Isolation and biological evaluation of lactic acid bacteria from bee pollen and bee bread

ABSTRACT

The present research aimed to isolate lactic acid-producing bacteria from pollen or bee bread. For this purpose, bacterial strains were isolated from various pollen and bee bread samples using an MRS culture medium. The characteristics of the isolates were assessed through Gram staining, catalase activity tests, fermentation of specific sugars, growth curve analysis, pH reduction in the culture medium, and gas production. The results from the growth curve analysis of the isolated bacteria demonstrated significant differences in their growth rates under identical culture conditions, indicating varying capacities for pollen fermentation. Specifically, bacteria MB1, MB2, MB4, and MP1 exhibited robust growth during the initial 48 hours. In contrast, bacteria MB3 and MP2 remained in the lag phase throughout this period; however, MP2 and MB4 subsequently experienced a marked increase in growth rate, with the highest optical density (OD). The maximum OD recorded for bacteria MB1, MB3, and MB4 were 1.15, 0.602, and 0.939 respectively after 115 hours, while bacterium MP2 achieved its plateau optical density of 1.314 after 65 hours. In the next phase of the study, sterilized and ground pollen was inoculated with the most effective bacterial strains identified in the initial isolation phase. Following incubation of the pollen-containing culture medium, bacterial activity in fermenting pollen was evaluated based on lactic acid production. All isolated bacteria were confirmed to be Gram-positive and catalase-negative, demonstrating the ability to ferment certain simple sugars. The isolated strains exhibited varying efficiencies in both growth rates and lactic acid production, suggesting differences in their capacity to utilize the nutrients found in pollen. However, no significant differences were observed among the bacterial strains concerning gas production.

Keywords: *lactic acid bacteria, bee bread, bee pollen, fermentation*

جداسازی و ارزیابی زیستی باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک از گرده گل و نان زنبورعسل

هدف از پژوهش حاضر جداسازی باکتری های مولد لاکتات از گرده گل و نان زنبورعسل بود. بدین منظور باکتری‌ها از یک نمونه گرده گل منطقه باروس جهرم و یک نمونه نان زنبور از منطقه کریم آباد تهران با استفاده از محیط کشت MRS جداسازی شد. خصوصیات جدایه ها بر اساس رنگ آمیزی گرم، فعالیت کاتالازی، تخمیر برخی از قندها، منحنی رشد، میزان کاهش pH محیط کشت و تولید گاز بررسی گردید. نتایج تعیین منحنی رشد باکتری های خالص شده تفاوت های چشمگیری در سرعت رشد آنها در محیط کشت یکسان نشان داد که می تواند نشان دهنده قدرت متفاوت آنها در تخمیر گرده گل باشد. باکتری های MB1، MB2، MB4 و MP1 تا حدود ۴۸ ساعت اول سرعت رشد خوبی از خود نشان دادند. در صورتی که باکتری ها MB3 و MP2 در این مدت در فاز تاخیری بوده و به یکباره سرعت رشد باکتری MP2 افزایش پیدا کرده و همراه با MB4 بالاترین نقطه جذب نوری از خود نشان می دهد. حداکثر جذب نوری برای باکتری های MB1، MB3 و MB4 مقادیر ۱/۱۱۵، ۰/۶۰۲ و ۰/۹۳۹ بود که بعد از ۱۱۵ ساعت اتفاق افتاد در حالی که باکتری MP2 بعد از ۶۵ ساعت به حداکثر جذب نوری خود (۱/۳۱۴) رسید. در مرحله بعدی گرده گل استریل و آسیاب شده با استفاده از بهترین باکتری‌های جدا شده در مرحله اول تلقیح شد. پس از انکوباسیون محیط کشت حاوی گرده گل، فعالیت باکتری‌ها در تخمیر گرده گل با توجه به تولید اسیدلاکتیک بررسی گردید. همه باکتری های استخراج شده گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند و توانایی تخمیر برخی قندهای ساده را داشتند. باکتری های جدا شده در محیط کشت حاوی گرده گل می توانند عمل تخمیر را انجام داده و اسیدلاکتیک تولید نمایند. توانایی این باکتری ها در سرعت رشد و تولید اسیدلاکتیک متفاوت بود که نشان دهنده قدرت متفاوت آن ها در استفاده از مواد مغذی گرده گل است. باکتری ها از لحاظ تولید گاز تفاوت معنی داری نداشتند.

کلیدواژه‌ها: *باکتری های مولد اسیدلاکتیک، نان زنبور، گرده گل، تخمیر*

ویرایش استاری نشده

مقدمه

گرده گل منبع اصلی تامین پروتئین برای زنبوران عسل است و کیفیت و قابلیت هضم آن از عوامل مهم برای سلامت زنبوران عسل می‌باشد (Frias et al., 2016) و رابطه مستقیمی بین تامین گرده گل و پرورش وجود دارد (Keller et al., 2005). در یک مطالعه سه ساله، کلنی‌هایی که در بهار با گرده گل یا جایگزین‌های گرده تغذیه شده بودند؛ پرورش نوزادان زودتر شروع شد و در یک سال این تفاوت منجر به افزایش دو برابری بازدهی عسل کلنی‌ها در طول سال گردید (Keller et al., 2005). گرده گل به دلیل ویژگی‌های تغذیه‌ای آن مانند پروتئین (۱۰ تا ۵۲ ٪)، لیپید (۱۰ تا ۲۰ ٪)، فیبر (۳ تا ۲۰ ٪) و مواد معدنی و همینطور خصوصیات زیست‌فعالی آن که به دلیل وجود ویتامین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های آن است یک ماده خام ارزشمند است و به توسعه میکروارگانیزم ها در فرایند تخمیر کمک می‌کند (Salazar-González & Díaz-Moreno, 2016). ریخت‌شناسی دانه‌های گرده دارای یک محافظ طبیعی در برابر عوامل بیرونی است که دسترسی به مواد مغذی آن را محدود می‌کند بنابراین زنبورهای درون کندو آن را به نان زنبور تبدیل می‌کنند که یک زیست فرایند تخمیر در بستر جامد[1] است (Del Risco R Carlos Alberto, 2004).

