

Bachelorproef

De opkweek van darmbacteriën van de honingbij (*Apis mellifera*) optimaliseren aan de hand van verschillende media



 hogeschool
VIVES

Bachelor in de agro- en biotechnologie

Afstudeerrichting Dierenzorg

Campus Roeselare

Student: Dina Schevernels

Academiejaar 2024 – 2025

Begeleidende docent(en): Lin Op de

Beeck & Dieter Anseeuw

Woord vooraf

Het is met groot genoegen dat ik dit wetenschappelijk rapport gewijd aan de honingbij (*Apis mellifera*) aan u mag introduceren.

Ik vond dit een geweldige kans als Bachelor studente met keuzerichting Wildlifemanagement om meer bij te leren over het darmmicrobioom van honingbij en het onderzoek erachter.

De afgelopen periode was druk en stressvol, maar voornamelijk zeer leerrijk. Ik kan de kennis die ik nu reeds verworven heb zien als een nieuwe ervaring. Dit enerzijds aangezien we van pollinatoren jammer genoeg maar een beperkt deel in de studie zien. Anderzijds kan ik deze kennis benutten in het werkveld na het afronden van mijn studie.

Graag zou ik van deze gelegenheid gebruik maken om een aantal mensen te bedanken.

Professor Peter Vandamme en Margo Cnockaert van het labo microbiologie van de UGent in het bijzonder voor hun begeleiding en de mogelijkheid om mijn wetenschappelijk rapport bij hen uit te mogen voeren. Voor mijn wetenschappelijk rapport te verbeteren en mij zoveel mogelijk bij te laten leren over het darmmicrobioom van honingbijen en het gebruik van verschillende kweekmedia alsook het gehele proces van MALDI-TOF MS.

Allereerst wil ik mijn dank uiten aan mevrouw Lin Op de Beeck en meneer Dieter Anseeuw. Zij gaven de nodige feedback voor mijn rapport te kunnen verfijnen. Ik dank hen voor de tijd hiervoor te nemen en ook op de contactmomenten tips te geven over hoe ik het best zaken formuleer en welke artikels het beste passen bij mijn onderwerp.

De auteurs, onderzoekers en wetenschappers die de bron waren voor dit interessante werk te kunnen creëren, evenals de organisaties die bijdragen aan de bescherming van de soort.

Lies Van Craenenbroeck en mijn vrienden, die de tijd genomen hebben om mijn rapport te lezen en hun eigen mening aan mij vertelden over hoe het mogelijks nog beter kon.

Ook wil ik mijn ouders bedanken voor me de kans te geven om deze richting te mogen volgen. Ook boden zij mij steun, begrip en motivatie tijdens deze uitdaging.

Voor u ligt mijn wetenschappelijk rapport omtrent de opkweek van darmbacteriën van de honingbij (*Apis mellifera*) optimaliseren aan de hand van verschillende media.

Ik hoop ten eerste dat het resultaat van mijn harde werk zichtbaar is en u er zelf iets kan uit leren.

Dina Schevernels
30-05-2025

BACHELORPROEF

Titel in het Nederlands

De opkweek van darmbacteriën van de honingbij (*Apis mellifera*) optimaliseren aan de hand van verschillende media

Titel in het Engels

Optimizing the cultivation of honeybee (*Apis mellifera*) intestinal bacteria using different media

Hoofdonderzoeksvraag

Hoe beïnvloeden verschillende media de opkweek van darmbacteriën van de honingbij (*Apis mellifera*)?

Trefwoorden

- Bij - bee
- Microbioom - microbiome
- Darmmicrobiota - intestinal microbiota
- Bacteriën - bacteria
- Media - Culture media

Abstract

Het darmmicrobioom van honingbijen (*Apis mellifera*) speelt een essentiële rol in hun gezondheid, metabolisme en weerstand tegen pathogenen. Opkweek en identificatie van bacteriën zijn essentieel om darmmicrobiota beter te kunnen bestuderen, echter is dit niet altijd even gemakkelijk. Binnen dit onderzoek werd nagegaan hoe verschillende kweekmedia de opkweek en identificatie van geselecteerde darmbacteriën beïnvloeden, met bijzondere aandacht voor de genera *Gilliamella*, *Snodgrassella*, *Commensalibacter*, *Apibacter* en *Bombella*. Hierbij werd gebruikgemaakt van aangepaste voedingsmedia, verrijkt met onder andere actieve houtskool, galzouten en sodium desoxycholaat. De groeiprestaties van de type stammen werden geëvalueerd onder geoptimaliseerde anaerobe en micro-aerobe incubatiecondities bij 28°C en 35°C.

Voor de identificatie van de bacteriën werd gebruikgemaakt van MALDI-TOF massaspectrometrie, waarbij de invloed van de kweekomstandigheden op de eiwitprofielen kritisch werd beoordeeld. De resultaten tonen dat *Gilliamella* en *Snodgrassella* robuust groeien op standaardmedia, terwijl *Commensalibacter intestini* enkel bij 28°C voldoende groeide. *Bombella* en *Apibacter* vereisten selectieve media voor succesvolle opkweek. Het toevoegen van actieve houtskool beïnvloedde de MALDI-TOF MS spectra minimaal, behalve bij enkele gevoelige stammen zoals *S. gandavensis*.

Deze studie benadrukt het belang van medium- en temperatuuroptimalisatie bij het isoleren van bijenmicrobiota en onderstreept de nood aan gestandaardiseerde kweekprotocollen voor betrouwbare identificatie. De bekomen inzichten kunnen bijdragen aan microbiologisch onderzoek rond bijengezondheid en de verdere karakterisering van functionele bacteriestammen.

Inhoudstafel

BACHELORPROEF	3
Titel in het Nederlands	3
De opkweek van darmbacteriën van de honingbij (<i>Apis mellifera</i>) optimaliseren aan de hand van verschillende media	3
Titel in het Engels	3
Optimizing the cultivation of honeybee (<i>Apis mellifera</i>) intestinal bacteria using different media	3
Hoofdonderzoeksvraag	3
Hoe beïnvloeden verschillende media de opkweek van darmbacteriën van de honingbij (<i>Apis mellifera</i>)?	3
Trefwoorden	3
Abstract	4
1 Probleemstelling en doelstelling	6
2 Literatuurstudie	7
2.1 Het microbioom en de darmmicrobiota	7
2.1.1 Het microbioom van de honingbij	8
2.1.2 Samenstelling van het microbioom van de honingbij (<i>Apis mellifera</i>).....	8
2.1.3 Verstoringen en gevolgen voor de bijengezondheid	9
2.2 Uitdagingen bij de opkweek en de isolatie van darmbacteriën.....	10
2.3 Invloed van kweekmedia op MALDI-TOF MS	11
3 Materiaal en methode.....	12
3.1 Deelonderzoeksvragen	12
3.2 Elementen en inclusie(exclusie)criteria	13
3.3 Proefopzet.....	14
3.4 Dataverzameling	15
3.5 Dataverwerking	16
4 Resultaten	17
4.1 Beschrijving van de elementen.....	17
4.2 Invloed van actieve houtskool op de bacteriële groei en op de MALDI-TOF massaspectra van <i>Gilliamella</i> , <i>Snodgrassella</i> en <i>Commensalibacter</i>	18
4.2.1 <i>Gilliamella</i>	18
4.2.2 <i>Snodgrassella</i>	20
4.2.3 <i>Commensalibacter</i>	22
4.3 Beïnvloeding van de opkweek en isolatie van <i>Apibacter</i> en <i>Bombella</i> door het type voedingsbodem	24
4.3.1 <i>Bombella</i>	24
4.3.2 <i>Apibacter</i>	26
5 Discussie en algemeen besluit	27
5.1 Discussie.....	27
5.1.1 Interpretatie en verklaring van de resultaten.....	27
5.1.2 Kritische kijk op de methodiek	28
5.1.3 Suggesties of aanbevelingen voor verder onderzoek of praktijkvertaling.....	28
5.2 Algemeen besluit.....	29
6 Bijlagen	XXX
6.1 Bijlage 1: receptuur kweekmedia:.....	XXX
7 Bronvermelding	XXXII

1 Probleemstelling en doelstelling

De afgelopen jaren nemen de populaties van bestuivers af. Dit grotendeels ten gevolge van menselijke activiteiten, zoals bijvoorbeeld het gebruik van pesticiden. Deze stressoren hebben niet alleen een negatieve invloed op honingbijen (*Apis mellifera*), maar leiden ook tot een achteruitgang en zelfs het verlies van honingbijen (Goulson et al., 2015). Naast externe bedreigingen spelen ook interne factoren, zoals de samenstelling en stabiliteit van het darmmicrobioom, een cruciale rol in de gezondheid van honingbijen (Engel et al., 2012).

De darmmicrobiota van honingbijen zijn essentieel voor de spijsvertering, bescherming tegen pathogene kiemen en de algehele weerstand in kolonies. Hun darmmicrobioom is kenmerkend en relatief stabiel, het bestaat uit een kernset van vijf bacterie genera. Dit maakt het makkelijker om interacties tussen de bacteriën en hun gastheer te bestuderen in vergelijking met het veel complexere menselijke microbioom (Engel et al., 2012). Onderzoek geeft aan dat verstoring van het microbioom door onder andere blootstelling aan antibiotica en pesticiden kunnen leiden tot dysbiose (verstoring van de samenstelling en balans van het microbioom), wat een negatieve invloed heeft en mogelijk bijdraagt aan een verhoogde sterfte bij honingbijen (Raymann & Moran, 2018).

