

# Mikrobiota včel a prostředí jejich chovu

Vojtěch Vrba

---

Bakalářská práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Vojtěch Vrba**  
Osobní číslo: **T21191**  
Studijní program: **B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin**  
Specializace: **Potravinářské biotechnologie a aplikovaná mikrobiologie**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Mikrobiota včel a prostředí jejich chovu**

## Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši zaměřenou na výskyt mikroorganismů u včel a v prostředí jejich chovu.
- 2) Odeberte vzorky včel a z prostředí jejich chovu a proveďte u nich mikrobiologickou analýzu.
- 3) Vybrané izoláty charakterizujte dostupnými metodami.
- 4) Výsledky vyhodnoťte, diskutujte a formulujte závěry práce.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- NGUYEN, P.N., REHAN, S.M. Environmental effects on bee microbiota. *Microbial Ecology*, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02226-6>
- XIONG, Z.R., SOGIN, J.H., WOROBO, R.W. Microbiome analysis of raw honey reveals important factors influencing the bacterial and fungal communities. *Frontiers in Microbiology*, 13:1099522. 2023
- PAVLOVIĆ, J., SCLOCCHI, M.C. et al. The microbiome of candle beeswax drops on ancient manuscripts. *International Biodegradation & Biodegradation*, 174: 105482: 2022
- FRIEDLE, C., D'ALVISE, P. et al. Changes of microorganism composition in fresh and stored bee pollen from Southern Germany. *Environmental Science and Pollution Research*, 28: 47251-47261. 2021
- Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně

Vedoucí bakalářské práce: **prof. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2024**

Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 6. února 2024

## PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## ABSTRAKT

Tato práce si klade za cíl přinést přehlednou literární rešerši na téma výskytu mikroorganismů u včely medonosné a vybraných včelích produktů. Zároveň toto téma zpracovává i praktickou formou. Při tvorbě praktické části byly paralelně využity tradiční kultivační přístupy a moderní metagenomická analýza pro získání přesných a dostatečných výsledků. Kultivačně bylo izolováno a později identifikováno celkem 25 bakteriálních druhů spadajících převážně do řádu *Enterobacterales*, *Caryophanales* a *Pseudomonadales*. Tyto bakterie však nevytváří jádrový mikrobiom včel. Důležitým faktem je, že se ve vzorcích včel metagenomickou analýzou podařilo identifikovat čeledi, které standardně včelí mikrobiom tvoří. Dále byla provedena metagenomická analýza mateří kašičky, která ukázala přítomnost čeledí *Lactobacillaceae* a *Acetobacteraceae* i přes její inhibiční účinky. U vzorků larev byla prokázána značná heterogenita ve složení jejich mikrobiomu.

Klíčová slova: včela medonosná, mikrobiom, včelí larva, pyl, mateří kašička, identifikace mikroorganismů, PCR, sekvenace

## ABSTRACT

This thesis aims to provide a clear literature review on the topic of the occurrence of microorganisms in the honeybee and selected bee products, while also applying a practical approach to the topic. The practical part integrates traditional cultivation approaches and modern metagenomic analysis to obtain accurate and sufficient results. Cultivation resulted in the isolation and subsequent identification of a total of 25 bacterial species, mainly belonging to the orders *Enterobacterales*, *Caryophanales*, and *Pseudomonadales*. However, these bacteria do not constitute the core microbiome of bees. Importantly, metagenomic analysis of bee samples successfully identified families that typically form the bee microbiome. Additionally, a metagenomic analysis of the royal jelly was performed, revealing the presence of the families *Lactobacillaceae* and *Acetobacteraceae* despite its inhibitory effects. As for larval samples, considerable heterogeneity in the composition of larval microbiomes was observed.

Keywords: honeybee, microbiome, honeybee larva, bee bread, royal jelly, identification of microorganisms, PCR, sequencing

Velké poděkování patří vedoucí mé práce paní prof. RNDr. Leoně Buňkové Ph.D. za možnost zpracovávat tak zajímavé téma a za cenné rady, ochotu a trpělivost. Zároveň bych chtěl poděkovat paním laborantkám Ing. Veronice Kučabové a Mgr. Markétě Havlišťové za pomoc při práci na praktické části bakalářské práce.

Poděkování patří také mé rodině a přítelkyni za podporu během celého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 VČELA MEDONOSNÁ</b> .....	<b>11</b>
1.1 PŮVOD VČELY MEDONOSNÉ .....	11
1.2 BIOLOGIE VČELY MEDONOSNÉ .....	12
1.2.1 Anatomie gastrointestinálního traktu .....	12
1.3 VČELSTVO A JEHO SLOŽKY .....	13
1.3.1 Plod .....	13
1.3.2 Matka.....	13
1.3.3 Dělnice .....	14
1.3.4 Trubci .....	14
1.4 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH MINORITNÍCH VČELÍCH PRODUKTŮ .....	14
1.4.1 Mateří kašička .....	15
1.4.2 Pyl .....	15
<b>2 MIKROBIOM</b> .....	<b>17</b>
2.1 MIKROBIOM VČELY MEDONOSNÉ .....	17
2.1.1 Mikrobiom gastrointestinálního traktu dospělé včely medonosné.....	17
2.1.2 Vývoj mikrobiomu během života včely .....	19
2.1.3 Mikrobiom včelí matky.....	19
2.1.4 Změny mikrobiomu v průběhu sezóny .....	20
2.1.5 Změny mikrobiomu působením člověka.....	20
2.2 VČELÍ PROBIOTICKÉ BAKTERIE.....	21
2.3 MIKROBIOM VYBRANÝCH VČELÍCH PRODUKTŮ .....	22
2.3.1 Mikrobiom mateří kašičky .....	22
2.3.2 Mikrobiom pylu .....	22
<b>3 ZÁVAŽNÁ ONEMOCNĚNÍ VČELY MEDONOSNÉ</b> .....	<b>24</b>
3.1 VIROVÁ ONEMOCNĚNÍ.....	24
3.2 BAKTERIÁLNÍ ONEMOCNĚNÍ .....	25
3.2.1 Hniloba včelího plodu (European foulbrood) .....	25
3.2.2 Mor včelího plodu (American foulbrood).....	26
3.3 HOUBOVÁ ONEMOCNĚNÍ .....	26
3.3.1 Nosemóza (nosemosis).....	27
3.3.2 Zvápenatění (chalk brood) a zkamenění (stone brood) včelího plodu .....	27
<b>4 REZISTENCE BAKTERIÍ K ANTIBIOTIKŮM</b> .....	<b>28</b>
4.1 ZÁKLADNÍ MECHANISMY ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE.....	28
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>29</b>
<b>5 CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>30</b>

<b>6</b>	<b>MATERIÁL</b> .....	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>METODY A POSTUP</b> .....	<b>33</b>
7.1	ODBĚR VZORKŮ.....	33
7.2	STANOVENÍ CFU/G VZORKU A IZOLACE ČISTÝCH KMENŮ .....	34
7.3	IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ POMOCÍ METODY MALDI-TOF MS .....	36
7.4	IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ POMOCÍ SANGEROVA SEKVENOVÁNÍ.....	36
7.5	DISKOVÁ DIFÚZNÍ METODA PRO ZJIŠTĚNÍ REZISTENCE K ATB.....	39
7.6	PŘÍPRAVA KNIHOVNY PRO NGS .....	40
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>44</b>
8.1	STANOVENÍ CFU/G VZORKU A IZOLACE ČISTÝCH KMENŮ .....	44
8.2	IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ POMOCÍ METODY MALDI-TOF MS A SANGEROVA SEKVENOVÁNÍ .....	47
8.3	DISKOVÁ DIFÚZNÍ METODA PRO ZJIŠTĚNÍ REZISTENCE K ATB .....	52
8.4	VÝSLEDKY SEKVENOVÁNÍ NGS .....	54
	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>60</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>61</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>70</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>73</b>
	<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>74</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....	<b>75</b>



## ÚVOD

V posledních letech, kdy dochází k obrovskému rozvoji sekvenčních analýz, jejich větší dostupnosti a výtěžnosti dat, se značně rozvíjí průzkum mikrobiomů různých živočichů včetně člověka. Jsou hledány zákonitosti a mechanismy působení vztahu mikrobiom – hostitel, popřípadě to, jak mikrobiom ovlivňuje podmínky vnějšího okolí. Nejinak je tomu i u včely medonosné, která patří mezi velmi cenný hmyz díky svým schopnostem opylovače. Rozvíjí se možnosti pozitivního ovlivnění mikrobiomu tak, aby včelám poskytoval vyšší ochranu především před patogenními mikroorganismy, kterým včely čelí čím dál častěji a dochází tak ke značným ztrátám včelstev. Ovlivnění mikrobiomu by mohlo vést i k vyšší odolnosti včel vůči pesticidům a chemickým látkám obecně, nebo by se mohla zvýšit odolnost vůči náhlým změnám počasí, které včelaře trápí v posledních letech i v našich oblastech.

Tyto aspekty by v budoucnu mohla pomoci zlepšit dobře definovaná a popsána včelí probiotika, která by byla do včel externě dodávána. Již nyní je možné setkat se na trhu s takovými produkty, nicméně v široké včelařské veřejnosti jim zatím není věnována přílišná pozornost. Před masovým nasazením takových přípravků je třeba zvážit i některá negativa, která s sebou mohou tyto doplňky včelí stravy nést a to především rozdílné složení mikrobiomu larev a dospělých včel, kdy mohou některé bakterie vhodné pro dospělé včely negativně ovlivňovat larvální stádia. Dalším problémem je značná konzervovanost mikrobiomu dospělé včely, kdy se složení ani zastoupení mikroorganismů příliš nemění a probiotika by nemusela mít požadovanou účinnost.

I přes tyto problémy se však jeví využití dobře definovaných bakteriálních kmenů jako jeden z nejlepších způsobů, jak včely více chránit před změnami prostředí a uchovat si tak jejich důležité služby, které každoročně tento hmyz plní.

Cílem praktické části práce byla identifikace a popis především bakteriálních skupin přítomných ve vzorcích včel, larev, pylu a mateří kašičky, a to za použití tradičních kultivačních metod s následnou identifikací, tak i metod založených na metagenomické analýze, které umožňují popsat celý mikrobiom jako celek pouze na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti DNA daného druhu nebo skupiny. Teoretická část je zaměřena na výskyt mikroorganismů ve včelím společenstvu včetně těch patogenních a zároveň popisuje některé základní pojmy charakterizující včelu medonosnou.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 VČELA MEDONOSNÁ

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je blanokřídlý hmyz s proměnou dokonalou, který je člověkem využíván tisíce let pro produkci medu, vosku a dalších včelích produktů. Archeologické nálezy dokazují, že byly včely chovány již před 4500 lety v oblasti Egypta a Řecka, nicméně existují i důkazy o chovech mnohem starších [1]. Kromě tvorby těchto produktů hraje včela společně s dalším hmyzem a živočichy zásadní roli při opylování rostlin a tedy udržení rovnováhy ekosystému a zachování biodiverzity. Této problematice je v posledních letech věnována velká pozornost, vzhledem k celosvětovému úbytku hmyzu. Populace chovaných včel jsou sice považovány za poměrně stabilní, nicméně se v současné době objevuje stále více faktorů, které je ohrožují [2]. Mezi ně patří především nešetrné používání pesticidů, dále ztráta přirozených stanovišť, změna klimatu a v neposlední řadě značný tlak parazitů (*Varroa destructor*) a patogenních mikroorganismů.

### 1.1 Původ včely medonosné

Původem včel se zabývají dvě hypotézy lišící se místem vzniku tohoto hmyzu [1]. Jako tradiční je označována teorie o vzniku včel v Asii. Důkazem je pak množství ostatních druhů kromě *Apis mellifera*, které se vyskytují výhradně zde [1, 3]. Rod *Apis* v současné době zahrnuje 9 druhů, z nichž 8 je původních pouze pro různé oblasti Asie a pouze *Apis mellifera* se dle teorie rozšířila dále do Afriky a Evropy.

Druhou hypotézou je africký původ včely. Tato teorie je podpořena četnými genetickými studiemi, kdy byly analyzovány genetické markery [3], na jejichž základě byly pak vytvořeny fylogenetické stromy, které svědčí o přítomnosti předka včely právě v Africe.

Druh *Apis mellifera* je v současné době rozdělen na 33 poddruhů, které se vyskytují v Evropě (13 poddruhů), západní Asii (9 poddruhů) a Africe (11 poddruhů) [3]. Pro Českou republiku je původní poddruh *Apis mellifera mellifera* nazývaný také jako včela tmavá [1]. V čisté podobě je tento poddruh však již vzácností a v populaci se častěji vyskytují kříženci tohoto poddruhu se včelou kraňskou (*Apis mellifera carnica*). Včela kraňská je ceněna pro své vlastnosti – především mírnou povahu, rychlý jarní rozvoj včelstev a dobré využití rozptýlených snůšek, proto v České republice v současné době převládá.

## 1.2 Biologie včely medonosné

Tělo včely je děleno, podobně jako u ostatního hmyzu, na tři základní segmenty – hlavu, hrud' a zadeček [1]. Dominantní částí hlavy jsou složené oči, které se skládají z velkého počtu drobných komorových oček, což včelám umožňuje schopnost dobrého prostorového vnímání [4]. Tyto vlastnosti jsou důležité pro orientaci mimo úl a hledání potravy. Dalším smyslovým orgánem umístěným na hlavě jsou tykadla s komunikační funkcí [5]. Na hlavě se kromě výše zmíněných orgánů nachází ještě kusadla a sosák sloužící především pro získávání a sběr potravy nebo krmení včelí matky a larev. Pro hrud' je typická přítomnost orgánů pohybu – končetin a křídel. Včely mají dva páry křídel, která se však za letu spojují pomocí háčků na předním páru a vytváří tak celistvý útvar [6]. Tři páry kráčivých končetin slouží pak především k přichycení k povrchu pomocí drobných háčků, ale také pro pohyb v úlu [1]. Třetí pár se od dvou předchozích značně odlišuje a slouží pro ukládání pylu při sběru. Zadeček včely tvoří značnou část těla a u jednotlivých kast se liší především přítomností žihadla. Žihadlo vzniklo vývojem z kladélka a je tedy přítomno pouze u samic. Včelí matka používá žihadlo převážně ke kladení vajíček, zatímco dělnicím slouží výhradně k obraně [7]. Typickou strukturou žihadla jsou tzv. vratizoubky (zpětné háčky), které zabraňují snadnému odstranění žihadla po bodnutí [7].

### 1.2.1 Anatomie gastrointestinálního traktu

Tělo včely je tvořeno řadou vysoce specializovaných orgánů, z nichž se skládají orgánové soustavy. Z mikrobiologického pohledu má největší význam gastrointestinální trakt, kde dochází k trávení potravy a je osídlen řadou symbiotických mikroorganismů.

Trávicí trubici včely lze rozdělit na několik segmentů. Přední část tvoří ústa, hltan, jícen, dále medné volátko (předžaludek), které se podílí na ukládání nektaru a jeho zpracování na med, a česlo oddělující přední a střední část [8]. Střední část trubice tvoří pravý žaludek (mezenteron), kde dochází k trávení potravy. Stěny žaludku jsou schopny vylučovat trávicí enzymy potřebné pro katabolismus bílkovin, sacharidů i tuků a zároveň vstřebávat tyto živiny [1, 9]. Od zadní části trubice je žaludek oddělen pylorickou chlopní. Zadní část je složena ze střeva a výkalového váčku. Ve střevě dochází především díky jeho velkému povrchu ke vstřebávání živin, které nebyly vstřebány dříve v žaludku. Poté nestrávené zbytky potravy pokračují do výkalového váčku, kde se hromadí do doby, než dojde k defekaci mimo úl [9]. V případě zimního období se takto mohou váčky plnit i několik

měsíců. Tento způsob vyprazdňování má za cíl především omezit výskyt patogenů přímo v úlu a snížit tak možné riziko šíření onemocnění.

### 1.3 Včelstvo a jeho složky

Včela medonosná je typická tvorbou mohutných kolonií čítajících desetitisíce jedinců, kdy každý z nich má svůj význam a své úkoly, které ve společenstvu plní. Každého z jedinců lze zařadit do některé ze tří kast. V běžném včelstvu se během letního období nachází jedna včelí matka, několik desítek tisíc včelích dělnic (počet se může velmi výrazně lišit mezi jednotlivými včelstvy a zároveň je značně závislý na klimatických podmínkách daného roku) a trubci v počtu stovek až nižších tisíců [10]. Jednotlivé kasty včel se odlišují, společným znakem je postupný vývoj z vajíčka, přes larvu a kuklu, po dospělce.

#### 1.3.1 Plod

Jako včelí plod lze označit vývojová stádia včely před vylíhnutím dospělce. Pro plod je zásadní poměrně vysoká a stabilní teplota po celou dobu vývoje (32 – 36 °C). Prvním stádiem je vajíčko nakladené včelí matkou. Toto stádium trvá u všech kast stejnou dobu a to tři dny [11]. Matky a dělnice se vyvíjí z oplozených vajíček, trubci pak z neoplozených [12]. Délka stádia larvy se u jednotlivých kast liší. Během tohoto období jsou larvy intenzivně krmeny. Larvy včelích matek po celou dobu přijímají mateří kašičku, larvy dělnic a trubců zpočátku dělničí kašičku (stejně složení, ale jiný poměr látek oproti mateří kašičce), poté jsou krmeny směsí této kašičky s pylem a medem [12]. Po zakuklení je každá plodová buňka v plástu překryta voskovým víčkem, které produkují dělnice. Metamorfóza trvá opět u různých kast různou dobu. Nejkratší je u včelí matky, dále následují dělnice a nejdelší je paradoxně u trubců [1].

#### 1.3.2 Matka

Včelí matka vzniká z oplozeného vajíčka a její somatické buňky jsou diploidní. Morfologicky se značně odlišuje od dělnic i trubců především svou velikostí. Hlavním úkolem včelích matek je reprodukce a udržování počtu včel v kolonii. Zpravidla se jedná o jedinou plodnou samici v úlu, která je rozmnožování schopna. Od ostatních kast se liší i mnohem větší délkou života, kdy se běžně dožívá 2 let, vzácně pak i mnohem vyššího věku (až 8 let) [13]. Zásadní roli hraje matka také pro soudržnost včelstva a komunikaci.

Ta je zprostředkována pomocí feromonů (obsaženy v sekretech žláz), které se potravou šíří mezi ostatní včely [1].

### 1.3.3 Dělnice

Dělnice se stejně jako matky líhnou z oplozených vajíček, nicméně u nich dochází k zakrnění vaječnicků a nejsou tedy schopny rozmnožování. Dělnice plní řadu zásadních úkolů pro fungování společenství. Jejich činnosti se mění postupem času, kdy mladušky (mladé včely) zůstávají v úlu a čistí buňky, krmí larvy, staví včelí dílo, zpracovávají přinesenou potravu, víčkují plod, stráží úl a podílí se na termoregulaci úlu. Poté se z nich stávají létavky, které již vyhledávají a sbírají potravu mimo úl [10].

Délka života dělnic se zásadně liší v závislosti na ročním období. Tzv. letní včely zajišťující rozvoj včelstva během letních měsíců a přípravy na zimní období žijí podstatně kratší dobu. Jejich průměrná délka života se pohybuje v rozmezí 25 – 40 dnů. Zimní včely vyskytující se v úlu v chladnějších měsících jsou schopny přežít až 250 dnů a jsou zásadní pro jarní rozvoj včelstva [10].