پیشینهٔ پژوهش

باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک گروهی از باکتری‌ها هستند که معمولاً در فلور نرمال ارگانیسم‌های سالم به عنوان همزیست یافت می‌شوند (Gasbarrini et al., 2008). اخیرا فلور باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک اندوژنوس متشکل از احتمالا ۱۲ گونه متفاوت از باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک از جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم‌ها شرح داده شده است (Olofsson & Vásquez, 2008; Vásquez et al., 2009). این فلور میکروبی در معده عسلی زنبور عسل *Apis mellifera* در سوئیس و آمریکا وجود داشتند (Vásquez et al., 2009) ولی تعداد آن‌ها (۱۲ عدد) با توجه به نوع شهد جمع آوری شده توسط زنبوران عسل می تواند متفاوت باشند (Olofsson & Vásquez, 2008). به نظر می‌رسد که این فلور باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک احتمالاً به صورت وابستگی متقابل با زنبوران عسل تکامل پیدا کرده‌اند چرا که باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک از مواد غذایی که زنبور تهیه کرده استفاده می‌کنند و در مقابل از زنبور عسل در برابر میکروارگانیسم‌های مضر مراقبت می‌نمایند (Vásquez & Olofsson, 2009). گرده گلی که توسط زنبوران عسل به کلنی آورده می‌شود، به ماده‌ای ارزشمند به نام نان زنبور تبدیل می‌گردد. این فرآیند با افزودن عسل، آنزیم‌های هضم‌کننده و تخمیر اسیدلاکتیک در زمان ذخیره سازی گرده‌ها در حجره‌های شان‌های زنبورعسل انجام می‌گیرد. (Mărgăoan et al., 2020). فرآیند تخمیر لاکتیکی گرده گل به وسیله برخی میکروارگانیزم های که به صورت خود به خودی در شان های عسل وجود دارند، تحت شرایط بی‌هوازی اتفاق می‌افتد (Vásquez & Olofsson, 2009). فرآیند تخمیر، گرده گل را در مقابل اتلاف خواص آن محافظت می‌کند و ترکیبات جدید آن را که حاصل از تغییر و تحولات آنزیمی است افزایش می‌دهد (Mărgăoan et al., 2020). اما مکانیسم دقیق آن هنوز درک نشده است (Vásquez & Olofsson, 2009). تحقیقات در مورد باکتری‌های‌اسیدلاکتیک جداسازی‌شده از گرده گل و نان زنبورعسل، پتانسیل‌های عملکردی آن‌ها را به ویژه در فرآیندهای تخمیری نشان داده است. با این حال، شکاف‌های قابل توجهی در درک قابلیت‌های خاص تخمیری این سویه‌ها وجود دارد. در حالی که مطالعات مختلفی گونه‌های مختلف باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک موجود در این محصولات، مانند گونه‌هایی از لاکتوباسیلوس ها را شناسایی کرده‌اند، تحقیقات جامع درباره مسیرهای متابولیکی و تغییرات بیوشیمیایی که آن‌ها در طول تخمیر ایجاد می‌کنند، محدود است (Vásquez & Olofsson, 2009). منابع موجود اغلب کاربردهای عملی این باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک را در تخمیر گرده زنبور نادیده می‌گیرد که می‌تواند باعث بهبود پروفایل‌های تغذیه‌ای و ترکیبات زیست‌فعال سودمند برای زنبورها و انسان‌ها شود (Pełka et al., 2021).

به طور مثال باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک نقش حیاتی در پایدارسازی میکروبی و حفظ و نگهداری نان زنبور از طریق تولید اسیدلاکتیک و سایر مواد ضد میکروبی دارد که از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در آن جلوگیری می‌کنند (Adaškevičiūtė et al., 2022). پرداختن به این شکاف‌ها علاوه بر افزایش درک ما از پویایی میکروب‌ها در محصولات زنبور عسل می‌تواند کاربردهای بالقوه‌ای را در علم تغذیه و زنبورداری ارائه دهد و همچنین به سلامت زنبورها کمک کند. هدف مطالعه حاضر جداسازی

[1] Solid state fermentation

و شناسایی جدایه های باکتری‌های‌تولید کننده اسیدلاکتیک از گرده گل و نان زنبور و بررسی خصوصیات جدایه ها و ارزیابی قدرت تخمیر آن ها بود.

روش‌شناسی پژوهش

استخراج و خالص سازی باکتری ها از گرده گل و نان زنبورعسل

مقدار ۱۰ گرم نان زنبور برداشت شده از زنبورستان غلامی واقع در استان تهران، کریم آباد، روستای شریف آباد و ۱۰ گرم گرده گل خشک شده برداشت شده از زنبورستان شریفی نیا در محل استان شیراز، شهرستان جهرم منطقه باروس در ۲۵۰ سی‌سی آب مقطر استریل شده حاوی پپتون ۰/۱ درصد وزنی/حجمی به عنوان محلول ذخیره با دور همزن ۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه با استفاده از همزن استریل شده مخلوط گردید (Di Cagno et al., 2019). به میزان ۲ سی‌سی از محلول ذخیره به دست آمده به محیط کشت ام آر اس براث تزریق شد. تعداد ۱۰ نمونه از محلول ذخیره حاصل از گرده گل و ۱۰ نمونه نیز از محلول ذخیره حاصل از نان زنبور داخل لوله های هانگیت تلقیح شد. با توجه به میزان گاز تولید شده بعد از ۷۲ ساعت یک نمونه از محیط کشت‌های حاصل از گرده گل و یک نمونه از محیط کشت‌های حاصل از نان زنبور به جهت آزمایش‌های بعدی انتخاب گردید. محیط کشت جامد ام آر اس آگار طبق دستورالعمل تهیه شد و دو نمونه به دست آمده از قبل در محیط کشت جامد تلقیح گردید. بعد از ۷۲ ساعت باکتری‌هایی که بیشترین رشد را داشتند (از لحاظ اندازه کلنی تشکیل شده در پلیت ها) با استفاده از لوپ استریل به جهت انجام زیرکشت[2]های بعدی به محیط کشت مایع انتقال داده شدند و این عمل تا ۵ مرتبه به جهت خالص سازی باکتری ها انجام شد. در هر مرحله باکتری‌هایی که در محیط کشت مایع گاز بیشتری تولید کرده بودند و یا در محیط آگار رشد بهتری داشتند جهت انجام زیرکشت های بعدی انتخاب شدند. در نهایت ۲۰ لوله هانگیت حاوی باکتری‌های با منشا گرده گل و نان زنبور انتخاب و برای انجام آزمایش های بعدی نگهداری گردید.