Verschillende studies bevestigen dat het optimaliseren van kweekmedia essentieel is voor het succesvol isoleren en bestuderen van specifieke darmbacteriën van honingbijen. Door aangepaste kweekomstandigheden te gebruiken, kunnen onderzoekers een volledig beeld krijgen van de samenstelling en functionaliteit van het bijenmicrobioom, wat cruciaal is voor het begrijpen van de gezondheid en het welzijn van honingbijen (Klammsteiner et al., 2023 & Engel et al., 2012). Verder is het doel van dit onderzoek het optimaliseren en standaardiseren van kweekmedia voor geselecteerde darmbacteriën van honingbijen, met als doel het gebruik van verschillende media te verminderen, de groei-efficiëntie te verbeteren en betrouwbare, reproduceerbare MALDI-TOF MS-resultaten te verkrijgen (Zautner et al., 2020).

2 Literatuurstudie

2.1 Het microbioom en de darmmicrobiota

Het darmmicrobiom speelt een essentiële rol in de menselijke gezondheid en heeft een uitgebreide invloed op het metabolisme, de immuunfunctie en de spijsvertering. Dit microbiom bestaat uit ongeveer 100 biljoen micro-organismen, waaronder bacteriën, virussen en schimmels, en bevat meer dan 3 miljoen genen die bijdragen aan een breed scala aan fysiologische functies (Vandeputte et al., 2017). De diversiteit en samenstelling van deze microbiële gemeenschap varieert afhankelijk van genetische en omgevingsfactoren, met name voeding, medicatie en levensstijl (Valdes et al. (2018).

Een van de belangrijkste functies van het darmmicrobiom is de fermentatie van onverteerbare voedingsstoffen, zoals voedingsvezels, waarbij korteketenvezuren zoals butyraat worden geproduceerd. Butyraat draagt bij aan de regulatie van de glucose- en energiehoeomestase, terwijl propionaat betrokken is bij de gluconeogenese in de lever en acetaat een rol speelt in het cholesterolmetabolisme en de eetlustregulatie. Daarnaast is het microbiom essentieel voor de vertering van galzuren en de productie van metabolieten (Vandeputte et al., 2017).

Het darmmicrobiom heeft ook een invloed op de algemene gezondheid, waarbij een hoge microbiële diversiteit geassocieerd wordt met een betere metabole en immuunfunctie, terwijl een lage diversiteit wordt waargenomen bij aandoeningen zoals obesitas en inflammatoire darmziekten (Valdes et al., 2018).

Voeding heeft, zoals eerder vermeld, een grote invloed op de microbiële diversiteit en de productie van metabolieten die essentieel zijn voor de gezondheid. Naast voeding hebben ook antibiotica en andere medicatie een invloed op de darmmicrobiota. Het gebruik van antibiotica kan leiden tot een verstoring in het darmmicrobiom, hierdoor raakt de microbiële balans verstoord (dysbiose) en deze kan de kans op infecties en andere gezondheidsproblemen die hieraan te wijten zijn verhogen. Ook medicatie die wordt toegeschreven tegen maagzuur, kan ook het risico op gastro-intestinale aandoeningen verhogen, vanwege de verstoringen in de microbiële balans.

Verder hebben ook levensstijl en omgevingsfactoren een impact hebben op het darmmicrobiom. Zo kunnen stress en een tekort aan slaap de microbiële diversiteit negatief beïnvloeden, dit kan bijdragen tot het ontstaan van ziekten. Fysieke activiteit daarentegen heeft een positieve invloed op het darmmicrobiom, doordat het de stabiliteit en diversiteit van de darmflora bevordert (Vandeputte et al., 2017; Valdes et al., 2018).

2.1.1 Het microbioom van de honingbij

Het darmmicrobiom van honingbijen (*Apis mellifera*) en hommels (*Bombus*) is beperkt aangezien het enkel 5 kern genera omvat, de andere voorkomende bacteriën keren terug afhankelijk van dieet en omgeving, dit in kleinere mate dan de kernbacteriën. Het omvat een complexe gemeenschap van gunstige, commensale en pathogene micro-organismen. Verschillende stressfactoren kunnen deze microbiële balans verstoren, wat mogelijk een negatieve impact heeft op de gezondheid van honingbijen (*Apis mellifera*) (Engel et al., 2016). Deze micro-organismen spelen een cruciale rol in de gezondheid van sociale bijen en worden overgedragen via onderlinge interacties met nestgenoten en de nestomgeving. Hierdoor blijft het microbiom grotendeels stabiel (Kwong & Moran, 2016).

2.1.2 Samenstelling van het microbiom van de honingbij (*Apis mellifera*)

De vijf kerngenera in het microbiom van honingbijen (*Apis mellifera*) zijn *Snodgrassella*, *Gilliamella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* en *Bombilactobacillus*. Het microbiom beïnvloedt de groei en metabole processen van honingbijen. *Lactobacillus* en *Bifidobacterium* zijn betrokken bij fermentatie en de productie van vetzuren, wat bijdraagt aan energieopslag en gewichtstoename.

Gilliamella apicola speelt een essentiële rol in de afbraak van polysachariden uit nectar en pollen, waardoor bijen efficiënter voedingsstoffen kunnen opnemen (Zheng et al., 2019). *Snodgrassella alvi* draagt bij aan de weerstand tegen pathogene micro-organismen en beschermt tegen infecties en toxines, wat resulteert in een hogere kolonieweerstand (Kwong & Moran, 2016). *Bombilactobacillus* helpt bij de afbraak van koolhydraten en produceert melkzuur, wat bijdraagt aan een zure darmomgeving die de groei van schadelijke micro-organismen remt (Kwong & Moran, 2016; Zheng et al., 2019).

Naast de kerngenera in het microbiom zijn er ook niet-kerngenera. *Apibacter*, bijvoorbeeld, wordt in lage aantallen aangetroffen in de darmen van honingbijen. Net als *Lactobacillus* en *Bifidobacterium* speelt het een rol bij de afbraak van koolhydraten (Engel & Moran, 2013; Zheng et al., 2019). *Bombella* heeft een vergelijkbare functie als *Apibacter* en kan mogelijk een beschermende werking hebben tegen schadelijke pathogenen (Kešnerová et al., 2020).

2.1.3 Verstoringen en gevolgen voor de bijengezondheid

Wanneer het microbioom wordt verstoord (dysbiose), kan dit negatieve gevolgen hebben. Blootstelling aan antibiotica, zoals tetracycline, kan bijvoorbeeld leiden tot een stijging van het aantal pathogene kiemen, waaronder *Serratia*, deze pathogene kiem wordt vaak geassocieerd met een verhoogde honingbijensterfte (Motta et al., 2018).

Honingbijen (*Apis mellifera*) die met antibiotica worden behandeld, blijken vatbaarder te zijn voor infecties dan niet-behandelde bijen. Dysbiose kan ook de opname van voedingsstoffen negatief beïnvloeden en het immuunsysteem verzwakken, wat de overlevingskansen van de bijen vermindert (Raymann et al., 2017; Motta & Moran, 2020).

Niet alleen pathogenen, maar ook dysbiose op zich kan leiden tot verhoogde honingbijensterfte (*Apis mellifera*), dit waarschijnlijk door een daling van de mogelijkheid om essentiële voedingsstoffen te kunnen metaboliseren of door verstoringen in de immuunrespons (Motta & Moran, 2020).

Ook herbiciden zoals glyfosaat kunnen een negatieve invloed op de gezondheid van honingbijen (*Apis mellifera*) hebben. Zelfs bij lage concentraties kan langdurige blootstelling aan glyfosaat de microbiële balans verstoren, wat in combinatie met andere stressoren zoals habitatverlies, pesticiden en klimaatverandering kan leiden tot verzwakte kolonies en ook een verhoogde bijensterfte (Motta & Moran, 2020).

Dit wijst op het belang van een evenwichtig en stabiel microbioom voor de gezondheid en overleving van honingbijen. Verdere studies naar de dynamiek van het bijenmicrobiom en strategieën om microbiële verstoringen tegen te gaan, kunnen bijdragen aan de bescherming van bijenpopulaties en hun cruciale rol als bestuivers (Engels et al., 2016; Kwong & Moran, 2016).

Uit het onderzoek van Ellegaard en Engel (2019) blijkt dat oudere bijen vatbaarder zijn voor niet-kernmicrobiota. Dit kan wijzen op een minder stabiele microbiota in de latere levensfase van bijen, evenals een afname in 'population turnover rates', wat duidt op een tragere microbiële replicatie. Het maakt het microbiom vatbaarder voor kolonisatie van pathogenen. Daarnaast wijst het onderzoek uit dat honingbijen een individuele, unieke microbiële gemeenschap hebben, die mogelijk wordt beïnvloed door omgevingsstressoren zoals voeding, pesticiden en ziekteverwekkers.