### 1.3.4 Trubci

Trubci jsou plodní samci včely medonosné. Líhnou se z neoplozených vajíček a jejich somatické buňky tedy obsahují pouze jednu sadu chromozomů. Trubci nemají žihadlo a jejich hlavním úkolem je oplození matky při snubním letu. Za tímto účelem opouštějí úl a putují na vzdálená trubčí shromaždiště. Zpravidla tedy dochází k oplození matky jiného včelstva, čímž je zabezpečena genetická variabilita [1]. Kromě toho hrají trubci důležitou roli při termoregulaci plodového tělesa, kdy mají vyšší účinnost tvorby tepla než dělnice [14]. Obecně lze však trubce považovat za značnou zátěž pro včelstvo a proto je jejich počet ve společenství poměrně nízký a odvíjí se od aktuální snůšky a vnějších faktorů.

## 1.4 Charakteristika vybraných minoritních včelích produktů

Mezi základní a všeobecně známé včelí produkty patří med a vosk. Ty jsou člověkem využívány již tisíce let. V poslední době ovšem stoupá povědomí i o ostatních včelích produktech, které lze využívat jako doplňky stravy nebo v kosmetice. Z minoritních včelích produktů lze jmenovat především mateří kašičku, pyl, propolis a včelí jed [14]. Vzhledem k zaměření praktické části práce bude největší pozornost věnována prvním dvěma zmíněným produktům.

### 1.4.1 Mateří kašička

Mateří kašička je sekretem hltanových žláz mladých dělnic včely medonosné a jedná se o velmi bohatý zdroj látek, které jsou důležité pro vývoj včelí matky. Tato kašovitá hmota má zpravidla bílou nebo lehce nažloutlou barvu a poměrně vysokou viskozitu [14]. Pro mateří kašičku je typické pH v rozmezí 3,6 – 4,2 [15]. Její složení je v čase značně proměnné a hodnoty uvedené v tabulce 1 mají velké rozpětí.

Tabulka 1: Složení mateří kašičky [15]

Složení	Obsah [%]
Voda	60 – 70
Proteiny	9 – 18
Sacharidy	10 – 16
Lipoidní látky	3 – 8
Ostatní	1 – 2

Jednotlivé skupiny látek lze dále dělit dle chemické povahy. Hlavními proteiny mateří kašičky jsou MRJPs (Major royal jelly proteins) 1 – 9, z nichž jsou nejvýznamnější MRJPs 1 – 5. Tyto proteiny obsahují esenciální aminokyseliny (AMK) v dostatečném množství pro vývoj larev a zároveň některé disponují značnou antimikrobní aktivitou (kapitola 2.3.1 Mikrobiom mateří kašičky) [15, 16].

Ze sacharidů se v mateří kašičce vyskytují především monosacharidy fruktóza a glukóza. Kromě těchto dvou základních mohou být přítomny v podstatně menším množství sacharóza, maltóza a ribóza [14].

Látky tukové povahy jsou pro mateří kašičku velmi specifické. Velká většina mastných kyselin se vyskytuje ve volné formě (až 90 %) [14] a patří sem řada neobvyklých mastných kyselin se 6 – 12 uhlíky. Nejvýznamnější mastnou kyselinou je 10-HDA (kyselina 10-hydroxy-2-decenová) [16], která je prekurzorem feromonálních látek. Mezi další přítomné lipoidní složky se řadí neutrální lipidy, steroly, vosky a fosfolipidy [14].

Mezi ostatní složky pak patří především minerální látky a vitaminy skupiny B [14].

### 1.4.2 Pyl

Pyl je pro včelstvo zásadním zdrojem výživy a poskytuje především proteiny, vitaminy a minerální látky. Pyl je sbírán dělnicemi z hmyzosprašných rostlin a spotřeba pylu

se ve včelstvu pohybuje v nižších desítkách kilogramů za rok [14]. Po sběru je pyl ve formě hrudek (rouskový pyl) uložen do buněk včelího plástu, utlačen a překryt tenkou vrstvou medu (pyl perga). V takto uskladněném pylu poté probíhají biochemické děje prostřednictvím nativních enzymů pylu, enzymů dodaných včelami i přítomného mikrobiomu, které mají za výsledek konzervaci pylu a možnost jeho využití až během zimy a jara [14, 17].

Chemické složení pylu je stejně jako u mateří kašičky značně proměnlivé a odvíjí se především od jeho původu (tabulka 2). Podobným rysem je také poměrně nízké pH, jehož přibližná hodnota se pohybuje kolem 4,4 [17].

Tabulka 2: Složení čerstvého pylu [14]

Složení	Obsah [%]
Voda	25 – 30
Proteiny a volné AMK	7,5 – 35
Sacharidy	1 – 37
Lipoidní látky	1 – 20
Minerální látky	1 – 20
Ostatní	5 – 7

Aminokyselinové složení pylu je značně bohaté a zpravidla obsahuje všechny pro člověka esenciální AMK [17], nicméně do značné míry závisí i na zdroji pylu. Mezi důležité látky proteinové povahy se řadí také enzymy.

Především jako zdroj energie slouží přítomné mono-, di- a oligosacharidy (fruktóza, glukóza, trehalóza, melecitóza a rafinóza) a různé nasycené i nenasycené mastné kyseliny (palmitová, myristová, linolová, olejová, linolenová a arachidonová) [14, 17].

Z minerálních látek obsažených v pylu lze jmenovat K, P, Ca, Mg, Fe, Na, Zn, Mn a celou řadu prvků stopových. Mezi ostatní významné látky patří především organické kyseliny (glukonová, mravenčí, mléčná, octová), vitaminy (E, C, skupina B) a fenolické látky [17].



## 2 MIKROBIOM

Mikrobiom lze definovat jako společenství mikroorganismů žijících ve stejném čase na stejném místě. Mezi těmito mikroorganismy mohou zároveň panovat různé vztahy. Zpravidla se jedná o konsorcium komenzálních, symbiotických a patogenních mikroorganismů vyskytujících se v živém nebo abiotickém systému či prostředí [18]. V případě mikrobiomu vyskytujícího se na povrchu těla nebo v těle živého makroorganismu se dále připojuje interakce typu mikrobiom – hostitel.

### 2.1 Mikrobiom včely medonosné

Mikrobiom včely medonosné lze rozdělit především dle lokalizace na mikroorganismy vyskytující se v gastrointestinálním traktu (GIT) a mikrobiom povrchu těla. Lépe prozkoumaný a poznáný je mikrobiom střevní, zatímco povrchu těla bylo dosud věnováno menší množství studií [19]. Složení především střevního mikrobiomu je poměrně stálé a značně nezávislé na zeměpisné poloze.

Hlavními úlohami mikrobiomu je podíl na metabolismu některých živin a tvorbě některých vitaminů, dále se účastní hospodaření s energií a je součástí imunitního systému včely, kdy přirozeně se vyskytující mikroorganismy často zabraňují infikování patogeny [20].

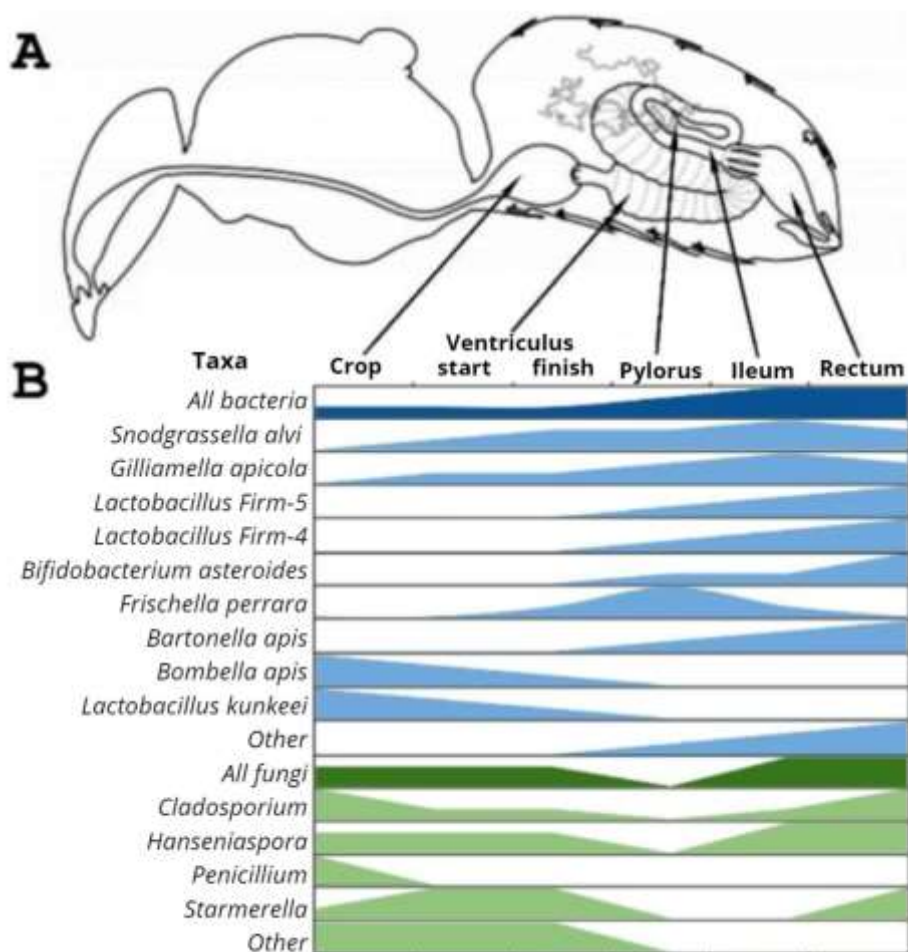
#### 2.1.1 Mikrobiom gastrointestinálního traktu dospělé včely medonosné

Většina mikroorganismů obývajících zažívací trakt včely medonosné tvoří bakterie, plísně a kvasinky. Druhové složení se však značně liší v jednotlivých částech GITu (obrázek 1). Zároveň lze říci, že včela medonosná je modelovým organismem právě pro výzkum střevního mikrobiomu [19], který se do jisté míry podobá tomu savčímu [20]. Je však poněkud jednodušší.

Střevo dospělé včely medonosné obsahuje asi  $10^9$  bakteriálních buněk [21], z nichž více než 95 % lze zařadit do devíti skupin [20]. V největší míře jsou přítomny *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, *Lactobacillus* Firm-4, *Lactobacillus* Firm-5 a *Bifidobacterium asteroides*. Z bakterií s nižším zastoupením lze jmenovat *Frischella perrara*, *Bartonella apis*, *Bombella apis* a *Apilactobacillus kunkeei*. [19]. Do skupiny *Lactobacillus* Firm-4 lze pak zařadit *Bombilactobacillus mellis* a *Bombilactobacillus mellifer*, do skupiny *Lactobacillus* Firm-5 *Lactobacillus apis*, *Lactobacillus helsingborgensis*, *Lactobacillus melliventris*, *Lactobacillus kimbladii* a *Lactobacillus kullabergensis* [22]. Z dalších uváděných bakterií lze jmenovat rody *Commensalibacter* a *Apibacter* [20].

Zastoupení jednotlivých druhů kolísá v závislosti na části gastrointestinálního traktu. Tato skutečnost je vyjádřena na obrázku 1. Obecně lze říci, že většina bakteriálních druhů se vyskytuje v zadní části trávicí trubice. Výjimku tvoří *Apilactobacillus kunkeei* a *Bombella apis*, které osidlují přední část GITu, konkrétně medné volátko. Žaludek zpravidla žádný stálý mikrobiom neobsahuje [20]. Ostatní druhy se vyskytují ve střevě a rektu.

Eukaryotický mikrobiom byl doposud méně prozkoumaný, nicméně byly popsány některé rody, které jsou ze včel pravidelně izolovány [23]. Z těchto rodů lze jmenovat *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Vairimorpha* [23], *Cladosporium*, *Hanseniaspora*, *Starmerella* [19], *Saccharomyces* a *Candida* [24]. Obecně je však na eukaryotický mikrobiom kladen menší důraz i vzhledem k tomu, že tvoří pouze asi 1 % celkového mikrobiomu včel [24].



Obrázek 1: Výskyt mikroorganismů v jednotlivých částech GITu včely [19]

### 2.1.2 Vývoj mikrobiomu během života včely

Mikrobiom larválních stádií včely medonosné je oproti dospělcům méně prozkoumaný, nicméně jsou prokázány značné odlišnosti oproti složení mikrobiomu dospělých včel. Odlišnosti souvisí pravděpodobně s rozdílnou stavbou gastrointestinálního traktu larev, který je značně redukován a jednodušší [25]. Zároveň je střevo larev vhodným místem pro osídlení patogenními mikroorganismy a včely se jim tedy musí bránit určitými antimikrobními mechanismy. Jedním z těchto mechanismů je i přirozený mikrobiom, který zabraňuje rozvoji patogenů.

Nejrozšířenější skupiny bakterií vyskytující se ve střevě larev patří do skupin *Bacillota* a *Gammaproteobacteria*, z méně zastoupených skupin lze pak jmenovat *Actinomycetota* a *Bacteroidota* [25]. Typický je výskyt některých druhů mikrobiomu dospělých včel, nicméně v mnohem menším zastoupení.

Složení mikrobiomu larev však nemá pravděpodobně velký význam na složení střevního mikrobiomu dospělců vzhledem k tomu, že dochází při zakuklení a metamorfóze k destrukci většiny bakterií, které se vyskytovaly v larvách [26]. Po vylíhnutí nemá mladá včela zpravidla žádný stálý mikrobiom a získává ho postupně během života interakcemi s ostatními včelami ve společenstvu. Tento mechanismus zajišťuje přenos mikrobiomu mezi jednotlivými generacemi. Zvláštností je, že mikrobiom larvy lze snadno ovlivnit zaočkováním určitých mikroorganismů, zatímco mikrobiom dospělců vykazuje podstatně stálejší složení a nelze ho ovlivnit tak snadno [26].

### 2.1.3 Mikrobiom včelí matky

Mikrobiom včelích matek se od mikrobiomu dělnic značně odlišuje především počtem bakteriálních druhů, které jsou stabilně přítomny. Ve vzorcích včelích matek se pravidelně vyskytují druhy *Bombella apis*, *Commensalibacter* sp., *Apilactobacillus kunkeei* a *Lactobacillus apis* [27] a tvoří více než 50 % mikrobiomu. Kromě těchto druhů se u včelích matek vyskytovali i další zástupci čeledí *Lactobacillaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Orbaceae* a *Enterobacteriaceae*.

Mikrobiom matek se v čase proměňuje. U mladých matek je možné detekovat bakterie skupin Alpha 2.1 *Acetobacteraceae*, *Caulobacteraceae*, *Hyphomicrobiales* a *Gilliamella apicola*, které se postupem času zcela vytrácejí a jsou nahrazeny výše uvedenými bakteriemi. Zároveň se liší mikrobiom starších slábnoucích včelích matek [28]. Existuje také spojitost mezi mikrobiomem matek a jejich dlouhověkostí [29].

#### 2.1.4 Změny mikrobiomu v průběhu sezóny

Jak bylo již zmíněno v kapitole 2.1 (Mikrobiom včely medonosné), zastoupení jednotlivých skupin mikroorganismů je poměrně stálé a neměnné i v průběhu roku. Nicméně k určitým odlišnostem dochází vzhledem ke způsobu života tzv. zimních včel. Tyto včely jsou dlouhověké a zároveň musí výkaly zadržovat po celou zimu a k vyprázdnění dochází až na jaře mimo úl. To může mít zásadní vliv na složení mikrobiomu gastrointestinálního traktu těchto včel [30]. Značný vliv na minoritní bakteriální skupiny může mít i přijímaná strava, která se mezi letními a zimními včelami také liší. Tomu odpovídá i zjištění, že nejvyšší diverzita střevního mikrobiomu je na jaře, nižší pak během léta a zimy, kdy převládají určité základní skupiny bakterií, ale ty jsou přítomny ve vyšších počtech [31]. Při sledování zástupců tzv. jádrového mikrobiomu bylo zjištěno, že v zimním období je přítomno desetkrát až stokrát více bakterií ve vzorcích oproti včelám letním [30]. Jednalo se o zástupce skupin *Lactobacillus* Firm-4, *Lactobacillus* Firm-5, *Bifidobacterium* a *Bartonella*. Změny mikrobiomu v čase byly popsány tak, že na začátku sezóny a na jejím konci jsou mikrobiomy včel velmi podobné a liší se pouze v období intenzivní medové a pylové snůšky [32]. Vývoj mikrobiomu včely medonosné lze tedy popsat jako uzavřený cyklus, ve kterém se shoduje počáteční a koncový stav bez ohledu na průběh sezóny.

Jednou z hlavních příčin změny mikrobiomu v průběhu roku je strava. Včely v letním období spotřebovávají zejména nektar, zatímco pyl slouží především pro výživu larev. Zimní včely konzumují i pylové zásoby uložené v plástech a dochází u nich ke zvýšení hmotnosti střeva. Bylo dokázáno, že tato skutečnost koreluje s vyšší bakteriální zátěží ve střevě [30]. Díky pylu mohou také snadněji kolonizovat střevo některé rody bakterií jako je *Bartonella* nebo *Frischella* [30]. Zároveň bylo dokázáno, že na složení mikrobiomu nemá přílišný vliv lokalizace včelího stanoviště a z tohoto pohledu jsou základní bakteriální druhy stabilní [32].

#### 2.1.5 Změny mikrobiomu působením člověka

Vzhledem k současným negativním vlivům na včelstva po celém světě se začíná klást důraz na výzkum mechanismů, kterými tyto vlivy působí, a bylo zjištěno, že řada z nich může ovlivňovat střevní mikrobiom včel. Těmito vlivy jsou především změna klimatu a s ní související změna skladby dostupné potravy, dále pak vliv zemědělské činnosti, pesticidů a jiných chemických látek toxických nejen pro včely [33].

Současné zemědělství zaměřené zpravidla na několik málo plodin je typické rozsáhlými monokulturními poli. Je zde velmi nízká diverzita rostlin a tedy i zdrojů potravy, což ovlivňuje mimo jiné i střevní mikrobiom včel [34] a je pozorován nárůst nežádoucích mikroorganismů za současného úbytku těch přirozených. V zemědělských oblastech je také velkým problémem aplikace pro hmyz toxických pesticidů, které ovlivňují i střevní mikrobiom. Zpravidla nastává opět pokles některých zástupců jádrového mikrobiomu (především u rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* [35]). Zásadními faktory míry intenzity těchto změn je především koncentrace, toxicita, doba působení pesticidu a souběh ostatních stresových faktorů [35]. Pokud jsou však dávky pesticidu nízké a dochází spíše k nízké chronické expozici, nemusí ovlivnění základních bakteriálních skupin tvořící mikrobiom nastat [36].

## 2.2 Včelí probiotické bakterie

Předpokládá se, že zavedením vhodných probiotických kultur do včelstva by mělo dojít ke snížení rizika rozvoje patogenních mikroorganismů a celkově tak zvýšit odolnost včelstev zvláště při nepříznivých klimatických obdobích a tlaku stran chemických látek a jiných vlivů na včelí společenstva. Před samotným zavedením probiotik je však nutné prozkoumat mikrobiom včel i v různých vývojových stádiích. To by umožnilo sestavit probiotika tak, aby odpovídala konkrétnímu vývojovému stádiu včely [37] a poskytla odpovídající účinek zejména ve formě ochrany před patogeny.

