	10 µg	BD BBL™ Sensi-Disc™; Becton Dickinson, SAD
	Streptomycin	300 µg	BD BBL™ Sensi-Disc™; Becton Dickinson, SAD
	Kanamycin	30 µg	BD BBL™ Sensi-Disc™; Becton Dickinson, SAD
Linkozamidi	Klindamicin	2 µg	BD BBL™ Sensi-Disc™; Becton Dickinson, SAD
Makrolidi	Eritromicin	15 µg	BD BBL™ Sensi-Disc™; Becton Dickinson, SAD



Slika 18. Komercijalno dostupni antibiotici korišteni za ispitivanje antibiotske rezistencije FBMK izolata

Za ispitivanje antibiotske rezistencije fruktofilnih sojeva korištena je Lactic acid bacteria (LAB) Susceptibility Test Medium (LSM) podloga s dodatkom D-fruktoze (LSM+F). Za pripremu je korišten 90 %-tni ISO Sensitest agar (Oxoid, Velika Britanija) i 10 %-tna MRS tekuća podloga. Podloga je pripremljena na način da je pomiješano 28,26 g ISO Sensitest agara, 5,52 g MRS tekuće podloge (De Man-Rogosa-Sharpe broth with Tween 80; Biolife, Italija), 1,5 g agara (Biolife, Italija) i 10 g D-fruktoze (HiMedia Laboratories, Njemačka) u 1000 ml podloge. Podloga je sterilizirana na 121 °C tijekom 15 minuta, a kada se ohladila na 50 °C izlivena je u Petrijeve zdjelice.

Svi analizirani sojevi su iscrpljeni su na krutoj PCA+F podlozi do čiste kulture prije analize antibiotske rezistencije. Nakon inkubacije na 30 °C tijekom 24 h, u 2 ml prethodno otpipetirane sterilne fiziološke otopine, dodavana je jedna po jedna kolonija do postizanja turbiditeta koji odgovara turbiditetu McFarland standarda 0,5 ($1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml) uz korištenje denzitometar („DEN-1 Densitometer“; Biosan, Latvija). U slučaju da je turbiditet veći od 0,5 bakterijska suspenzija je razrijeđena sterilnom fiziološkom otopinom.

Nakon pripreme McFarland standarda, za svaki od ispitivanih sojeva, inokulirane su LSM+F krute podloge bakterijskim suspenzijama, na način da je sterilnim vatenim štapićem bakterijska suspenzija gusto razmazana po cijeloj površini hranjive podloge. Ploče su ostavljene na sobnoj temperaturi kako bi se suspenzija upila u agar prije nanošenja antibiotskih diskova.

Pomoću štambilja za antibiotike (Becton Dickinson, SAD) odgovarajući antibiotski diskovi naneseni su na LSM+F podloge.



Slika 19. Štambilj za antibiotike (Becton Dickinson, SAD)

Ploče su inkubirane na 30 °C tijekom 48 h. Nakon inkubacije, izmjeren je jasno vidljiv promjer zona inhibicije rasta, uključujući i promjer diska. Dobiveni rezultati interpretirani su prema CLSI standardu (2016.).

3.4.2. Enzimatska aktivnost sojeva FBMK

Kako bi se ispitala enzimatska aktivnost fruktofilnih sojeva izoliranih iz pčelinjeg kruha, upotrijebljene su hranjive podloge prikazane u Tablici 4.

Tablica 4. Hranjive podloge korištene za ispitivanje enzimatske aktivnosti

Enzimatska aktivnost	Hranjiva podloga
Proteolitička aktivnost	PCA agar sa skim milkom (1.5 % w/v)
Celulolitička aktivnost	PCA agar s karboksimetil celulozom (2 % w/v)
Amilazna aktivnost	PCA agar sa škrobom (2 % w/v)
Lakazna aktivnost	PCA agar s gvajakolom (100 µl/l)
β-galaktozidazna aktivnost	PCA agar s x-gal-om (20 mg/l)
Lipolitička aktivnost	Tributirin agar s tributirinom (10 ml/l)

PCA kruta hranjiva podloga s obranim mlijekom pripremljena je na način da je u običnu PCA (Plate count agar) podlogu dodano 1,5 g obranog mlijeka (VWR Chemicals, Belgija) na 100 ml podloge te je nakon toga otopina sterilizirana na 121 °C tijekom 15 minuta. Kada se podloga

ohladila na ~50 °C, izlivena je u sterilne Petrijeve zdjelice. Podloga je korištena za ispitivanje proteolitičke aktivnosti mikroorganizama.

PCA kruta hranjiva podloga s karboksimetil celulozom pripremljena je na način da je u PCA agar, nakon dodavanja destilirane vode i uz stalno miješanje, dodano 2 g karboksimetil celuloze (VWR Chemicals, Belgija) u 100 ml podloge, zatim je sterilizirana (121 °C/15 min) i nakon hlađenja (~50 °C) izlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Podloga je korištena za ispitivanje celulolitičke aktivnosti mikroorganizama.

PCA kruta hranjiva podloga sa škrobom pripremljena je na način da je u PCA podlogu dodano 2 g škroba (Grammol, Hrvatska) u 100 ml podloge te je podloga sterilizirana (121 °C/15 min). Nakon hlađenja (~50 °C) podloga je izlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Podloga je korištena za ispitivanje amilazne aktivnosti mikroorganizama.

PCA kruta hranjiva podloga s dodatkom gvajakola pripremljena je na način da je u PCA hranjivu podlogu (koja je sterilizirana (121 °C/15 min) i ohlađena na ~50 °C) dodano 100 µl gvajakola (Thermo Scientific, SAD), steriliziranog filtracijom, u 1000 ml podloge. S obzirom da je gvajakol osjetljiv na svjetlost, podloga je čuvana zaštićena od svjetlosti do upotrebe. Podloga je korištena za ispitivanje lakazne aktivnosti mikroorganizama.

PCA kruta hranjiva podloga s dodatkom X-gala pripremljena je na način da je 20 mg X-gala (VWR Chemicals, Belgija) otopljeno u 1 ml DMSO-a (Sigma-Aldrich, SAD). X-gal je, prije dodavanja u sterilnu, ohlađenu podlogu steriliziran filtracijom. S obzirom da je osjetljiv na svjetlost, podloga je čuvana zaštićena od svjetlosti do upotrebe. Podloga je korištena za ispitivanje β-galaktozidazne aktivnosti mikroorganizama.

Tributirin kruta hranjiva podloga (Biolab Diagnostics Laboratory Inc., Mađarska) pripremljena je na način da je 20 g podloge suspendirano u 1000 ml destilirane vode. Zatim je dodano 10 ml tributirin suplementa u 1000 ml podloge (Biolab Diagnostics Laboratory Inc., Mađarska) te se sve zajedno homogenizirano miješanjem. Nakon toga otopina je zagrijana do ključanja i sterilizirana autoklaviranjem na 121 °C tijekom 15 minuta. Kada se ohladila na ~50 °C, izlivena je u sterilne Petrijeve zdjelice. Podloga je korištena za ispitivanje lipolitičke aktivnosti mikroorganizama.

Petrijeve ploče s hranjivim podlogama za ispitivanje enzimatske aktivnosti, podijeljene su na 10 jednakih dijelova te su adekvanto označene. Svaki soj apliciran je u dva ponavljanja na svaku od odgovarajućih hranjivih podloga, na način da je 2 µl tekuće kulture ispitivanih sojeva aplicirano direktno u agar pomoću mikropipete. Tako inokulirane ploče inkubirane su na 30 °C tijekom 24 h, u aerobnim uvjetima. Enzimatska aktivnost očituje se u pojavi prozirne zone oko mjesta inokulacije ispitivanog soja.

Za vizualizaciju amilazne aktivnosti, ploče su natopljene lugolom. Kao pozitivna kontrola, korišten je *Pseudomonas* sp. W2-8 (interna oznaka soja na Zavodu za mikrobiologiju) kojem je prethodno ispitana enzimatska aktivnost.

3.4.3. Antimikrobno djelovanje sojeva FBMK izoliranih iz pčelinjeg kruha

Za ispitivanje antimikrobnog djelovanja izoliranih FBMK iz pčelinjeg kruha korišteni su sljedeći sojevi patogenih mikroorganizama koji su komercijalno dostupni te su nabavljeni s Instituta u Leibniz-u (kolekcija mikroorganizama, engl. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, DSM) ili američke zbirke (engl. American Type Culture Collection, ATCC):

- *Salmonella enterica* DSM 14221
- *Escherichia coli* DSM 682
- *Listeria innocua* ATCC 33090
- *Staphylococcus aureus* DSM 20231

Za uzgoj prekonoćnih kultura patogenih bakterija pripremljena je kruta BHI (Brain Heart Infusion) podloga, dok je za uzgoj tekućih kultura patogenih bakterija korištena tekuća BHI podloga.

Za pripremu krute BHI (Brain Heart Infusion) podloge korištena je komercijalno dostupna, dehidrirana hranjiva podloga (Brain Heart Infusion broth; Biolife, Italija) kojoj je dodano 15 g agara (Biolife, Italija) u 1000 ml podloge. Podloga je pripremljena prema uputama proizvođača, nakon čega je sterilizirana pri 121 °C tijekom 15 minuta, ohlađena (na 50 °C) i izlivena u Petrijeve zdjelice.

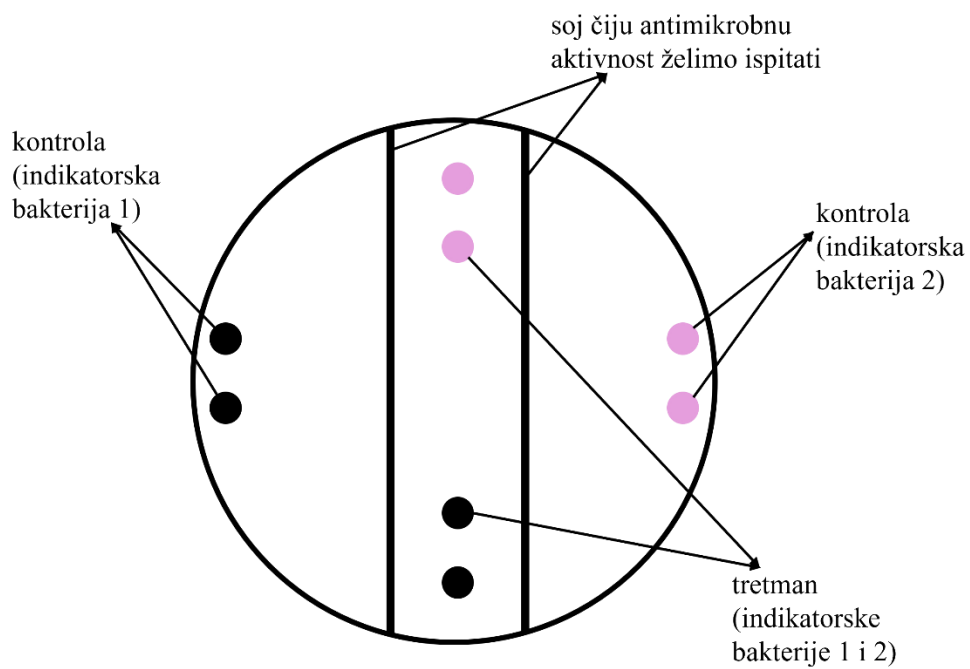
Za pripremu tekuće BHI (Brain Heart Infusion) podloge korištena je komercijalno dostupna, dehidrirana hranjiva podloga (Brain Heart Infusion broth; Biolife, Italija). Podloga je pripremljena prema uputama proizvođača, nakon čega je sterilizirana pri 121 °C tijekom 15 minuta te u potpunosti ohlađena prije korištenja.