2.2 Uitdagingen bij de opkweek en de isolatie van darmbacteriën

Het kweken van verschillende bacteriën in het darmmicrobioom van honingbijen (*Apis mellifera*) vormt enkele uitdagingen vanwege hun specifieke groeivereisten. *Gilliamella* en *Snodgrassella*, zijn micro-aerofiel en vereisen specifieke zuurstofniveaus om te kunnen groeien. *Frischella* is daarentegen moeilijk buiten het microbioom van de honingbij (*Apis mellifera*) te kweken, dit vanwege de afwezigheid van bepaalde interacties tussen de microbiota en de honingbij zelf. Niet alleen *Frischella*, maar ook *Snodgrassella* is moeilijk te kweken door hun afhankelijkheid van de gastheer, ze ontwikkelen zich moeizaam zonder de specifieke verbindingen die door de gastheer of andere microbiota worden geproduceerd (Ellegaard et al., 2019; Kwong & Moran, 2016; Engel & Moran, 2013; Kešnerová et al., 2020).

Daarnaast vereisen beide genera bepaalde pH-niveaus nodig die moeilijk na te bootsen zijn op een kweekmedium, deze kunnen wel gestuurd worden met gepaste buffers. *Apibacter* vormt op zijn beurt biofilms, wat gunstig is voor hun overleving, maar de bacteriekweek bemoeilijkt. Alsook de noodzaak van specifieke koolstofbronnen en vitamines maakt het vinden van een geschikt medium moeilijk. Ook de informatie die isolatie toe zou laten ontbreekt. Verder dient de incubatietemperatuur overeen te komen met de lichaamstemperatuur van de honingbij (*Apis mellifera*), die gemiddeld rond de 35°C ligt (Ellegaard et al., 2019; Kwong & Moran, 2016; Engel & Moran, 2013; Kešnerová et al., 2020).

Het kweken en isoleren van darmmicrobiota blijft een complexe uitdaging in het microbiologisch onderzoek. Kweekmethoden hebben vaak beperkingen vanwege de specifieke en soms strikte groeicondities die bacteriën vereisen. Vaak zijn standaardmedia ontoereikend voor bacteriën die afhankelijk zijn van nauwkeurig gebalanceerde nutriënten (Xu et al., 2024).

Innovaties zoals culturomics en microfluïdische technologieën hebben ertoe geleid dat er een verbetering is in het isoleren en karakteriseren van deze bacteriën. Culturomics maakt gebruik van een breed scala aan kweekcondities en geavanceerde identificatietechnieken, zoals matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometrie (MALDI-TOF MS) en genoomsequencing, om de microbiële diversiteit beter in te kunnen kaderen. Desondanks blijven veel bacteriesoorten, zoals bijvoorbeeld obligaat anaerobe en langzaam groeiende micro-organismen, moeilijk te isoleren en te identificeren (Wan et al., 2023).

Daarnaast zijn er waarschijnlijk interbacteriële interacties die ook een mogelijke invloed hebben op kweekbaarheid. Sommige bacteriën groeien enkel in de aanwezigheid van specifieke co-factoren of andere bacteriën, dit bemoeilijkt de isolatie. Maar ook factoren als gastheer-specifieke aanpassingen en genetische diversiteit beïnvloeden de reproduceerbaarheid van kweekexperimenten (Rudi & Zhao, 2021).

2.3 Invloed van kweekmedia op MALDI-TOF MS

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is een technologie die wordt gebruikt om micro-organismen te identificeren en te classificeren. Het wordt in microbiologisch onderzoek ingezet om massaspectra te genereren van isolaten van bacteriën. Deze spectra weerspiegelen voornamelijk ribosomale eiwitten die als unieke vingerafdrukken voor elke bacteriesoort dienen (Mortier et al., 2021).

Het identificatieproces begint met het verkrijgen van massaspectra van de isolaten. Vervolgens worden deze spectra vergeleken met referentiedatabases, zoals de Bruker en de LMU_GENT DATABASE, om de bacteriesoorten te bepalen. Echter, de nauwkeurigheid van deze identificatie is afhankelijk van de volledigheid en de kwaliteit van de gebruikte database(s). Vooral bij omgevingsisolaten ontbreekt een geschikte referentie, wat leidt tot een aanzienlijk percentage niet-geïdentificeerde of foutief geïdentificeerde isolaten (Rychert, 2019).

De mate van overeenkomst tussen spectra van verschillende isolaten wordt geanalyseerd. Isolaten met sterk gelijkende spectra worden gegroepeerd, dit suggereert dat ze tot dezelfde soort behoren. De clustering maakt het mogelijk om genoomsequencing te beperken tot één of enkele representatieve isolaten per groep, dit bespaart zowel tijd alsook middelen. Groeicondities, zoals het gebruikte medium kunnen een invloed hebben op de gegenereerde massaspectra. Verschillende groeibodems kunnen leiden tot variaties in de spectra, dit bemoeilijkt de vergelijkbaarheid tussen isolaten en het aantal noodzakelijke vervolgonderzoeken kan vergroten (Rahi et al., 2016).

Bacteriën die gekweekt worden op verschillende types groeimedia, zoals agarplaten, vloeibare media en groeimedia met antibacteriële middelen, vertonen variaties in hun proteïne-expressieprofielen (Richelson et al., 2019). Lavigne et al. (2020) onderzochten hoe verschillende parameters de kwaliteit van MALDI-TOF MS beïnvloeden, het gaat hierbij over kweekmedia, incubatietijd en temperatuur. Media met een hoge concentratie aan voedingsstoffen zoals bloedagar geven betere identificaties. Verdere incubatietemperatuur bij 35°C blijkt het meest geschikt te zijn voor eiwitexpressie.

Een daling van proteïnesynthese, wat leidt tot vermindering van betrouwbare resultaten, wordt veroorzaakt door ongunstige stressoren zoals antibiotica en afwijkende pH-omstandigheden. Dit wil zeggen dat MALDI-TOF MS gevoelig is aan de fysieke toestand van bacteriën en hun metabolische activiteit. Indien de incubatietijd te kort is, zorgt dit voor een onvolledige proteïnesynthese, te lange incubatieperiodes zorgen dan weer voor de afbraak van eiwitten (Lavigne et al., 2020; Richelson et al., 2019).

Hoewel de kweekomstandigheden de eiwitexpressies beïnvloeden, blijft er wel een stabiele hoeveelheid eiwitten behouden, dit zorgt ervoor dat MALDI-TOF MS nog steeds in staat is om een betrouwbare identificatie te bieden. Tevens rust er een grote nadruk op het belang van standaardisatie van kweekprotocollen, dit verbetert de identificatienauwkeurigheid. Variaties in de kweekomstandigheden kunnen de nauwkeurigheid en haalbaarheid van de identificatie beïnvloeden, dit is voornamelijk het geval bij minder goed gekarakteriseerde bacteriën (Richelson et al., 2019; Valentine et al., 2005; Zong et al., 2016).

3 Materiaal en methode

3.1 Deelonderzoeksvragen

- Hoe beïnvloedt het toevoegen van actieve houtskool aan het voedingsmedium (all culture agar) de groei van *Gilliamella*, *Snodgrassella* en *Commensalibacter*?
- Hoe beïnvloedt het toevoegen van actieve houtskool aan het voedingsmedium (all culture agar) de MALDI-TOF massaspectra van *Gilliamella*, *Snodgrassella* en *Commensalibacter*?
- Hoe beïnvloedt het type voedingsbodem de opkweek en isolatie van *Apibacter* en *Bombella*?

3.2 Elementen en inclusie(exclusie)criteria

Voor dit onderzoek werden in totaal 23 tpeestammen gebruikt, die allen afkomstig zijn uit de BCCM/LMG bacteriënverzameling. Deze stammen behoren tot de genera *Gilliamella*, *Commensalibacter*, *Snodgrassella*, *Bombella* en *Apibacter*, die onderdeel uitmaken van de microbiota van bestuivende insecten.

De onderzochte tpeestammen zijn geïsoleerd uit verschillende gastheren: twaalf stammen kwamen uit honingbijen (*Apis mellifera*), negen uit hommels (*Bombus*), twee uit vlinders (*Papilionoidea*) en Aziatische hoornaars (*Vespa velutina*), en één stam werd eerder geïsoleerd uit fruitvliegen (*Drosophila*).

Van *Snodgrassella* werden drie tpeestammen onderzocht: *S. alvi*, *S. gandavensis* en *S. communis*. Binnen het genus *Gilliamella* zijn zes tpeestammen betrokken: *G. apicola*, *G. apis*, *G. bombi*, *G. bombicola*, *G. intestini* en *G. mensalis*. Voor *Commensalibacter* zijn de volgende vier tpeestammen bestudeerd: *C. communis*, *C. intestini*, *C. melissae* en *C. papalotli*.

De twee onderzochte tpeestammen van *Apibacter* zijn *A. adventoris* en *A. mensalis*. Tot slot werden acht tpeestammen van *Bombella* geanalyseerd: *B. pollinis*, *B. intestini*, *B. apis*, *B. favorum*, *B. mellum*, *B. dulcis*, *B. pleuderhausensis* en *B. saccharophila*.

Voor een volledig overzicht van de gebruikte tpeestammen en hun herkomst wordt verwezen naar tabel 1.

Tabel 1 (De gebruikte reeds geïsoleerde en geïdentificeerde tpeestammen die gebruikt werden, met de oorsprong van het staal.)