رنگ امیزی گرم

به جهت بررسی خالص بودن جدایه ها همه ۲۰ نمونه با استفاده از رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند. ارزیابی میکروسکوپی نشان داد که از این تعداد ۱۲ نمونه کاملا خالص شده بودند و تمامی باکتری‌های خالص شده نیز گرم مثبت بودند.

تست تخمیر قند ها

مقدار ۰/۲۵ گرم ازقندهای ساکاروز، گلوکز، فروکتوز، مالتوز، زایلوز و لاکتوز به همراه ۵ سی‌سی محیط کشت فنول رد براث در لوله هانگیت ریخته شد و اتوکلاو گردید (John P. Harley, 2008). سپس باکتری‌های خالص شده به آنها تزریق شده و پس از چهار روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد (Filannino et al., 2016) میزان تخمیر قندها مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس درجه‌بندی کیفی به آن ها شماره ۱ تا ۳ داده شد. به صورتی که عدد یک بیانگر عدم تخمیر و عدد سه به معنای تخمیر کامل است.

تست کاتالاز

به جهت بررسی فعالیت کاتالیزی باکتری‌ها ۱۲ باکتری انتخاب شده در رقت ۴-، در محیط کشت جامد حاوی آگار کشت داده شدند و با استفاده از هیدروژن پراکسید روی آنها تست کاتالاز انجام شد. معیار اندازه گیری تولید حباب بود که به عنوان کاتالاز مثبت در نظر گرفته می‌شد. تمامی ۱۲ باکتری انتخاب شده کاتالاز منفی بودند.

منحنی رشد

برای تعیین سرعت رشد باکتری های خالص شده ۴۰ سی‌سی محیط کشت مایع در ویال های با حجم ۱۰۰ سی‌سی ریخته شد و ۴ سی‌سی باکتری خالص شده به آنها تلقیح گردید و میزان جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر در زمان های ۱۸، ۲۶، ۴۴، ۴۹، ۶۵، ۷۴، ۹۱، ۱۱۵ و ۱۳۷ ساعت پس از انکوباسیون با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری یووی-ویزیبل مدل ۲۱۰۰ اندازه گیری شد.

[2] Subculture

همچنین در هر نوبت اندازه گیری سرعت رشد میزان گاز تولید شده در ویال ها با توجه به میزان جابجای پیستون در سرنگ انسولین اندازه گیری شد. در پایان آزمون سرعت رشد، مقدار pH نهایی محیط کشت با استفاده از pH متر مدل WTW نیز اندازه گیری شد.

قدرت تخمیر گرده گل توسط باکتری‌ها

با توجه به منحنی رشد باکتری‌ها در مرحله قبل ۶ عدد از باکتری‌هایی که بعد از ۶۵ ساعت بیشترین جذب نوری را داشتند انتخاب شده و به محیط کشت حاوی گرده گل تلقیح گردید تا میزان اسیدلاکتیک تولید شده بررسی گردد. همچنین مقدار تولید گاز و pH نهایی محیط کشت حاوی گرده گل نیز اندازه گیری شد.

اندازه گیری اسیدلاکتیک

غلظت اسیدلاکتیک نمونه ها با استفاده از رنگ‌سنجی و طبق روش فیگن اسچو و ماریس مورد اندازه گیری قرار گرفت (Figenschou & Marais, 1991). نیم میلی‌لیتر از هر نمونه درون لوله آزمایش ریخته شد و ۱/۵ میلی‌لیتر معرف اکسید کننده به آن اضافه گردید. استاندارد و بلانک نیز به همین نحو تهیه شد (بلانک با آب مقطر تهیه شد و استاندارد با اسیدلاکتیک ۹۰ درصد درست شد). پس از ۱۵ دقیقه، ۰/۲ میلی‌لیتر محلول نیتریت، ۵ میلی‌لیتر محلول معرف قلیایی و ۱ میلی‌لیتر محلول اگزالیل دی هیدرازید اضافه گردید. نمونه ها کاملا مخلوط و میکس شده و به مدت یک دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. جذب آنها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر یووی-ویزیبل مدل ۲۱۰۰ در طول موج ۶۰۰ نانومتر پس از نیم ساعت قرائت شد.

بررسی آماری

داده های ثبت شده در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی انجام شد که در آن زمان ارزیابی به عنوان بلوک در نظر گرفته شده است. نتایج به دست آمده با برنامه آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون دانکن در سطح ۵٪ خطا استفاده شد.

یافته‌های پژوهش

نتایج نشان داد که همه ۱۲ باکتری خالص شده کاتالاز منفی و گرم مثبت هستند. همچنین همه جدایه های خالص شده از نوع کوکسی بودند (جدول ۱).