Významnou skupinou probiotických bakterií jsou bakterie mléčného kvašení (BMK), které gastrointestinální trakt včel osidlují přirozeně (kapitola 2.1.1 Mikrobiom gastrointestinálního traktu dospělé včely medonosné). Bakteriální rody, které by mohly mít probiotické vlastnosti, jsou zpravidla izolovány přímo ze včel, jejich prostředí, nebo jejich potenciální potravy (květy rostlin). Jako nejúčinnější bakteriální druhy s probiotickými vlastnostmi byly určeny *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus casei* [38], dále pak *Lactobacillus apis*, *Lactobacillus panisapium*, *Lactobacillus melliventris* [39] a někteří zástupci rodu *Bifidobacterium* [40]. Bakteriální kmeny označené jako probiotické musí splňovat přísná kritéria. V případě včelích probiotik se hodnotí přežití mikroorganismů v zažívacím traktu, cytotoxicita, citlivost k antibiotikům a antibiotická rezistence, inhibiční účinek vůči patogenům, bezpečnost pro dospělé včely i larvální stádia nebo schopnost přežití bakterií v cukerných

sirupech, kterými jsou aplikovány [38, 39]. Účinnost byla prokázána i u závažných včelích patogenů jakými jsou *Paenibacillus larvae* nebo *Vairimorpha apis* [40].

Některé kmeny *Bacillus subtilis* s probiotickým potenciálem pak působí inhibičně na další patogenní mikroorganismus *Ascospaera apis* [41].

### 2.3 Mikrobiom vybraných včelích produktů

Včelí produkty disponují zpravidla značnými antimikrobními vlastnostmi, které často brání rozvoji nežádoucích mikroorganismů a tyto produkty jsou tak konzervovány. V některých případech jsou člověkem využívány právě pro tyto své vlastnosti.

#### 2.3.1 Mikrobiom mateří kašičky

Na mikrobiom samotné mateří kašičky není kladen důraz právě pro její schopnost inhibovat řadu patogenních i nepatogenních mikroorganismů. Pro tyto své vlastnosti je ceněna a využívána jako doplněk stravy, v kosmetice a farmacii. Její antimikrobní a antioxidační vlastnosti jsou dány řadou látek, z nichž lze jmenovat především proteiny (MRJP1, MRJP2, MRJP3 a MRJP4) [42], peptidy (royalisin, jelleiny I – III) narušující integritu cytoplasmatické membrány mikroorganismů [43] a mastná kyselina 10-HDA. Fenolické látky pak působí především antioxidačně [43].

Mateří kašička má vyšší inhibiční účinek v případě grampozitivních bakterií [44], kdy inhibuje i patogeny jako jsou *Staphylococcus aureus* (včetně MRSA [45]), [44], dále pak *Cutibacterium acnes* a *Staphylococcus epidermidis* [45]. Z gramnegativních bakterií lze pak zmínit *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella pneumoniae* [44]. Z hlediska včel samotných má mateří kašička význam především při inhibici *Paenibacillus larvae* prostřednictvím její proteinové složky [46] i kyseliny 10-HDA [47], jejichž účinek byl proti tomuto patogenu prokázán. Určitou ochranu poskytuje tedy i larvám v raných fázích jejich vývoje.

#### 2.3.2 Mikrobiom pylu

Pyl sbíraný včelami pochází z vnějšího prostředí a může tedy nést značnou mikrobiální zátěž podobně jako jiné rostlinné produkty. Je proto poměrně obtížné popsat mikrobiom tohoto pylu, nicméně bylo pozorováno, že po sběru dochází u pylu ke značným změnám složení mikrobiomu. Pyl při sběru obsahuje především nežádoucí bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, *Microbacteriaceae* a *Pseudomonadaceae* [48]. Tyto bakterie jsou

však po uložení pylu do plástů inhibovány bakteriemi, které se běžně u včel vyskytují – bakteriemi jádrového mikrobiomu a jinými BMK [49]. Jedná se především o *Apilactobacillus kunkeei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Fructobacillus fructosus*, *Levilactobacillus brevis*, *Companilactobacillus crustorum* a *Lactobacillus delbrueckii* [50], dále jsou pak přítomny rody *Bombella* (čeleď *Acetobacteraceae*), *Snodgrassella* (čeleď *Neisseriaceae*), *Frischella* a *Gilliamella* (čeleď *Orbaceae*) [48, 49]. Zároveň lze říct, že složení mikroorganismů pylu uloženého v plástech je do značné míry konzervované a nezávislé na zdroji pylu [51]. Pro pyl je typická přítomnost hub – plísní a kvasinek. Kvasinky mají především pozitivní význam, kdy rostou společně s bakteriemi a pyl svými metabolity konzervují [52]. Jedná se především o osmotolerantní kvasinky (např. rod *Zygosaccharomyces* [53]) schopné v tomto prostředí přežít. Jejich životaschopnost je zároveň vyšší než u BMK [52]. Mezi plísně, které jsou často z pylu izolovány, lze zařadit rody *Cladosporium*, *Penicillium* a *Alternaria* [54]. Zároveň jsou v některých případech izolovány i jiné rody, což pravděpodobně souvisí s kontaminací prostředí.

Antimikrobní aktivita pylu je založena především na nízkém pH (produkce organických kyselin bakteriemi mléčného kvašení) a snížení aktivity vody pod přijatelnou úroveň pro řadu mikroorganismů [52]. Při enzymatických procesech také vzniká peroxid vodíku (enzym glukózooxidáza), který má schopnost inhibovat některé nežádoucí mikroorganismy [55]. Po určité době však dochází i k poklesu životaschopnosti žádoucích bakterií [52].

### 3 ZÁVAŽNÁ ONEMOCNĚNÍ VČELY MEDONOSNÉ

Zdravotní stav včely a včelstva je ovlivňován řadou faktorů, které zpravidla působí navzájem a dochází tak ke značným změnám ve včelstvu. Mezi tyto faktory lze zařadit klimatické podmínky, sílu včelstva, genetickou výbavu, podmínky chovu a zásahy včelaře a vliv některých parazitů [56]. Hlavním faktorem pak ale zůstává samotná přítomnost patogenních mikroorganismů ve včelstvu a jejich schopnost ve vhodných podmínkách vyvolat onemocnění.

Z hlediska původců onemocnění lze nemoci rozdělit na virové, bakteriální a houbové. Mimo tyto kategorie stojí onemocnění varroóza, kterou způsobuje parazit kleštík včelí (*Varroa destructor*). Na včelstvo zpravidla působí jako oslabující faktor a záleží tedy na míře napadení včel. Jeho nebezpečnost spočívá ve vylučování proteinů při sání hemolymfy, které jsou toxické především pro larvy [57], dále pak může *Varroa destructor* sloužit jako vektor pro přenos řady nákaz [57, 58] a je dokázán jeho negativní vliv na přezimování včelstev. Pro kontrolu tohoto onemocnění je zcela zásadní monitoring [59] a pravidelné využívání veterinárních přípravků pro snížení počtu roztočů.

#### 3.1 Virová onemocnění

V současné době bylo popsáno obrovské množství virů, které jsou ve včelách přítomny. Řada z nich se na včelstvu neprojeví zásadním způsobem a mohou tak se včelami koexistovat. Problém nastává u některých závažnějších virových onemocnění, ta mohou působit značné ztráty včelstev [60]. Mezi původce těchto onemocnění patří RNA viry, tj. virus deformovaných křídel – DWV (čeleď *Iflaviridae*). Jedná se o nejrozšířenější virus včel a vyskytuje se ve čtyřech variantách DWV-A – DWV-D [61]. Křídla takto postižených včel nejsou vyvinuta a tyto včely brzy hynou. Dále lze jmenovat virus chronické paralýzy včel – CPV (čeleď *Iflaviridae*) a virus akutní paralýzy včel – APV (čeleď *Dicistroviridae*) způsobující paralýzu, třes a omezení pohybu včel. Tyto včely nejsou schopny letu a zpravidla samovolně lezou mimo úl, kde později hynou [56, 60]. Posledním zmíněným je virus pytlíčkovitosti plodu – SBV (čeleď *Iflaviridae*) způsobující úhyn larev. Napadené larvy ztrácejí schopnost svlékat kutikulu a nemohou se ani zakuklit. Dělnice uhynulé larvy odnáší mimo úl, což je jeden z typických symptomů [62].

Přenos včelích virů probíhá zpravidla fekálně-orální cestou, kdy jsou viry hojně vylučovány výkaly. Následuje uvolnění virů do prostředí, kde se může při sběru potravy nebo vody nakazit jiná včela. Závažným problémem jsou také průjmová onemocnění,



kdy včely kálí uvnitř úlu a k rozvoji virů může tak docházet intenzivněji [63]. Dalším mechanismem je výše zmíněný přenos (kapitola 3 Závažná onemocnění včely medonosné) pomocí vektoru (nejčastěji *Varroa destructor*). Zároveň je možný přenos některých virů i formou včelích produktů v rámci úlu, kdy mají větší vliv kontaminované produkty pro výživu včel (pyl a med) než vosk [64].

Detekce virů je založena na metodě RT-PCR [65], kdy je RNA virů reverzní transkripcí převedena do molekuly cDNA a ta je v PCR reakci poté amplifikována za použití specifických primerů. Přítomnost očekávaného produktu na agarózovém gelu pak svědčí o přítomnosti viru. Další možností je využití RT-qPCR [66], která probíhá obdobně jako RT-PCR, nicméně produkt je detekován už během reakce pomocí fluorescenčního barviva. Tyto metody lze pak kombinovat se sekvenační analýzou pro úplný a přesný popis viru.

## 3.2 Bakteriální onemocnění

Z bakteriálních onemocnění lze jmenovat především hnilobu včelího plodu (European foulbrood) a mor včelího plodu (American foulbrood) [56]. Tato onemocnění jsou velmi závažná a pro včelstvo často fatální. Vzhledem k povaze nemocí je nejlepším opatřením především prevence a důsledné dodržování zásad čistoty chovu včel.

### 3.2.1 Hniloba včelího plodu (European foulbrood)

Toto celosvětově rozšířené onemocnění způsobuje bakterie *Melissococcus plutonius* [67], která napadá larvy v plástu. Pro toto onemocnění je typická přítomnost sekundárních patogenů, jako jsou *Paenibacillus alvei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* nebo *Brevibacillus laterosporus* [56, 68].

Pokud jsou tyto patogeny přítomny, nastává u larev střevní infekce, která vede k úhynu larvy během čtvrtého až sedmého dne vývoje. Během tohoto procesu dochází ke změně barvy larev od fyziologické bílé, přes žlutou až po hnědou [69]. Poté dochází k tvorbě příškvaru (hnědé kašovitě hmoty). Toto stádium lze v případě většího napadení snadno zpozorovat. Postižený úl často zapáchá [67]. Léčba se v rámci Evropské unie neprovádí a napadená včelstva musí být zlikvidována, zatímco v USA je pro léčbu počátečních fází nemoci povoleno antibiotikum oxytetracyklin. Problémem je však často pouhé zakrytí klinických příznaků a návrat nemoci nebo vznik kmenů rezistentních tomuto antibiotiku [68].

Detekce *Melissococcus plutonius* se dříve prováděla pomocí kultivace na půdě KSBHI (BHI s přísadkou  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a rozpustného škrobu) po dobu 48 h při 37 °C. Následoval výběr typických kolonií a jejich konfirmace pomocí Gramova barvení a PCR detekce [70]. V dnešní době je však již hojně využívaná samotná technika PCR a qPCR pro amplifikaci specifického úseku genomu *Melissococcus plutonius* a tedy jeho průkazu [71].

### 3.2.2 Mor včelího plodu (American foulbrood)

Mor včelího plodu je nejzávažnějším onemocněním, které i v našich podmínkách často likviduje včelstva. Původcem je gram pozitivní sporulující bakterie *Paenibacillus larvae*, jejíž endospory jsou velmi odolné vůči teplotě i ostatním vlivům.

Rozvoj onemocnění zpravidla nastává po pozření endospor larvou, kdy dochází k jejich vyklíčení ve střevě larvy a dalšímu dělení vegetativních bakteriálních buněk [72]. Larva poté hyne a dochází k hnilobnému procesu, který je při masivnějším napadení doprovázen zápachem a tvorbou tzv. příškvaru na dně buňky [56]. Při odstraňování uhynulých larev a čištění buněk dělnicemi zpravidla dochází k přenosu a šíření infekce v rámci úlu, ale i mimo něj při sběru pylu a nektaru [73]. Léčba se stejně jako v případě hniloby včelího plodu v rámci Evropské unie neprovádí. Postižená včelstva jsou utracena a stanoviště řádně sanitováno.

Detekce *Paenibacillus larvae* je zpravidla založena na kultivačních metodách, kdy se stanovuje jako běžné sporulující bakterie tj. přípravou výchozí suspenze z odebraného vzorku a jejím zahřátím na 80 °C po dobu 10 minut pro inaktivaci vegetativních forem buněk [74]. Následuje příprava desítkové řady a vyočkování na tuhé půdy s častým využitím MYPGP agaru (Mueller Hinton bujón, kvasničný extrakt, pyruvát sodný, glukóza,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , a agar) [75]. Kultivace probíhá pak při 37 °C po dobu 48 h [74, 75]. Zároveň lze v současné době využít značně rychlejší metody založené na detekci pomocí qPCR [74] popsané výše.

### 3.3 Houbová onemocnění

Houbová onemocnění jsou zpravidla poměrně závažná, nicméně lze jim do značné míry předcházet správnými zákroky včelaře. Zároveň lze u těchto onemocnění provádět terapii, která zpravidla spočívá v radikálních opatřeních, jako je odstranění a likvidace veškerého plodu a tzv. přemetení na mezistěny, nicméně při včasném zásahu nedochází ke ztrátě včelstva jako takového [56].

### 3.3.1 Nosemóza (nosemosis)

Toto onemocnění způsobují dva zástupci kmene *Microsporidia* a to *Vairimorpha apis* (dříve *Nosema apis* [76]) a *Vairimorpha ceranae* (dříve *Nosema ceranae* [77]). U hub došlo k výrazné změně taxonomie a ve starší, ale i současné literatuře jsou často uváděny starší již nesprávné názvy.

Průběh onemocnění zahrnuje vstup patogenu do těla a jeho usazení ve střevě dospělých včel. Tam parazituje na buňkách střeva a poškozuje je, což má za následek deformaci trávicí trubice, postupnou ztrátu schopnosti trávení a vstřebávání živin a nakonec úhyn napadené včely [78]. Typickým příznakem je pak kálení uvnitř úlu a v jeho blízkosti, kdy tak dochází ještě k většímu zesílení nákazy [56].

Diagnostika je založena na světelné mikroskopii, kdy se stanovuje počet spor ve vypreparované trávicí trubici. Zároveň lze také s určitými odchylkami odlišit spory *Vairimorpha apis* a *Vairimorpha ceranae* [79]. Další možností je pak využití klasické PCR se specifickými primery nebo qPCR [80].

### 3.3.2 Zvápenatění (chalk brood) a zkamenění (stone brood) včelího plodu

Tato onemocnění jsou pojmenována podle svých typických příznaků, kdy napadené a uhynulé larvy připomínají drobné hrudky vápna popřípadě malé kamínky. Původcem onemocnění jsou však mikroskopické vláknité houby a to konkrétně *Ascosphaera apis* [81] v případě zwápenatění a *Aspergillus flavus* nebo *Aspergillus fumigatus* [82] v případě zkamenění.

Pro obě onemocnění je typické prorůstání mycelia hub skrz larvu, kterou tak poškodí a larva zahyne. Vzhled larev pak připomíná výše zmíněné útvary a často se jedná o důležitý klinický příznak [56]. Dalšími metodami detekce jsou mikroskopické techniky, kdy je pozorováno mycelium, spory a další typické útvary pro danou houbu. Dále je možné kultivační vyšetření, kdy jsou vzorky napadených včel upraveny a vyočkovány na selektivní půdy (např. Sabouraud agar nebo Potato Dextrose Agar) a kultivovány s následnou konfirmací [81, 82]. I zde lze však využít modernější metody molekulární biologie jako jsou různé modifikace PCR.

Tato onemocnění se hojně vyskytují v našich oblastech, a jejich potlačování je založeno především na prevenci. V případě většího napadení je včelstvo přemeteno do čistého úlu a plod zlikvidován [56].

## 4 REZISTENCE BAKTERIÍ K ANTIBIOTIKŮM

Antibiotická rezistence začíná být v současné době velmi závažným problémem, protože řada antibiotik, která byla dříve účinná proti patogenním mikroorganismům, přestává působit. Na antibiotickou rezistenci je kladen důraz především v medicíně, nicméně je nutné si uvědomit, že geny, které rezistenci způsobují, přenáší i běžné komenzální bakterie vyskytující se v prostředí a přispívají tak k jejímu šíření [83]. Zároveň jsou u běžných mikroorganismů v prostředí často přítomny již existující geny, které odolnost zapříčiňují a mohly by být využity patogeny jako výhoda při působení antibiotika, kdyby tento gen získaly. [84]

Z možných příčin vzniku rezistentních kmenů bakterií lze jmenovat jednak přirozené mechanismy jako jsou mutace v genomu pro přizpůsobení se selekčnímu tlaku a možný horizontální i vertikální přenos genetického materiálu mezi bakteriemi. Geny pro rezistenci k antibiotikům jsou často uloženy na plasmidech a mohou být tak přenášeny s vysokou pravděpodobností i mezi nepříbuznými druhy. K tvorbě rezistentních kmenů přispěl značnou měrou i člověk, kdy zejména dříve docházelo k masivnímu nadužívání antibiotik v humánní i veterinární medicíně, dále mohla přispět také nepřesná diagnostika onemocnění, kdy byla využívána antibiotika naprosto nevhodně, anebo nedisciplinovanost pacientů, kteří nedodrží dávkování a umožňují tak bakteriím přežít a selektovat odolnější kmeny [85].

### 4.1 Základní mechanismy antibiotické rezistence

Mezi mechanismy antibiotické rezistence lze zařadit omezení průniku antibiotika do buňky, kdy jsou přirozeně odolnější gramnegativní bakterie vzhledem k přítomnosti membrány na povrchu. Dále lze jmenovat aktivní transport antibiotika z buňky, příkladem je pak rezistence k tetracyklinům. Některé mechanismy umožňují chemickou modifikaci léčiva, a to buď jeho úplnou degradaci (např. štěpení  $\beta$ -laktamového kruhu enzymem  $\beta$ -laktamázou), nebo připojením vazebné skupiny, která antibiotikum zablokuje. Další možností je modifikace cíle antibiotika, kdy může dojít ke změnám ve struktuře cílového proteinu tak, že zůstává funkčním, nicméně antibiotikum se na něj nemůže vázat [85].

Řešením těchto problémů by mohlo být využití bakteriofágů při léčbě bakteriálních infekcí, hledání nových antibiotik, vakcinace, využívání probiotických bakterií [83] a některých bakteriálních produktů jako jsou bakteriociny [85].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo zpracování literární rešerše o výskytu mikroorganismů ve vzorcích včel, larev, pylu a mateří kašičky. Důraz byl kladen především na přirozený mikrobiom, ale zároveň také na patogenní mikroorganismy.