<i>Apis mellifera</i>	<i>Snodgrassella alvi</i>	LMG 33055T
<i>Bombus</i>	<i>Snodgrassella gandavensis</i>	LMG 30236T
<i>Bombus</i>	<i>Snodgrassella communis</i>	LMG 28360T
<i>Apis mellifera</i>	<i>Gilliamella apicola</i>	LMG 33053T
<i>Apis mellifera</i>	<i>Gilliamella apis</i>	LMG 30293T
<i>Bombus</i>	<i>Gilliamella bombi</i>	LMG 29879T
<i>Bombus</i>	<i>Gilliamella bombicola</i>	LMG 28359T
<i>Bombus</i>	<i>Gilliamella intestini</i>	LMG 28358T
<i>Bombus</i>	<i>Gilliamella mensalis</i>	LMG 29880T
<i>Bombus</i> , <i>Vespa velutina</i> , <i>Lepidoptera</i>	<i>Commensalibacter communis</i>	LMG 31819T
<i>Drosophilidae</i>	<i>Commensalibacter intestini</i>	LMG 27436T
<i>Apis mellifera</i>	<i>Commensalibacter melissae</i>	LMG 31900T
<i>Lepidoptera</i> , <i>Vespa velutina</i>	<i>Commensalibacter papalotli</i>	LMG 32512T
<i>Apis mellifera</i>	<i>Apibacter adventoris</i>	LMG 28934T
<i>Bombus</i>	<i>Apibacter mensalis</i>	LMG 28357T
<i>Apis mellifera</i>	<i>Bombella pollinis</i>	LMG 32792T
<i>Bombus</i>	<i>Bombella intestini</i>	LMG 28161T
<i>Apis mellifera</i>	<i>Bombella apis</i>	LMG 30666T
<i>Apis mellifera</i>	<i>Bombella favorum</i>	LMG 31882T
<i>Apis mellifera</i>	<i>Bombella mellum</i>	LMG 31883T
<i>Apis mellifera</i>	<i>Bombella dulcis</i>	LMG 32794T
<i>Apis mellifera</i>	<i>Bombella pleuderhausensis</i>	LMG 32791T
<i>Apis mellifera</i>	<i>Bombella saccharophila</i>	LMG 32793T

3.3 Proefopzet

Tijdens dit onderzoek werden verschillende bacteriële tpeestammen gekweekt op diverse geproduceerde kweekmedia en de bacteriële tpeestammen vervolgens te laten incuberen op de petriplaten naargelang hun optimale incubatie atmosfeer (micro-aeroob of anaeroob). Vervolgens werd er aan de hand van MALDI-TOF MS analyse een identificatie uitgevoerd, om te kijken of de keuze van medium de groei, isolatie en kwaliteit van de bekomen MALDI-TOF MS spectra beïnvloedt.

De media die in dit onderzoek worden gebruikt zijn onder andere TSABL_GZ_AN, TSABL_SDC, AC, ACC, ACC_GZ, ACC_SDC en M1056. Deze media zijn geselecteerd op basis van hun eerdere toepassing in vergelijkbare onderzoeken naar de bovengenoemde bacteriën en dienen als geschikte groeiomstandigheden voor de bestudeerde organismen. De geselecteerde media ondersteunen de groei van micro-aërobe en anaërobe bacteriën, die essentieel zijn voor het onderzoeken van deze tpeestammen. Elk medium is samengesteld om de specifieke voedingsstoffen te bevatten die nodig zijn voor de groei van deze bacteriën, waarbij de juiste voedingsstoffen, mineralen en andere factoren worden toegevoegd om de optimale groeiomstandigheden te waarborgen.

Het onderzoek werd in 2 delen onder verdeeld, er wordt onderzocht of actieve houtskool een effect heeft op de groei en de kwaliteit van de MALDI-TOF MS spectra van de tpeestammen van *Gilliamella*, *Snodgrassella* en *Commensalibacter*. Er werden drie kweekmedia gebruikt voor dit deelexperiment. All culture agar (AC) werd gekozen als breedspectrum, niet-selectief medium. In eerdere studies werd dit medium ook gebruikt voor de kweek van bacteriën van honingbij. All culture agar met 0.2% actieve houtskool (ACC) werd opgenomen om na te gaan of het toevoegen van houtskool de groei en/of de kwaliteit van de MALDI-TOF MS spectra beïnvloedt. Actieve houtskool kan toxische metabolieten, vetzuren of andere groeiremmende stoffen binden die tijdens de incubatie ontstaan of in het medium aanwezig zijn. TSA met 5% paardenbloed is een rijk medium dat wordt gebruikt om bacteriën te ondersteunen.

Anderzijds werd onderzocht hoe de verschillende voedingsbodems, verrijkt met galzouten of sodium desoxycholaat, de opkweek (kolonievorming) en isolatie (koloniemorfologie en zuiverheid) van de tpeestammen beïnvloeden. Galzouten en sodium desoxycholaat zijn selectieve componenten. Galzouten (GZ) onderdrukken de groei van galgevoelige bacteriën. Ze stimuleren de natuurlijke omstandigheden in het darmkanaal van bijen. Sodium desoxycholaat (SDC) wordt gebruikt om grampositieven te remmen. M1056 is een literatuur gebaseerd medium, het dient als referentiemedium om te vergelijken met de andere media.

De isolatie en identificatie van de verschillende tpeestammen gebeurde van 27-01-2025 tot en met 31-01-2025 en van 10-02-2025 tot en met 21-03-2025 in het labo Microbiologie van de universiteit Gent.

3.4 Dataverzameling

De identificatie van de bacteriën gebeurt door MALDI-TOF MS analyse. Er worden grafieken weergegeven met unieke eiwitprofielen, deze dienen als 'vingerafdruk' voor bacteriële identificatie. De spectra worden weergegeven als grafieken met eiwitpieken, op basis waarvan bepaald kan worden of de bacterie aanwezig is, ook wanneer visuele groei op het medium minimaal of afwezig lijkt. Moeilijk te groeien bacteriën als *Snodgrassella* en *Gilliamella* kunnen mogelijk zodanig klein zijn gegroeid dat men het niet direct kan zien met het blote oog, maar via MALDI-TOF MS analyse er toch mogelijk een aanwezigheid gedetecteerd kan worden van deze soorten. MALDI-TOF MS is een makkelijke manier om kweekmedia snel te kunnen evalueren en waarna men binnen enkele minuten de bacteriën kan identificeren. De resultaten zijn reproduceerbaar dankzij de analyse van unieke eiwitprofielen. (Dingle & Butler, 2013). Na het onderzoek kan het resultaat gegeven worden per kweekmedium en weergegeven worden of de tpeestammen al dan niet beter groeien op de kweekmedia.

Voor de verwerking en analyse van de massaspectrometrische data werd gebruikgemaakt van het softwarepakket BioNumerics (Applied Maths NV), dat een gestandaardiseerde en reproduceerbare evaluatie van de eiwitprofielen mogelijk maakt. Dit pakket wordt veelvuldig toegepast binnen de microbiële identificatie en diagnostiek.

Eerdere studies hebben aangetoond dat het gebruik van MALDI-TOF MS in combinatie met BioNumerics een hoge technische reproduceerbaarheid oplevert, met waarden tussen 96,8% en 99,4%. De biologische reproduceerbaarheid, die variatie tussen biologische replicaten meet, lag tussen 47,6% en 94,4%, wat binnen een aanvaardbare marge valt voor microbiële typering (Vranckx et al., 2017; Sparbier et al., 2012).

MALDI-TOF MS wordt in dit onderzoek ook gebruikt als evaluatiemethode voor de geschiktheid van verschillende voedingsmedia. Binnen enkele minuten kan worden vastgesteld of bepaalde tpeestammen effectief aanwezig zijn, wat deze techniek geschikt maakt voor snelle screening.

De incubatietemperatuur voor de media moet consistent zijn met de voor de bacteriën optimale temperatuur, die in dit geval 35°C bedraagt. De incubatieomstandigheden moeten nauwkeurig worden nageleefd om te zorgen voor een succesvolle groei van de bacteriën. Dit omvat ook het nauwkeurig bijhouden van de incubatieduur en het moment van bemonstering, zodat de resultaten van de experimenten representatief en reproduceerbaar zijn. De tijdsduur van de incubatie en de bemonstering moeten worden gemonitord om ervoor te zorgen dat de bacteriën voldoende tijd hebben om te groeien en zich te vermenigvuldigen onder de gestelde omstandigheden.

De recepten van de gebruikte media zijn opgenomen in bijlage 1.

3.5 Dataverwerking

De identificatie van de bacteriën gebeurt door MALDI-TOF MS analyse. Er worden grafieken weergegeven met eiwitpieken. Waarna er kan worden beschreven of de bacterie effectief gegroeid is. Moeilijk te groeien bacteriën als *Snodgrassella* en *Gilliamella* kunnen mogelijk zodanig klein zijn gegroeid dat men het niet direct kan zien met het blote oog, maar via MALDI-TOF MS analyse er toch mogelijk een aanwezigheid gedetecteerd kan worden van deze soorten. MALDI-TOF MS is een makkelijke manier om kweekmedia snel te kunnen evalueren en waarna men binnen enkele minuten de bacteriën kan identificeren. De resultaten zijn reproduceerbaar dankzij de analyse van unieke eiwitprofielen. (Dingle & Butler, 2013). Na het onderzoek kan het resultaat gegeven worden per kweekmedium en weergegeven worden of de tpeestammen al dan niet beter groeien op de kweekmedia.