جدول ۱. ویژگی فنوتیپی و بیوشیمیایی برخی باکتری‌های جداسازی شده از منابع گرده گل و نان زنبورعسل

ویژگی‌ها	جدایه ها					
	MB1	*MP1*	*MP2*	*MB2*	*MB3*	*MB4*
منشاء استخراج	نان زنبور	گرده گل	گرده گل	نان زنبور	نان زنبور	نان زنبور
واکنش گرم	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت
مورفولوژی	کوکسی	کوکسی	کوکسی	کوکسی	کوکسی	کوکسی
آزمون کاتالاز	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی

تست تخمیر قندها روی ۱۲ جدایه نشان داد که همه آن ها قابلیت بالایی برای تخمیر قندهای ذکر شده دارند. قدرت تخمیر جدایه ها در قند های مالتوز، زایلوز و لاکتوز همگی یکسان بوده و بیشترین مقدار تخمیر را از خود نشان دادند. در صورتی که قدرت تخمیر این باکتری‌ها در قندهای ساکارز، گلوکز و فروکتوز تفاوت های اندکی داشت که نشان دهنده قدرت متفاوت باکتری‌ها در تخمیر این ۳ قند است و ۱ عدد از باکتری‌ها (MP2) در تخمیر این ۳ قند ضعیف تر عمل کرده بود (جدول ۲). نکته قابل توجه

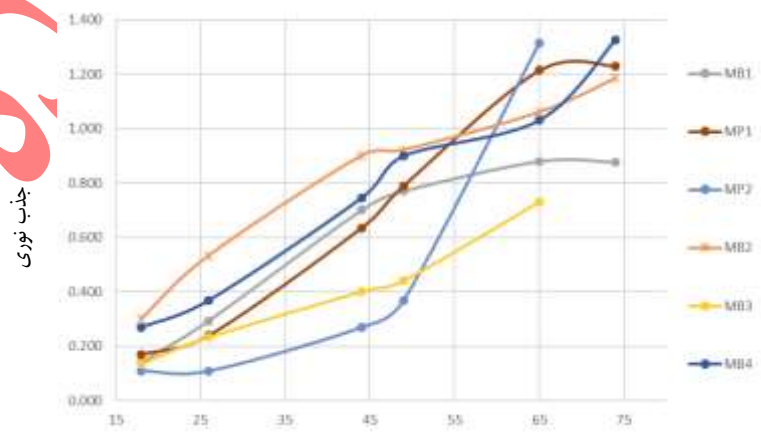
ویرایش استادی نشده

این بود که همه باکتری‌ها در قند فروکتوز رشد بیشتری کرده بودند و رسوبات بیشتری در انتهای لوله آزمایش جمع شده بود.

جدول ۲. ارزیابی قدرت تخمیر برخی باکتری‌های جداسازی شده از منابع گرده گل و نان زنبورعسل

قند	جدایه ها					
	MB1	*MP1*	*MP2*	*MB2*	*MB3*	*MB4*
ساکارز	۳	۳	۲	۳	۳	۳
گلوکز	۳	۳	۲	۳	۳	۳
فروکتوز	۳	۳	۲/۵	۳	۳	۳
مالتوز	۳	۳	۳	۳	۳	۳
زایلوز	۳	۳	۳	۳	۳	۳
لاکتوز	۳	۳	۳	۳	۳	۳

نتایج تعیین منحنی رشد باکتری‌های خالص شده تفاوت های چشمگیری در سرعت رشد آنها در محیط کشت یکسان نشان داد که می‌تواند نشان دهنده قدرت متفاوت آنها در تخمیر گرده گل باشد (شکل ۱). باکتری‌های MB1، MB2، MB4 و MP1 برخلاف دو باکتری دیگر تا حدود ۴۸ ساعت اول سرعت رشد خوبی از خود نشان دادند. در صورتی که باکتری‌های MB3 و MP2 در این مدت در فاز تاخیری بوده و به یکباره سرعت رشد باکتری MP2 افزایش پیدا کرده و همراه با MB4 بیشترین پیک را از خود نشان می‌دهد. حداکثر جذب نوری برای باکتری‌های MB1، MB3 و MB4 مقادیر ۱/۱۱۵، ۰/۶۰۲ و ۰/۹۳۹ بود که بعد از ۱۱۵ ساعت اتفاق افتاد در حالی که باکتری MP2 بعد از ۶۵ ساعت به حداکثر جذب نوری خود (۱/۳۱۴) رسید و باکتری‌های MP1 و MB2 بعد از ۷۱ و ۹۱ ساعت به حداکثر جذب نوری خود یعنی ۱/۲۳۰ و ۱/۲۸۷ رسیدند. MP2 دارای نرخ رشد نسبتاً سریعی است و می‌تواند تحت شرایط بهینه به سرعت تکثیر شود و این امر آن را در محیط‌های غنی از مواد غذایی رقابتی می‌سازد. درحالی که MB2 دارای کندترین نرخ رشد در میان این گروه است و ممکن است این ارگانیسم دارای نیازها یا زیستگاه‌های خاصی باشد که مانع از تکثیر سریع آن می‌شود.



شکل ۱. سرعت رشد جدایه ها بر اساس میزان جذب نوری محیط کشت در ۶۰۰ نانومتر

نتایج به دست آمده از جدایه های مختلف درجات متنوعی از تولید اسیدلاکتیک را نشان می‌دهد که می‌تواند بیانگر تنوع عملکردی بین جمعیت های باکتری‌های جدا شده باشد. برخی از جدایه های به دست آمده مانند جدایه MB1 توانایی تولید اسیدلاکتیک بالایی از خود نشان دادند (جدول ۳).

جدول ۳. میزان اسیدلاکتیک، *pH* و گاز تولیدی بعد از تلقیح جدایه ها به محیط کشت حاوی گرده گل

جدایه ها	مشاهدات تلقیح جدایه ها به محیط کشت حاوی گرده گل استریل		
	تولید گاز (*cc*)	*pH*	اسیدلاکتیک (میلی‌مول)
Ctrl	۰/۰۱ ± ۰/۰۱	^{a} ۴/۷۴ ± ۰/۰۶	^{d} ۱۷/۸۶ ± ۰/۷۹
MB1	۰/۰۳ ± ۰/۰۱	^{b} ۴/۴۴ ± ۰/۰۴	^{a} ۴۲/۶۱ ± ۲/۲۸
MP1	۰/۰۲ ± ۰/۰۲	^{b} ۴/۴۰ ± ۰/۰۷	^{c} ۳۴/۴۶ ± ۰/۸۹
MP2	۰/۳۰ ± ۰/۴۸	^{b} ۴/۴۳ ± ۰/۰۱	^{c} ۳۲/۶۸ ± ۰/۷۵
MB2	۰/۳۴ ± ۰/۴۹	^{b} ۴/۵۳ ± ۰/۰۷	^{bc} ۳۵/۸۷ ± ۱/۰۸
MB3	۰/۱۸ ± ۰/۱۲	^{b} ۴/۴۱ ± ۰/۰۵	^{ab} ۳۸/۸۰ ± ۱/۹۵
MB4	۰/۱۵ ± ۰/۱۴	^{b} ۴/۴۳ ± ۰/۰۳	^{c} ۳۳/۲۸ ± ۰/۳۵
SEM	۰/۱۳	۰/۰۳	۰/۷۸
P-value	۰/۴۲۴۸	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱

میانگین‌هایی که در هر ستون حرف‌های متفاوت دارند، دارای اختلاف آماری معنی‌داری با هم هستند ($P<$۰/۰۵)

بحث

دستگاه گوارش زنبورعسل به عنوان یک مخزن قابل توجهی از باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک به شمار می‌آید (Shehata et al., 2024). نان زنبور ترکیبی از گرده گل، عسل و بزاق زنبورعسل است و به عنوان یک سوبسترای غنی از مواد مغذی عمل می‌کند. نان زنبور به خاطر ترکیبات بیوشیمیایی غنی خود که حاوی پروتئین ها، لیپیدها، ترکیبات فنولی، ویتامین ها و مواد معدنی است شناخته شده است. این ترکیبات می‌توانند محیط بهینه ای برای رشد انواع باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک فراهم سازند. جداسازی باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک از نان زنبور و گرده گل که در ارتباط نزدیک با مایعات ترشحی دستگاه گوارش زنبورعسل هستند می‌تواند بینش های ارزشمندی در رابطه با نقش بالقوه این باکتری‌ها در فرآیندهای تخمیر و ارتباط آن ها در سلامت و تغذیه زنبورعسل به ما ارائه دهد. در چندین مطالعه نیز باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک از دستگاه گوارش زنبورعسل استخراج و شناسایی شده اند (Carina Audisio et al., 2011; El-Sohaimy et al., 2020).

نرخ رشد یک پارامتر مهم برای انتخاب باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک است چرا که مستقیما بر توانایی آنها برای رشد در محیط‌های خاص تأثیر می‌گذارد؛ در مطالعه ای مشاهده شد که برخی سویه‌های خاص باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک مخصوص زنبورعسل از جنس لاکتو باسیلوس‌ها، مانند Fhon2N و Fhon13N، نرخ‌های رشد سریع‌تری نسبت به سایر سویه‌های مورد مطالعه داشتند و بعد از ۲۴ ساعت به فاز ایستایی[3] خود رسیدند (Lamei et al., 2017). همانطور که در مطالعه ما نیز باکتری‌هایی مانند MP2 بیتشرین جذب نوری و نرخ رشد را از خود نشان داد (شکل ۱)؛ هرچند بعد از حدود ۶۵ ساعت به فاز ایستایی خود رسید. باید توجه داشت که باکتری‌های Fhon2N و Fhon13N در محیط کشت MRS مکمل شده به چنین سرعت رشدی رسیده اند در حالی که محیط کشت MRS مورد استفاده در آزمایش ما هیچ گونه ماده مکملی نداشت. نرخ رشد باکتری‌ها می‌تواند در سویه‌های مختلف تفاوت معنی داری داشته باشد؛ به طور مثال در مطالعه ذکر شده باکتری Biut2N در همان محیط کشت مکمل شده بعد از حدود ۳۲ ساعت به فاز ایستایی خود رسید (Lamei et al., 2017). در مطالعه ما نیز باکتری MB1 بعد از حدود ۱۱۵ ساعت به

[3] Stationary phase

فاز ایستایی خود رسیده است که نشان دهنده تفاوت در نرخ رشد باکتری های تولید کننده اسیدلاکتیک است. سویه‌های سریع‌الرشد باکتری‌های اسیدلاکتیک با احتمال بیشتری در دستگاه گوارش زنبورعسل جایگزین می‌شوند؛ این موضوع زمانی اهمیت پیدا می‌کند که این باکتری‌های مفید می‌توانند با عوامل بیماری‌زا بر سر منابع رقابت کنند و به این ترتیب سلامت زنبور عسل را افزایش دهند (Nowak et al., 2021). همچنین فعالیت متابولیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک اغلب با نرخ رشد آنها مرتبط است؛ سویه‌هایی که سریع رشد می‌کنند می‌توانند مواد مغذی را به طور موثرتری متابولیزه کرده و ترکیبات مفیدی مانند اسیدهای آلی تولید کنند که به سلامت کلی میزبان کمک کرده و رشد عوامل بیماری‌زا را مهار می‌کند (Nowak et al., 2021). در مطالعه‌ای جداسازی باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک از منابع متفاوتی مانند عسل، نان زنبور، گرده گل و ژل رویال از گونه‌های مختلف زنبورعسل بررسی شد؛ مشخص شد که منابع مختلف می‌توانند حاوی باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک با ویژگی های رشدی متفاوتی باشند (Mathialagan et al., 2018). در همین مطالعه ۴۲ جدایه متعلق به ۶ جنس باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک شناسایی شد که به خاطر ویژگی‌های پروبیوتیکی، ظرفیت فرآوری مواد مغذی، پتانسیل آن‌ها در مدیریت بیماری‌ها و حمایت از سیستم ایمنی زنبورعسل شناخته شده اند (Mathialagan et al., 2018). با استفاده از این ظرفیت ها می‌توان تغییراتی در تغذیه تکمیلی زنبورعسل اعمال نمود و از این خواص در افزایش مواد مغذی گرده گل خام و همچنین بهبود سیستم ایمنی و کاهش بیماری‌های زنبورعسل استفاده نمود.