Cíle praktické části lze definovat v následujících bodech:

- kultivační stanovení počtu přítomných mikroorganismů ve vzorcích a izolace čistých kmenů,
- identifikace získaných izolátů za pomoci metody MALDI-TOF MS,
- izolace DNA z bakteriálních kmenů a identifikace získaných izolátů za pomoci Sangerova sekvenování,
- diskový difúzní test na rezistenci k antibiotikům u vybraných kmenů,
- izolace DNA ze vzorků, její metagenomická analýza za pomoci NGS a identifikace přítomných mikroorganismů na úrovni čeledí.

## 6 MATERIÁL

V tabulce 3 se nachází soupis použitého laboratorního vybavení, v tabulce 4 jsou pak uvedeny chemikálie a materiál potřebný pro provedení analýz vzorků. Všechny použité komerční kity obsahovaly originální roztoky a chemikálie dodávané výrobcem.

Tabulka 3: Soupis použitých nástrojů a vybavení

Nástroje a vybavení:	Použito při:*
Aeris™ thermocycler (ESCO, Singapur)	4, 6
Aura PCR box (BioAir, Itálie)	4, 6
Autokláv (Tuttnauer, Nizozemsko)	1 – 6
Automatické pipety 20 µl, 100 µl a 1000 µl (Eppendorf, Německo)	2 – 6
Biohazard box (MERCİ, ČR)	2 – 6
Biological thermostat BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, ČR)	2 – 5
BEAD RUPTOR ELITE (OMNI, USA)	6
Centrifuga miniSpin plus (Eppendorf, Německo)	4, 6
DeNovix QFX Fluorometer (DeNovix, USA)	6
DENZI-LA-METER (Erba Lachema, ČR)	5
Dry Block Heating Thermostat (BioSan, Lotyšsko)	4, 6
Elektroforetická aparatura (Cleaver Scientific Ltd, Velká Británie)	4, 6
Lžička pro odběr mateří kašičky	1
Matečnickové misky voskové	1
Mikrobiologický inkubátor (Memmert, Německo)	2 – 5
Mikroskop binokulární OLYMPUS CX41 (OLYMPUS, Japonsko)	2
Mikrovlnná trouba (Electrolux, Švédsko)	4, 6
Mrazák -18 °C (Beko Europe, Nizozemsko)	1, 4, 6
Mrazák -80 °C (PHCbi, Japonsko)	2, 3
Petriho misky průměr 90 mm a 60 mm (GAMA, ČR)	2 – 5
Pinzeta	1, 2
Plynový kahan gasprofi 1 micro (WLD-TEC, Německo)	2 – 6
Podložní a krycí skla	2
Přelarovací lžička	1
Sterilní mikrobiologické kličky a hokejky	2 – 5
Stojan na zkumavky a mikrozukavky	1 – 6
Stolní počítač se softwarem (Lenovo, Čína)	2, 4, 6
Stomacher Classic UIL (Biotech, ČR)	2
Tecan Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko)	4, 6
Transiluminátor InGenius (Syngene, Velká Británie)	4, 6
UVP Visi-Blue Transiluminator (Analytik Jena, Německo)	6
Váhy analytické (DENVER INSTRUMENT, USA)	2
Váhy WLC 2/A2 (RADWAG, Polsko)	2 – 5
Váhy KERN 440-45N (KERN, Německo)	4, 6
Vodní lázeň (Memmert, Německo)	2
Vortex Mixer (Labnet, USA)	2 – 6
Základní laboratorní sklo a plastové pomůcky	1 – 6

- \* 1 – odběr vzorků,
- 2 – stanovení CFU/g, izolace čistých kmenů,
- 3 – identifikace MALDI-TOF MS,
- 4 – Sangerovo sekvenování,
- 5 – disková difúzní metoda,
- 6 – NGS (Next generation sequencing)

Tabulka 4: Soupis použitých chemikálií a materiálů

Chemikálie a materiál:	Použito při:*
Aceton (PENTA, ČR)	2
Agar Type I (HIMEDIA, Indie)	2 – 5
Antibiotické disky (HIMEDIA, Indie)	5
Benzin lékařský (PENTA, ČR)	2
Brain Heart Infusion broth (Merck KGaA, Německo)	2 – 5
DeNovix dsDNA High Sensitivity Evaluation Kit (DeNovix, USA)	6
DNeasy <sup>®</sup> PowerSoil <sup>®</sup> Pro Kit (QIAGEN, Německo)	6
EliZyme <sup>™</sup> HS Robust Mix (Elisabeth <sup>®</sup> Pharmacon, ČR)	6
Etanol 70% denaturovaný (PENTA, ČR)	1 – 6
Etanol 96 % (PENTA, ČR)	3, 4, 6
Gelred Nucleic Acid Stain 10,000x Water (Biotium, USA)	4, 6
High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Švýcarsko)	4
Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (HIMEDIA, Indie)	2
Imerzní olej (Merck KGaA, Německo)	2
Krystalová violet (PENTA, ČR)	2
Lugolův roztok	2
Mateří kašička : voda (1 : 1)	1
Mueller Hinton Broth (HIMEDIA, Indie)	5
NucleoMag SEP kit (MACHREY-NAGEL, Německo)	4, 6
PCR voda	4, 6
Peqlab peqGOLD, DNA Ladder, 100 bp Plus (VWR <sup>®</sup> , USA)	4, 6
Plate Count Agar (HIMEDIA, Indie)	2 – 4
QIAquick <sup>®</sup> Gel Extraction Kit (QIAGEN, Německo)	6
Red Taq 2X Master Mix 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> (VWR <sup>®</sup> , USA)	4
Safranin (HIMEDIA, Indie)	2
SPRIselect Bead-Based Reagent (Beckman Coulter, USA)	4, 6
Sterilní destilovaná voda	3
Sterilní fyziologický roztok	2
Sada univerzálních primerů pro bakterie (Metabiom, Německo)	4
Sada univerzálních primerů pro bakterie, NGS (Metabiom, Německo)	6
Sada univerzálních primerů pro houby, NGS (Metabiom, Německo)	6
Sada univerzálních primerů pro archea, NGS (Metabiom, Německo)	6
Sady primerů pro 2. PCR s indexy, NGS (Metabiom, Německo)	6
SYBR <sup>™</sup> Green I nucleic acid gel stain (Invitrogen, USA)	6
TAE pufr (Sigma-Aldrich, USA)	4, 6

- \* 1 – odběr vzorků,  
2 – stanovení CFU/g, izolace čistých kmenů,  
3 – identifikace MALDI-TOF MS,  
4 – Sangerovo sekvenování,  
5 – disková difúzní metoda,  
6 – NGS (Next generation sequencing)



## 7 METODY A POSTUP

### 7.1 Odběr vzorků

Analyzované vzorky byly odebrány 19. 6. 2023 z úlů na zahradě ve Zlíně (místní část Louky, souřadnice 49,218472° N, 17,605917° E). Odběr vzorků byl proveden přímo na včelnici za co nejpečlivějšího dodržování základních aseptických pravidel a do sterilních vzorkovacích mikrozkrumavek. Vzorky byly odebírány z pěti úlů (označení 1 – 5) a jednalo se o včelu dělnici, larvu ve stáří cca 7 – 9 dnů, mateří kašičku a pyl uložený v plástu. Jednotlivé včely, larvy a pyl byly odebírány náhodně a z různých částí úlu, aby bylo dosaženo reprezentativního vzorku. Shrnutí označení vzorků je zapsáno v tabulce 5.

Tabulka 5: Označení analyzovaných vzorků včel a dalších produktů

Vzorek	Kód čeština	Kód angličtina
Včela (honeybee)	V1 – V5	HB_1 – HB_5
Larva (larva)	L1 – L5	L_1 – L_5
Mateří kašička (royal jelly)	MK1 – MK5	RJ_1 – RJ_5
Pyl z plástu (bee bread)	P1 – P5	BB_1 – BB_5

Odběr včel a larev probíhal pinzetou vydezinfikovanou 70% etanolem a ožehnutou v plamenu. Včely byly odebrány v počtu osmi jedinců z každého úlu, larev bylo odebráno přibližně deset dle velikosti.

Vzorky pylu byly odebírány pomocí lžičky pro odběr mateří kašičky. Zároveň byly vybrány buňky, které byly naplněny pylem téměř po okraj, a existoval tedy předpoklad, že v nich již proběhla fermentace a budou méně zatíženy kontaminací prostředí. Pyl byl v každém včelstvu odebrán asi ze šesti buněk (v dostatečném množství), některé buňky obsahovaly i lehkou příměs medu.

Před odběrem mateří kašičky bylo třeba tzv. přelarvit. Principem přelarvení je vložení co nejmladší larvičky do kapky směsi mateří kašička-voda (1 : 1) do voskové nebo plastové misky, která má průměr odpovídající matečníku pro vývoj včelí matky. V případě, že včely matečník tzv. přijmou, zaplní jamku mateří kašičkou pro výživu budoucí včelí matky. Mateří kašička může být asi po dvou dnech od přelarvení odebrána řádově v množství stovek mg/matečník. Přelarvení proběhlo 17. 6. 2023 a jako chovný materiál bylo zvoleno včelstvo 32, které se během sezóny projevovalo dobrými vlastnostmi.

Po dvou dnech byl zároveň s ostatními vzorky proveden odběr, kdy byla nejprve z misky odstraněna larva a poté byla lžičkou nabrána mateří kašička a uložena do sterilní mikrozkušavky. Pro naplnění mikrozkušavky bylo zpravidla třeba 5 – 7 matečnicků v závislosti na množství mateří kašičky v každém z nich.

Vzorky byly ihned po odběru převezeny do laboratoře a zamraženy při teplotě  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  do následné mikrobiologické a molekulárně biologické analýzy.

## 7.2 Stanovení CFU/g vzorku a izolace čistých kmenů

Po rozmražení byly vzorky zváženy na analytických vahách a ke každému z nich byl přidán devítinásobek sterilního fyziologického roztoku. Vzorky byly homogenizovány po dobu 120 s a pipetovány do sterilních prázdných zkumavek (ředění  $10^{-1}$ ). Dále byly vytvořeny příslušné desítkové řady tak, že do 4,5 ml sterilního fyziologického roztoku bylo přidáno 0,5 ml suspenze (ředění  $10^{-2}$ ). Tento postup byl opakován až do zisku odpovídajícího ředění (ředění  $10^{-3} - 10^{-5}$ ). Následně byla provedena inokulace dané suspenze na příslušné půdy. Pro stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM) byly využity univerzální půdy PCA (Plate Count Agar) a pro zachycení nutričně náročnějších mikrobů také půda BHI (Brain Heart Infusion agar). Pro stanovení počtu kvasinek a plísní byla využita půda CHYGA (Chloramphenicol Yeast Glucose Agar). Aerobní sporuláty byly stanoveny na půdě PCA (označení PCA-S), kdy samotnému vyočkování předcházela zahřev výchozí suspenze ve vodní lázni při  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 minut. Poté byla suspenze ochlazená proudem studené vody a ředěna obdobně jako ostatní vzorky. Očkování proběhlo metodou roztěru, kdy bylo na tři agarové plotny nanášeno 100  $\mu\text{l}$  příslušné suspenze a ta byla rozetřena sterilní bakteriologickou hokejkou. Přehled očkovaných ředění na dané půdy je uveden v tabulce 6.

Tabulka 6: Použitá ředění jednotlivých vzorků

Kód vzorku	Půda	Ředění	Kód vzorku	Půda	Ředění
V1 – V5	PCA	$10^{-3} - 10^{-5}$	MK1 – MK5	PCA	$10^{-1} - 10^{-3}$
	BHI	$10^{-3} - 10^{-5}$		BHI	$10^{-1} - 10^{-3}$
	CHYGA	$10^{-1} - 10^{-3}$		CHYGA	$10^{-1} - 10^{-3}$
	PCA-S	$10^{-1} - 10^{-3}$		PCA-S	$10^{-1} - 10^{-3}$
L1 – L5	PCA	$10^{-1} - 10^{-3}$	P1 – P5	PCA	$10^{-3} - 10^{-5}$
	BHI	$10^{-1} - 10^{-3}$		BHI	$10^{-3} - 10^{-5}$
	CHYGA	$10^{-1} - 10^{-3}$		CHYGA	$10^{-1} - 10^{-3}$
	PCA-S	$10^{-1} - 10^{-3}$		PCA-S	$10^{-1} - 10^{-3}$

Zaočkované misky (půdy BHI a PCA) byly kultivovány při 30 °C po dobu 48 h, kvasinky a plísně (půda CHYGA) byly kultivovány při pokojové teplotě po dobu 4 dnů. Po uplynutí doby kultivace byly spočítány kolonie na počitatelných miskách a stanoveno CFU/g (kapitola 8.1 Stanovení CFU/g vzorku a izolace čistých kmenů) dle následujícího vzorce.

$$CFU/g = \frac{\sum C}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

kde:  $\sum C$  – součet všech kolonií z počitatelných misek ze dvou po sobě následujících ředění [1]

$V$  – objem inokula pipetovaný na misky [ml]

$n_1, n_2$  – počty počitatelných misek ze dvou po sobě následujících ředění [1]

$d$  – příslušné nižší použité ředění [1]

Na miskách byly stanovovány mikroorganismy schopné růstu za daných podmínek, tj. aerobní nebo fakultativně anaerobní mikroorganismy rostoucí při 30 °C, respektive pokojové teplotě.

Čisté bakteriální kmeny byly izolovány technikou křížového roztěru, kdy z každého vzorku bylo vybráno 5 – 10 kolonií s odlišnou morfologií. Z těchto kolonií bylo odebráno bakteriologickou kličkou inokulum, které bylo rozetřeno na sterilní agarovou plotnu (univerzální médium PCA, popřípadě BHI) křížovým roztěrem. Křížový roztěr byl poté několikrát opakován pro zajištění dostatečné čistoty. Kultivace probíhala vždy při 30 °C po dobu 24 – 48 hodin dle růstových vlastností daného izolátu.

Čistota kmenů byla poté ověřena mikroskopicky, kdy byly jednotlivé vzorky barveny dle Grama. Tato metoda spočívá ve vícefázovém barvení, kdy je prvním krokem převrstvení fixovaného preparátu krystalovou violetí po dobu 60 s. V této fázi dochází k obarvení všech přítomných buněk fialově. Následuje převrstvení preparátu Lugolovým roztokem po dobu 30 s za tvorby komplexu krystalová violet' – peptidoglykan. Poté dochází k promytí preparátu acetonem (po dobu asi 2 s), kdy se uvolňuje přebytečná krystalová violet' a zároveň dochází k vymytí krystalové violeti z buněčných stěn buněk s gramnegativní stavbou. Buněčné stěny těchto buněk tvoří kromě vnější membrány pouze slabá vrstva peptidoglykanu oproti grampozitivní stěně. Po promytí následuje převrstvení preparátu safraninem po dobu 60 s, který dobarví gramnegativní bakterie červeně. Preparáty jsou pak pozorovány světelným mikroskopem s imerzním objektivem a hodnotí se stavba buněčné stěny (G+/G-), jednotný tvar buněk, tvorba typických shluků a velikost

buněk. V některých případech lze pozorovat endospory, které se Gramovým barvením neobarví a jeví se jako bílé útvary uvnitř nebo vně buněk.

### 7.3 Identifikace mikroorganismů pomocí metody MALDI-TOF MS

Metoda MALDI-TOF MS je založena na analýze proteomu daných mikroorganismů. Zjednodušeným principem je vytvoření polymerní matrice se zakomponovanými proteiny, které jsou desorbovány a ionizovány z této matrice laserem. Tato technika je spojena s analyzátozem doby letu (TOF) a hmotnostní spektrometrií (MS). Program na základě dopadajících proteinů (jejich poměru hmotnosti a náboje) na detektor vytvoří peaky, které mohou být porovnány s databází a jsou specifické pro daný mikroorganismus (tzv. fingerprinting) [86].

Laboratoře naší univerzity nedisponují zařízením pro analýzu proteomu, proto byly vzorky odeslány na Slovenskou poľnohospodárskou univerzitu v Nitře, Fakultu záhradníctva a krajinného inžinierstva, kde byly za pomoci paní prof. Ing. Miroslavy Kačániové, Ph.D. analyzovány. Výsledky byly odeslány zpět v elektronické podobě.

Samotné analýze předcházela příprava vzorků. Ta zahrnovala kultivaci čerstvé 24 hodinové kultury. Z ní bylo poté odebráno inokulum bakteriologickou kličkou, které bylo resuspendováno ve 150  $\mu$ l sterilní destilované vody v mikrozkuhavce. Poté bylo přidáno 450  $\mu$ l 96% etanolu a směs byla dobře promíchána. Do převozu k analýze byly vzorky zamrazeny při  $-80$  °C.

### 7.4 Identifikace mikroorganismů pomocí Sangerova sekvenování

Sangerovo sekvenování je jedna ze základních a stále používaných sekvenačních metod. Jejím principem je polymerázová řetězová reakce (PCR), kdy jsou polymerázou přidávány jednotlivé deoxyribonukleotidy (dNTP) dle komplementarity dusíkatých bází. V reakční směsi jsou však přítomny v nižší koncentraci také dideoxyribonukleotidy (ddNTP), které na 3. uhlíku sacharidu neobsahují hydroxylovou skupinu. Polymeráza tedy nemůže připojit další nukleotid a syntéza vlákna je ukončena. Výsledkem je směs různě dlouhých fragmentů molekul DNA, které na svém konci vždy obsahují právě ddNTP s fluorescenční značkou specifickou pro danou bázi. Směs je dále dělena pomocí kapilární gelové elektroforézy dle délky jednotlivých fragmentů, kdy nejrychleji prochází kratší fragmenty a naopak. Na konci kapiláry se nachází laser a detektor, který při průchodu fluorescenční značky ddNTP zaznamená její identitu a v programu je vytvořen chromatogram dané

sekvence [87]. Pro Sangerovo sekvenování a získání relevantních výsledků je nutná přítomnost pouze jediné templátové molekuly DNA. Nelze tedy sekvenovat více molekul v jedné reakci paralelně.

Před sekvenováním samotným bylo nutné vzorky připravit. Sangerovo sekvenování bylo využito u vybraných kmenů, které se nepodařilo identifikovat pomocí metody MALDI-TOF MS. Příprava vzorků zahrnovala kultivaci 24 hodinové kultury v BHI bujónu. Obsah kultivační zkumavky byl asepticky převeden do centrifugační mikrozukavky a centrifugován při 6000 ot/min po dobu dvou minut. Supernatant byl odpipetován a pelet resuspendován ve sterilním fyziologickém roztoku. Postup byl zopakován ještě jednou pro dokonalé promytí. Poté bylo možné extrahovat DNA. K tomuto účelu byl využit High Pure PCR Template Preparation Kit s příloženými reagensii a potřebným vybavením. Dále bylo postupováno dle pokynů výrobce. Po extrakci DNA byla zkontrolována její koncentrace a čistota za pomoci přístroje Tecan Infinite M200. Hodnoty koncentrace a čistoty jsou uvedeny v tabulce 16. Příliš koncentrované vzorky (20, 55 a 96) byly naředěny PCR vodou, aby výsledná koncentrace DNA ležela v intervalu 30 – 50 ng/μl.