Om deze massaspectrometrische data te analyseren, verwerken en interpreteren wordt gebruik gemaakt van het softwarepakket BioNumerics. Deze technologie is cruciaal binnen de microbiële identificatie, en wordt steeds vaker toegepast binnen de klinische en microbiologische diagnostiek.

4 Resultaten

4.1 Beschrijving van de elementen

In totaal werden 23 tpeestammen onderzocht, verdeeld over vijf bacteriële genera die een centrale rol spelen in het microbiom van bestuivende insecten. Deze stammen vormden de basis voor een reeks analyses die gericht waren op groeiomstandigheden, identificatiemethoden en isolatie-efficiëntie van de bacteriën. Binnen dit onderzoek werden drie deelonderzoeksvragen geformuleerd, elk gericht op een specifiek aspect van de kweek en identificatie van deze microbiota.

Tne eerste werd onderzocht hoe het toevoegen van actieve houtskool aan AC de groei van *Gilliamella*, *Snodgrassella* en *Commensalibacter* beïnvloedt. Hierbij werd gekeken naar verschil in groei/geen groei op het ACC medium in vergelijking met het AC medium.

Ten tweede werd nagegaan hoe actieve houtskool in het medium de MALDI-TOF massaspectra van deze drie genera beïnvloedt. MALDI-TOF wordt zoals eerder vermeld gebruikt voor de snelle bacteriële identificatie, maar de betrouwbaarheid van de spectra kan variëren afhankelijk van de gebruikte kweekomstandigheden.

Tot slot werd onderzocht hoe het type voedingsbodem de opkweek en isolatie van *Apibacter* en *Bombella* beïnvloedt. Aangezien deze genera vaak moeilijker te cultiveren zijn, lag de focus hier op het optimaliseren van voedingsmedia om de kweekbaarheid van deze bacteriën te verbeteren.

4.2 Invloed van actieve houtskool op de bacteriële groei en op de MALDI-TOF massaspectra van *Gilliamella*, *Snodgrassella* en *Commensalibacter*

Om de invloed van actieve houtskool op de groei van geselecteerde bacteriële stammen te beoordelen, werd het groeipatroon van *Gilliamella*, *Snodgrassella* en *Commensalibacter* vergeleken op all culture agar met en zonder toevoeging van actieve houtskool.

Naast de groei werd onderzocht of actieve houtskool in het voedingsmedium een effect heeft op de kwaliteit en reproduceerbaarheid van de MALDI-TOF massaspectra van *Gilliamella*, *Snodgrassella* en *Commensalibacter*.

4.2.1 *Gilliamella*

De eerste generatie van de tpeestammen van *Gilliamella* werden uitgeplaat op All Culture medium (AC), All Culture met 0.2% charcoal medium (ACC) en Tryptic Soy Agar met paardenbloed. De uitgeplate tpeestammen werden geïncubeerd in anaerobe condities bij 35°C. Na zeven dagen kon vastgesteld worden dat er groei is van de gebruikte tpeestammen op de drie media (tabel 3).

Tabel 2 (Resultaten groei tpeestammen *Gilliamella* generatie 1 op AC, ACC en TSABL)

Typestam	<i>G. intestini</i> LMG 28358T	<i>G. bombi</i> LMG 29879T	<i>G. mensalis</i> LMG 29880T	<i>G. bombicola</i> LMG 28359T	<i>G. apis</i> LMG 30293T	<i>G. apicola</i> LMG 33053T
AC	JA	JA	JA	JA	JA	JA
ACC	JA	JA	JA	JA	JA	JA
TSABL	JA	JA	JA	JA	JA	JA

De tweede generatie van de tpeestammen van *Gilliamella* werden overgeënt naar All Culture medium en All Culture met 0.2% charcoal medium. Ze werden anaeroob bij 35°C gedurende zeven dagen bewaard. Hierna kon vastgesteld worden dat er groei is van de gebruikte tpeestammen op de beide media (tabel 4).

Tabel 3 (Resultaten groei tpeestammen *Gilliamella* generatie 2 op AC en ACC.)

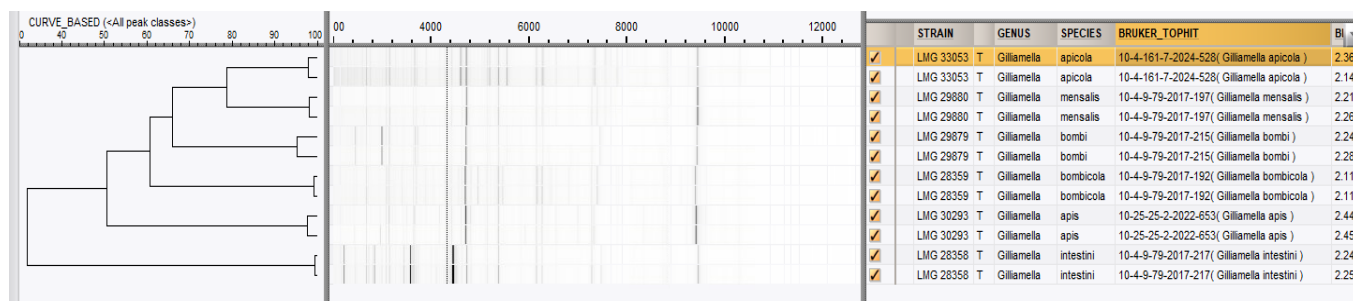
Typestam	<i>G. intestini</i> LMG 28358T	<i>G. bombi</i> LMG 29879T	<i>G. mensalis</i> LMG 29880T	<i>G. bombicola</i> LMG 28359T	<i>G. apis</i> LMG 30293T	<i>G. apicola</i> LMG 33053T
AC	JA	JA	JA	JA	JA	JA
ACC	JA	JA	JA	JA	JA	JA

De derde generatie van de tpeestammen van *Gilliamella* werden overgeënt naar All Culture medium en All Culture met 0.2% charcoal medium. Ze werden anaeroob bij 35°C gedurende zeven dagen bewaard. Hierna kon vastgesteld worden dat er groei is van de gebruikte tpeestammen op de beide media (tabel 5).

Tabel 4 (Resultaten groei tpeestammen *Gilliamella* generatie 3 op AC en ACC.)

Typestam	<i>G. intestini</i> LMG 28358T	<i>G. bombi</i> LMG 29879T	<i>G. mensalis</i> LMG 29880T	<i>G. bombicola</i> LMG 28359T	<i>G. apis</i> LMG 30293T	<i>G. apicola</i> LMG 33053T
AC	JA	JA	JA	JA	JA	JA
ACC	JA	JA	JA	JA	JA	JA

Figuur 1 toont aan dat de spectra van *Gilliamella* die gekweekt werden op AC en ACC gelijkend zijn met elkaar. Dit wijst erop dat het toevoegen van charcoal geen invloed heeft op de massaspectrometrie.



Figuur 1 (Massaspectrometrie van *Gilliamella*.)

4.2.2 *Snodgrassella*

De eerste generatie van de typestammen van *Snodgrassella* werden uitgeplaat op All Culture medium (AC), All Culture met 0.2% charcoal medium (ACC) en Tryptic Soy Agar met 5% paardenbloed. De uitgeplate typestammen werden geïncubeerd in micro-aerobe condities bij 35°C. Na zeven dagen kon vastgesteld worden dat er groei is van de gebruikte typestammen op de drie media (tabel 6).

Tabel 5 (Resultaten groei typestammen *Snodgrassella* generatie 1 op AC, ACC en TSABL.)

Typestam	<i>S. gandavensis</i> LMG 30236T	<i>S. alvi</i> LMG 33055T	<i>S. communis</i> LMG 28360T
AC	JA	JA	JA
ACC	JA	JA	JA
TSABL	JA	JA	JA

De tweede generatie van de typestammen van *Snodgrassella* werden overgeënt naar All Culture medium en All Culture met 0.2% charcoal medium. Ze werden micro-aeroob bij 35°C gedurende zeven dagen geïncubeerd. Hierna kon vastgesteld worden dat er groei is van de gebruikte typestammen op de beide media (tabel 7).

Tabel 6 (Resultaten groei typestammen *Snodgrassella* generatie 2 op AC en ACC.)

Typestam	<i>S. gandavensis</i> LMG 30236T	<i>S. alvi</i> LMG 33055T	<i>S. communis</i> LMG 28360T
AC	JA	JA	JA
ACC	JA	JA	JA

De derde generatie van de typestammen van *Snodgrassella* werden overgeënt naar All Culture medium en All Culture met 0.2% charcoal medium. Ze werden micro-aeroob bij 35°C gedurende zeven dagen geïncubeerd. Hierna kon vastgesteld worden dat er groei is van de gebruikte typestammen op de beide media (tabel 8).

Tabel 7 (Resultaten groei typestammen *Snodgrassella* generatie 3 op AC en ACC.)

Typestam	<i>S. gandavensis</i> LMG 30236T	<i>S. alvi</i> LMG 33055T	<i>S. communis</i> LMG 28360T
AC	JA	JA	JA
ACC	JA	JA	JA

Figuur 2 en figuur 3 tonen aan dat de spectra van *S. alvi* en *S. communis* die gekweekt werden op AC en ACC gelijkend zijn met elkaar. Dit wijst erop dat het toevoegen van charcoal geen invloed heeft op de massaspectrometrie. Bij *S. gandavensis* zien we dat de spectra niet gelijkend zijn met elkaar onderling tussen AC en ACC.