Sojevi fruktofila iscrpljeni su do monokulture na krutoj PCA+F podlozi te inkubirani na 30 °C tijekom 48 h. Nakon inkubacije u sterilne tubice otpipetirano je po 1 ml tekuće FYP podloge i sterilno je ezom inokuliran dio pojedinačne kolonije odgovarajućeg soja. Tubice su inkubirane pri 30 °C i 150 rpm tijekom 48 h u orbitalnoj treskalici/inkubatoru („Orbital shaker – Inkubator ES-20; Biosan, Latvija).

Zatim je na sredinu krute PCA+F podloge sterilnim vatenim štapićem naciepljen odgovarajući soj, čiju se aktivnost ispituje, u dvije paralelne crte međusobno udaljene 2 cm. Ploče su inkubirane na 30 °C tijekom 24 h (do vidljivog rasta). Svaki soj ispitan je u dva ponavljanja.

Također, pripremljene su prekonoćne kulture indikatorskih bakterija na način da su kulture iscrpljene na krutoj BHI podlozi do monokulture i inkubiraju na 30 °C, aerobno. Nakon inkubacije u sterilne tubice otpipetirano je po 1 ml tekuće BHI podloge i sterilno je inokuliran dio pojedinačne kolonije odgovarajuće indikatorske bakterije. Tubice su inkubirane na 30 °C i 150 rpm tijekom 24 h.

Na ploče na kojima su narasli sojevi FBMK, naciepljeno je po 5 µl tekuće, prekonoćne indikatorske kulture. Na sredinu ploče između dvije paralelne crte naciepljena je indikatorska kultura u dva ponavljanja - tretman. Indikatorska kultura također je naciepljena uz rub ploče u dva ponavljanja - kontrola. Inokulirane ploče inkubirane su u uvjetima optimalnim za rast indikatorskih kultura (30 °C/24 h, aerobno).



Slika 20. Shematski prikaz načina ispitivanja antimikrobnog djelovanja FBMK

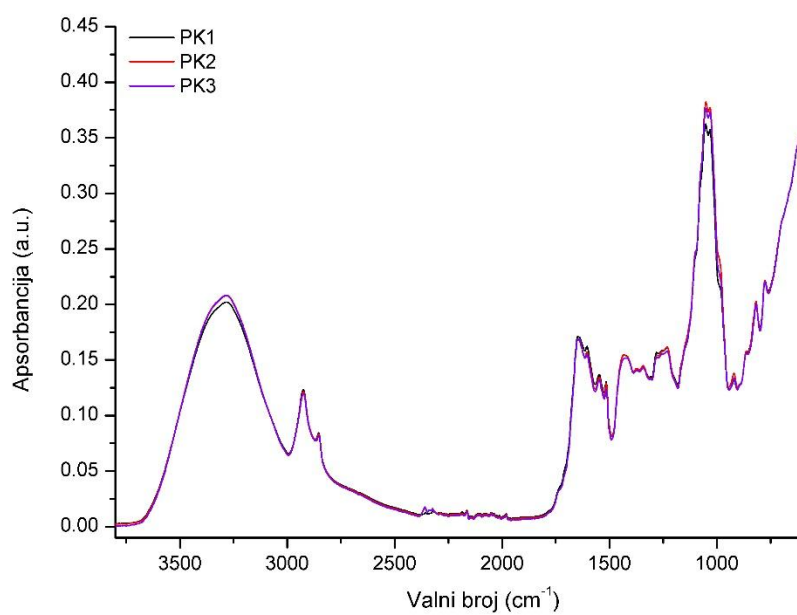
Nakon inkubacije, očitaju se rezultati, tj. izmjeri se promjer indikatorskih kolonija između crta (tretman) i promjer indikatorskih kolonija uz rub ploče (kontrola) u milimetrima.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Rezultati spektralne (FTIR-ATR) analize pčelinjeg kruha

Na Grafikonu 1. prikazani su srednji infracrveni (FTIR-ATR) spektri skupnih uzoraka pčelinjeg kruha PK1, PK2 i PK3 prikupljenih iz pokusnih zajednica (srednji spektri dobiveni su kao srednja vrijednost četiri IR spektara dobivenih snimanjem četiri alikvote istog uzorka). Rezultati kvalitativne spektralne analize prikupljenih uzoraka pčelinjeg kruha pokazali su slične integralne spektralne značajke analiziranih uzoraka s neznatnim razlikama u spektralnoj regiji između 3600 i 3000 cm^{-1} koja primarno pripada molekulskim vibracijama vode te u području „otiska prsta“ / *fingerprint* regiji (1800 – 700 cm^{-1}) u kojoj su najzastupljenije razlike vezane za šećernu frakciju pčelinjeg kruha, odnosno molekulske vibracije C–O skupina fruktoze, glukoze i saharoze na 1052, 1032 i 993 cm^{-1} (najviši intenziteti apsorpcijskih vrpca na ovim valnim brojevima ukazuju na najviši udio šećera u uzorku PK2). Spomenute neznatne spektralne razlike između analiziranih uzoraka). PK1, PK2 i PK3 ukazuju na sličan kemijski sastav prikupljenih uzoraka pčelinjeg kruha, što je bilo i očekivano s obzirom na to da su pokusne pčelinje zajednice bile smještene na istoj mikrolokaciji te se može pretpostaviti da su im na raspolaganju bili dostupni slični izvori peludi, odnosno da je pelud iz koje su nastali istraživani uzorci pčelinjeg kruha bila sličnog botaničkog podrijetla. Ipak, osim izvora peludi, na sastav pčelinjeg kruha svakao utječu i biokemijske promjene do kojih dolazi tijekom fermentacije pčelinje peludi u stanicama saća (transformacije u pčelinji kruh).

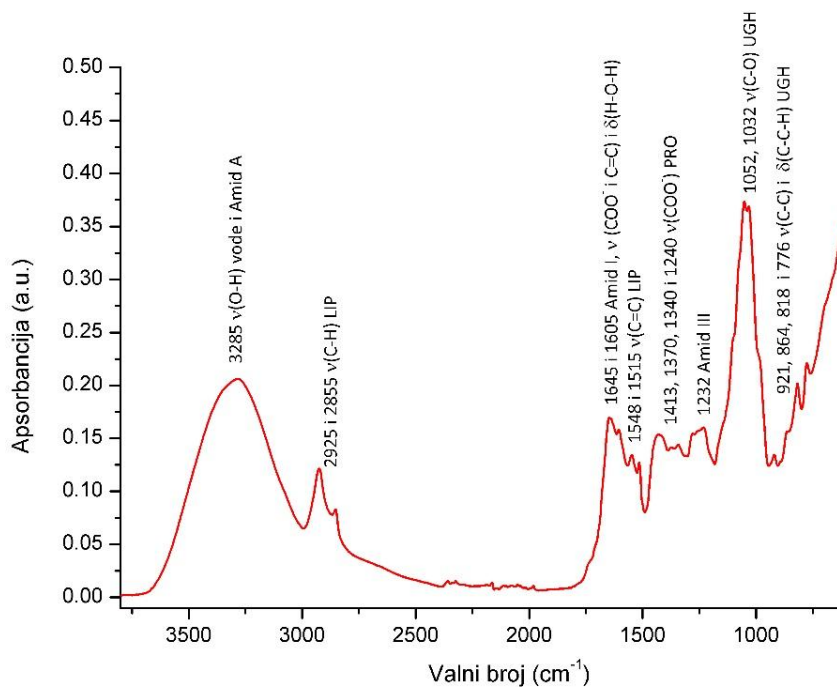
Kako bi razlike između uzoraka PK1, PK2 i PK3 bile detaljnije razjašnjene te kako bi se dobio uvid u ukupni kemijski sastav analiziranih uzoraka pčelinjeg kruha, provedena je interpretacija spektralnih podataka u vidu asignacije svih apsorpcijskih vrpca (IR signala) uočenih u IR spektrima pčelinjeg kruha, a navedeno je prikazano na Grafikonu 2.



Grafikon 1. FTIR-ATR spektri skupnih uzoraka pčelinjeg kruha (PK1, PK2, PK3) prikupljenih iz tri pokusne pčelinje zajednice (K1, K2, K3)

Na Grafikonu 2. prikazan je karakterističan FTIR-ATR spektar pčelinjeg kruha (prikazan kao srednji spektar uzoraka PK1, PK2 i PK3) s asignacijom apsorpcijskih vrpce odgovarajućim vibracijama funkcionalnih skupina molekula u pčelinjem kruhu koje odražavaju njegove glavne sastavnice. Asignacija je provedena koristeći spektralnu zbirku (Socrates, 2004.) i relevantnu srodnu znanstvenu literaturu (Svečnjak i sur., 2023.; Svečnjak i sur., 2017.; Prđun i sur., 2021.; Conte i sur., 2017.; Wang i sur., 2010.; Pielichowska i sur., 2008.; Kong, i Yu, 2007.; Max i Chapados, 2007.; Max i Chapados, 2001.).

Kako je vidljivo iz Grafikona 2. široka apsorpcijska vrpca u spektralnom području od 3600 cm^{-1} do 3000 cm^{-1} s apsorpcijskim maksimumom na 3285 cm^{-1} pripada isteznim vibracijama O–H skupine vode i djelomično vibracijama ugljikohidrata. U tom se području inače pojavljuje i apsorpcijska vrpca bjelančevina (Amid A vrpca), ali je preklopljena intenzivnijim vibracijama vode i ugljikohidrata. Apsorpcijska vrpca srednjeg intenziteta pri 2925 cm^{-1} i susjedna slabija vrpca na 2855 cm^{-1} , karakteristične su za asimetrične i simetrične istezne vibracije alifatskih C–H skupina lipida. Vrpce s apsorpcijskim maksimumom pri 1645 cm^{-1} i 1605 cm^{-1} uglavnom se pripisuje proteinskim strukturama Amida I, apsorpcijske vrpce koja se uglavnom sastoji od isteznih vibracija C=O i C–N skupina. Međutim, može se pripisati i molekulskim vibracijama funkcionalnih skupina vode (H–O–H deformacijska vibracija) i lipida (COO– i C=C istezne vibracije) koje se u tom spektralnom području međusobno preklapaju. IR signali na 1548 cm^{-1} i 1515 cm^{-1} povezuju se s isteznim vibracijama C=C skupina lipida. Vrpce s apsorpcijskim maksimumom na 1413 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} , 1340 cm^{-1} i 1240 cm^{-1} pripisane su isteznim vibracijama COO– skupina bočnih lanaca proteina. Na 1232 cm^{-1} smještena je Amid III apsorpcijska vrpca koja se sastoji od C–N isteznih vibracija (30 %), N – H deformacijskih vibracija (30 %), C – O isteznih vibracija (10 %) te C–O–C–N deformacijskih vibracija (10 %). Najintenzivnije apsorpcijske vrpce u IR spektru pčelinjeg kruha pojavljuju se u *fingerprint* regiji ($1800 - 700\text{ cm}^{-1}$), a najznačajnije su C–O istezne vibracije s apsorpcijskim maksimumom na 1052 cm^{-1} pripisane fruktozi, odnosno na 1032 cm^{-1} pripisane glukozi. Krajnji dio spektra obilježavaju četiri vrpce manjeg intenziteta apsorpcije. Vrpce uočene na 921 cm^{-1} i 846 cm^{-1} pripisane su C–C isteznim vibracijama monosaharida (glukoze i fruktoze), dok su vrpce uočene na 818 cm^{-1} i 776 cm^{-1} karakteristične za deformacijske C–C–H vibracije fruktoze.