Následně byla provedena klasická PCR se sadou univerzálních bakteriálních primerů BamHI FD1 a PstI RD1, jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Sekvence použité dvojice primerů pro 16S rRNA gen

Primery	Sekvence
BamHI FD1	5'-ATG GGA TCC AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'
PstI RD1	5'-CAG CTG CAG AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'

Složení PCR směsi pro jeden vzorek je pak uvedeno v tabulce 8. Směs byla připravena smícháním třináctinásobku hodnot objemů uvedených v tabulce (12 vzorků + negativní kontrola) tak, že do sterilní mikrozukavky byl napipetován Red *Taq* 2X Master Mix 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, sada obou primerů a PCR voda. Směs byla promíchána na vortexu a rozpipetována po 24 μl do sterilních mikrozukavek pro PCR. Do každé mikrozukavky byl pak přidán 1 μl templátové DNA od konkrétního vzorku. Výsledný objem směsi tedy byl 25 μl. Do třinácté mikrozukavky nebyla přidána žádná templátová DNA a tato reakce sloužila jako negativní kontrola.

Tabulka 8: Složení PCR směsi pro přípravu DNA ampliconu k sekvenaci 16S rRNA genu

Reagencie	Objem [μl]
Red <i>Taq</i> 2X Master Mix 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>	12,5
PCR voda	9,5
BamHI FD1	1
PstI RD1	1
Templátová DNA	1
<b>Součet</b>	<b>25</b>

Mikrozkumavky byly vloženy do přístroje Aeris™ thermocycler a průběh PCR byl nastaven dle v laboratoři již dříve ověřených postupů. Teploty a časy jednotlivých fází jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Průběh PCR pro přípravu DNA ampliconu k sekvenaci 16S rRNA genu

Fáze	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů [1]
Počáteční denaturace	95	180	Před 1. cyklem
Denaturace	95	30	25
Annealing primerů	63	30	
Elongace	72	90	
Závěrečná extenze	72	600	Po 25. cyklu
Chlazení po PCR	4	∞	Po skončení PCR

Po PCR byla přítomnost daného produktu ověřena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu o koncentraci 1,5 %. 1,5 g agarózy bylo rozvařeno ve 100 ml 1x koncentrovaného TAE pufru v mikrovlnné troubě. Po mírném ochlazení následovalo přidání dvou kapek barviva Gelred Nucleic Acid Stain a roztok byl nalit do formy. Po utužení byl gel ponořen do elektroforetické vany naplněné TAE puftrem a do jednotlivých jamek byly pipetovány 3 μl markeru DNA Ladder, 100 bp Plus a 3 μl PCR produktů včetně negativní kontroly. Následovalo spuštění elektrického proudu po dobu 45 minut. Produkty v gelu byly vizualizovány pomocí transiluminátoru InGenius a stolního počítače se softwarem GeneSnap. Obrázek gelu se nachází na obrázku 3. Očekávaná délka produktu byla přibližně 1500 bp [88].

Poté byla provedena purifikace PCR produktů pomocí NucleoMag SEP kit v kombinaci se SPRIselect Bead-Based Reagent. Postup byl proveden dle pokynů výrobce. Poté byla

opět ověřena koncentrace a čistota DNA na přístroji Tecan Infinite M200. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 17.

Takto připravené vzorky byly zamrazeny při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  a odeslány na samotnou sekvenaci do společnosti SEQme s. r. o. a výsledky byly odeslány zpět v elektronické podobě. Získané sekvence byly vyhodnoceny pomocí programu DNA Baser Assembler a porovnány s databází BLAST.

## 7.5 Disková difúzní metoda pro zjištění rezistence k ATB

Disková difúzní metoda je jednou z nejběžnějších technik, která umožňuje zjistit citlivost nebo rezistenci daného mikrobiálního kmene k antimikrobní látce. Nejčastěji jsou využívány papírové disky předem napuštěné daným antibiotikem v dané koncentraci, nicméně lze testovat i látky jiné tak, že roztok antimikrobní látky je pipetován na čistý papírový disk. Po kultivaci je nutné změřit průměr inhibiční zóny a porovnat výsledek se standardem [89]. Jako kultivační médium je volen Mueller Hinton agar. Toto médium je standardizované pro danou metodu a zároveň je univerzální.

Test antibiotické rezistence byl proveden u kmenů s označením 21, 23 a 36, které představovaly zástupce rodu *Pseudomonas*. Další testované kmeny spadaly do řádu *Enterobacterales* a nesly označení 9, 31, 38 a 42. U obou skupin byla volena různá antibiotika dle organizace EUCAST, v případě pseudomonád byly pak využity antibiotika, která vykazovala nejvyšší rezistenci v práci Mgr. Martiny Coufalové [90]. Přehled použitých antibiotik s jejich zkratkou a koncentrací je uveden v tabulce 10.

Tabulka 10: Použitá ATB pro diskovou difúzní metodu

Antibiotikum	Zkratka	Koncentrace [ $\mu\text{g}$ ]	Test rezistence
Amikacin	AK 30	30	<i>Enterobacterales</i>
Ampicillin	AMP 25	25	<i>Enterobacterales</i>
Cefepim	FEP 30	30	<i>Pseudomonas spp.</i>
Ceftazidim	CAZ 10	10	<i>Pseudomonas spp.</i>
Ciprofloxacin	CIP 5	5	<i>Enterobacterales, Pseudomonas spp.</i>
Chloramfenikol	C 30	30	<i>Enterobacterales, Pseudomonas spp.</i>
Imipenem	IPM 10	10	<i>Pseudomonas spp.</i>
Tetracyklin	TE 10	10	<i>Enterobacterales</i>

Z bakteriální kultury bylo přeneseno inokulum do sterilního fyziologického roztoku tak, aby byl vytvořen zákal o optické hustotě 0,5 McF. Měření probíhalo na přístroji DENZI-LA-METER. Poté byla sterilní miska s Mueller Hinton agarem převrstvena touto suspenzí a nadbytek suspenze byl odpipetován. Po oschnutí byly na misky umístěny antibiotické disky v počtu pěti kusů. Tento test byl proveden ve dvou opakováních. Kultivace probíhala 24 h při 30 °C. Po uplynutí této doby byly změřeny průměry zón (průměr disku 6 mm). Výsledky byly porovnány se souborem vytvořeným organizací EUCAST.

## 7.6 Příprava knihovny pro NGS

Metody nazývané jako NGS se v současné době uplatňují při analýzách různých mikrobiálních společenstev a jsou ceněny především pro svůj metagenomický přístup tj. sekvenování velkého množství vzorků paralelně v jedné reakci. NGS se provádí ve třech fázích. Těmi jsou příprava knihovny, samotná sekvenace a vyhodnocení dat za použití bioinformatických nástrojů [91]. Principem sekvenování pomocí platformy Illumina je tzv. sekvenace syntézou, kdy dochází k přichycení DNA fragmentu pomocí několika nukleotidů (adaptérů) přidaných během 2. PCR. Následuje tvorba klastrů s obsahem stejného fragmentu DNA – amplifikace fragmentu. Poté dochází k syntéze vlákna pomocí DNA polymerázy, která připojuje fluorescenčně značené deoxyribonukleotidy. Při připojení různých nukleotidů dochází k uvolnění různého fluorescenčního signálu, který je snímán, a sekvence jsou zaznamenávány. Zároveň je sekvenace provedena z obou konců fragmentu pro zvýšení délky přečteného úseku. Délka přečtených úseků se pohybuje mezi 250 – 800 bp [92].

Prvním krokem přípravy knihovny byla izolace DNA ze samotné včely, larvy, mateří kašičky a pylu. Izolace byla provedena pomocí DNeasy<sup>®</sup> PowerSoil<sup>®</sup> Pro Kit dle doporučení výrobce. Koncentrace DNA byla změřena pomocí DeNovix QFX Fluorometer a DeNovix dsDNA High Sensitivity Evaluation Kit. Hodnoty koncentrací pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tabulce 22. V případě vysokých koncentrací byly příslušné vzorky ředěny PCR vodou na koncentraci 25 – 30 ng/μl.

Následovalo provedení 1. PCR, kdy je specifickou sadou primerů amplifikována část genu pro 16S rRNA u prokaryot a část genu pro 18S rRNA v případě eukaryot. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v tabulce 11. Primery jsou hybridizované pro co nejširší záchyt mikroorganismů.



Tabulka 11: Sekvence použitých dvojic primerů (1. PCR pro přípravu vzorků pro NGS)

Primery	Sekvence
515F (bakterie)	5'-GTG YCA GCM GCC GCG GTA A-3'
926R (bakterie)	5'-CCG YCA ATT YMT TTR AGT TT-3'
Arch349F (archea)	5'-GYG CAS CAG KCG MGA AW-3'
Arch806R (archea)	5'-GGA CTA CVS GGG TAT CTA AT-3'
ITS3F (houby)	5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3'
ITS4R (houby)	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'

Složení PCR směsi je uvedeno v tabulce 12. Směs pro bakterie, archea a houby se vždy lišila dvojicí použitých primerů. Směsi byly připraveny smícháním dvaceti jedna násobku hodnot objemů uvedených v tabulce (20 vzorků + negativní kontrola) tak, že do sterilní mikrozkušavky byl napipetován EliZyme<sup>TM</sup> HS Robust Mix, sada dvou příslušných primerů a PCR voda. Směs byla promíchána na vortexu a rozpipetována po 24  $\mu$ l do sterilních mikrozkušavek pro PCR. Do každé mikrozkušavky byl pak přidán 1  $\mu$ l templátové DNA od konkrétního vzorku. Výsledný objem směsi tedy byl 25  $\mu$ l. Do dvacáté první mikrozkušavky nebyla přidána žádná templátová DNA a tato reakce sloužila jako negativní kontrola.

Tabulka 12: Složení 1. PCR směsi pro přípravu vzorků pro NGS

Reagencie	Objem [ $\mu$ l]
EliZyme <sup>TM</sup> HS Robust Mix	12,5
PCR voda	10,5
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
Templátová DNA	1
<b>Součet</b>	<b>25</b>

Mikrozkušavky byly vloženy do přístroje Aeris<sup>TM</sup> thermocycler a průběh PCR byl nastaven dle v laboratoři již dříve ověřených postupů. Teploty a časy jednotlivých fází jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13: Průběh 1. PCR pro přípravu vzorků pro NGS

Fáze	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů [1]
Počáteční denaturace	95	180	Před 1. cyklem
Denaturace	95	30	25 – 35
Annealing primerů	55	30	
Elongace	72	60	
Závěrečná extenze	72	600	Po 25. cyklu
Chlazení po PCR	4	∞	Po skončení PCR

Průběh 1. PCR byl ověřen na agarózovém gelu o koncentraci 1,5 %. Očekávaná délka produktu byla přibližně 500 bp a byl detekován pomocí barviva Gelred Nucleic Acid Stain stejně jako v případě přípravy vzorků pro Sangerovo sekvenování (kapitola 6.4). Elektroforetické gely se nachází na obrázcích 4 a 5. Poté byla provedena purifikace PCR produktů pomocí NucleoMag SEP kit v kombinaci se SPRIselect Bead-Based Reagent a byla změřena koncentrace DNA pomocí DeNovix QFX Fluorometer a DeNovix dsDNA High Sensitivity Evaluation Kit.

V případě vzorků HB\_1 – HB\_5 a L\_1 – L\_5 (houbové primery) byly kromě hlavního produktu detekovány také další nespecifické produkty ve značně vyšších koncentracích než hlavní produkt. Zároveň se nepodařilo těchto produktů zbavit ani při purifikaci. PCR byla opakována a na elektroforetický gel obsahující barvivo SYBR<sup>TM</sup> Green I nucleic acid gel stain byl pipetován celý objem PCR mikrozkušavky. Po rozdělení produktů dle pohyblivosti v gelu byl band s hlavním produktem vyříznut skalpelem za prosvěcování UVP Visi-Blue Transiluminator. DNA byla poté extrahována z gelu pomocí QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit. S těmito vzorky bylo dále pracováno jako s ostatními.

Dalším krokem přípravy knihovny pro NGS je 2. PCR, při které jsou na fragment DNA připojeny adaptéry s indexy, díky jejichž sekvenci lze pak jednotlivé vzorky odlišit od sebe a sekvenovat je tak paralelně v jedné reakci. Sekvence použitých indexů u jednotlivých vzorků jsou uvedeny v příloze P I. Indexy jsou přidávány ve dvojici (i5 a i7) a u každého vzorku musí být kombinace indexů jiná. Složení PCR směsi je uvedeno v tabulce 14.

Tabulka 14: Složení 2. PCR směsi pro přípravu vzorků pro NGS s použitím příslušných dvojic primerů s indexy

<b>Reagencie</b>	<b>Objem [μl]</b>
EliZyme™ HS Robust Mix	12,5
Forward primer	5
Reverse primer	5
Templát z 1. PCR	2,5
<b>Součet</b>	<b>25</b>

Průběh 2. PCR byl obdobný jako u 1. PCR uvedený v tabulce 12, nicméně byl snížen počet cyklů na deset. Produkt byl detekován na 1,5% agarózovém gelu, poté byla DNA opět purifikována byla měřena koncentrace dle výše popsaných postupů.

Poslední fází bylo provedení poolingů vzorků, kdy byly příliš koncentrované vzorky naředěny PCR vodou na výslednou koncentraci 15 ng/μl. Od každého vzorku bylo pak pipetováno 10 μl do sterilní mikroskopické pipetky a ta byla odeslána na sekvenční analýzu do společnosti SEQme s. r. o. a výsledky byly odeslány zpět v elektronické podobě. Výsledky byly vyhodnoceny za pomoci pana prof. Mgr. Marka Koutného Ph.D. a byla provedena jejich vizualizace.

## 8 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 8.1 Stanovení CFU/g vzorku a izolace čistých kmenů

Výsledky běžného kultivačního stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a/nebo fakultativně anaerobních mikroorganismů (CPM), počtu plísní a kvasinek (PK) a počtu aerobních sporulátů (AS) jsou shrnuty v tabulce 15 pro vzorky včel a vzorky pylu. Na základě těchto parametrů lze odhadnout mikrobiální zátěž ve sledovaných včelstvech. Pravděpodobně mnohem lepším ukazatelem než počet mikroorganismů je jejich identita.

Tabulka 15: Stanovení CFU/g u vzorků včel a pylu

Vzorek	Sledovaná charakteristika	CFU/g	Vzorek	Sledovaná charakteristika	CFU/g
V1	CPM	$7,0 \cdot 10^5$	P1	CPM	$3,3 \cdot 10^5$
	PK	$1,6 \cdot 10^3$		PK	$1,5 \cdot 10^3$
	AS	$< 1,0 \cdot 10^2$		AS	$7,0 \cdot 10^2$
V2	CPM	$7,7 \cdot 10^6$	P2	CPM	$1,3 \cdot 10^5$
	PK	$4,9 \cdot 10^3$		PK	$7,0 \cdot 10^2$
	AS	$< 1,0 \cdot 10^2$		AS	$2,0 \cdot 10^2$
V3	CPM	$4,8 \cdot 10^6$	P3	CPM	$9,6 \cdot 10^5$
	PK	$4,2 \cdot 10^4$		PK	$4,4 \cdot 10^3$
	AS	$< 1,0 \cdot 10^2$		AS	$7,0 \cdot 10^2$
V4	CPM	$6,2 \cdot 10^7$	P4	CPM	$< 1,0 \cdot 10^4$
	PK	$4,2 \cdot 10^5$		PK	$< 1,0 \cdot 10^2$
	AS	$1,0 \cdot 10^2$		AS	$1,1 \cdot 10^3$
V5	CPM	$3,9 \cdot 10^6$	P5	CPM	$2,0 \cdot 10^5$
	PK	$3,1 \cdot 10^4$		PK	$2,2 \cdot 10^3$
	AS	$< 1,0 \cdot 10^2$		AS	$3,0 \cdot 10^2$

CPM – Celkový počet mikroorganismů

PK – Počet plísní a kvasinek

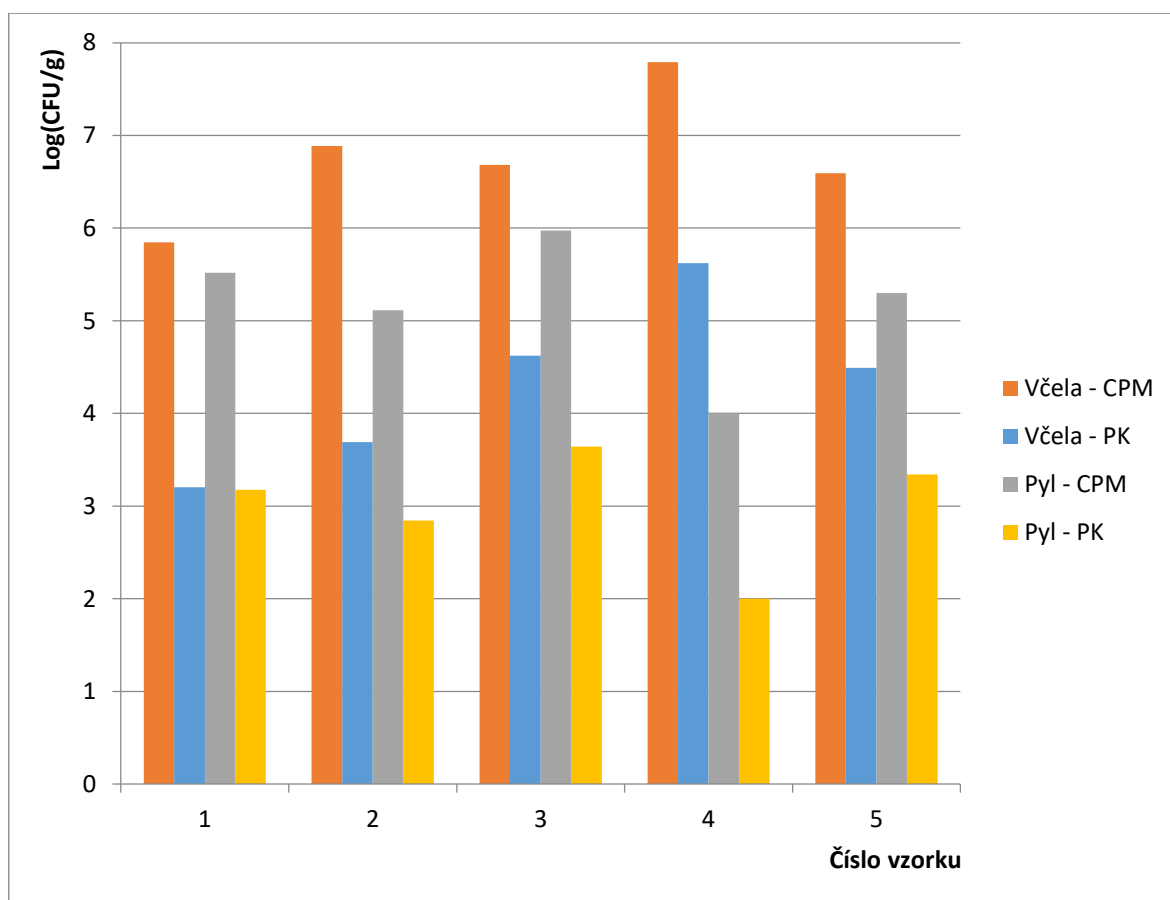
AS – Počet aerobních sporulátů

Jak vyplývá z tabulky 15 rozpětí CFU/g (pro CPM) u včel se řádově pohybovalo mezi  $10^5 - 10^7$ . Nejvyšší hodnota byla zaznamenána u vzorku V4, kde CFU/g dosáhlo  $6,2 \cdot 10^7$ . Nejnižší CFU/g bylo pak stanovené u vzorku V1 ( $7,0 \cdot 10^5$ ). Při stanovení kvasinek a plísní se hodnoty pohybovaly v řádech  $10^3 - 10^5$  a poměrně věrně kopírovaly hodnoty CPM. Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo u včelstva V4, nejnižší pak u včelstva V1. Aerobní sporuláty nebyly u včel detekovány, proto jsou hodnoty vyjádřeny symbolem „<“.