Figuur 2 (Massaspectrometrie van *Snodgrassella*.)



Figuur 3 (Massaspectrometrie van *Snodgrassella*.)

4.2.3 Commensalibacter

De eerste generatie van de type stammen van *Commensalibacter* werden met uitzondering van *Commensalibacter intestini* uitgeplaat op AC, ACC en TSABL. Deze werden bij 35°C micro-aeroob geïncubeerd gedurende 7 dagen. Hierna kon vastgesteld worden dat deze groeien op de drie media (tabel 9).

Commensalibacter intestini werd op AC, ACC, TSABL uitgeplaat en micro-aeroob bij 28°C geïncubeerd, alsook op M404 aeroob bij 28°C. Hierna kon vastgesteld worden dat *C. intestini* groeit op deze vier media bij 28°C.

Tabel 8 (Resultaten groei type stammen *Commensalibacter* generatie 1 op AC, ACC en TSABL micro-aeroob bij 35°C geïncubeerd.)

Typestam	<i>C. melissae</i> LMG 31900T	<i>C. papalotli</i> LMG 32512T	<i>C. communis</i> LMG 31819T	<i>C. intestini</i> LMG27436T
AC	JA	JA	JA	NEE
ACC	JA	JA	JA	NEE
TSABL	JA	JA	JA	NEE

De tweede generatie van de type stammen van *Commensalibacter* werden met uitzondering van *C. intestini* uitgeplaat op AC en ACC. Deze werden micro-aeroob bij 35°C geïncubeerd gedurende 7 dagen. Hierna kon vastgesteld worden dat met uitzondering van *C. intestini* de type stammen van *Commensalibacter* groeien op beide media (tabel 10).

Commensalibacter intestini werd overgeënt op AC, ACC en TSABL telkens micro-aeroob bij 28°C en micro-aeroob bij 35°C geïncubeerd. Hierna kon vastgesteld worden dat er geen groei waargenomen kon worden bij TSABL micro-aeroob bij 35°C, en slechts weinig groei op AC en ACC micro-aeroob bij 35°C. Op de drie media was er groei bij de type stammen die micro-aeroob bij 28°C geïncubeerd werden.

Tabel 9 (Resultaten groei type stammen *Commensalibacter* generatie 2 op AC en ACC micro-aeroob bij 35°C geïncubeerd (met uitzondering van *C. intestini*))

Typestam	<i>C. melissae</i> LMG 31900T	<i>C. papalotli</i> LMG 32512T	<i>C. communis</i> LMG 31819T
AC	JA	JA	JA
ACC	JA	JA	JA

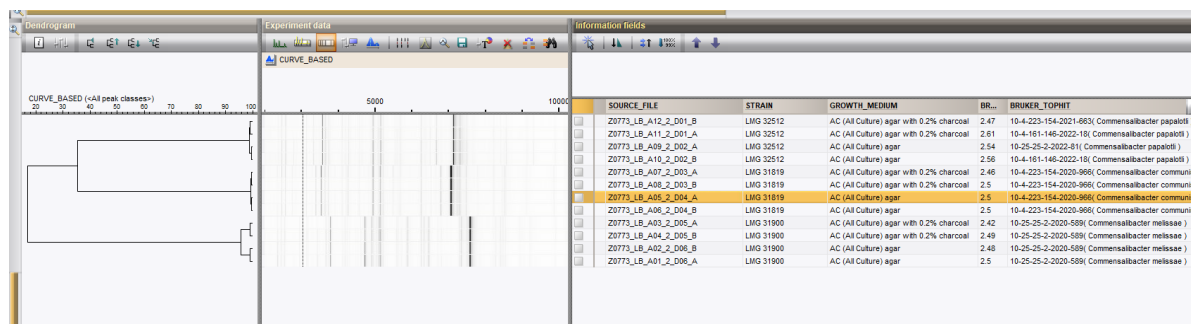
De derde generatie van de type stammen van *Commensalibacter* werden met uitzondering van *C. intestini* uitgeplaat op AC en ACC. Deze werden micro-aeroob bij 35°C geïncubeerd gedurende 7 dagen. Hierna kon vastgesteld worden dat met uitzondering van *C. intestini* de type stammen van *Commensalibacter* groeien op beide media (tabel 11).

Commensalibacter intestini werd 6 dagen langer geïncubeerd micro-aeroob bij 35°C. Hierna kon vastgesteld worden dat er geen groei is op AC, ACC en TSABL micro-aeroob bij 35°C.

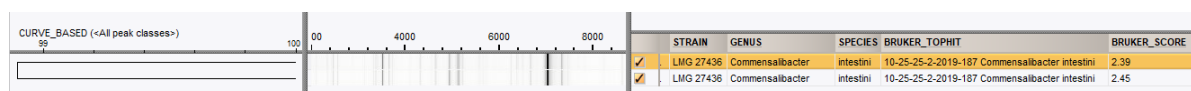
Tabel 10 (Resultaten groei type stammen *Commensalibacter* generatie 3 op AC en ACC micro-aeroob bij 35°C geïncubeerd (met uitzondering van *C. intestini*))

Typestam	<i>C. melissae</i> LMG 31900T	<i>C. papalotli</i> LMG 32512T	<i>C. communis</i> LMG 31819T
AC	JA	JA	JA
ACC	JA	JA	JA

Figuur 4 toont aan dat de spectra van *C. melissae*, *C. papalotli* en *C. communis* die gekweekt werden op AC en ACC gelijkend zijn met elkaar. Dit wijst erop dat het toevoegen van charcoal geen invloed heeft op de massaspectrometrie. Ook de spectra van *C. intestini* zijn gelijkend met elkaar (figuur 5).



Figuur 4 (Massaspectrometrie van Commensalibacter, met uitzondering van *C. intestini*.)



Figuur 5 (Massaspectrometrie van Commensalibacter intestini.)

4.3 Beïnvloeding van de opkweek en isolatie van *Apibacter* en *Bombella* door het type voedingsbodem

Voor de moeilijker te cultiveren genera *Apibacter* en *Bombella* werd nagegaan welk type voedingsbodem het meest geschikt is voor succesvolle opkweek en isolatie onder laboratoriumomstandigheden.

4.3.1 *Bombella*

De eerste generatie van de typestammen van *Bombella* werd uitgeplaat op M404 en vervolgens aeroob en micro-aeroob bij 35°C geïncubeerd. Na 7 dagen kon worden vastgesteld dat alle typestammen zowel aeroob alsook micro-aeroob bij 35°C gegroeid waren.

De tweede generatie van de typestammen van *Bombella* werd overgeënt op M404 en vervolgens micro-aeroob bij 35°C geïncubeerd. Na 7 dagen kon worden vastgesteld dat alle typestammen gegroeid waren.

De derde generatie van typestammen van *Bombella* werd overgeënt op TSABL_GZ, TSABL_SDC, ACC_GZ, ACC_SDC en M1056. Na 7 dagen kon worden vastgesteld dat alle typestammen enkel groeiden op ACC_SDC en M1056 (tabel 12).

Tabel 11 (Resultaten groei typestammen *Bombella* generatie 3 op TSABL_GZ, TSABL_SDC, ACC_GZ, ACC_SDC en M1056.)

Typestam <i>Bombella</i>	TSABL_GZ	TSABL_SDC	ACC_GZ	ACC_SDC	M1056
<i>B. dulcis</i> LMG 32794T	NEE	NEE	NEE	JA	JA
<i>B. mellum</i> LMG 31883T	NEE	NEE	NEE	JA	JA
<i>B. pleuderhausensis</i> LMG 32791T	NEE	NEE	NEE	JA	JA
<i>B. intestini</i> LMG 28161T	NEE	NEE	NEE	JA	JA
<i>B. favorum</i> LMG 31882T	NEE	NEE	NEE	JA	JA
<i>B. pollinis</i> LMG 32792	NEE	NEE	NEE	JA	JA
<i>B. apis</i> LMG 30666T	NEE	NEE	NEE	JA	JA

De vierde generatie van typestammen van *Bombella* werd overgeënt op TSABL_GZ, TSABL_SDC, ACC_GZ, ACC_SDC en M1056. Na 7 dagen kon worden vastgesteld dat alle typestammen enkel groeiden op ACC_SDC en M1056 (tabel 13).

Tabel 12 (Resultaten groei typestammen *Bombella* generatie 4 op TSABL_GZ, TSABL_SDC, ACC_GZ, ACC_SDC en M1056.)

Typestam <i>Bombella</i>	TSABL_GZ	TSABL_SDC	ACC_GZ	ACC_SDC	M1056
<i>B. dulcis</i> LMG 32794T	NEE	NEE	NEE	JA	JA
<i>B. mellum</i> LMG 31883T	NEE	NEE	NEE	JA	JA
<i>B. pleuderhausensis</i> LMG 32791T	NEE	NEE	NEE	JA	JA
<i>B. intestini</i> LMG 28161T	NEE	NEE	NEE	JA	JA
<i>B. favorum</i> LMG 31882T	NEE	NEE	NEE	JA	JA
<i>B. pollinis</i> LMG 32792	NEE	NEE	NEE	JA	JA
<i>B. apis</i> LMG 30666T	NEE	NEE	NEE	JA	JA

4.3.2 *Apibacter*

De eerste generatie van de tpeestammen van *Apibacter* werd uitgeplaat op TSABL. Deze werd vervolgens micro-aeroob bij 35°C geïncubeerd. Na 3 dagen werd vastgesteld dat er groei is van beide tpeestammen op TSABL (tabel 14).