* ν = ravninska istezna vibracija; δ = ravninska deformacijska vibracija; PRO = proteini; LIP = lipidi, UGH = ugljikohidrati

Grafikon 2. Karakterističan FTIR-ATR spektar pčelinjeg kruha (srednji spektar PK1 – PK3) s asignacijom pripadajućih molekulskih vibracija

Prema podacima iz dostupne znanstvene literature, FTIR-ATR spektroskopija je dosad uglavnom bila primijenjena za kemijsku karakterizaciju pčelinje peludi (Svečnjak i sur., 2023.; Prđun i sur., 2021.; Isopescu i sur., 2020.; Kasprzyk i sur., 2018.; Castiglioni i sur., 2019.; Anjos i sur., 2017.), dok je preliminarni prikaz IR spektra pčelinjeg kruha (komparativno s IR spektrom pčelinje peludi) prikazan samo u jednom recentnom istraživanju (Svečnjak i sur., 2023.).

Rezultati spektralne analize uzoraka (Grafikon 1. i 2.) pokazali su kako opći (integralni) spektralni profil analiziranih uzoraka pčelinjeg kruha odgovara onom iz preliminarne studije koju su objavili Svečnjak i sur. (2023.), no uočene su određene razlike u intenzitetu i položaju apsorpcijskih vrpca koje ukazuju na određene razlike u kemijskom sastavu istraživanih uzoraka u odnosu na uzorke iz spomenute publikacije. Navedeno se može povezati s drugačijim vremenskim periodom prikupljanja uzoraka pčelinjeg kruha i/ili drugačijim botaničkim podrijetlom pčelinje peludi kao sirovine iz koje je nastao istraživani pčelinji kruh.

Rezultati spektralne analize pokazali su kako uzorak pčelinjeg kruha PK2 sadrži najviši udio šećera (posebice fruktoze i glukoze), a kasnijim je mikrobiološkim analizama utvrđeno kako je korisna mikrobiota (fruktofilne bakterije mliječne kiseline) izolirana iz uzorka PK2 ujedno i najbrojnija prilikom prvotnog uzgoja na hranjivim podlogama.

4.2. Brojnost bakterija u pčelinjem kruhu

Nakon inkubacije ploča, na koje su nacijepljena razrjeđenja uzoraka pčelinjeg kruha, pobrojane su porasle kolonije te je izračunata CFU vrijednost (tablica 5).

Tablica 5. Brojnost bakterija (CFU/g) uzoraka pčelinjeg kruha na različitim hranjivim podlogama (vrijednosti prikazane kao prosjek±standardna devijacija, odnosno ukupan broj bakterija±standardna devijacija)

Košnica	Brojnost korisne mikrobiote			$\Sigma \pm sd$
	Lactobacillus spp. ^a (LamVab)	FBMK ^a (FMRS)	BMK ^a (MRS)	
K1 ^a	4.9E+03 ± 3.5E+02	7.6E+03 ± 9.2E+02	7.9E+03 ± 3.0E+03	4.1E+04 ± 2.0E+03
K2 ^b	1.9E+04 ± 4.9E+03	2.6E+04 ± 4.2E+03	3.4E+04 ± 1.3E+04	1.6E+05 ± 9.4E+03
K3 ^b	1.6E+04 ± 2.1E+03	2.2E+04 ± 8.5E+03	2.1E+04 ± 7.1E+02	1.2E+05 ± 5.0E03
$\Sigma \pm sd$	7.8E+04 ± 6.9E+03	1.1E+05 ± 9.7E+03	1.2E+05 ± 1.3E+04	

^{a-b} unutar iste kategorije označavaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$)

Može se primijetiti kako brojnost bakterija mliječne kiseline u uzorku pčelinjeg kruha ovisi o korištenim podlogama. Najmanji broj bakterija (laktobacila i BMK) je zabilježen na LamVab selektivnoj hranjivoj podlozi za uzgoj laktobacila, dok je na MRS podlogama koje služe za određivanje brojnosti BMK, detektiran najveći broj kolonija. Međutim, ove razlike nisu statistički opravdane ($p > 0,05$).

Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) evidentne su za brojnost BMK i laktobacila u pčelinjem kruhu dobivenog iz različitih pčelinjih zajednica bez obzira na korištene hranjive podloge. Ukupna brojnost BMK u uzorcima pčelinjeg kruha u zajednici K1 značajno je manja od brojnosti BMK u zajednicama K2 i K3. Između zajednice K2 i K3 nisu zabilježene značajne razlike.

4.3. Identifikacija bakterija MALDI-TOF metodom

Metodom MALDI-TOF, uspješno je identificirano 23 izolata. Svi izolati identificirani su kao vrsta *Apilactobacillus kunkeei*.

Ukupno 19 izolata identificirano je s visokom pouzdanošću, gdje se raspon vrijednosti rezultata kretao između 2,02 i 2,33. Četiri izolata identificirana su s niskom pouzdanošću, s rasponom vrijednosti rezultata 1,97 do 1,99.

Nakon dobivenih rezultata, dalje je provedena ekstrakcija DNA i genotipizacija metodom rep-PCR.

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
<u>A4</u> (+++)(A)	A4 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.06
<u>B2</u> (+++)(A)	B2 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.16
<u>B7</u> (+++)(A)	B7 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.21
<u>C3</u> (+++)(A)	C3 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.25
<u>C4</u> (+++)(A)	C4 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.23
<u>C5</u> (+++)(A)	C5 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.32
<u>C6</u> (+++)(A)	C6 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.12
<u>A8</u> (+++)(A)	A8 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.15
<u>C1</u> (+++)(A)	C1 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.18
<u>C2</u> (+++)(A)	C2 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.22
<u>C3</u> (+++)(A)	C3 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.33
<u>C4</u> (+++)(A)	C4 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.21
<u>D9</u> (+++)(A)	D9 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.15
<u>F10</u> (+)(B)	F10 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	1.99
<u>A4</u> (+++)(A)	A4 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.06
<u>A7</u> (+++)(A)	A7 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.07
<u>C5</u> (+++)(A)	C5 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.13
<u>C6</u> (+++)(A)	C6 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.05
<u>C7</u> (+)(B)	C7 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	1.97
<u>C8</u> (+++)(A)	C8 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.17
<u>E5</u> (+)(B)	E5 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	1.98
<u>E6</u> (+++)(A)	E6 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	2.08
<u>F2</u> (+)(B)	F2 (Standard)	Apilactobacillus kunkeei	1.99

Meaning of Score Values

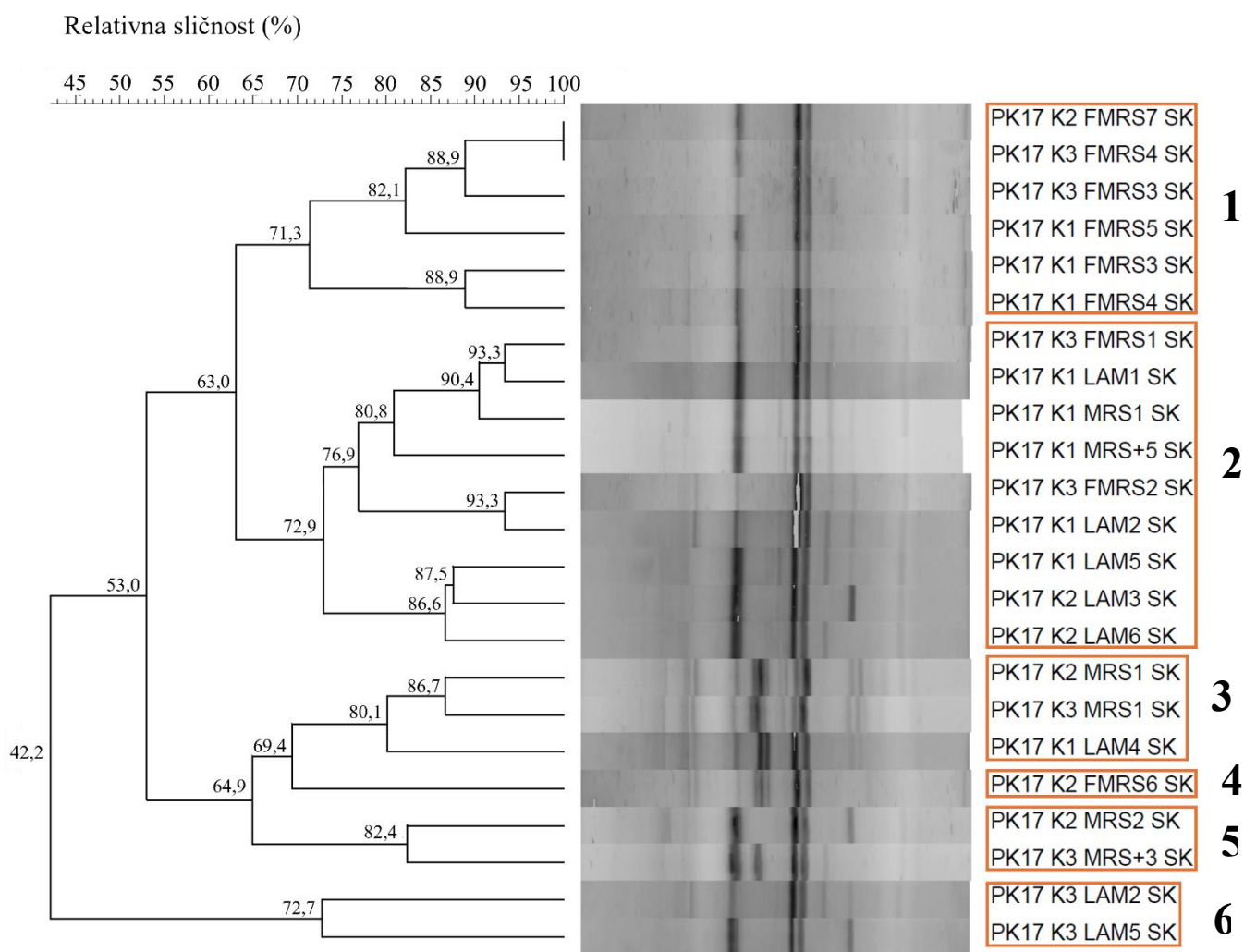
Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Slika 21. Rezultati identifikacije bakterija MALDI-TOF metodom do razine vrste

4.4. Rep-PCR analiza izolata

Rep-PCR analizom dobiveni su obrasci koji su analizirani BioNumerics programom (Slika 22). Iako je u pčelinjem kruhu identificirana samo jedna vrsta, ona pokazuje značajnu unutarvrstu varijabilnost te općenito, relativna sličnost između sojeva varira između 42,2 % i 100 %.