U vzorku V4 byla detekována jediná kolonie sporulátu a u tohoto vzorku je CFU/g vyjádřen jako odhad nízkých počtů, který však není statisticky průkazný.

CPM pylu se pak pohyboval v řádu  $10^5$  u všech vzorků kromě vzorku P4. Zde nebyly detekovány žádné kolonie, a to ani v případě stanovení plísní a kvasinek. Pravděpodobně to bylo způsobeno značnou příměsí medu v tomto vzorku a jeho antimikrobními vlastnostmi. Počty plísní a kvasinek se pak u ostatních vzorků pohybovaly v řádech  $10^2 - 10^3$ . Aerobní sporuláty byly u pylu zastoupeny více než u včel a na všech miskách byl pozorován nárůst velkých rozlézavých kolonií. Tento počet však kromě vzorku P4 nepřesahoval 10 kolonií, proto se jedná o odhady nízkých počtů. Vzorek P4 obsahoval kolonií 11, což by korespondovalo s nejvyššími počty mikrobů ve vzorku V4. Endospory bakterií jsou velmi odolné vůči antimikrobním látkám, a přestože mezofilní mikroorganismy a plísně a kvasinky po vyočkování vzorku P4 nerostly, sporuláty po naředění inhibitorů vyklíčit mohly.

Grafické shrnutí výsledků je vyjádřeno na obrázku 2, kde je na ose y vynesena logaritmus CFU/g, na ose x se nachází číslo daného vzorku (V1 – V5 a P1 – P5).



Obrázek 2: Detekovaný počet mikroorganismů u jednotlivých vzorků

Jak vyplývá z obrázku 2, počty PK a CPM tvoří téměř shodné trendy s tím, že počty mikroorganismů pro PK jsou přibližně o dva řády CFU/g nižší. U pylu je pak tato závislost ještě více patrná. Při porovnání množství mikroorganismů u včel a pylu se počty liší významněji a nelze tedy jednoznačně říct, že včelstva s vyšším CPM a PK u analyzovaných včel budou mít i vyšší CPM a PK testovaného pylu. Značně vybočuje především vzorek P4 z výše zmíněných důvodů.

Při porovnání s literaturou bylo zjištěno, že studie se zpravidla zabývají více identifikací mikroorganismů než jejich počty. V případě sledování počtů jsou pak stanovovány jiné bakterie (např. BMK) tvořící značnou část mikrobiomu. Na aerobní mikrobiom tedy není kladen důraz. Obecně platí, že dospělec včely obsahuje asi  $10^9$  bakteriálních buněk [21], tedy řádově více než bylo odhaleno kultivačním stanovením CPM. Je nutné brát v potaz to, že druhy obývající střevo jsou často anaerobní nebo mikroaerofilní a mohou také vyžadovat jiná kultivační média. Obecně však platí, že naprostá většina bakteriálních druhů je nekultivovatelná [93].

Mikrobiální zátěž analyzovaného pylu byla značná. Ve studiích, které se touto problematikou zabývaly, dosahovaly hodnoty CFU/g řádově  $10^2 - 10^3$  [94]. Oproti těmto hodnotám jsou hodnoty analyzovaného pylu vyšší asi o 2 řády. Vzhledem k tomu, že pyl je včelami sbírán ve vnějším prostředí, může nést mikrobiální zátěž dané oblasti. Pyl odebraný pro analýzu byl ze zemědělské oblasti a je tedy možné, že i z tohoto důvodu byla mikrobiální zátěž vyšší. Zároveň byl analyzován čerstvý pyl, zatímco při jiné analýze byl použit pyl sušený [94], což mohlo mít značný dopad na snížení CPM.

Naproti tomu ve většině vzorků mateří kašičky bylo detekováno pouze několik kolonií v počtu 1 – 3 a CFU/g (pro CPM), což lze vyjádřit jako odhad nízkého počtu  $1,0 \cdot 10^2 - 3,0 \cdot 10^2$ . Vzorek K1 byl bez nárůstu zcela. Plísňe a kvasinky ani aerobní sporuláty nebyly detekovány vůbec.

Včelí larvy obsahovaly také velmi nízké počty mikrobiálních buněk kultivovatelných za daných podmínek, nicméně tyto počty byly vyšší než u mateří kašičky. CFU/g (pro CPM) bylo pak stanoveno jako odhady nízkých počtů – u vzorku L1 jako  $7,0 \cdot 10^2$ , u vzorků L2, L3 a L4 jako  $2,0 \cdot 10^2$  a u vzorku L5 jako  $5,0 \cdot 10^2$ . Plísňe a kvasinky nebyly detekovány, nicméně byla zachycena jedna kolonie sporulátu ve vzorku L3. Nízká mikrobiální kontaminace mateří kašičky a larev, které jsou touto kašičkou z části krmeny, pravděpodobně souvisí s její antimikrobní aktivitou [42, 43, 44, 45] a nepřímo byly tyto vlastnosti prokázány.

V příloze II se nachází fotografie vybraných kmenů izolovaných z původních vzorků technikou křížového roztěru a v příloze III fotografie Gramova barvení těchto izolátů.

Gramovo barvení sloužilo především pro kontrolu čistoty izolátů, nicméně odhalilo několik skutečností. Ve vzorcích včel se nacházely především gramnegativní bakterie tvaru drobných tyčinek a jedinou detekovanou grampozitivní bakterií byl sporulát (V4, číslo izolátu 37). Naproti tomu pro pyl byly typické grampozitivní bakterie. Velmi zvláštním preparátem byl izolát 93, kdy se jednalo o velmi dlouhé až vláknité gramnegativní tyčinky. Tento kmen byl izolován ze vzorku L2. Zároveň mikroskopie odhalila gramnegativní tyčinky rostoucí na půdě CHYGA, která má být selektivní a je určena pro izolaci plísní a kvasinek. Selektivní látkou je širokospektrální antibiotikum chloramfenikol. Bakteriální izoláty rostoucí na půdě CHYGA nesly označení 21, 23, 36 a 42. Později byly identifikovány jako *Pseudomonas libanensis* (21), *Pseudomonas marginalis* (23), *Pseudomonas extremorientalis* (36) a *Serratia marcescens* (42).

## 8.2 Identifikace mikroorganismů pomocí metody MALDI-TOF MS a Sangerova sekvenování

Využití metod MALDI-TOF MS a Sangerovo sekvenování mělo stejný cíl a to identifikovat izolované bakteriální kmeny. Úplná identifikace je sice brána na úrovni sekvenování DNA, nicméně pro účely této práce byla metoda MALDI-TOF MS zcela dostačující a byla volena jako první. Na sekvenační analýzu byly odeslány vzorky, které se nepodařilo určit touto metodou.

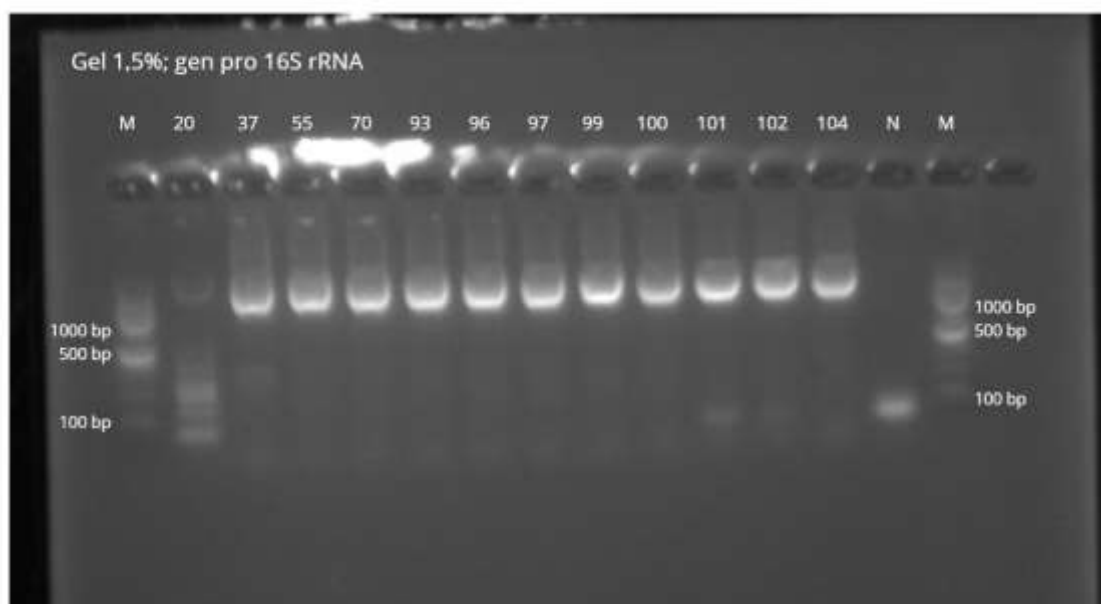
Mezi dílčí výsledky při přípravě vzorků na Sangerovo sekvenování patřila úspěšnost izolace DNA z bakteriálních kultur. Hodnoty její koncentrace a čistoty jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16: Koncentrace a čistota izolované DNA pro amplifikaci genu pro 16S rRNA

Kmen	c <sub>DNA</sub> [ng/μl]	Čistota [1]	Kmen	c <sub>DNA</sub> [ng/μl]	Čistota [1]
20	214,8	2,08	97	14,5	1,93
37	84,8	1,98	99	68,9	2,08
55	121,1	2,07	100	48,4	2,07
70	57,2	2,10	101	6,9	1,82
93	50,0	2,10	102	10,3	1,91
96	91,5	2,16	104	10,2	2,04

Z tabulky 16 vyplývá, že izolace proběhla úspěšně u všech dvanácti vzorků. Poměrně nízká koncentrace DNA byla zaznamenána u vzorku 101 (6,9 ng/μl), nicméně pro PCR je tato koncentrace dostatečná. U všech ostatních vzorků byla zjištěna koncentrace vyšší než 10 ng/μl a vzorky 20 a 55 dokonce více než 100 ng/μl, proto u nich bylo přistoupeno k ředění. Čistotu DNA vyjadřuje poměr absorbancí  $A_{260}/A_{280}$ , který by pro čistou DNA měl být přibližně 1,8 – 2,0. Většina vzorků maximální hranici převyšuje, nicméně tato skutečnost zpravidla nepůsobí potíží oproti případům, kdy by byl poměr absorbancí výrazně menší než 1,8 [95].

Výsledky gelové elektroforézy po PCR se nachází na obrázku 3.



Obrázek 3: Elektroforetický gel s amplifikovaným genem pro 16S rRNA

Čísla 20 – 104 – označení identifikovaného izolátu; M – marker velikosti fragmentu DNA; N – negativní kontrola

Jak vyplývá z obrázku 3, amplifikace genu *in vitro* byla úspěšná kromě jednoho vzorku (20). Tento vzorek obsahoval sice velké množství templátové DNA po extrakci, nicméně při PCR reakci nedošlo k tvorbě cílového produktu, ale vznikaly četné nespécifické produkty. Úsek se nepodařilo amplifikovat ani při opakované PCR a vzorek byl tedy ze sekvenace vyřazen. Ostatní vzorky vykazovaly vznik hlavního produktu v dostatečném množství. Tyto bandy byly porovnány s markerem (M), kdy měly očekávanou délku cca 1500 bp. Jamka s negativní kontrolou (N) dokládá, že byla práce provedena asepticky. V čele většiny drah se nachází oblast, která oproti okolí září. S největší pravděpodobností se jedná o nespótrebované primery nebo velmi krátké



nespecifické produkty, které lze odstranit purifikačním krokem. Po purifikaci byla opět změřena koncentrace a čistota DNA. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 17.

Tabulka 17: Koncentrace a čistota amplikonu pro 16S rRNA po purifikaci

Kmen	c <sub>DNA</sub> [ng/μl]	Čistota [1]	Kmen	c <sub>DNA</sub> [ng/μl]	Čistota [1]
20	vyřazeno		97	43,5	1,92
37	56,0	1,90	99	50,7	1,94
55	56,4	1,90	100	45,6	1,89
70	49,8	1,90	101	59,9	1,93
93	49,1	1,93	102	59,4	1,94
96	49,9	1,97	104	39,1	1,89

Koncentrace DNA byla po purifikaci poměrně vyrovnaná a pohybovala se mezi hodnotami 39,1 – 59,9 ng/μl. Zároveň byla vyšší čistota oproti měření čistoty po izolaci DNA (tabulka 16). Hodnoty poměrů absorbancí se pohybovaly mezi 1,89 – 1,97, tedy v optimálním intervalu.

V tabulce 18 jsou uvedeny výsledky Sangerova sekvenování. U sekvenační analýzy se obecně bere jako výsledek vhodný pro určení druhu shoda 98 – 100 % (ISS). V tabulce 19 jsou pak uvedeny výsledky identifikace pomocí MALDI-TOF MS, kdy je u každého izolátu uvedeno identifikační skóre (ISM). V případě, že je vyšší než 2,000, je bezpečně určen rod a s vysokou pravděpodobností také druh. V případě, že leží mezi 1,700 – 1,999 je bezpečně určen pouze rod.

Tabulka 18: Výsledky identifikace bakterií (Sangerovo sekvenování)

Číslo izolátu	Původ izolátu	Zástupce	Čeleď	ISS [%]
37	V4	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	<i>Paenibacillaceae</i>	98,38
55	P1	<i>Bacillus altitudinis</i>	<i>Bacillaceae</i>	100
70	P3	<i>Peribacillus butanolivorans</i>	<i>Bacillaceae</i>	99,73
93	L2	<i>Mesobacillus subterraneus</i>	<i>Bacillaceae</i>	99,73
96	L4	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillaceae</i>	99,64
97		<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillaceae</i>	98,88
99	L5	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillaceae</i>	99,78
100		<i>Priestia megaterium</i>	<i>Bacillaceae</i>	97,62

ISS – Identifikační skóre u Sangerova sekvenování

Tabulka 19: Výsledky identifikace bakterií (metoda MALDI-TOF MS)

Číslo izolátu	Původ izolátu	Zástupce	Čeleď	ISM
1	V1	<i>Serratia fonticola</i>	<i>Yersiniaceae</i>	2,414
2		<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Erwiniaceae</i>	2,297
3		<i>Serratia fonticola</i>	<i>Yersiniaceae</i>	2,425
4		<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Erwiniaceae</i>	2,402
8	V2	<i>Pantoea ananatis</i>	<i>Erwiniaceae</i>	2,205
9		<i>Erwinia persicina</i>	<i>Erwiniaceae</i>	2,202
10		<i>Erwinia persicina</i>	<i>Erwiniaceae</i>	2,235
11		<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafniaceae</i>	2,596
12		<i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	2,138
14		<i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	2,414
16	V3	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafniaceae</i>	2,468
17		<i>Erwinia persicina</i>	<i>Erwiniaceae</i>	2,281
18		<i>Erwinia persicina</i>	<i>Erwiniaceae</i>	2,239
19		<i>Erwinia persicina</i>	<i>Erwiniaceae</i>	2,227
20		<i>Providencia sp.</i>	<i>Morganellaceae</i>	1,791
21		<i>Pseudomonas libanensis</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	2,113
23		<i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	2,163
27	V4	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafniaceae</i>	2,570
28		<i>Klebsiella variicola</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	2,525
29		<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafniaceae</i>	2,590
30		<i>Klebsiella variicola</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	2,487
31		<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafniaceae</i>	2,528
32		<i>Proteus myxofaciens</i>	<i>Morganellaceae</i>	2,369
33		<i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	2,420
34		<i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	2,393
35		<i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	2,381
36		<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	2,095
38	V5	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	2,550
39		<i>Kluyvera cryocrescens</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	2,125
40		<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	2,436
41		<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	2,418
42		<i>Serratia marcescens</i>	<i>Yersiniaceae</i>	2,308
48	P1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	<i>Caryophanaceae</i>	2,184
49		<i>Brevibacillus sp.</i>	<i>Paenibacillaceae</i>	1,885
64	P2	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillaceae</i>	1,820
65		<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillaceae</i>	2,320
69	P3	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	2,091
79	P4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	2,096
81		<i>Bacillus mojavenis</i>	<i>Bacillaceae</i>	2,011
95	L3	<i>Priestia megaterium</i>	<i>Bacillaceae</i>	2,035
103	K3	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	2,283
105	K4	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	<i>Caryophanaceae</i>	2,098

ISM – Identifikační skóre u metody MALDI-TOF MS

Jak vyplývá z tabulky 19, pro vzorky včel byla typická přítomnost gramnegativních tyčinkovitých bakterií, z nichž velká většina patří mezi zástupce řádu *Enterobacterales*. Zástupci rodu *Pseudomonas* spadají do řádu *Pseudomonadales*. Jedinou grampozitivní bakterií izolovanou ze vzorku včel byl sporulát *Paenibacillus amylolyticus* (tabulka 18) patřící do řádu *Caryophanales*. Přítomnost těchto bakterií ve vzorcích včel je poměrně běžná, obdobně i zástupci řádu *Enterobacterales* bývají izolováni pravidelně. Typicky jsou ve vzorcích přítomni zástupci rodů *Klebsiella*, *Pantoea* a *Enterobacter* a druhy jako *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Escherichia coli* nebo *Serratia marcescens* [96, 97, 98, 99]. Ze včel bývají často izolovány i grampozitivní bakterie, především zástupci rodů *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus* a *Enterococcus* [94, 98, 99]. V analyzovaných vzorcích včel však k nárůstu těchto bakterií nedošlo. Z gramnegativních bakterií jsou typickými zástupci i různé druhy rodu *Pseudomonas*. Ty se vyskytují v prostředí velmi běžně a vzhledem k vysoké metabolické aktivitě mohou pozitivně ovlivňovat zdraví včel degradací některých toxických sloučenin, jako jsou rezidua pesticidů a podobně [100]. Mezi často se vyskytujícími zástupci tohoto rodu patří *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas putida* nebo *Pseudomonas aeruginosa* [99, 100]. Ze vzorků včel nebyly vyizolovány bakterie tvořící jádrový mikrobiom vzhledem k odlišným růstovým vlastnostem (vztah ke kyslíku, nutriční požadavky, kultivační teplota a podobně).

Pro pyl je typická přítomnost zástupců rodu *Bacillus*. Nejčastěji bývají izolovány druhy *Bacillus pumilus*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus licheniformis* a *Bacillus subtilis* [94]. Kromě *B. subtilis* byli všichni tito zástupci přítomni ve vzorcích pylu. Kromě nich byli detekováni i jiní zástupci tohoto rodu, popřípadě rodů odvozených. Kromě zmíněných bakterií byl v pylu detekován *Staphylococcus equorum* a *Staphylococcus epidermidis*, které bývají přítomny u včel a touto cestou mohou být vneseny do pylu. Totéž platí pro *Staphylococcus hominis*, který byl nalezen v mateří kašičce. Zvláštností je přítomnost izolátu 93, který byl identifikován Sangerovým sekvenováním s vysokou mírou shody jako *Mesobacillus subterraneus*. Jedná se o bakterii, která má grampozitivní stavbu buněčné stěny, nicméně se barví gramnegativně a původně byla izolována z teplých pramenů. Růst probíhá však i při 30 °C. Dalším znakem je poměrně rozmanitá délka buněk, kdy mohou připomínat až vlákna s délkou 25 μm [101]. Preparát Gramova barvení tohoto zástupce se nachází v příloze III (obrázek M).