Tabel 13 (Resultaten groei van de tpeestammen van *Apibacter* generatie 1 micro-aeroob bij 35°C geïncubeerd op TSABL.)

Typestam <i>Apibacter</i>	TSABL
MA <i>A. adventoris</i> LMG 28934T	JA
MA <i>A. mensalis</i> LMG 28357T	JA

De tweede generatie van de tpeestammen van *Apibacter* werd uitgeplaat op TSABL. Deze werd vervolgens micro-aeroob bij 35°C geïncubeerd. Na 3 dagen werd vastgesteld dat er groei is van beide tpeestammen op TSABL (tabel 15).

Tabel 14 (Resultaten groei van de tpeestammen van *Apibacter* generatie 2 micro-aeroob bij 35°C geïncubeerd op TSABL.)

Typestam <i>Apibacter</i>	TSABL
MA <i>A. adventoris</i> LMG 28934T	JA
MA <i>A. mensalis</i> LMG 28357T	JA

De derde generatie van de tpeestammen van *Apibacter* werd uitgeplaat op TSABL, TSABL_GZ, TSABL_SDC, ACC_GZ, ACC_SDC en M1056. Deze werd vervolgens micro-aeroob bij 35°C geïncubeerd. Na 3 dagen werd vastgesteld dat er groei is van beide tpeestammen op TSABL. Alle tpeestammen werden nogmaals 3 dagen verder geïncubeerd onder dezelfde omstandigheden om zeker te zijn dat er geen groei aanwezig is op andere groeimmedia (tabel 16).

Tabel 16 (Resultaten groei van de tpeestammen van *Apibacter* generatie 3 na een incubatieperiode van 3 dagen, micro-aeroob bij 35°C op TSABL, TSABL_GZ, TSABL_SDC, ACC_GZ, ACC_SDC en M1056.)

Typestam <i>Apibacter</i>	TSABL	TSABL_G Z	TSABL_SD C	ACC_G Z	ACC_SD C	M1056
<i>A. adventoris</i> LMG 28934T	JA	NEE	NEE	NEE	NEE	NEE
<i>A. mensalis</i> LMG 28357T	JA	NEE	NEE	NEE	NEE	NEE

De derde generatie van de tpeestammen van *Apibacter* werd verder geïncubeerd, na 6 dagen kon worden vastgesteld dat de beide tpeestammen van *Apibacter* op TSABL en TSABL_SDC groeien (tabel 17).

Tabel 17 (Resultaten groei *Apibacter* generatie 3 na een incubatieperiode van 6 dagen, micro-aeroob bij 35°C op TSABL, TSABL_GZ, TSABL_SDC, ACC_GZ, ACC_SDC en M1056.)

Typestam <i>Apibacter</i>	TSABL	TSABL_GZ	TSABL_SD C	ACC_GZ	ACC_SDC	M1056
<i>A. adventoris</i> LMG 28934T	JA	NEE	JA	NEE	NEE	NEE
<i>A. mensalis</i> LMG 28357T	JA	NEE	JA	NEE	NEE	NEE

5 Discussie en algemeen besluit

5.1 Discussie

5.1.1 Interpretatie en verklaring van de resultaten

De resultaten tonen aan dat het groeipatroon van de onderzochte bacteriële tpeestammen sterk beïnvloed wordt door zowel het type kweekmedium als de incubatieomstandigheden. Bij de tpeestammen van *Gilliamella* werd consistente groei vastgesteld op zowel AC als ACC en TSABL, wat bevestigt dat deze bacteriën groeien onder micro-aerobe condities. Het toevoegen van charcoal beïnvloedt de massaspectrometrie niet bij *Gilliamella*.

Voor *Snodgrassella* was er ook consistente groei onder micro-aerobe condities op de drie geteste media. Over het algemeen kwamen de MALDI-TOF MS spectra overeen, echter viel bij *S. gandavensis* op dat er verschillen waren tussen de spectra op AC en ACC, wat erop kan wijzen dat deze stam gevoeliger is voor de samenstelling van het medium.

Daarnaast bevestigt de studie van Richelson et al. (2019) dat de keuze van groeimedum de eiwitexpressie beïnvloedt, wat belangrijk is voor de betrouwbaarheid van MALDI-TOF MS. In dit onderzoek werd dit effect enkel significant waargenomen bij *S. gandavensis*, wat suggereert dat sommige stammen gevoeliger zijn aan omgevingsstressoren of nutriëntsamenstelling.

De resultaten zijn in lijn met de bevindingen uit bestaande literatuur. *Gilliamella* en *Snodgrassella* behoren tot het kernmicrobioom van honingbijen en zijn aangepast aan zuurstofarme niches (Kwong & Moran, 2016; Zheng et al., 2019). Dat verklaart hun succesvolle groei onder micro-aerobe condities en op voedzame media.

Commensalibacter toonde variaties: *C. intestini* bleek enkel te groeien bij 28°C, terwijl andere soorten binnen dit genus groeiden bij 35°C. de bevinding onderstreept het belang van temperatuurgevoeligheid bij de opkweek van bepaalde stammen. De spectra blijven wel gelijkend, temperatuur beïnvloedt vooral de groei en dus niet noodzakelijk de eiwitexpressie.

De temperatuurspecifieke groei van *C. intestini* wordt ondersteunt door onderzoek van Ellegaard & Engel (2019), die erop wijzen dat stammen van andere insecten (zoals fruitvliegen) andere fysiologische behoeften kunnen hebben, waaronder een lagere optimale temperatuur.

De groei van *Bombella* en *Apibacter* was media-afhankelijk. Beide genera groeide enkel op specifieke media, namelijk ACC_SDC en M1056 voor *Bombella* en TSABL en TSABL_SDC voor *Apibacter*. Dit bevestigt dat deze bacteriën specifieke groeifactoren of een selectieve omgeving nodig hebben om te kunnen groeien. De afwezigheid van groei op andere media toont dat standaardmedia niet toereikend zijn voor minder robuuste bacteriën.

De selectieve groei van *Bombella* op M1056 en ACC_SDC weerspiegelt bevindingen van Kešnerová et al. (2020), waarin werd aangetoond dat *Bombella*-soorten sterk afhankelijk zijn van specifieke suikers, zuren en aminozuren die niet in elk medium beschikbaar zijn.

Ook *Apibacter* vereist een specifieke omgeving om zich te ontwikkelen, wat in lijn ligt met de beperkte informatie over deze bacterie en haar moeilijkheid om geïsoleerd te worden uit het darmkanaal (Engel & Moran, 2013).

5.1.2 Kritische kijk op de methodiek

Hoewel de resultaten waardevolle inzichten opleveren, zijn er verschillende beperkingen. De evaluatie van bacteriegroei werd hoofdzakelijk kwalitatief uitgevoerd (JA/NEE), zonder kwantitatieve metingen van koloniedichtheid of groei-intensiteit.

Ook werd er geen rekening gehouden met eventuele co-culturen of bacteriële interacties, die mogelijk de groei of eiwitexpressie beïnvloeden. De invloed van factoren zoals pH, incubatieduur, en pre-incubatiecondities werd niet systematisch geëvalueerd.

5.1.3 Suggesties of aanbevelingen voor verder onderzoek of praktijkvertaling

Toekomstige studies zouden zich moeten richten op een meer gestandaardiseerde en kwantitatieve benadering van groei-evaluatie. Het gebruik van gecontroleerde fermentoren en geautomatiseerde groeicurves kan helpen om nauwkeuriger data te verzamelen. Verder onderzoek naar de metabole profielen van *Bombella* en *Apibacter* kan leiden tot meer gerichte samenstellingen van selectieve media.

Daarnaast verdient het aanbeveling om de MALDI-TOF MS databanken uit te breiden met spectra van omgevingsisolaten en darmbacteriën van honingbijen, om de betrouwbaarheid van de identificatie te verhogen.

Op praktijkniveau kunnen deze inzichten bijdragen aan het optimaliseren van diagnostiek in bijengezondheid, waarbij het correct en reproduceerbaar isoleren van darmbacteriën essentieel is voor monitoring, onderzoek en behandeling van microbiële verstoringen bij bijenpopulaties.

5.2 Algemeen besluit

Het doel van dit onderzoek was het optimaliseren van de kweek van bacteriën uit het darmmicrobioom van honingbijen via aangepaste kweekmedia, met het oog op een betere isolatie en identificatie via MALDI-TOF MS. De resultaten tonen aan dat elk bacteriegenus specifieke vereisten heeft qua medium en incubatiecondities.

Gilliamella kan worden geïsoleerd op ACC en voor MALDI-TOF MS analyse uit te voeren kan overgeschakeld worden naar AC. De spectra van AC en ACC liggen bij *Gilliamella* niet altijd bij elkaar na uitvoering van MALDI-TOF MS analyse, hier dient dus rekening mee gehouden te worden bij de interpretatie van de resultaten.