S obzirom na dobivene rep-PCR obrasce i na temelju sličnosti ≥ 70 % koja je uzeta kao relevantna granična vrijednost (eng. cutoff), izolati se mogu grupirati u šest skupina (klastera). Pet skupina sadržava više od jednog izolata i jedna skupina sadrži samo jedan izolat (PK17 K2 FMRS6 SK). Klasteri 5 i 6 sadrže po dva soja (skupina 5 – 82,4 % sličnosti; skupina 6 – 72,7 % sličnosti), klaster 3 sadrži tri soja (skupina 3 – 80,1 % sličnosti) te su prisutna dva velika klastera, jedan sa šest sojeva (skupina 1 – 71,3 % sličnosti) te jedna skupina s devet sojeva (skupina 2 – 72,9 % sličnosti). Kako bi se ispitala korisna svojstva što većeg broja izolata, u daljnje analize su uključeni svi izolati osim izolata koji pripadaju u skupinu 1, a koji pokazuju potpuno identične obrasce (100 % sličnost). Stoga je za daljnu biotehnološku karakterizaciju FBMK korišten samo jedan predstavnik ova dva izolata i to soj PK17 K3 FMRS 4 (Tablica 6).



Slika 22. Dendrogram sojeva *Apilactobacillus kunkeei* konstruiran na temelju rep-PCR
obrazaca dobivenih s početnicom GTG5

Tablica 6. Izabrani izolati nakon rep-PCR analize (n=22)

Soj	Oznaka izolata	Vrsta
1	PK17_K1_FMRS_5	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
2	PK17_K3_FMRS_1	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
3	PK17_K3_LAM_2	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
4	PK17_K3_FMRS_3	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
5	PK17_K3_LAM_5	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
6	PK17_K3_FMRS_4	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
7	PK17_K3_MRS+_3	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
8	PK17_K3_FMRS_2	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
9	PK17_K2_MRS_1	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
10	PK17_K2_LAM_6	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
11	PK17_K2_MRS_2	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
12	PK17_K2_LAM_3	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
13	PK17_K1_MRS+_5	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
14	PK17_K1_LAM_1	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
15	PK17_K1_MRS_1	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
16	PK17_K1_LAM_2	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
17	PK17_K3_MRS_1	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
18	PK17_K1_LAM_4	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
19	PK17_K2_FMRS_6	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
20	PK17_K1_LAM_5	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
21	PK17_K1_FMRS_3	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
22	PK17_K1_FMRS_4	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>

4.5. Antibiotička rezistencija fruktofilnih sojeva BMK

Budući da je analiza obrazaca antibiotičke rezistencije nužna kod selekcije sojeva za biotehnološku primjenu, a istovremeno ova analiza daje podatke o pojavnosti antibiotičke rezistencije među bakterijama u okolišu, svi izolati dobiveni iz pčelinjeg kruha podvrgnuti su ovoj analizi koja je provedena prema CLSI standardu (2016.). S obzirom na izmjerene promjere inhibicijskih zona, svi sojevi su rezistentni na vankomicin (VA-5). Niti jedan soj nije rezistentan na kloramfenikol (C-30), ampicilin (AM-10), tetraciklin (TE-30), gentamicin (GM-10), klindamicin (CC-2), eritromicin (E-15) i streptomycin (S-300). Tri soja (1, 13 i 14) nisu rezistentna na kanamicin (K-30) dok su ostali sojevi (2, 3, 4, 10, 11, 15, 18, 19 i 21) umjereno osjetljivi ili rezistentni na kanamicin.



Slika 23. Rast FBMK soja 16 na Petrijevim pločama s antibiotičkim diskovima. Vidljive zone inhibicije rasta izmjerene su kao promjer (označeno sterlicom).

Kako navode Vergalito i sur. (2020.) antibiotička rezistencija kodirana je jednim stabilnim genom u kromosomu *A. kunkeei*, te su svi sojevi koje su ispitali, rezistentni na ampicilin i kloramfenikol. Uz to, Olmos i sur. (2014.) pronašli su gen za rezistentnost na kloramfenikol kod *A. kunkeei*. Rezistentnost na ampicilin i kloramfenikol nije potvrđena u tom istraživanju. BMK, u koje spada i *A. kunkeei*, intrinzično su rezistentne na vankomicin i kanamicin (Usta i sur., 2025.; Campedelli i sur., 2018; Gueimonde i sur., 2013.). Ovim istraživanjem je potvrđena rezistentnost sojeva na vankomicin (100 %). Međutim, nisu svi sojevi pokazali rezistentnost na kanamicin, što ipak ukazuje na određene varijabilnosti u genomu BMK i FBMK, odnosno *A. kunkeei*.

Tablica 7. Promjer zona inhibicije rasta sojeva *A. kunkei* uključujući i promjer diska s antibiotikom prikazan u milimetrima (mm)

Soj	Antibiotik s pripadajućim koncentracijama								
	C-30	AM-10	TE-30	VA-5	GM-10	K-30	CC-2	E-15	S-300
1	44	54	30	0	24	25	46	50	39
2	40	48	30	0	22	17	44	46	33
3	44	46	32	0	19	16	44	46	32
4	42	44	28	0	20	14	44	44	31
5	40	44	28	0	20	13	42	44	30
6	44	48	30	0	20	11	44	44	29
7	40	44	26	0	19	13	38	40	28
8	40	42	22	0	17	10	38	42	29
9	38	474	24	0	18	12	39	42	29
10	42	46	28	0	20	14	43	46	32
11	28	46	26	0	20	14	42	43	31
12	40	48	26	0	18	12	42	44	28
13	36	44	28	0	20	20	40	44	32
14	38	44	28	0	20	18	40	45	34
15	40	48	26	0	20	14	44	46	31
16	36	38	24	0	16	10	36	38	29
17	36	40	28	0	20	12	32	38	20
18	40	42	22	0	20	15	40	43	32
19	42	52	28	0	22	15	43	44	35
20	40	44	24	0	20	12	43	43	31
21	40	44	26	0	21	14	43	45	31
22	42	48	30	0	20	13	44	44	31

Tablica 8. Interpretacija dobivenih rezultata rezistencije na antibiotike sojeva *A. kunkeei* na temelju izmjerenih promjera zona inhibicije rasta (CLSI, 2016.)

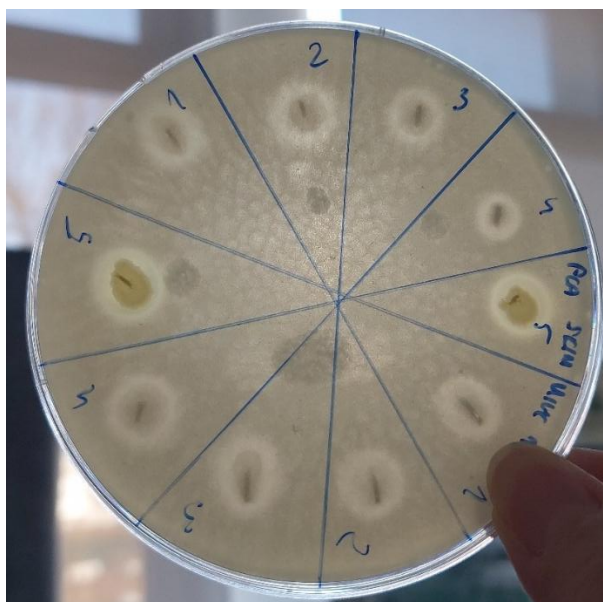
Soj	Antibiotik s pripadajućim koncentracijama								
	C-30	AM-10	TE-30	VA-5	GM-10	K-30	CC-2	E-15	S-300
1	O	O	O	R	O	S	O	O	O
2	O	O	O	R	O	UO	O	O	O
3	O	O	O	R	O	UO	O	O	O
4	O	O	O	R	O	UO	O	O	O
5	O	O	O	R	O	R	O	O	O
6	O	O	O	R	O	R	O	O	O
7	O	O	O	R	O	R	O	O	O
8	O	O	O	R	O	R	O	O	O
9	O	O	O	R	O	R	O	O	O
10	O	O	O	R	O	UO	O	O	O
11	O	O	O	R	O	UO	O	O	O
12	O	O	O	R	O	R	O	O	O
13	O	O	O	R	O	S	O	O	O
14	O	O	O	R	O	S	O	O	O
15	O	O	O	R	O	UO	O	O	O
16	O	O	O	R	O	R	O	O	O
17	O	O	O	R	O	R	O	O	O
18	O	O	O	R	O	UO	O	O	O
19	O	O	O	R	O	UO	O	O	O
20	O	O	O	R	O	R	O	O	O
21	O	O	O	R	O	UO	O	O	O
22	O	O	O	R	O	R	O	O	O

Legenda:

UO umjereno osjetljiv R rezistentan O osjetljiv

4.6. Enzimatska aktivnost fruktofilnih sojeva BMK

Kako bi se utvrdila uloga bakterija u različitim ekosustavima, ali i njihov potencijal u biotehnološkim procesima, nužno je provesti analizu enzimatske aktivnosti bakterijskih izolata. Enzimatska aktivnost sojeva očituje se kao prozirna zona oko mjesta inokulacije tekuće kulture ispitivanog soja na specifičnoj hranjivoj podlozi. Ispitana je proteolitička, celulolitička, amilazna, lakazna, β -galaktozidazna i lipolitička aktivnost svih reprezentativnih sojeva *A. kunkeei*. Uočen je isti obrazac aktivnosti za sve sojeve. Svi sojevi pokazuju značajnu proteolitičku aktivnost (Slika 24.) dok ostale enzimatske aktivnosti nisu detektirane ni za jedan od testiranih sojeva.



Slika 24. Proteolitička aktivnost sojeva *A. kunkeei* (n=4) na hranjivoj podlozi s obranim mlijekom. Prozirne zone oko mjesta inokulacije u podlogu pokazatelj su aktivnosti. Izolat broj 5 = pozitivna kontrola (*Pseudomonas* sp. W2-8).

Budući da su proteini glavna komponenta peludi (Thakur i Nanda, 2020.), ne iznenađuje zabilježena proteolitička aktivnost sojeva *A. kunkeei*. Međutim, u istraživanju Vergalito i sur. (2020.) također je dokazana β -galaktozidazna aktivnost vrste *A. kunkeei* koja je izostala za sojeve u ovom radu. Također je izostala celulolitička aktivnost, što donekle iznenađuje, budući da je intina (unutarnja stijenka) pčelinje peludi građena od velikog postotka celuloze i pektina (Barene i sur., 2015.). Međutim, unutar mikrobioma pčelinje peludi i kruha nalazi se velik broj različitih vrsta i sojeva, te je pretpostavka da neki od njih imaju razvijene metaboličke putove

uključene u razgradnju različitih kompleksnih spojeva prisutnih u pčelinjoj peludi, a koji nisu prisutni (osim proteolize) kod sojeva analiziranih u ovom radu. Sojevi isto tako nisu pokazali ni amilaznu ni lipolitičku aktivnost. Budući da su istraživanja mikrobioma pčelinjeg kruha nedostatna, ne postoje literaturni navodi o enzimatskoj aktivnosti vrste *A. kunkeei* (osim za već spomenutu β -galaktozidaznu aktivnost), a kako bi se mogli usporediti dobiveni rezultati analiza.