تولید اسیدلاکتیک به وسیله باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش زنبورعسل خصوصا در قسمت‌های هضم کننده مورد بررسی قرار گرفته است. مقدار اسیدلاکتیک تولید شده اهمیت بسیار زیادی دارد چراکه می‌تواند بیانگر مواردی از قبیل فعالیت تخمیری (راندمان تخمیر کربوهیدرات ها توسط انواع باکتری‌ها در لوله گوارشی زنبورعسل)، تنظیم کننده pH (جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا در pH پایین)، سودمندی تغذیه‌ای (استفاده از اسیدلاکتیک به عنوان یک منبع انرژی) و تعدیل کننده سیستم ایمنی (حمایت از سیستم ایمنی توسط اسیدلاکتیک و دیگر متابولیت‌های تولید شده) باشد (Nowak et al., 2021). از طرف دیگر توانایی باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک در تولید اسیدلاکتیک یک عامل مهم در انتخاب آن به عنوان پروبیوتیک است (Nowak et al., 2021). در مطالعه‌ای باکتری های جدا شده از لوله گوارشی زنبورعسل، اسیدهای ارگانیک متنوعی مانند اسید استیک، بوتیریک، سوکسینیک، مالیک، تارتاریک و لاکتیک تولید کرده اند (Elzeini et al., 2021). در این مطالعه اسیدهای آلی با استفاده از روش HPLC اندازه گیری شده اند؛ درحالی که در آزمایش ما تنها غلظت اسیدلاکتیک تولید شده با استفاده از روش رنگ‌سنجی ارزیابی شد (Figenschou & Marais, 1991).

باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک از محیط زیست زنبورعسل مانند نان زنبور، گرده گل و فلور میکروبی دستگاه گوارش جداسازی شده اند. مطالعات انجام شده چندین گونه از باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک را شناسایی کرده اند که *Lactobacillus kunkeei* و *Fructobacillus fructosus* از فراوان ترین آن ها بوده اند (Endo & Salminen, 2013; Linjordet, 2016). این باکتری‌ها نقش مهمی در تخمیر نان زنبور ایفا می‌کنند که در تغذیه زنبورعسل ضروری است و در مقابل عوامل بیماری‌زا از زنبورعسل محافظت می‌کند (Vásquez & Olofsson, 2009). مطالعات نشان داده است که باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک جدا سازی شده از زنبورعسل می‌توانند اسیدلاکتیک تولید کنند و برخی از سویه های آن ها ظرفیت تولیدی بالایی نیز دارند (Leska, Nowak, & Motyl, 2022). این یافته ها به امکان استفاده از این باکتری‌ها برای توسعه برنامه های حفاظتی برای سلامت زنبورعسل اشاره می‌کنند (Leska, Nowak, & Motyl, 2022). گزارشات اندکی مبنی بر میزان اسیدلاکتیک تولید شده توسط باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک وجود دارد؛ هرچند در آزمایشی برای بررسی اثر آنتاگونیستی سویه های مختلف باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک بر عوامل بیماری‌زای زنبورعسل، مشخص شد که سویه *Lacticaseibacillus casei* 12AN بیشترین فعالیت آنتاگونیستی در برابر این عوامل را از خود نشان می‌دهد، که می‌تواند بیانگر ظرفیت بالای تولید اسیدلاکتیک توسط این سویه باشد (Leska, Nowak, Szulc, et al., 2022). در مطالعه دیگری نیز با اندازه گیری محتوی اسیدلاکتیک موجود در سوپرناتانت[4] محیط کشت ۶ سویه از باکتری‌های FLAB[5] میزان این اسید محدوده‌ای بین ۵۶–۴۰ میلی‌مول را از خود نشان داد که در آزمایش ما نیز دامنه تولید اسیدلاکتیک بین ۶ باکتری انتخاب شده محدوده ای بین ۴۲–۱۷ میلی‌مول داشت (جدول ۳).

برخی از جدایه های به دست آمده در آزمایش ما تولید اسیدلاکتیک خوبی از خود نشان دادند (جدایه MB1) که بیانگر پتانسیل

[4] Supernatants
[5] Fructophilic lactic acid bacteria

تخمیری بالای آن ها است. در حالی که گروهی دیگر از باکتری‌ها اسیدلاکتیک کمتری تولید کردند. این تفاوت ها در تولید اسیدلاکتیک می‌تواند بیانگر تنوع عملکردی بین باکتری‌های جدا شده باشد و می‌توانند حاصل فاکتورهای متفاوتی مانند ویژگی های ژنتیکی جدایه ها، شرایط محیطی هنگام استخراج آن ها و ترکیبات مواد مغذی گرده گل و نان زنبورعسل ایجاد شده باشد. همانطور که در مطالعه دیگری نیز تمامی جدایه‌های باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک قادر به تولید اسیدلاکتیک و بیومس بودند اما مقادیر تولیدی برای هر سویه متفاوت بود (Endo & Salminen, 2013). از طرفی مقدار اسیدلاکتیک تولید شده بسیار مهم است چرا که حضور آن تضمینی برای حفظ سترونی محصول پروبیوتیکی است (Vamanu et al., 2006). علاوه بر این باکتری‌های به دست آمده از نان زنبور با آن هایی که از گرده گل استخراج شده می‌توانند متفاوت باشند که نشان از اثر تفاوت سوبسترا بر تنوع میکروبی است (Vásquez & Olofsson, 2009). جداسازی باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک به علت نقش اکولوژیکی این میکروارگانیزم ها و کاربرد بالقوه آن ها در تولید غذا و سلامتی بسیار با اهمیت است. فلور باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک معده عسلی زنبور عسل می‌تواند برای سلامتی زنبوران عسل، لاروهای آن ها و کل کلنی با اهمیت باشد و باور بعضی از محققان بر این است که فلور باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک که جدیدا یافت شده اند برای سلامت زنبورعسل اهمیت حیاتی دارد (Vásquez & Olofsson, 2009) و همچنین می‌تواند بر تولید و ذخیره عسل آن ها نیز مهم باشد (Olofsson & Vásquez, 2008).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک جداسازی شده از دستگاه گوارش و یا محصولات زنبور عسل مانند گرده گل و نان زنبور عسل دارای توانایی تخمیر موادی مانند گرده گل خام هستند و می‌توانند قابلیت های پروبیوتیکی خوبی برای استفاده در تغذیه زنبور عسل و انسان داشته باشند. همه باکتری‌های انتخاب شده در این آزمایش توانایی تولید اسیدلاکتیک و تخمیر گرده گل را داشتند. می‌توان با استفاده از آن ها به صورت انفرادی و یا ترکیبی از آن ها یک خوراک تخمیری با قابلیت افزایش وضعیت سلامت زنبور عسل تولید کرد. همچنین با انجام آزمایشات بیشتر می‌توان از این باکتری‌ها پروبیوتیک مخصوص زنبورعسل را نیز تولید نمود. مطالعات بیشتری با هدف بهبود جداسازی این باکتری‌ها و بهینه سازی تکنیک‌های تخمیر برای حداکثر نمودن پتانسیل این باکتری‌های مفید نیاز است. به طور مثال استفاده از محیط کشت‌های مکمل شده با موادی مانند فروکتور، ال‌سیستئین و یا کربنات کلسیم. همچنین می‌توان جداسازی باکتری‌ها را در شرایط بی‌هوازی و یا با محیط کشت های مختلفی انجام داد.