Kromě tohoto zástupce jsou ostatní izoláty ve včelách běžně zastoupeny a nebyly zjištěny velké odlišnosti od dostupné literatury.

Vzorky 101, 102 a 104 byly vyřazeny, protože se jejich identifikace nezdařila ani pomocí Sangerovy sekvenace. Zároveň vzorek 100 (označen oranžovou barvou) byl určen jako *Priestia megaterium* s nižší pravděpodobností než 98 %, nicméně v databázi BLAST tvořil většinu zástupců na předních místech s podobným identifikačním skóre, a proto se pravděpodobně skutečně jedná o tento druh. Celkově se podařilo s různou pravděpodobností identifikovat 50 bakteriálních izolátů, které tvořilo 25 druhů. Tři izoláty byly identifikovány pouze na úrovni rodu.

### 8.3 Disková difúzní metoda pro zjištění rezistence k ATB

Cílem této screeningové metody bylo zjistit, zda některé kmeny rodu *Pseudomonas* a řádu *Enterobacterales* jsou rezistentní vůči vybraným antibiotikům. Zvláštní postavení mělo antibiotikum chloramfenikol, které je využíváno jako selekční látka při kultivaci plísní a kvasinek, nicméně z půdy CHYGA byly vyizolovány bakteriální kmeny 21, 23, 36 (*Pseudomonas* spp.) a 42 (*Serratia marcescens*). Výsledky pro pseudomonády se nachází v tabulce 20, pro zástupce řádu *Enterobacterales* v tabulce 21. Fotografie misek se nachází v příloze IV (*Pseudomonas* spp.) a V (*Enterobacterales*).

Po porovnání se souborem vytvořeným organizací EUCAST byly v tabulce označeny žlutou barvou kmeny vykazující citlivost při zvýšené expozici (I) a červenou barvou kmeny, které vykazovaly rezistenci (R) pro dané antibiotikum. Neoznačená pole vyjadřují, že daný kmen je k danému antibiotiku citlivý (S).

Tabulka 20: Průměry inhibičních zón u *Pseudomonas* spp.

ATB MO	Průměr inhibiční zóny pro dané antibiotikum [mm] (disky 6 mm)									
	FEP 30		CAZ 10		CIP 5		C 30 <sup>N</sup>		IPM 10	
<i>Pseudomonas libanensis</i> (21)	6	6	6	6	31	32	10	11	21	21
<i>Pseudomonas marginalis</i> (23)	6	6	10	11	41	40	11	11	20	20
<i>Pseudomonas extremorientalis</i> (36)	6	6	12	13	34	32	10	11	18	17

<sup>N</sup> – citlivost u dané skupiny není v souboru EUCAST definována

FEP 30 – cefepim 30 µg

CAZ 10 – ceftazidim 10 µg

CIP 5 – ciprofloxacín 5 µg

C 30 – chloramfenikol 30 µg

IPM 10 – imipenem 10 µg

Tabulka 21: Průměry inhibičních zón u zástupců řádu *Enterobacteriales*

ATB MO	Průměr inhibiční zóny pro dané antibiotikum [mm] (disky 6 mm)									
	AK 30		AMP 25		CIP 5		C 30		TE 10 <sup>N</sup>	
<i>Erwinia persicina</i> (9)	25	24	14	15	46	45	29	31	21	22
<i>Hafnia alvei</i> (31)	18	20	20	21	38	39	31	30	15	17
<i>Escherichia coli</i> (38)	18	19	24	23	38	40	28	30	19	18
<i>Serratia marcescens</i> (42)	18	12	9	12	35	36	8	15	8	8

<sup>N</sup> – citlivost u dané skupiny není v souboru EUCAST definována

AK 30 – amikacin 30 µg

AMP 25 – ampicilin 25 µg

CIP 5 – ciprofloxacin 5 µg

C 30 – chloramfenikol 30 µg

TE 10 – tetracyklin 10 µg

Výsledky ukázaly značnou rezistenci pseudomonád k cefalosporinovým antibiotikům ceftazidimu a cefepimu. Zóny nebyly buď vytvořeny vůbec, nebo spadaly do kategorie rezistence. U izolátu 36 byla dále zjištěna rezistence k imipenemu. Ostatní izoláty byly na toto antibiotikum citlivé při zvýšené expozici. Obdobné výsledky poskytl také test na rezistenci k ciprofloxacinu, kdy všechny testované kmeny spadaly právě do této kategorie. Výsledky poměrně dobře korespondují s diplomovou prací Mgr. Martiny Coufalové, která zjistila značnou míru rezistence u antibiotik ceftazidimu a imipenemu [90]. Rezistence k chloramfenikolu není v souboru EUCAST definována, nicméně v literatuře existují případy, kdy byly kmeny rezistentní na toto antibiotikum izolovány z prostředí [102]. Za hodnotu pro rezistenci lze považovat průměr inhibiční zóny menší než 12 mm [103]. Z tohoto pohledu vykazují všechny izoláty rezistenci, nicméně oficiální údaje bohužel chybí.

Zástupci řádu *Enterobacteriales* (izoláty 9, 31 a 38) byli citliví na všechna testovaná antibiotika, nicméně izolát 42 vykazoval rezistenci na ampicilin, chloramfenikol a částečně také na amikacin. Zároveň u všech ostatních izolátů měly zóny v prvním a druhém opakování velmi podobnou velikost, zatímco velikosti zón u izolátu 42 se mezi pokusy výrazně lišily. Zároveň jsou izoláty *Serratia marcescens* často rezistentní k antibiotikům včetně chloramfenikolu [104]. Nejvyšší účinnost u všech izolátů vykazovalo antibiotikum ciprofloxacin, přestože bylo v nejnižší koncentraci ze všech zkoumaných antibiotik.

## 8.4 Výsledky sekvenování NGS

Mezi dílčí výsledky přípravy knihovny pro NGS patřilo měření koncentrace vyizolované DNA. Hodnoty těchto koncentrací jsou uvedeny v tabulce 22.

Tabulka 22: Koncentrace DNA využitou při 1. PCR pro přípravu vzorků pro NGS

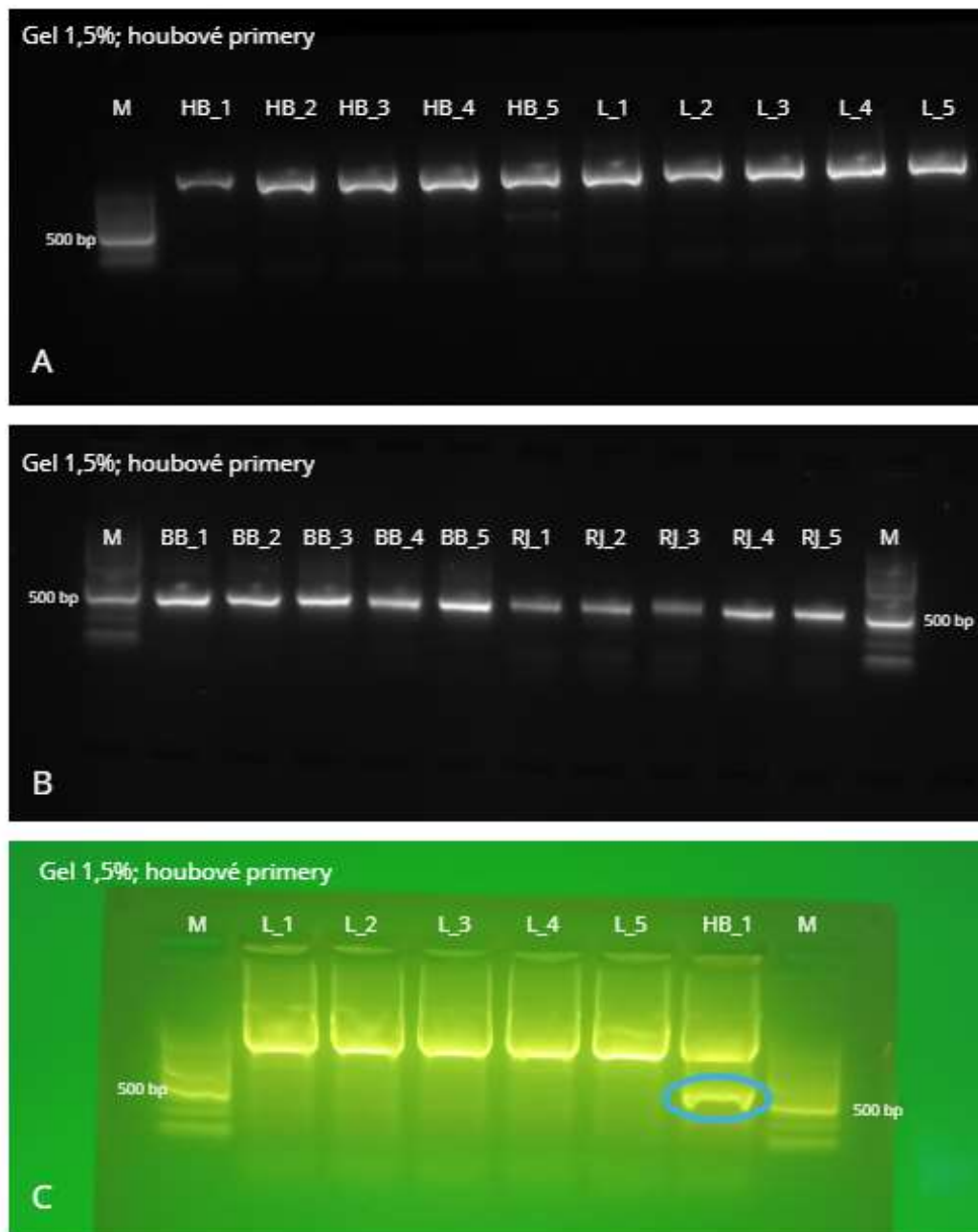
Vzorek	$C_{DNA}$ [ng/ $\mu$ l]	Vzorek	$C_{DNA}$ [ng/ $\mu$ l]	Vzorek	$C_{DNA}$ [ng/ $\mu$ l]	Vzorek	$C_{DNA}$ [ng/ $\mu$ l]
HB_1	5,8	L_1	95,1	RJ_1	1,0	BB_1	119,5
HB_2	27,1	L_2	168,9	RJ_2	3,8	BB_2	24,0
HB_3	64,3	L_3	73,2	RJ_3	3,4	BB_3	105,0
HB_4	64,9	L_4	96,8	RJ_4	1,1	BB_4	1,9
HB_5	75,8	L_5	101,6	RJ_5	1,3	BB_5	45,9

Koncentrace DNA u jednotlivých vzorků se značně lišila. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u vzorků larev (L), poměrně vysoké koncentrace DNA vykazovaly i vzorky včely a pylu (HB a BB). Mezi vzorky s nejnižšími koncentracemi patřily vzorky mateří kašičky (RJ), u kterých se však tato skutečnost předpokládala. Nízkou koncentraci měl i vzorek BB\_4, což mohlo být opět způsobeno příměsí medu a inhibitory, které bránily účinnější extrakci. Ze vzorků včel a larev bylo pravděpodobně vyizolováno i velké množství včelí DNA. Po naředění příliš koncentrovaných vzorků, provedení PCR a následné gelové elektroforézy byly gely vizualizovány a nachází se na obrázcích 4 a 5.



Obrázek 4: Elektroforetický gel s PCR produkty pro NGS (bakteriální primery)

HB\_1 – HB\_5 – vzorky včel; L\_1 – L\_5 – vzorky larev; BB\_1 – BB\_5 – vzorky pylu; RJ\_1 – RJ\_5 – vzorky mateří kašičky; M – marker velikosti fragmentu DNA; N – negativní kontrola



Obrázek 5: Elektroforetické gely s PCR produkty pro NGS (houbové primery)

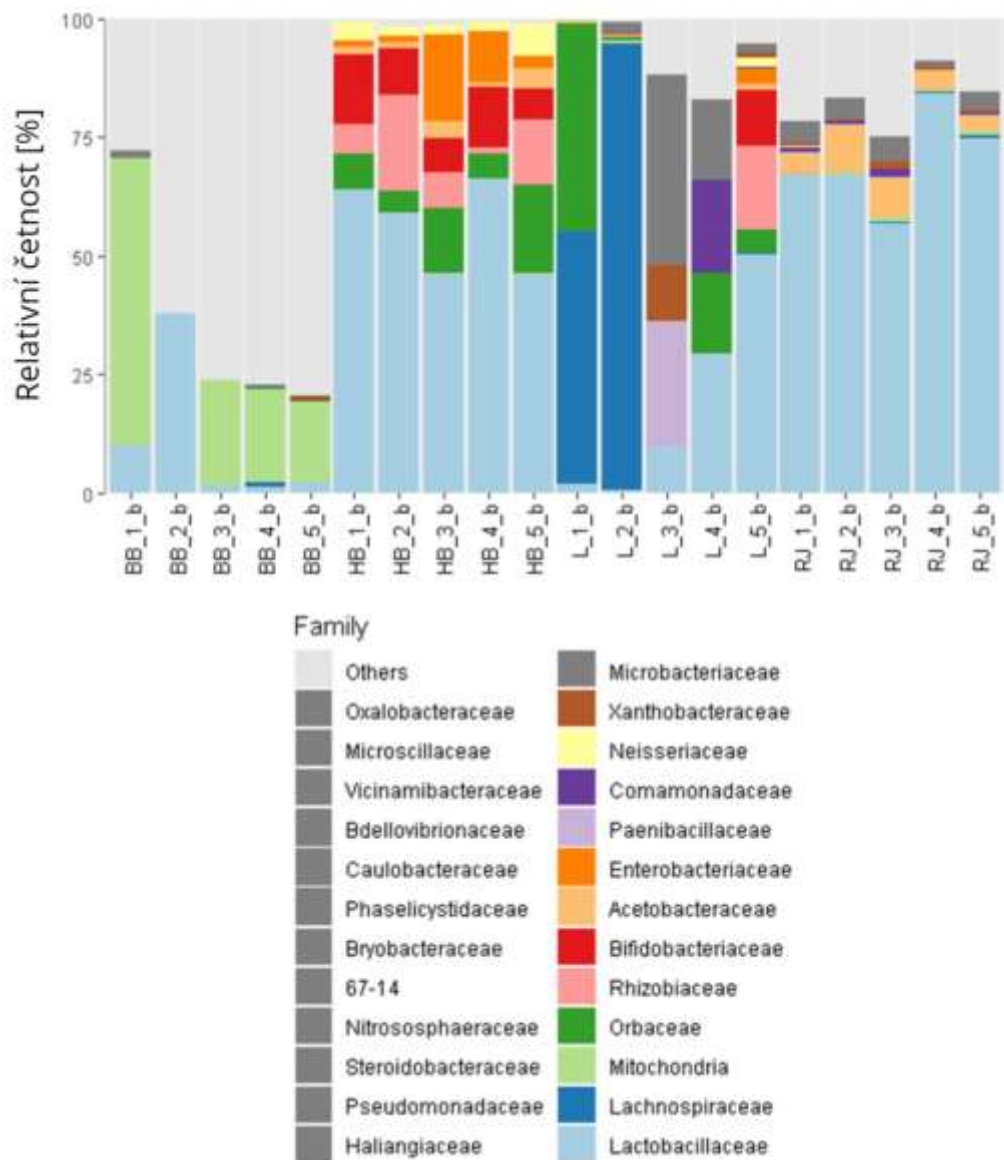
Gel A – vzorky včel (HB\_1 – HB\_5) a larev (L\_1 – L\_5) po 25 cyklech; Gel B – vzorky pylu (BB\_1 – BB\_5) a mateří kašičky (RJ\_1 – RJ\_5) po 35 cyklech; Gel C – vzorky včel (HB\_1) a larev (L\_1 – L\_5) po 35 cyklech; M – marker velikosti fragmentu DNA

Jak vyplývá z obrázku 4 amplifikace části genu 16S rRNA s bakteriálními primery byla úspěšná a požadované produkty o velikosti cca 500 bp vznikaly u vzorků včel, pylu i mateří kašičky. U vzorků larev nebyly produkty o velikosti 500 bp po 25 cyklech detekovány, nicméně PCR byla opakována s 35 cykly a produkty byly přítomny i u těchto vzorků. Zároveň se u vzorků včel, larev a pylu vyskytovaly produkty delší. Tyto produkty

se však povedlo odstranit následným purifikačním krokem a v elektroforéze po 2. PCR již nebyly detekovány. Obrázek 5 pak ukazuje amplifikaci genu pomocí houbových primerů. Na obrázku A je patrná pouze přítomnost nespecifických produktů bez vznikajícího požadovaného produktu o velikosti 500 bp u vzorků včel a larev po 25 cyklech. PCR byla taktéž opakována s 35 cykly a požadované produkty skutečně vznikly u včel, nicméně u larev chyběly (gel C). Bylo proto vyhodnoceno, že se u larev nenacházelo dostatečné množství houbové DNA a tyto vzorky nebyly na sekvenaci odeslány. V tomto případě se nespecifické produkty nepodařilo odstranit následným purifikačním krokem a proto bylo provedeno vyříznutí bandu správného produktu (označeno modře) u vzorků včel a byla provedena extrakce DNA z gelu. Vzorky HB\_2 – HB\_5 vypadaly obdobně jako vzorek HB\_1, ale jejich fotografie nebyla pořízena. Gel B pak ukazuje amplifikaci produktu po 35 cyklech u pylu a mateří kašičky, kdy vznikal pouze očekávaný produkt. Archeální primery byly taktéž využity, nicméně i po 35 cyklech vznikaly pouze nespecifické produkty a tyto vzorky nebyly sekvenací analýze podrobeny.

Po průběhu všech dalších kroků (kapitola 6.6 Příprava knihovny pro NGS) byly vzorky odeslány na sekvenaci a výsledky se nachází na obrázcích 6 a 7.





Obrázek 6: Výsledky sekvenace NGS (bakterie)

Obrázek 6 vyjadřuje relativní zastoupení jednotlivých skupin bakterií na úrovni čeledí. Vzorky s označením BB\_1, BB\_2 a L\_2 – L\_5 obsahovaly pouze málo sekvencí a tyto výsledky nemají velkou statistickou váhu.