Tablica 9. Rezultati ispitavanja enzimatske aktivnosti fruktofilnih sojeva *A. kunkeei* (n=22)

Soj	Proteolitička aktivnost	Celulolitička aktivnost	Amilazna aktivnost	Lakazna aktivnost	β -galaktozidazna aktivnost	Lipolitička aktivnost
1	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-
8	+	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	-
16	+	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-
18	+	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-
20	+	-	-	-	-	-
21	+	-	-	-	-	-
22	+	-	-	-	-	-
PK	+	-	-	-	-	+

4.7. Antibakterijsko djelovanje fruktofilnih sojeva na odabrane patogene sojeve

Svi sojevi *A. kunkeei* (n=22), izolirani i selektirani u ovom istraživanju, pokazali su značajno inhibitorno djelovanje na sve patogene bakterije (*Salmonella enterica* DSM 14221, *Escherichia coli* DSM 682, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Staphylococcus aureus* DSM 20231). Zabilježena je potpuna inhibicija rasta bakterija *S. enterica* i *S. aureus* nakon aplikacije svakog od 22 soja *A. kunkeei*. Svi sojevi pokazali su jako inhibitorno djelovanje prema patogenoj bakteriji *E. coli* (DSM 682), dok je jedan soj potpuno inhibirao ovu bakteriju (soj 10). Šest sojeva (3, 4, 7, 17, 18 i 19) pokazalo je jako inhibitorno djelovanje prema bakteriji *L. innocua*, dok su ju ostali sojevi u potpunosti inhibirali.

Istraživanja koja se bave antimikrobnim (inhibitornim) djelovanjem vrste *A. kunkeei* prema patogenim mikroorganizmima su vrlo oskudna (Usta i sur., 2025.; Vergalito i sur., 2020.), što nije iznenađujuće s obzirom da su istraživanja mikrobioma pčelinjeg kruha započela relativno nedavno i većinom se istražuje djelotvornost ukupnog uzorka (potpoglavlje 2.1.3.).

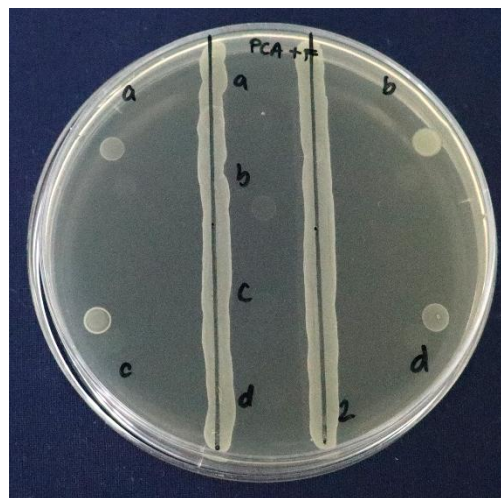
Rezultati ovog istraživanja nisu potvrdili nedostatak antimikrobne aktivnosti sojeva *A. kunkeei* na patogene bakterije kao što je to bio slučaj u istraživanju Vergalita i sur. (2020.) te Uste i sur. (2025.), u kojima su sojevi pokazali slabije inhibitorno djelovanje (potpoglavlje 2.1.2.3.).

Rezultati koje su pokazali sojevi *A. kunkeei* izolirani iz uzoraka pčelinjeg kruha iz pokusnih zajednica K1, K2 i K3 su zbilja impresivni jer pokazuju potpunu inhibiciju prema potencijalnim patogenim bakterijama, uz izuzetak *E. coli*, te se može zaključiti da općenito snažnije inhibiraju Gram-pozitivne bakterije.

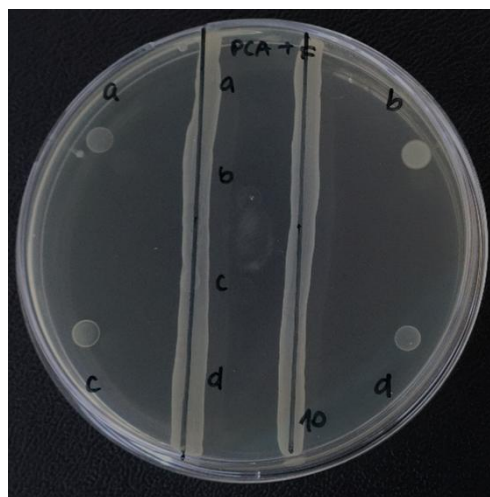
Nekoliko je dokazanih mehanizama antimikrobnog djelovanja bakterija mliječne kiseline. Kao i ostale FBMK, *A. kunkeei* fermentiraju fruktozu iz podloge, a pritom proizvode veće količine laktata, čime utječu na pH podloge i samim time stvaraju nepovoljnije uvjete za rast patogenih bakterija (Endo i sur., 2018.; Gillor i sur., 2008). Uz to, BMK su poznate po proizvodnji bakteriocina, koji inhibiraju rast patogenih bakterija (Darbandi i sur., 2021.; Dobson i sur., 2011.; de Vuyst i Vandamme, 1994.), primjerice kuncecin A izoliran iz *A. kunkeei* inhibirao je rast *E. coli* u istraživanju koje su proveli Zendo i sur. (2020.).

Rezultati istraživanja antibakterijskog djelovanja u ovom radu upućuju na to da je pčelinji kruh odličan izvor korisnih bakterija koje imaju potencijal inhibicije rasta patogenih

mikroorganizma. S obzirom da ovo područje nije još istraženo, ovo je jedan od prvih radova u kojem je evidentirana impresivna antimikrobna aktivnost mikrobiote pčelinjeg kruha.



Slika 25. Antibakterijsko djelovanje *A. kunkei* soja 2 na patogene bakterije. Tretmani patogenih bakterija a, c i d nisu vidljivi (potpuna inhibicija), tretman patogena b izgleda kao osušena kapljica inokuluma (jaka inhibicija); kontrole svih patogenih bakterija dobro rastu, jasno vidljive



Slika 26. Antibakterijsko djelovanje *A. kunkei* soja 10 na patogene bakterije. Tretmani patogenih bakterija nisu vidljivi (potpuna inhibicija); kontrole svih patogenih bakterija dobro rastu, jasno vidljive

Tablica 10. Rezultati antibakterijskog djelovanja fruktofilnih sojeva *A. kunkeei* (n=22) na patogene bakterije (n=4).

Soj <i>A. kunkeei</i>	Patogena bakterija			
	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	p.i.	+++	p.i.	p.i.
2	p.i.	+++	p.i.	p.i.
3	p.i.	+++	+++	p.i.
4	p.i.	+++	+++	p.i.
5	p.i.	+++	p.i.	p.i.
6	p.i.	+++	p.i.	p.i.
7	p.i.	+++	+++	p.i.
8	p.i.	+++	p.i.	p.i.
9	p.i.	+++	p.i.	p.i.
10	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.
11	p.i.	+++	p.i.	p.i.
12	p.i.	+++	p.i.	p.i.
13	p.i.	+++	p.i.	p.i.
14	p.i.	+++	p.i.	p.i.
15	p.i.	+++	p.i.	p.i.
16	p.i.	+++	p.i.	p.i.
17	p.i.	+++	+++	p.i.
18	p.i.	+++	+++	p.i.
19	p.i.	+++	+++	p.i.
20	p.i.	+++	p.i.	p.i.
21	p.i.	+++	p.i.	p.i.
22	p.i.	+++	p.i.	p.i.

p.i. = potpuna inhibicija, +++ = vrlo jaka inhibicija, ++ = jaka inhibicija, + = slaba inhibicija

5. Zaključak

Pčelinji kruh je proizvod medonosnih pčela (*A. mellifera* L.) koji nastaje procesom fermentacije pčelinje peludi u stanicama saća, a ima iznimno važnu ulogu u pčelinjoj zajednici jer predstavlja glavni izvor proteina, lipida, vitamina i minerala. Većina pčelinjih proizvoda već je vrlo dobro istraжена, međutim istraživanje pčelinjeg kruha započelo je tek nedavno. Upravo iz tog razloga, ovim istraživanjem provedena je analiza spektralnog profila pčelinjeg kruha metodom FTIR-ATR spektroskopije te su iz uzoraka pčelinjeg kruha izolirani korisni mikroorganizmi s ciljem njihovog detaljnog biotehnološkog proučavanja, što je uključivalo izolaciju, genotipizaciju i identifikaciju korisne mikrobiote te određivanje antibiotske rezistencije, enzimatske aktivnosti i antimikrobnog djelovanja na patogene bakterije (*S. enterica*, *E. coli*, *L. innocua*, *S. aureus*).

Rezultati spektralne (FTIR-ATR) analize pokazali su jedinstvene spektralne profile istraжivanih uzoraka pčelinjeg kruha, a provedena asignacija apsorpcijskih vrpca, uočenih u IR spektrima, dala je uvid u glavne sastavnice analiziranih uzoraka (vode, ugljikohidrata, lipida i proteina). Spektralni profili uzoraka ukazali su na sličan kemijski sastav, što se može povezati sa sličnim botaničkim podrijetlom peludi. Najviši udio šećera utvrđen je u uzorku PK2 te je kasnijom mikrobiološkom analizom utvrđena i najveća brojnost (CFU/g) korisne mikrobiote u tom uzorku na svim podlogama, u odnosu na druge uzroke.

Brojnost bakterija mliječne kiseline u uzorku pčelinjeg kruha također je ovisila o tome koja je podloga korištena za njihovu izolaciju. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) utvrđene su za brojnost bakterija mliječne kiseline (BMK) i laktobacila u pčelinjem kruhu iz različitih pčelinjih zajednica, bez obzira na korištene hranjive podloge. Ukupna brojnost BMK u uzorcima pčelinjeg kruha u zajednici K1 ($4.1E+04 \pm 2.0E+03$ CFU/g) značajno je manja od brojnosti BMK u zajednicama K2 ($1.6E+05 \pm 9.4E+03$ CFU/g) i K3 ($1.2E+05 \pm 5.0E+03$ CFU/g), dok između zajednica K2 i K3 nisu zabilježene značajne razlike.

MALDI-TOF metodom uspješno je identificirano 23 izolata kao vrsta *Apilactobacillus kunkeei* koja pripada skupini fruktofilnih BMK, te je ukupno 19 izolata izolirano s visokom pouzdanosti. Rep-PCR metoda korištena je kako bi se izolati identificirali do razine soja te su nakon analize dobivenih obrazaca, izolati podijeljeni u šest klastera na temelju sličnosti ≥ 70

%. Samo dva soja pokazala su 100 %-tnu sličnost, što znači da je varijabilnost unutar vrste značajna. Općenito, relativna sličnost između sojeva varira između 42,2 % i 100 %.

BMK, u koje spada i *A. kunkeei*, intrinzično su rezistentne na vankomicin i kanamicin. Ovim istraživanjem je potvrđena rezistentnost sojeva na vankomicin (100 %). Međutim, nisu svi sojevi pokazali rezistentnost na kanamicin, što ipak ukazuje na određene varijabilnosti u genomu BMK i FBMK, odnosno *A. kunkeei*. Zabilježena je proteolitička enzimatska aktivnost sojeva *A. kunkeei*, međutim izostale su lipolitička, β -galaktozidazna, lakazna, amilazna i celulolitička aktivnost. Sojevi *A. kunkeei* inhibitorno su djelovali na sve patogene (*S. enterica*, *E. coli*, *L. innocua*, *S. aureus*) te su pokazali jaču antimikrobnu aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama (*L. innocua*, *S. aureus*). *A. kunkeei* soj 10 jedini je u potpunosti inhibirao sve patogene bakterije.