Commensalibacter kan worden geïsoleerd op ACC en voor MALDI-TOF MS analyse uit te voeren kan men AC gebruiken, met uitzondering van *Commensalibacter intestini*. *Commensalibacter intestini* vertoont weinig tot geen groei onder microaerobe condities bij 35°C. De eerste en tweede generatie tonen een voorkeur voor 28°C, dit suggereert dat 28°C de optimale groeitemperatuur is voor *Commensalibacter intestini*. Deze kunnen dus op ACC geïsoleerd worden bij 28°C en MALDI-TOF MS analyse uitvoeren op AC. Bij de spectra van *Commensalibacter* is er gelijkheid tussen de spectra op AC en de spectra op ACC.

Snodgrassella kan worden geïsoleerd op ACC en voor MALDI-TOF MS analyse uit te voeren kan overgeschakeld worden naar AC. Bij de spectra van *Snodgrassella* is er gelijkheid tussen de spectra op AC en de spectra op ACC. Bij LMG30236 vertonen de spectra minder gelijkheid, wel liggen ze bij elkaar.

Deze bevindingen beantwoorden de onderzoeksvraag volledig en sluiten nauw aan bij de literatuur. Ze leveren waardevolle informatie voor het verbeteren van de standaardisatie in bacteriële opkweek en identificatie, zowel in onderzoek als in de praktijk. Hiermee wordt een belangrijke bijdrage geleverd aan het begrijpen en bewaken van de gezondheid van honingbijen in een tijd waarin hun overleving steeds meer onder druk staat.

6 Bijlagen

6.1 Bijlage 1: receptuur kweekmedia:

AC (all culture medium)

- 20g/l tryptose
- 3g/l beef extract
- 3g/l yeast extract
- 3g/l malt extract
- 5g/l dextrose
- 0.2g/l ascorbic acid
- 15g/l bacteriological agar

ACC (all culture medium met 0.2% charcoal)

- 20g/l tryptose
- 3g/l beef extract
- 3g/l yeast extract
- 3g/l malt extract
- 5g/l dextrose
- 0.2g/l ascorbic acid
- 15g/l bacteriological agar
- 2g/l activated charcoal

ACC_GZ (all culture medium met 0.2% charcoal en galzouten)

- 20g/l tryptose
- 3g/l beef extract
- 3g/l yeast extract
- 3g/l malt extract
- 5g/l dextrose
- 0.2g/l ascorbic acid
- 15g/l bacteriological agar
- 2g/l activated charcoal
- 1g/l sorbic acid
- 5g/l galzouten

ACC_SDC (all culture medium met 0.2% charcoal en sodiumdesoxycholaat)

- 20g/l tryptose
- 3g/l beef extract
- 3g/l yeast extract
- 3g/l malt extract
- 5g/l dextrose
- 0.2g/l ascorbic acid
- 15g/l bacteriological agar
- 2g/l activated charcoal
- 1g/l sorbic acid
- 4g/l sodium desoxycholaat (SDC)

TSABL

- 40g/l TSA
- 50 ml/l horse blood

TSABL_GZ

- 40g/l TSA
- 50ml/l horse blood
- 5g/l galzouten

TSABL_SDC

- 40g/l TSA
- 50 ml/l horse blood
- 2g/l sodium desoxycholaat (SDC)

M1056

- 10g peptone
- 8g beef extract
- 4g yeast extract
- 20g glucose
- 2g K₂PO₄
- 1ml Sorbitan mono-oleate (tween 80)
- 5g sodium acetate
- 2g Tri-ammonium citrate
- 0.2g MgSO₄·7H₂O
- 0.05g MgSO₄·4H₂O
- 15g bacteriological agar
- Na sterilisatie 20g steriele fructose toevoegen

M404

- 50g/l glucose
- 10g/l yeast extract
- 15g/l agar

7 Bronvermelding

Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229). <https://doi.org/10.1126/science.1255957>

Engel, P., Martinson, V. G., & Moran, N. A. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27), 11002-11007.

Raymann, K., & Moran, N. A. (2018). The role of gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers (*Apis mellifera*). *Current Opinion in Insect Science*, 26, 97-104.

Engel, P., Kwong, W. K., McFrederick, Q., Anderson, K. E., Barribeau, S. M., Chandler, J. A., Cornman, R. S., Dainat, J., De Miranda, J. R., Doublet, V., Emery, O., Evans, J. D., Farinelli, L., Flenniken, M. L., Granberg, F., Grasis, J. A., Gauthier, L., Hayer, J., Koch, H., . . . Dainat, B. (2016). The Bee Microbiome: Impact on Bee Health and Model for Evolution and Ecology of Host-Microbe Interactions. *mBio*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.02164-15>

Raymann, K., Shaffer, Z., & Moran, N. A. (2017). Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees (*Apis mellifera*). *PLoS Biology*, 15(3), e2001861. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001861>

Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, 14(6), 374–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.43>

Engel, P., Bartlett, K. D., & Moran, N. A. (2016). The bacterium *Frischella perrara* causes scab formation in the gut of its honeybee host. *mBio*, 7(2), e00193-16.

Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, 14(6), 374-384.

Raymann, K., Shaffer, Z., & Moran, N. A. (2017). Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS Biology*, 15(3), e2001861.

Motta, E. V., Raymann, K., & Moran, N. A. (2018). *Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(41), 10305-10310.

Zheng, H., Powell, J. E., Steele, M. I., Dietrich, C., & Moran, N. A. (2019). Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(12), 5143-5148.

Motta, E. V., & Moran, N. A. (2020). Impact of glyphosate on the honey bee gut microbiota: A review. *Journal of Applied Microbiology*, 129(6), 1541-1550.

Kešnerová, L., Emery, O., Troilo, M., Erkosar, B., & Engel, P. (2020). Gut microbiota structure differs between honeybees and bumblebees despite convergence in functional genes. *Nature Communications*, 11(1), 1-12.

Ellegaard, K. M., & Engel, P. (2019). New reference genome sequences for 17 bacterial strains of the honey bee gut microbiota. *Pacific Biosciences*.

Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, 14(6), 374–384.

Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735.

Lavigne, J. P., Vandenbussche, M., & Pignard, M. (2020). Influence of culture conditions on the performance of MALDI-TOF MS in the identification of bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(8), e00714-20.

Richelson, A. S., Richards, M., & Gant, V. (2019). The impact of growth conditions on bacterial protein profiles and MALDI-TOF MS identification. *Journal of Microbiological Methods*, 162, 10-16.

Zong, Y., Zhang, W., & Li, Y. (2016). Influence of growth media on MALDI-TOF MS analysis of bacterial species: A study of clinical isolates. *Journal of Microbiological Methods*, 129, 44-49.

Valentine, N., Wunschel, S., Wunschel, D., Petersen, C., & Wahl, K. (2005). Effect of Culture Conditions on Microorganism Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Applied And Environmental Microbiology*, 71(1), 58–64.
<https://doi.org/10.1128/aem.71.1.58-64.2005>

Dingle, T. C., & Butler-Wu, S. M. (2013). MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. *Clinical Laboratory Medicine*, 33(3), 589-607.
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2013.03.001>

Xu, M., Pan, F., Peng, L., & Yang, Y. (2024). Advances in the isolation, cultivation, and identification of gut microbes. *Military Medical Research*, 11(1).
<https://doi.org/10.1186/s40779-024-00534-7>

Wan, X., Yang, Q., Wang, X., Bai, Y., & Liu, Z. (2023). Isolation and Cultivation of Human Gut Microorganisms: A Review. *Micro-organisms*, 11(4), 1080.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11041080>

Rudi, K., & Zhao, L. (2021). Grand challenges in understanding gut microbes. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.752829>

Ellegaard, K. M., & Engel, P. (2019). Genomic diversity landscape of the honey bee gut microbiota. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08303-0>

Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E., & Spector, T. D. (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*, k2179. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>

Mortier, T., Wieme, A. D., Vandamme, P. & Waegeman, W. (2021). Bacterial species identification using MALDI-TOF mass spectrometry and machine learning techniques: A large-scale benchmarking study. *Computational And Structural Biotechnology Journal*, 19, 6157-6168. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.11.004>

Rychert, J. (2019). Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. <https://www.infectiologyjournal.com/public/articles/benefits-and-limitations-of-malдитof-mass-spectrometry-for-the-identification-of-microorganisms.html>

Zautner, A. E., Groß, U., & Rohde, M. (2020). *MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology: Identification of bacteria and beyond*. *Future Microbiology*, 15(5), 317–329.
<https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0001>

Klammsteiner, T., Wagner, A. O., Insam, H., & Ertl, T. (2023). *Optimizing growth media for insect-associated gut microbiota: A cultivation approach*. Journal of Insect Microbiology, 45(2), 123–137. <https://doi.org/10.1016/j.jinsmic.2023.01.005>

Rahi, P., Prakash, O., & Shouche, Y. S. (2016). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Microbial Identifications: Challenges and Scopes for Microbial Ecologists. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01359>

Vranckx, K., De Bruyne, K., & Pot, B. (2017). Analysis of MALDI-TOF MS spectra using the BioNumerics software. In D. Sengupta & A. K. Singh (Eds.), *MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology* (pp. 539–562). Springer.

Vandeputte, D., Falony, G., Vieira-Silva, S., Tito, R. Y., Joossens, M., & Raes, J. (2017). Prebiotic inulin-type fructans induce specific changes in the human gut microbiota. *Gut*, 66(11), 1968–1974. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313271>