منابع

Adaškevičiūtė, V., Kaškonienė, V., Barčauskaitė, K., Kaškonas, P., & Maruška, A. (2022). The Impact of Fermentation on Bee Pollen Polyphenolic Compounds Composition. *Antioxidants*, *11*(4), 645. https://doi.org/10.3390/antiox11040645

Carina Audisio, M., Torres, M. J., Sabaté, D. C., Ibarguren, C., & Apella, M. C. (2011). Properties of different lactic acid bacteria isolated from Apis mellifera L. bee-gut. *Microbiological Research*, *166*(1), 1–13. https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.01.003

Del Risco R Carlos Alberto. (2004). *Polen-Pan de Abejas: Composición, Nutrición, Acción en la Salud Humana y Microbiolog\'\ia*.

Di Cagno, R., Filannino, P., Cantatore, V., & Gobbetti, M. (2019). Novel solid-state fermentation of bee-collected pollen emulating the natural fermentation process of bee bread. *Food Microbiology*, *82*, 218–230. https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.007

El-Sohaimy, A. A., Masry, S. H. D., Shehata, M. G., Al-Kahtani, S. N., Abdelwahab, T. E., Abdelmotal, Y. A. T., & Nour, M. E. (2020). Isolation, Identification and Antimicrobial Activity of Unprecedented Lactic Acid Bacterial Isolates from Honeybees. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *23*(4), 467–477. https://doi.org/10.3923/pjbs.2020.467.477

Elzeini, H. M., Ali, A. A., Nasr, N. F., Elenany, Y. E., & Hassan, A. A. M. (2021). Isolation and identification of lactic acid bacteria from the intestinal tracts of honey bees, Apis mellifera L., in

Egypt. *Journal of Apicultural Research*, *60*(2), 349–357. https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1746019

Endo, A., & Salminen, S. (2013). Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, *36*(6), 444–448. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.06.002

Figenschou, D. L., & Marais, J. P. (1991). Spectrophotometric method for the determination of microquantities of lactic acid in biological material. *Analytical Biochemistry*, *195*(2), 308–312. https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90335-Q

Filannino, P., Di Cagno, R., Addante, R., Pontonio, E., & Gobbetti, M. (2016). Metabolism of Fructophilic Lactic Acid Bacteria Isolated from the Apis mellifera L. Bee Gut: Phenolic Acids as External Electron Acceptors. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(23), 6899–6911. https://doi.org/10.1128/AEM.02194-16

Frias, B. E. D., Barbosa, C. D., & Lourenço, A. P. (2016). Pollen nutrition in honey bees (Apis mellifera): impact on adult health. *Apidologie*, *47*(1), 15–25. https://doi.org/10.1007/s13592-015-0373-y

Gasbarrini, G., Montalto, M., Santoro, L., Curigliano, V., D'Onofrio, F., Gallo, A., Visca, D., & Gasbarrini, A. (2008). Intestine: Organ or Apparatus? *Digestive Diseases*, *26*(2), 92–95. https://doi.org/10.1159/000116765

John P. Harley. (2008). Laboratory exercises in microbiology. In *(No Title)*. McGraw-Hill/Higher Education 7th ed.

Keller, I., Fluri, P., & Imdorf, A. (2005). Pollen nutrition and colony development in honey bees - Part II. *Bee World*, *86*(2), 27–34. https://doi.org/10.1080/0005772X.2005.11099650

Lamei, S., Hu, Y. O. O., Olofsson, T. C., Andersson, A. F., Forsgren, E., & Vásquez, A. (2017). Improvement of identification methods for honeybee specific Lactic Acid Bacteria; future approaches. *PLOS ONE*, *12*(3), e0174614. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174614

Leska, A., Nowak, A., & Motyl, I. (2022). Isolation and Some Basic Characteristics of Lactic Acid Bacteria from Honeybee (Apis mellifera L.) Environment—A Preliminary Study. *Agriculture*, *12*(10), 1562. https://doi.org/10.3390/agriculture12101562

Leska, A., Nowak, A., Szulc, J., Motyl, I., & Czarnecka-Chrebelska, K. H. (2022). Antagonistic Activity of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria against Honeybee (Apis mellifera L.) Pathogens. *Pathogens*, *11*(11), 1367. https://doi.org/10.3390/pathogens11111367

Linjordet, M. S. (2016). *A comparative analysis of lactic acid bacteria isolated from honeybee gut and flowers, with focus on phylogeny and plasmid profiling*. Norwegian University of Life Sciences, Ås.