S obzirom na dobivene vrijednosti biotehnološke karakterizacije sojeva korisne mikrobiote pčelinjeg kruha, može se reći kako pčelinji kruh predstavlja izvor korisnih bakterija koje bi mogle pronaći primjenu u farmaceutskoj i/ili prehrambenoj industriji. Budući da ovo područje nije dovoljno istraženo, ovo je jedan od prvih radova u kojem je evidentirana impresivna antimikrobna aktivnost mikrobiote pčelinjeg kruha.

6. Zahvale

Zahvaljujem se mentoricama izv. prof. dr. sc. Lidiji Svečnjak i prof. dr. sc. Mirni Mrkonjić Fuka na pruženoj prilici za stjecanje novih znanja i vještina kao i neizmjernoj pomoći prilikom izrade ovog rada pružanjem materijala, savjetima i kritikama.

Hvala asistentici Valentini Odorčić, mag. ing. agr., koja mi je pomogla u laboratorijskom dijelu istraživanja i pružala savjete za pisanje. Hvala joj i na moralnoj podršci.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Lidiji Svečnjak, voditeljici projekta u okviru kojeg je izrađen ovaj rad, na pruženoj prilici za sudjelovanje, učenje i usavršavanje.

Hvala Agenciji za plaćanje u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju što je omogućila sredstva za ovo istraživanje u sklopu projekta „Kemijsko, molekularno i antimikrobno profiliranje pčelinje peludi, pčelinjeg kruha i propolisa (Bee-PROfiling)“.

Također, htjela bih se zahvaliti svojoj obitelji koja mi je podrška od prvog dana.

7. Popis literature

1. Abatcha M. G., Goni M. D., Abbas M. A., Jalo I. M., Mohammed G. (2020.) A review of *Listeria* and *Salmonella*: An Update on Description, Characteristics, Incidence, and Antibiotic Susceptibility. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 8(11);1232-1249
2. Ahmed E., Holmström S.J. (2014.) Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*. 7(3);196-208.
3. Alenazy R. (2022.) Antibiotic resistance in *Salmonella*: Targeting multidrug resistance by understanding efflux pumps, regulators and the inhibitors. *Journal of King Saud University – Science*. 34.
4. Amador G.J., Matherne M., Waller D., Mathews M., Gorb S.N., Hu D.L. (2017.) Honey bee hairs and pollenkitt are essential for pollen capture and removal. *Bioinspiration & Biomimetics*. 12(2);026015.
5. Anderson K. E., Carroll M. J., Sheehan T., Mott B. M., Maes P., Corby-Harris V. (2014.) Hive-stored pollen of honey bees: many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Molecular Ecology*. 23(23);5904-5917
6. Anjos O., Santos A., Dias T., Estevinho L. (2017.) Application of FTIR-ATR spectroscopy on the bee pollen characterization. *Journal of Apicultural Research*. 56(3);210-218.
7. Aylanc V., Falcão S., Ertosun S., Vilas-Boas M. (2021.) From the hive to the table: Nutrition value, digestibility and bioavailability of the dietary phytochemicals present in the bee pollen and bee bread. *Trends in Food Science & Technology*. 109.
8. Bakour M., Fernandes Â., Barros L., Sokovic M., Ferreira I.C.F.R., Badiia L. (2019.) Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties. *LWT*. 109;276–282.
9. Bakour M., Laaroussi H., Ousaid D., El Ghouizi A., Es-Safi I., Mechchate H., Lyoussi B. (2022). Bee Bread as a Promising Source of Bioactive Molecules and Functional Properties: An Up-To-Date Review. *Antibiotics* 11(2);203.
10. Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S.K. (2016.) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 6(2);71-79.

11. Baran I., Aksu N. (2016.) Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Turkey. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 15;20
12. Barene I., Daberte I., Siksna S. (2015.) Investigation of bee bread and development of its dosage forms. *Medicinos*. 21(1);16-22
13. BioNumerics. (1992.) Universal software for microbiology applications. Version 1.2.16.1. Applied Maths, Belgija.
14. Bogdanov S. (2016.) Pollen: Collection, Harvest, Composition, Quality. *Bee Product Science. The Pollen Book*, Chapter 1.
15. Calderaro A., Chezzi C. (2024.) MALDI-TOF MS: A Reliable Tool in the Real Life of the Clinical Microbiology Laboratory. *Microorganisms*. 12(2);322.
16. Campedelli I., Mathur H., Salvetti E., Clarke S., Rea M.C., Torriani S., Ross R.P., Hill C., O'Toole P.W. (2018.) Genus-Wide Assessment of Antibiotic Resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied Environmental Microbiology*. 85(1);e01738-18.
17. Campos M., Anjos O., Chica M., Campoy P., Nôžková J., Almaraz-Abarca N., Barreto L., Nordi J., Estevinho L., Pascoal A., Paula V., Choupina A., Dias L., Tesic Z., Mosić M., Kostić A., Pešić M., Milojković-Opsenica D., Sickel W., Carreck N. (2021). Standard methods for pollen research. *Journal of Apicultural Research*. 60;1-109.
18. Cancelli M. J., Santos T. A., Miguel E. M., Moreira G. D. M., Sobral D., de Almeida F. A. (2024.) Lactic acid bacteria as probiotics, food bio-preservatives and producers of bacteriocins: a review. *Journal of Candido Tostes Dairy Institute*. 79(1);37-47.
19. Castiglioni S.; Astolfi, P.; Conti, C.; Monaci, E.; Stefano, M.; Carloni, P. (2019.) Morphological, Physicochemical and FTIR Spectroscopic Properties of Bee Pollen Loads from Different Botanical Origin. *Molecules*. 24;3974.
20. Castro-Vargas R. E., Herrera-Sánchez M. P., Rodríguez-Hernández R., Rondón-Barragán I. S. (2020.) Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: A global overview. *Veterinary World*. 13(10);2070-2084
21. Cebeci A., Kirmusaoglu S. (2020.) Introductory Chapter: An Overview of the Genus *Staphylococcus* and *Streptococcus*.
22. Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M. (2013.) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology*. 26(3);547-603

23. CLSI (prethodno NCCLS). (1999.) Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. NCCLS document M26-A; 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA
24. CLSI. (2012.) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 32(1)
25. CLSI. (2016.) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 36(1)
26. Conte G., Benelli G., Serra A., Signorini F., Bientinesi M., Nicoletta C., Mele M., Canale, A. (2017.) Lipid Characterization of Chestnut and Willow Honeybee-Collected Pollen: Impact of Freeze-Drying and Microwave-Assisted Drying. *Journal of Food Composition and Analysis*. 55;12–19.
27. Darbandi A., Asadi A., Ari M. M., Ohadi E., Talebi M., Zadeh M. H., Emamie A. D., Ghanavati R., Kakanj M. (2021.) Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 36(1);e24093.
28. De Vuyst L, Vandamme E. (1994.) Bacteriocins of lactic acid bacteria. Scotland: Blackie Academic & Professional, 320-539.
29. Dekker J., Frank K. (2016.) Salmonella, Shigella and Yersinia. *Clin Lab Med*. 35(2);225-246
30. Didaras, N.A., Kafantaris, I., Dimitriou, T.G., Mitsagga, C., Karatasou, K., Giavasis, I., Stagos, D., Amoutzias, G.D., Hatjina, F., Mossialos, D., 2021. Biological Properties of Bee Bread Collected from Apiaries Located across Greece. *Antibiotics* 10(5);555.
31. Dobson A., Cotter P. D., Ross R. P., Hill C. (2012.) Bacteriocin Production: a Probiotic Trait?. *Applied and Environmental Microbiology* 78:1-6.
32. Domig K. J., Kiss H., Petricevic L., Viernstein H., Unger F., Kneifel W. (2014). Strategies for the evaluation and selection of potential vaginal probiotics from human sources: an exemplary study. *Beneficial Microbes* 5(3);263–272.
33. Dufailu O. A., Yaqub M. O., Owusu-Kwarteng J., Addy F. (2021.) Prevalence and characteristics of *Listeria* species from selected African countries. *Tropical Diseases. Travel Medicine and Vaccines*. 7;26

34. Edwards C. G., Haag K. M., Collins M. D., Hutson R. A., Huang Y. C. (1998.) *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organism associated with grape juice fermentations. *Journal of Applied Microbiology*. 84;698-702.
35. Elsayed N., El-Din H.S., Altemimi A.B., Ahmed H.Y., Pratap-Singh A., Abdelmaksoud T.G., (2021.) In Vitro Antimicrobial, Antioxidant and Anticancer Activities of Egyptian Citrus Beebread. *Molecules*. 26(9);2433.
36. Endo A. (2012.) Fructophilic lactic acid bacteria inhabit fructose-rich niches in nature. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 23.
37. Endo A., Futagawa-Endo Y., Dicks L. M. (2009.) Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. *Syst Appl Microbiol*. 32;593–600.
38. Endo A., Maeno S., Tanizawa Y., Kneifel W., Arita M., Dicks L., Salminen S. (2018.) Fructophilic Lactic Acid Bacteria, a Unique Group of Fructose Fermenting Microbes. *Applied and Environmental Microbiology*. 84(19)
39. Endo A., Okada S. (2008.). Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58;2195-2205.
40. Endo A., Salminen S. (2013.) Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. 36(6);444-8.
41. FAO/WHO. (2001.) Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food. Córdoba, Argentina Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organisation pp 1–34
42. Filannino P., Di Cagno R., Gobbetti M. (2018.). Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. *Current Opinion in Biotechnology*. 49;64-72
43. Giampieri F., Quiles J. L., Cianciosi D., Forbes-Hernández T. Y., Orantes-Bermejo F. J., Alvarez-Suarez J. M., Battino M. (2022.) Bee Products: An Emblematic Example of Underutilized Sources of Bioactive Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 70;6833-6848
44. Giannella RA. (1996.) Salmonella. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. Chapter 21.

45. Gilliam M. (1979.) Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie*. 10(1);43-53
46. Gilliam, M., Prest, D. B., & Lorenz, B. J. (1989). Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. *Apidologie*. 20;53-68.
47. Gillor O., Etzion A., Riley M. A. (2008.) The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81;591-606.
48. GOTTSCHALK, G. (1979.) *Bacterial Metabolism*. -- Springer, New York.
49. Gueimonde M., Sánchez B., G de Los Reyes-Gavilán C., Margolles A. (2013.) Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 4;202.
50. Haydak M. H. (1970). *Honey Bee Nutrition*. 15th ed. St. Paul, Minnesota: University of Minnesota. 143 – 156.
51. Herbert E. W. Jr., Shimanuki H. (1978.) Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie*. 9(1);33-40
52. Hudzicki J. (2009.) Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology.
53. Hung, Keng-Lou James, Kingston, Jennifer M., Albrecht, Matthias, Holway, David A. Kohn, Joshua R. (2018). The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings, Biological Sciences*. 285(1870);20172140.
54. Ilie C.-I., Spoiala A., Geana E.-I., Chircov C., Ficai A., Ditu L.-M., Oprea E. (2024). Bee Bread: A Promising Source of Bioactive Compounds with Antioxidant Properties—First Report on Some Antimicrobial Features. *Antioxidants*. 13(3);353.
55. Isopescu R.D., Spulber R., Josceanu A.M., Mihaiescu D.E., Popa O. (2020.) Romanian Bee Pollen Classification and Property Modelling. *Journal of Apicultural Research*. 59;443–451.
56. Ivanišová, E.; Kačániová, M.; Frančáková, H.; Petrová, J.; Hutková, J.; Brovarskyi, V.; Velychko, S.; Adamchuk, L.; Schubertová, Z.; Musilová, J. (2015.) Bee Bread—Perspective Source of Bioactive Compounds for Future. *Potravinárstvo*. 9;592–598.
57. Jahan M., Holley R. A. (2016.) Transfer of antibiotic resistance from *Enterococcus faecium* of fermented meat origin to *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Letters in Applied Microbiology*. 62;304-310
58. Jajere S. M. (2019.) A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*. 12(4);504-521

59. Janashia I., Choiset Y., Jozefiak D., Dénier F., Coton E., Moosavi-Movahedi A.A., Chanishvili N., Haertlé T. (2018.) Beneficial Protective Role of Endogenous Lactic Acid Bacteria Against Mycotic Contamination of Honeybee Beebread. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*. 10(4);638–646.
60. Jones J.C., Helliwell P., Beekman M., Maleszka R., Oldroyd B.P. (2005.) The effects of rearing temperature on developmental stability and learning and memory in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, sensory, neural and bibehavioral physiology*. 191;1121–1129
61. Kabakci D. (2024.) Comparison of some biological activities of propolis and bee bread samples obtained from *Apis mellifera* Anatoliaca and its Muğla and Efe ecotypes. *Journal of Hellenic Veterinary Medical Society*. 74;6451–6462.
62. Kasprzyk I.; Depciuch J.; Grabek-Lejko D.; Parlinska-Wojtan M. (2018.) FTIR-ATR Spectroscopy of Pollen and Honey as a Tool for Unifloral Honey Authentication. The Case Study of Rape Honey. *Food Control*. 84;33–40.
63. Kassim A., Pflüger V., Premji Z., Daubenberger C., Revathi G. (2017.) Comparison of biomarker based Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and conventional methods in the identification of clinically relevant bacteria and yeast. *BMC Microbiology*. 17(1);128.
64. Kaszoni-Rückerl I., Mustedanagic A., Muri-Klinger S., Brugger K., Wagner K.-H., Wagner M., Stessl B. (2020.) Predominance of Distinct *Listeria Innocua* and *Listeria Monocytogenes* in Recurrent Contamination Events at Dairy Processing Facilities. *Microorganisms*. 8;234
65. Kerek A., Roman I., Szabo A., Kovacs D., Kardos G., Kovacs L., Jerzsele A. (2025.) Antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* – literature review. *Critical reviews in microbiology*.
66. Kezić N., Bubalo D., Grgić Z., Dražić M., Barišić D., Filipi J., Jakopović I., Ševar M., Krakar D. i Tretnjak V. (2014). *Priručnik – Konvencionalno i ekološko pčelarenje*. Zagreb: CIP Katalogizacija, 32 – 34.
67. Khalifa S.A.M., Elashal M., Kieliszek M., Ghazala N.E., Farag M.A., Saeed A., Xiao J., Zou X., Khatib A., Göransson U., et al. (2020.) Recent Insights into Chemical and Pharmacological Studies of Bee Bread. *Trends in Food Science and Technology*. 97;300–316.

68. Khasheii B., Mahmoodi P., Mohammadzadeh A. (2021.) Siderophores: Importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. *Microbiological Research*. 250;126790
69. Kieliszek M., Piwowarek K., Kot A.M., Błażej S., Chlebowska-Śmigiel A., Wolska I., (2017.) Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review, *Trends in Food Science & Technology*. 71(4);170-180.
70. Kieliszek M., Kolotylo V., Mikolajczuk-Szczyrba A., Giurgiulescu L., Kot A. M., Klaisz S., Pobiega K., Cendrowski A. (2021.) Isolation and identification of new yeast strains from bee bread. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*. 13(1); 207-213.
71. Klaenhammer T.R., Kullen M.J. (1999.). Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 50;45–57.
72. Kong J., Yu S. (2007.) Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 39;549–559.
73. König H., Fröhlich J. (2009). Lactic Acid Bacteria. In: König, H., Unden, G., Fröhlich, J. (eds) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, Berlin, Heidelberg.
74. Lee P.Y., Costumbrado J., Hsu C.Y., Kim Y.H. (2012.) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualised Experiments: JoVE*. (62);3923.
75. Maeno S., Nishimura H., Tanizawa Y., Dicks L., Arita M., Endo A. (2021.) Unique niche-specific adaptation of fructophilic lactic acid bacteria and proposal of three *Apilactobacillus* species as novel members of the group. *BMC Microbiology*. 21(1);41.
76. Mărgăoan R., Cornea-Cipcigan M., Topal E., Kösoglu M. (2020.) Impact of Fermentation Processes on the Bioactive Profile and Health-Promoting Properties of Bee Bread, Mead and Honey Vinegar. *Processes*. 8;1081
77. Martinez J. L., Baquero F. (2000.) Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*. 1771-1777
78. Max J.J., Chapados C. (2001.) Sucrose Hydrates in Aqueous Solution by IR Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry*. 105;10681–10688.
79. Max J.J., Chapados C. (2007.) Glucose and Fructose Hydrates in Aqueous Solution by IR Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry*. 111;2679–2689.
80. Mayda N., Özkök A., Bayram N. E., Gerçek Y. C., Sorkun K. (2020.) Bee bread and bee pollen of different plant sources: determination of phenolic content, antioxidant

- activity, fatty acid and element profiles. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 14;1795-1809
81. Michalik M., Podbielska-Kubera A., Dmowska-Korobiewska A. (2025.) Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* Strains—Searching for New Antimicrobial Agents—Review. *Pharmaceuticals*. 18;81.
 82. MMWR – Morbidity and Mortality Weekly Report, Centers for Disease Control and Prevention. (2023.) Foodborne Illness Outbreaks at Retail Food Establishments — National Environmental Assessment Reporting System, 25 State and Local Health Departments, 2017–2019. *Surveillance Summaries*. 72(6)
 83. Mokoena M. P., Omatola C. A., Olaniran A. O. (2021.). Applications of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins against Food Spoilage Microorganisms and Foodborne Pathogens. *Molecules*. 26(22);7055
 84. Morales-López S., Yepes J. A., Prada-Herrera J. C., Torres-Jiménez A. (2019.). Enterobacteria in 21st century: a review focused on taxonomic changes
 85. Moreira de Gouveia M.I., Bernalier-Donadille A., Jubelin G. (2024.) Enterobacteriaceae in the Human Gut: Dynamics and Ecological Roles in Health and Disease. *Biology*. 13(3);142.
 86. Nogueira C., Iglesias A., Feás X., Estevinho L. M. (2012). Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(9);11173-11187
 87. Olmos A., Henríquez-Piskulich P., Sanchez C., Rojas-Herrera M., Moreno-Pino M., Gómez M., Rodríguez Da Silva R., Maracaja-Coutinho V., Aldea P., Trombert A.N. (2014.) Draft Genome of Chilean Honeybee (*Apis mellifera*) Gut Strain *Lactobacillus kunkeei* MP2. *Genome Announcements*. 2(5);e01013-14
 88. Origin. Data Analysis and Graphing Software, Version 8.1; OriginLab Corporation: Northampton, MA, USA, 2009.
 89. Orla-Jensen S (1919) The lactic acid bacteria. Fred Host and Son, Copenhagen
 90. Pandey A., Joshi V. K., Singh - Nee Nigam, P., Soccol, C. R. (2000.). Enterobacteriaceae, Coliforms and *E. coli*. In R. K. Robinson, C. A. Batt, & P. D. Patel (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 604-617). Academic Press.
 91. Peterson S. B., Bertolli S. K., Mougous J. D. (2020.) The Central Role of Interbacterial Antagonism in Bacterial Life. *Current Biology*. 30;R1203-R1214.

92. Pielichowska K., Głowinkowski S., Lekki J., Binia's D., Pielichowski K., Jenczyk J. (2008.) PEO/Fatty Acid Blends for Thermal Energy Storage Materials. Structural/Morphological Features and Hydrogen Interactions. *European Polymer Journal*. 44;3344–3360.
93. Prđun, S.; Svečnjak, L.; Valentić, M.; Marijanović, Z.; Jerković, I. (2021.) Characterization of Bee Pollen: Physico-Chemical Properties, Headspace Composition and FTIR Spectral Profiles. *Foods*. 10;2103.
94. Quinby M. (2008). *Mysteries of Bee – Keeping Explained*. 1st ed. New York: C. M. Saxton, agricultural book publisher 152 Fulton street. 1853;12.
95. Ranpariya V., Tarpara N. (2023). The Ability of Microorganisms to Produce Antibiotics- A Review. *World Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research*. 41-46.
96. Resolutions Pro. FTIR Software, Version 5.3.0; Agilent Technologies: Palo Alto, CA, USA, 2015.
97. Sawicki T., Starowicz M., Kłębukowska L., Hanus P. (2022.) The Profile of Polyphenolic Compounds, Contents of Total Phenolics and Flavonoids, and Antioxidant and Antimicrobial Properties of Bee Products. *Molecules*. 27;1301.
98. Seeley T. D. (1985). *Honeybee Ecology. A Study of Adaptation in Social Life*. Princeton: Princeton University Press.
99. Sivanesan I., Gopal J., Hasan N., Muthu M. (2023). A systematic assessment of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) application for rapid identification of pathogenic microbes that affect food crops: delivered and future deliverables. *RSC Advances*. 13;17297-17314.
100. Skoog D. A., Leary J. J. (1992). *Principles of instrumental analysis* (4th ed.). New York, NY: Saunders College Publishing, 700 pp.
101. Smati, N. (2021.) *Bee Bread Preservation Methods: Physical, Chemical and Microbial Stability throughout Storage*. Master's Thesis, Instituto Politécnico de Bragança—Escola Superior Agrária, Bragança, Portugal
102. Socrates, G. (2004.) *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts*, 3rd ed.; John Wiley and Sons, Ltd.: New York, NY, USA.
103. Sonmez E., Kekecoglu M., Sahin H., Bozdeveci A., Karaoglu S.A. (2023.) Comparing the biological properties and chemical profiling of chestnut bee pollen and

- bee bread collected from Anatolia. *Brazilian Journal of Microbiology*. 54(3);2307–2317.
104. Spectragryph. Spectroscopy software, Version 1.2.16.1., Dr. Friedrich Menges Software-Entwicklung, Oberstdorf, Germany 2016.
 105. Spigaglia P., Mastrantonio P. (2003.) Evaluation of Repetitive Element Sequence-Based PCR as a Molecular Typing Method for *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(6);2454-7.
 106. Svečnjak L., Bošković K., Prđun S., Mrkonjić Fuka M., Tanuwidjaja I. (2023.) Metric and Spectral Insight into Bee-Pollen-to-Bee-Bread Transformation Process. *Foods*. 12(22);4149.
 107. Svečnjak L., Chesson L.A., Gallina A., Maia M., Martinello M., Mutinelli F., Muz M.N., Nunes M.F., Saucy F., Tipple J.B., Wallner K., Was E., Waters T.A. (2019.) Standard methods for *Apis mellifera* beeswax research. *Journal of Apicultural Research*. 58(2);1-108.
 108. Svečnjak L., Prđun S., Rogina J., Bubalo D., Jerković I. (2017.) Characterization of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) Nectar-to-Honey Transformation Pathway Using FTIR-ATR Spectroscopy. *Food Chemistry*. 232;286–294.
 109. Švec P., Vancanneyt M., Seman M., Snauwaert C., Lefebvre K., Sedláček I., Swings J. (2005.) Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol Letters*. 247(1);59-63.
 110. Thakur M., Nanda V. (2020.) Composition and Functionality of Bee Pollen: A Review. *Trends in Food Science & Technology*. 98;82–106.
 111. Touaitia R., Mairi A., Ibrahim N. A., Basher N. S., Idres T., Touati A. (2025.) *Staphylococcus aureus*: A Review of the Pathogenesis and Virulence Mechanisms. *Antibiotics*. 14;470
 112. Troxler R., von Graevenitz A., Funke G., Wiedemann B., Stock I. (2000.) Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 6;525-535
 113. Urban-Chmiel R., Marek A., Stępień-Pyśniak D., Wieczorak K., Dec M., Nowaczek A., Osek J. (2022.) Antibiotic Resistance in Bacteria – A Review. *Antibiotics*. 11;1079