Mărgăoan, R., Cornea-Cipcigan, M., Topal, E., & Kösoğlu, M. (2020). Impact of Fermentation Processes on the Bioactive Profile and Health-Promoting Properties of Bee Bread, Mead and Honey Vinegar. *Processes*, *8*(9), 1081. https://doi.org/10.3390/pr8091081

Mathialagan, M., Thangaraj Edward, Y. S. J., David, P. M. M., Senthilkumar, M., Srinivasan, M. R., & Mohankumar, S. (2018). Isolation, Characterization and Identification of Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) from Honey Bees. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *7*(04), 894–906. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.704.096

Nowak, A., Szczuka, D., Górczyńska, A., Motyl, I., & Kręgiel, D. (2021). Characterization of Apis mellifera Gastrointestinal Microbiota and Lactic Acid Bacteria for Honeybee Protection—A Review. *Cells*, *10*(3), 701. https://doi.org/10.3390/cells10030701

Olofsson, T. C., & Vásquez, A. (2008). Detection and Identification of a Novel Lactic Acid Bacterial Flora Within the Honey Stomach of the Honeybee Apis mellifera. *Current Microbiology*, *57*(4), 356–363. https://doi.org/10.1007/s00284-008-9202-0

Pełka, K., Worobo, R. W., Walkusz, J., & Szweda, P. (2021). Bee Pollen and Bee Bread as a Source of Bacteria Producing Antimicrobials. *Antibiotics*, *10*(6), 713. https://doi.org/10.3390/antibiotics10060713

Salazar-González, C., & Díaz-Moreno, C. (2016). The nutritional and bioactive aptitude of bee pollen for a solid-state fermentation process. *Journal of Apicultural Research*, *55*(2), 161–175. https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1205824

Shehata, M. G., Masry, S. H. D., Abd El-Aziz, N. M., Ridouane, F. L., Mirza, S. B., & El-Sohaimy, S. A. (2024). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from honeybees stomach: Functional and technological insights. *Annals of Agricultural Sciences*, *69*(1), 11–18. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2024.06.001

Vamanu, A., Vamanu, E., Drugulescu, M., Popa, O., & Câmpeanu, G. (2006). Identification of a lactic bacterium strain used for obtaining a pollen-based probiotic product. *Turkish Journal of Biology*, *30*(2), 75–80.

Vásquez, A., & Olofsson, T. C. (2009). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research*, *48*(3), 189–195. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.07

Vásquez, A., Olofsson, T. C., & Sammataro, D. (2009). A scientific note on the lactic acid bacterial flora in honeybees in the USA – A comparison with bees from Sweden. *Apidologie*, *40*(3), 417–417. https://doi.org/10.1051/apido/2009042

ویراستاری شده

Extended Abstract

Introduction

Pollen is the primary source of protein for honeybees, and its quality and digestibility are crucial factors for their health. There is a direct correlation between pollen supply and the successful rearing of broods. The morphology of pollen grains features a natural protective layer against external factors, which limits access to its nutrients. Consequently, bees within the hive convert it into bee bread through a solid-state fermentation process. Lactic acid bacteria, a group of bacteria that typically found in the normal flora of healthy organisms, play a significant role in this convertion. The pollen brought to the colony by honeybees is converted into a valuable substance known as bee bread, a process that occurs through the addition of honey, digestive enzymes, and lactic acid fermentation during the storage of pollen in honeycomb cells. This fermentation process protects pollen from losing its properties and enhances the compounds resulting from enzymatic changes; however, the precise mechanism remains unclear.

Materials and methods

A mixture of 10 grams of bee bread and 10 grams of dried pollen was prepared in 250 cc of sterilized distilled water containing 0.1% (w/v) peptone using a sterilized mixer at 300 rpm for 2 minutes. Two cc of the resulting stock solution was injected into MRS broth culture medium. Ten samples from the pollen stock solution and ten from the bee bread stock solution were inoculated into Hungate tubes. Based on gas production after 72 hours, one sample from each culture (pollen and bee bread) was selected for further testing and inoculated into solid culture media. After another 72 hours, the bacteria with the most significant growth (in terms of colony size on plates) were transferred to liquid culture for subsequent subculturing, which was repeated five times for bacterial purification. Ultimately, 20 Hungate tubes containing bacteria derived from pollen and bee bread were selected for further tests, including Gram staining, sugar fermentation tests, catalase tests, growth curve analysis, fermentation capacity of pollen by bacteria, and lactic acid measurement.

Results and Discussion

The results indicated that all 12 purified bacteria were catalase-negative and Gram-positive. Sugar fermentation tests showed that all isolates had a high capability to ferment the specified sugars. Notably, all bacteria exhibited greater growth in fructose. Growth curve analysis revealed significant differences in growth rates among isolates in identical culture conditions, suggesting varying abilities to ferment pollen. Different isolates demonstrated diverse levels of lactic acid production, indicating functional diversity among the isolated bacterial populations. The honeybee gut serves as a substantial reservoir for lactic acid-producing bacteria. Isolating these bacteria from bee bread and pollen that are associated with the honeybee gut, can provide valuable insights into their potential roles in fermentation processes and their relationship with honeybee health and nutrition. The metabolic activity of lactic acid bacteria is often linked to their growth rates; fast-growing strains can metabolize nutrients more efficiently and produce beneficial compounds such as organic acids that support host health while inhibiting pathogen growth. The production of lactic acid by these bacteria has been studied in various sections of the honeybee gut, particularly in digestive areas. The amount of lactic acid produced is crucial as it can indicate aspects such as fermentation activity (the efficiency of carbohydrate fermentation by various bacteria in the honeybee gut), pH regulation (preventing pathogen growth at low pH), nutritional benefits (using lactic acid as an energy source), and immune system modulation (supporting immunity through lactic acid and other metabolites). Furthermore, the ability of lactic acid bacteria to produce lactic acid is an important factor in their selection as probiotics. Studies have shown that lactic acid bacteria isolated from honeybees can produce lactic acid, with some strains exhibiting high production capacity. Some isolates obtained in our study also demonstrated good lactic acid production potential, indicating their high fermentative capacity. These differences in lactic acid production may reflect functional diversity among isolated bacteria. all isolated lactic acid bacteria were capable of producing lactic acid and biomass; however, production levels varied among strains.

Conclusion:

Lactic acid bacteria isolated from the digestive tract or honeybee products such as pollen and bee bread possess the ability to ferment raw pollen and may offer good probiotic potential for use in honeybee and human nutrition. Further studies aimed at improving the isolation of these bacteria and optimizing fermentation techniques are necessary to maximize the potential of these beneficial microbes.