114. Urcan A., Mărghițaș L. A., Dezmirean D. S., Bobiș O., Bonta V., Mureșan C. I., Mărgăoan R. (2017.) Chemical Composition and Biological Activities of Beebread – Review. Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies. 74(1);6.
115. Usta M., Zangin K., Okuyan S., Solmaz S., Nağacıoğlu R., Demirbağ Z. (2025.) Isolation and probiotic evaluation of *Apilactobacillus kunkeei* and *Bombella* sp. from *Apis mellifera anatoliaca* and *Bombus terrestris*. International Microbiology. 28(6);1419-1430.
116. Vásquez A., Olofsson T. C. (2009.) The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. Journal of Apicultural Research and Bee World. 48(3);189-195
117. Vergalito F., Testa B., Cozzolino A., Letizia F., Succi M., Lombardi S. J., Tremonte P., Pannella G., Di Marco R., Sorrentino E., Coppola R., Iorizzo M. (2020.) Potential Application of *Apilactobacillus kunkeei* for Human Use: Evaluation of Probiotic and Functional Properties. Foods. 9;1535.
118. Wang J., Kliks M.M., Jun S., Jackson M., Li Q.X. (2010.) Rapid Analysis of Glucose, Fructose, Sucrose, and Maltose in Honey from Different Geographic Regions Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis. Journal of Food Science. 75(2);C208–C214.
119. Yu D., Banting G., Neumann N.F. (2021.) A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. Canadian Journal of Microbiology. 67(8);553-571.
120. Zendo T., Ohashi C., Maeno S., Piao X., Salminen S., Sonomoto K., Endo A. (2020.) Kunkecin A, a New Nisin Variant Bacteriocin Produced by the Fructophilic Lactic Acid Bacterium, *Apilactobacillus kunkeei* FF30-6 Isolated From Honey Bees. Frontiers in Microbiology. 11;571903.
121. Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C. M. A. P., Harris H. M. B. , Mattarelli P., O'Toole P. W., Pot B., Vandamme P., Walter J., Watanabe K., Wuyts S., Felis G. E., Gänzle M. G., Lebeer S. (2020.) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology. 70(4);2782-2858.

8. Sažetak

Kemijska karakterizacija i antimikrobno djelovanje korisne mikrobiote pčelinjeg kruha na patogene bakterije

Ana Knežić

Proizvodnja pčelinjeg kruha (PK) kompleksan je biološki proces koji počinje jedinstvenim oblikom sinergije biljaka i medonosnih pčela (*Apis mellifera* L.). Pčele skupljaju peludna zrnca te ih u formi granula na goljenicama stražnjih nogu unose u stanice saća u košnici, gdje zbog specifičnih uvjeta pelud podliježe procesu fermentacije kojim nastaje PK (fermentirana pčelinja pelud). Transformaciju pčelinje peludi u PK najvećim dijelom provode bakterije mliječne kiseline (BMK), prilikom čega nastaje nutritivniji i biodostupniji proizvod za pčele. Iako je većina pčelinjih proizvoda predmet dugogodišnjih istraživanja, pčelinji kruh je i dalje nedostatan istražen. Stoga je cilj ovoga rada bio provesti kemijsku karakterizaciju (FTIR kemijski *fingerprinting*) PK prikupljenog iz pčelinjih zajednica, izolirati korisne bakterije mikrobioma prikupljenih uzoraka PK te istražiti njihovu enzimatsku aktivnost i antimikrobno djelovanje prema najznačajnijim patogenim bakterijama, koje se prenose hranom i uzrokuju bolesti kod ljudi (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*). Istraživanje je provedeno na skupnim uzorcima PK prikupljenih iz tri pokusne pčelinje zajednice sive pčele (*A. mellifera carnica*). Uzorci pčelinjeg kruha kemijski su karakterizirani metodom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR) i ATR tehnikom snimanja spektara. Iz uzoraka pčelinjeg kruha izolirana je korisna mikrobiota, identificirana do razine vrste metodom MALDI-TOF MS te do razine soja rep-PCR metodom. Kako bi se izolati biotehnološki karakterizirali, ispitana im je antibiotska rezistencija, enzimatska aktivnost i antimikrobno djelovanje. Rezultati spektralne (FTIR-ATR) analize pokazali su jedinstvene spektralne profile istraživanih uzoraka PK, a provedena asignacija apsorpcijskih vrpce uočeni u IR spektrima, dala je uvid u glavne sastavnice analiziranih uzoraka (vode, ugljikohidrata/šećera, lipida i proteina). Spektralni profili istraživanih uzoraka PK ukazuju na sličan kemijski sastav, što se može povezati sa sličnim botaničkim podrijetlom peludi, a najintenzivnije su molekulske vibracije šećera (na 1052 i 1032 cm^{-1}). Kasnijom mikrobiološkom analizom utvrđena je najveća brojnost korisne mikrobiote ($1.6\text{E}+05 \pm 9.4\text{E}+03$ CFU/g) u uzorku PK2 koji je ujedno sadržavao najviši udio šećera. Brojnost BMK u uzorcima PK iznosila je $4.1\text{E}+04 \pm 2.0\text{E}+03$ CFU/g do $1.6\text{E}+05 \pm 9.4\text{E}+03$ CFU/g. Izolati

izolirani iz PK identificirani su kao vrsta *Apilactobacillus kunkeei*, koja pripada skupini fruktofilnih BMK. Rep-PCR analizom utvrđena je značajna unutarvrstna varijabilnost unutar ove vrste. Za biotehnološku karakterizaciju, odabrana su 22 soja kojima je potvrđena intrinzična rezistentnost na vankomicin i kanamicin, ali ne i rezistentnost na druge korištene antibiotike. Utvrđeno je kako izolirani sojevi pokazuju značajnu proteolitičku enzimatsku aktivnost. Također je dokazano snažno inhibitorno djelovanje na sve ispitivane patogene bakterije (*S. enterica*, *E. coli*, *L. innocua*, *S. aureus*), koje varira od vrlo jake, do potpune inhibicije te jačom anitmikrobnom aktivnosti prema Gram-pozitivnim bakterijama. Rezultati ovog istraživanja potvrdili su kako je PK značajan izvor korisnih bakterija što ukazuje i na mogućnost njihove primjene u farmaceutskoj i/ili prehrambenoj industriji.

Ključne riječi: pčelinji kruh, FTIR-ATR spektroskopija, biotehnološka karakterizacija korisne mikrobiote, *Apilactobacillus kunkeei*, antimikrobno djelovanje

9. Summary

Chemical characterisation and antimicrobial activity of beneficial microbiota from bee bread on pathogenic bacteria

Ana Knežić

The production of bee bread (BB) is a complex biological process that begins with a unique form of synergy between plants and honey bees (*Apis mellifera* L.). Bees collect pollen grains and transport it on the corbiculae (pollen baskets) of their hind legs into the honeycomb cells within the hive, where under the specific conditions, the pollen undergoes a fermentation process that results in the formation of BB (fermented bee pollen). The transformation of bee pollen into BB is primarily carried out by lactic acid bacteria (LAB), producing a more nutritious and bioavailable product for bees. While most bee products have been the subject of long-term scientific research, bee bread remains insufficiently studied. Therefore, the aim of this study was to conduct a chemical characterization (FTIR chemical fingerprinting) of BB collected from bee colonies, to isolate the most significant bacteria from the microbiome of the BB samples, and to investigate their enzymatic activity and antimicrobial effect against major foodborne pathogens that cause diseases in humans (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*). The research was conducted on polled BB samples from three experimental colonies of *A. mellifera carnica*. The BB samples were chemically characterized using Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FTIR) with the ATR technique. Beneficial microbiota were isolated from the BB samples, identified to the species level using MALDI-TOF MS method, and to the strain level using rep-PCR method. For biotechnological characterization, the isolates were tested for antibiotic resistance, enzymatic activity and antimicrobial activity. FTIR-ATR analysis showed unique spectral profiles of analyzed BB samples and the assignation of absorption bands observed in the IR spectra provided insight into the main components of the samples (water, carbohydrates/sugars, lipids and proteins). The spectral profiles of the BB samples indicated a similar chemical composition, that can be linked to a similar botanical origin of the pollen. The most intense molecular vibrations are assigned to sugars (at 1052 and 1032 cm^{-1}). Subsequent microbiological analysis revealed the highest abundance of beneficial microbiota ($1.6\text{E}+05 \pm 9.4\text{E}+03$ CFU/g) in sample PK2, which also had the highest sugar content. The abundance of LAB in the BB samples ranged from $4.1\text{E}+04 \pm 2.0\text{E}+03$ CFU/g to $1.6\text{E}+05 \pm 9.4\text{E}+03$ CFU/g. The isolates obtained from BB were

identified as *Apilactobacillus kunkeei*, a species belonging to the group of fructophilic LAB. Rep-PCR analysis revealed significant intraspecies variability within this species. For biotechnological characterization, 22 strains were selected, all of which showed intrinsic resistance to vancomycin and kanamycin, but were susceptible to other tested antibiotics. The isolated strains exhibited significant proteolytic enzymatic activity. Additionally, a strong inhibitory effect was observed against all tested pathogenic bacteria (*S. enterica*, *E. coli*, *L. innocua*, *S. aureus*), ranging from strong to complete inhibition, with stronger antimicrobial activity against Gram-positive bacteria. The results of this study confirmed that BB is a significant source of beneficial bacteria, indicating the potential application in the pharmaceutical and/or food industries.

Key words: bee bread, *Apilactobacillus kunkeei*, FTIR-ATR spectroscopy, biotechnological characterisation of beneficial microbiota, antimicrobial activity

Životopis

Ana Knežić rođena je 07.10.2000. godine u Zagrebu. Do svoje 18. godine živjela je u Hrastovici, selu pokraj Petrinje gdje je završila 1. osnovnu školu Petrinja te Opću gimnaziju. Uz osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje završila je i Osnovnu glazbenu školu Fran Lhotka u Petrinji te svira klavir. Nakon srednje škole seli se u Zagreb, gdje upisuje preddiplomski studij Animalne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te ga završava u roku s pohvalom (*cum laude*), obranom završnog rada pod naslovom “Kakvoća pčelinjeg voska u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji” pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Lidije Svečnjak. Nakon preddiplomskog studija, upisuje diplomski studij Mikroba biotehnologija u poljoprivredi na Agronomskom fakultetu. Izabrana je u Vijeće studija te trenutno završava 2. godinu diplomskog studija. Odlično razumije i govori engleski jezik te dobro poznaje njemački jezik. Izvrsno se služi računalom te odlično poznaje MS Office paket.