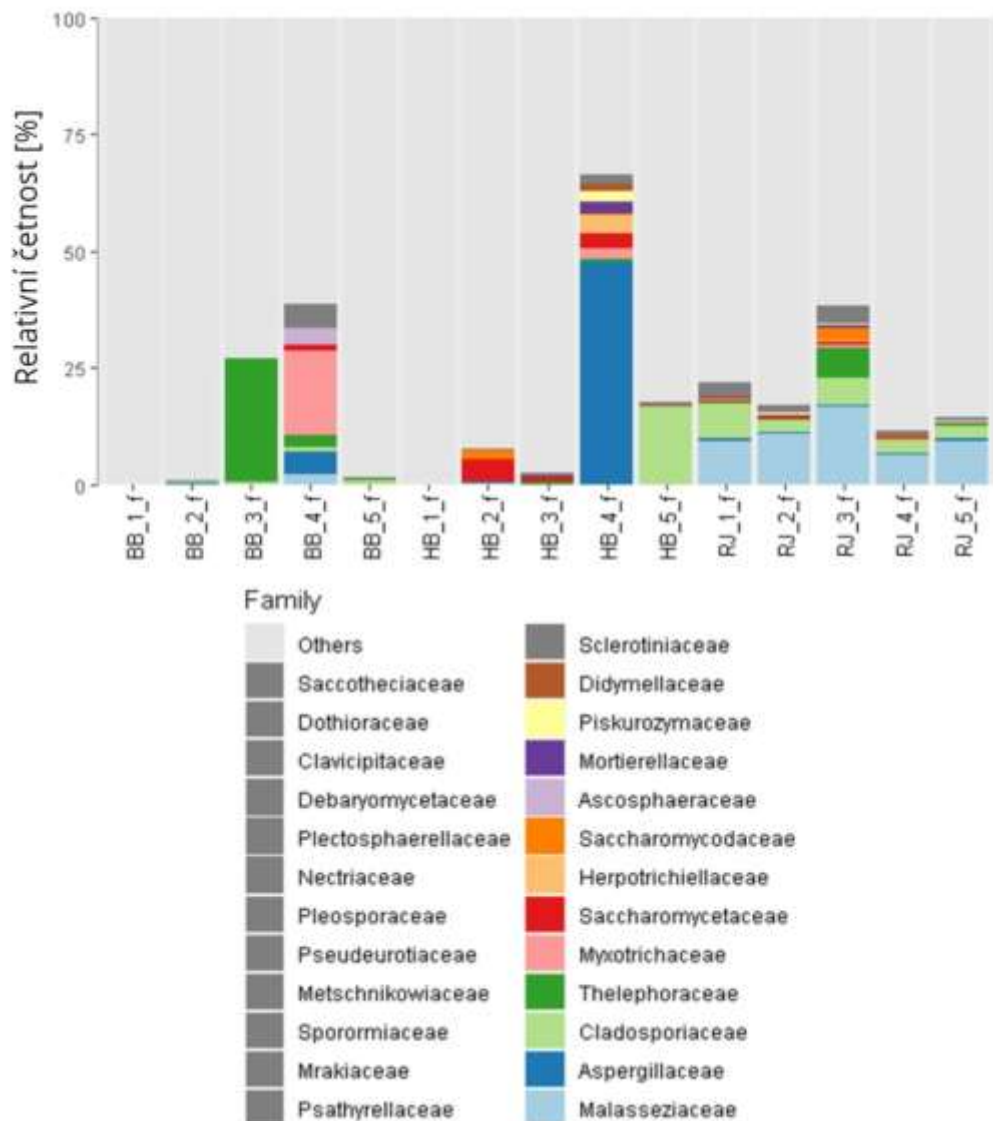
Pro vzorky pylu je typická přítomnost bakteriální skupiny označené jako Mitochondria. Tato skupina nebyla detekována pouze ve vzorku BB\_2. V tomto případě se s největší pravděpodobností jedná o sinice, jejichž DNA je velmi podobná mitochondriální DNA, a program používaný ke zpracování výsledků takto vyhodnocuje. Obecně platí, že skupiny různých cyanobakterií jsou v přírodě velmi hojně zastoupeny a mohou být přítomny

i v pylu, který je uložen v plástu [51]. Ve všech vzorcích pylu pak byli přítomni v různém množství zástupci čeledi *Lactobacillaceae*, kteří jsou pro pyl typičtí [49, 50]. Ve vzorku BB\_5 byli pak nalezeni zástupci čeledi *Bifidobacteriaceae*. Značnou část přítomného mikrobiomu však tvořily bakterie zařazené do skupiny „ostatní“.

Ve všech vzorcích včel bylo identifikováno 7 přítomných čeledí, a to *Lactobacillaceae*, *Orbaceae*, *Rhizobiaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Acetobacteraceae* a *Neisseriaceae*. Největší část (asi polovinu) tvoří zástupci čeledi *Lactobacillaceae*. Zástupci ostatních čeledí jsou přítomni v nižších počtech a jsou i značné rozdíly mezi jednotlivými včelstvy. Vzorky HB\_3 a HB\_4 vykazovaly vyšší přítomnost zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*, s čímž především v případě vzorku HB\_4 korespondovalo i kultivační stanovení. S vysokou pravděpodobností byli ve vzorcích přítomni zástupci jádrového mikrobiomu *Lactobacillus Firm-4*, *Lactobacillus Firm-5* a *Apilactobacillus kunkeei* (čeleď *Lactobacillaceae*), *Bifidobacterium asteroides* (čeleď *Bifidobacteriaceae*), *Frischella perrara* a *Gilliamella apicola* (čeleď *Orbaceae*), *Bombella apis* (čeleď *Acetobacteraceae*) a *Snodgrassella alvi* (čeleď *Neisseriaceae*) [19, 20]. Z jádrového mikrobiomu nebyla detekována pouze čeleď *Bartonellaceae*, do které by spadal druh *Bartonella apis*.

Vzorky larev L\_1 – L\_5 vykazují značnou rozmanitost a nízkou konzistenci bakteriálních čeledí. Existuje značná podobnost mezi prvními dvěma vzorky, ostatní jsou však již značně odlišné a liší se i mezi sebou. To může být důkazem větší diverzity v mikrobiomu larev a jeho snazším ovlivněním vnějšími faktory [26]. Menší byla také diverzita, kdy bylo izolováno méně bakteriálních čeledí než u dospělých včel. Výjimkou byl vzorek L\_5, jehož mikrobiom byl prakticky totožný s mikrobiomem dospělé včely. Za zmínku stojí také přítomnost čeledi *Paenibacillaceae* ve vzorku L\_3, která však kultivačně potvrzena nebyla.

Složení mikrobiomu mateří kašičky je ze všech zkoumaných vzorků nejvíce konzistentní a jednotlivé vzorky RJ\_1 – RJ\_5 se liší jen zcela nepatrně. Dominantní čeleď je stejně jako u vzorků včel *Lactobacillaceae*. Tato čeleď byla přítomna u všech vzorků v relativním zastoupení > 50 %, u vzorků RJ\_4 a RJ\_5 pak > 75 %. Druhou významnou skupinou, která byla přítomna, je čeleď *Acetobacteraceae*. Diverzita mateří kašičky byla tedy oproti ostatním vzorkům velmi nízká. Tato skutečnost platí i pro vzorky pylu a může to být nepřímý důkaz o jejich značné antimikrobní aktivitě, kdy v nich dokáže přežít pouze velmi úzká skupina mikroorganismů a jsou tedy dobře konzervované před kontaminanty z okolního prostředí.



Obrázek 7: Výsledky sekvenace NGS (houby)

Na obrázku 7 se pak nachází relativní zastoupení přítomných houbových mikroorganismů. U vzorků pylu BB\_1 – BB\_5 a včel HB\_1 – HB\_5 lze pozorovat značnou diverzitu a eukaryotické mikrobiomy se mezi jednotlivými včelstvy neshodují. Zároveň u těchto vzorků byly často přítomné mikroorganismy zařazené do skupiny „ostatní“, což dokazuje také značnou rozmanitost. Vzorky HB\_3 a HB\_4 zároveň obsahovaly velmi nízký počet sekvencí a tyto výsledky nejsou příliš validní. Obecně je eukaryotický mikrobiom velmi málo prozkoumaný [23]. Určitou míru konzervovanosti lze pozorovat u vzorků mateří kašičky RJ\_1 – RJ\_5. Dominantní čeledí byla *Malasseziaceae* následovaná *Cladosporiaceae*. U vzorku RJ\_3 byly ve větším množství přítomny ještě čeledi *Thelephoraceae* a *Saccharomycodaceae*.

## ZÁVĚR

Kultivačními metodami s následnou identifikací se podařilo určit ve vzorcích včel, larev, pylu a mateří kašičky 50 izolátů, které tvořilo 25 mikroorganismů identifikovaných na úrovni druhu a 3 mikroorganismy identifikované na úrovni rodu. Vzhledem k tomu, že izolované bakteriální kmeny nepatřily mezi bakterie jádrového mikrobiomu, byly mezi jednotlivými včelstvy rozdíly. Poměrně častými izoláty byly izoláty rodu *Pseudomonas* a druhu *Hafnia alvei*, které se vyskytovaly u 3 z 5 vzorků včel. Pro vzorky včel byla typická přítomnost gramnegativních tyčinek. U vybraných izolátů pocházejících ze vzorků včel byla provedena disková difúzní metoda na screening antibiotické rezistence u bakterií přítomných v prostředí. Bylo zjištěno, že pseudomonády vykazují rezistenci nebo sníženou míru citlivosti ke všem zkoumaným antibiotikům, což byl očekávaný výsledek vzhledem k dřívějším pracem. Zástupci řádu *Enterobacterales* byli na testovaná antibiotika citliví. Výjimkou byl kmen *Serratia marcescens*, kde byla zjištěna rezistence na amikacin, ampicilin a chloramfenikol. To je důkazem, že i v běžném prostředí se rezistentní bakterie vyskytují. Pro vzorky pylu a larev byla typická přítomnost grampozitivních bakterií včetně sporulátů spadajících nejčastěji do čeledi *Bacillaceae*. V mateří kašičce bylo nalezeno jen velmi malé množství mikroorganismů rostoucích za daných podmínek.

Metagenomickou analýzou vzorků ze stejných včelstev byla zjištěna přítomnost jádrového mikrobiomu ve vzorcích včel. Zároveň byl mikrobiom dle očekávání značně podobný mezi jednotlivými vzorky a to složením i relativním zastoupením jednotlivých čeledí. Podobná konzervativnost byla pozorována u vzorků mateří kašičky a vzorků pylu, nicméně v případě pylu bylo určeno většinou menší množství přítomných skupin bakterií. Mikrobiomy larviček mezi sebou vykazovaly značné odlišnosti. Zvláštností byl pak mikrobiom larev L\_5, který se velmi podobal mikrobiomu dospělé včely.

Identifikace hub nepřinesla příliš dobré výsledky, nicméně bylo dokázáno, že složení eukaryotického mikrobiomu je mnohem méně konzervativní než toho prokaryotického. Zároveň byla často určena pouze malá část mikroskopických hub a většina přítomného mikrobiomu byla zahrnuta do skupiny „ostatní“. Určité stále složení eukaryot vykazovaly mezi sebou vzorky mateří kašičky.

Pro zpřesnění výsledků by bylo třeba analyzovat větší množství vzorků z různých lokalit, nicméně i tak byly pozorovány některé zákonitosti popsané v odborné literatuře, což podporuje validitu získaných výsledků.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DANIHLÍK, Jiří et al., 2017. Biologie včely medonosné. In: Včelařství, Svazek II. PSNV, s. 10 - 94. ISBN 978-80-270-0776-9.
- [2] HALVORSON, Kennedy et al., 2021. Protection of honeybees and other pollinators: one global study. *Apidologie* [online]. **52**(3), 535-547. ISSN 0044-8435. Dostupné z: doi:10.1007/s13592-021-00841-1
- [3] HAN, Fan, Andreas WALLBERG a Matthew T. WEBSTER, 2012. From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate? *Ecology and Evolution* [online]. **2**(8), 1949-1957. ISSN 2045-7758. Dostupné z: doi:10.1002/ece3.312
- [4] RYAN, Laura A. et al., 2020. The buzz around spatial resolving power and contrast sensitivity in the honeybee, *Apis mellifera*. *Vision Research* [online]. **169**, 25-32. ISSN 00426989. Dostupné z: doi:10.1016/j.visres.2020.02.005
- [5] CHOLÉ, Hanna et al., 2022. Antenna movements as a function of odorants' biological value in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Scientific Reports* [online]. **12**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-022-14354-z
- [6] MA, Yun et al., 2019. Structure, properties and functions of the forewing-hindwing coupling of honeybees. *Journal of Insect Physiology* [online]. **118**. ISSN 00221910. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinsphys.2019.103936
- [7] RAMIREZ-ESQUIVEL, Fiorella a Sridhar RAVI, 2023. Functional anatomy of the worker honeybee stinger (*Apis mellifera*). *IScience* [online]. **26**(7). ISSN 25890042. Dostupné z: doi:10.1016/j.isci.2023.107103
- [8] RUDRA GOUDA, M. N. et al., 2024. Diversity of Gut Microbes in the Forager and Hive Bees of an Indian Population of *Apis mellifera*. *National Academy Science Letters* [online]. **47**(1), 23-28. ISSN 0250-541X. Dostupné z: doi:10.1007/s40009-023-01318-8
- [9] ALATAWY, Marfat et al., 2020. Gut Microbial Communities of Adult Honey Bee Workers (*Apis mellifera*). *Biosciences Biotechnology Research Asia* [online]. **17**(2), 353-362. ISSN 09731245. Dostupné z: doi:10.13005/bbra/2838
- [10] KNOLL, Stephane et al., 2020. The honey bee (*Apis mellifera* L., 1758) and the seasonal adaptation of productions. Highlights on summer to winter transition and back to summer metabolic activity. A review. *Livestock Science* [online]. **235**. ISSN 18711413. Dostupné z: doi:10.1016/j.livsci.2020.104011
- [11] COLLINS, Anita M., 2004. Variation in Time of Egg Hatch by the Honey Bee, (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America* [online]. **97**(1), 140-146. ISSN 00138746. Dostupné z: doi:10.1603/0013-8746(2004)097[0140:VITOEH]2.0.CO;2
- [12] HE, Xu-Jiang et al., 2019. A comparison of honeybee (*Apis mellifera*) queen, worker and drone larvae by RNA-Seq. *Insect Science* [online]. **26**(3), 499-509. ISSN 1672-9609. Dostupné z: doi:10.1111/1744-7917.12557
- [13] HSIEH, Yu-Shan a Chin-Yuan HSU, 2011. The changes of age-related molecules in the trophocytes and fat cells of queen honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* [online]. **42**(6), 728-739. ISSN 0044-8435. Dostupné z: doi:10.1007/s13592-011-0085-x

- [14] GRUNA, Bronislav et al., 2020. Včelí produkty. In: Včelařství, Svazek III. PSNV, s. 123 - 133. ISBN 978-80-907079-3-1.
- [15] RAMANATHAN, Ajitha Nath Koomankode Ganapathi, Ananthakrishnan Jayakumaran NAIR a Vetha Sundaram SUGUNAN, 2018. A review on Royal Jelly proteins and peptides. *Journal of Functional Foods* [online]. **44**, 255-264. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2018.03.008
- [16] HU, Fu-Liang et al., 2019. Standard methods for *Apis mellifera* royal jelly research. *Journal of Apicultural Research* [online]. **58**(2), 1-68. ISSN 0021-8839. Dostupné z: doi:10.1080/00218839.2017.1286003
- [17] BAKOUR, Meryem et al., 2022. Bee Bread as a Promising Source of Bioactive Molecules and Functional Properties: An Up-To-Date Review. *Antibiotics* [online]. **11**(2). ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics11020203
- [18] BRÜSSOW, Harald, 2020. Problems with the concept of gut microbiota dysbiosis. *Microbial Biotechnology* [online]. **13**(2), 423-434. ISSN 1751-7915. Dostupné z: doi:10.1111/1751-7915.13479
- [19] SMUTIN, Daniil et al., 2022. Micro”bee”ota: Honey Bee Normal Microbiota as a Part of Superorganism. *Microorganisms* [online]. **10**(12). ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10122359
- [20] NOWAK, Adriana et al., 2021. Characterization of *Apis mellifera* Gastrointestinal Microbiota and Lactic Acid Bacteria for Honeybee Protection - A Review. *Cells* [online]. **10**(3). ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10030701
- [21] HRONCOVA, Zuzana et al., 2015. Variation in Honey Bee Gut Microbial Diversity Affected by Ontogenetic Stage, Age and Geographic Location. *PLOS ONE* [online]. **10**(3). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0118707
- [22] ELLEGAARD, Kirsten M et al., 2015. Extensive intra-phylotype diversity in lactobacilli and bifidobacteria from the honeybee gut. *BMC Genomics* [online]. **16**(1). ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-015-1476-6
- [23] ROMERO, S. et al., 2019. The honey bee gut microbiota: strategies for study and characterization. *Insect Molecular Biology* [online]. **28**(4), 455-472. ISSN 0962-1075. Dostupné z: doi:10.1111/imb.12567
- [24] TAUBER, James P. et al., 2019. Effects of a Resident Yeast from the Honeybee Gut on Immunity, Microbiota, and *Nosema* Disease. *Insects* [online]. **10**(9). ISSN 2075-4450. Dostupné z: doi:10.3390/insects10090296
- [25] HRONCOVA, Zuzana et al., 2019. In-hive variation of the gut microbial composition of honey bee larvae and pupae from the same oviposition time. *BMC Microbiology* [online]. **19**(1). ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-019-1490-y
- [26] KOWALLIK, Vienna et al., 2021. Honey Bee Larval and Adult Microbiome Life Stages Are Effectively Decoupled with Vertical Transmission Overcoming Early Life Perturbations. *MBio* [online]. **12**(6), e02966-21. ISSN 2150-7511. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.02966-21

- [27] CAESAR, Lílian et al., 2024. Metagenomic analysis of the honey bee queen microbiome reveals low bacterial diversity and Caudoviricetes phages. *MSystems* [online]. **9**(2), e01182-23. ISSN 2379-5077. Dostupné z: doi:10.1128/msystems.01182-23
- [28] COPELAND, Duan C. et al., 2022. Early Queen Development in Honey Bees: Social Context and Queen Breeder Source Affect Gut Microbiota and Associated Metabolism. *Microbiology Spectrum* [online]. **10**(4), e00383-22. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/spectrum.00383-22
- [29] WANG, Hongfang et al., 2024. Queen bee gut microbiota extends honeybee lifespan by inhibiting insulin signaling. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **90**(4), e01799-23. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.01799-23
- [30] KEŠNEROVÁ, Lucie et al., 2020. Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer. *The ISME Journal* [online]. **14**(3), 801-814. ISSN 1751-7362. Dostupné z: doi:10.1038/s41396-019-0568-8
- [31] CASTELLI, Loreley et al., 2022. Seasonal Dynamics of the Honey Bee Gut Microbiota in Colonies Under Subtropical Climate. *Microbial Ecology* [online]. **83**(2), 492-500. ISSN 0095-3628. Dostupné z: doi:10.1007/s00248-021-01756-1
- [32] ALMEIDA, Eduardo L. et al., 2023. Geographical and Seasonal Analysis of the Honeybee Microbiome. *Microbial Ecology* [online]. **85**(2), 765-778. ISSN 0095-3628. Dostupné z: doi:10.1007/s00248-022-01986-x
- [33] NGUYEN, Phuong N. a Sandra M. REHAN, 2023. Environmental Effects on Bee Microbiota. *Microbial Ecology* [online]. **86**(3), 1487-1498. ISSN 0095-3628. Dostupné z: doi:10.1007/s00248-023-02226-6
- [34] GORROCHATEGUI-ORTEGA, June et al., 2022. A short exposure to a semi-natural habitat alleviates the honey bee hive microbial imbalance caused by agricultural stress. *Scientific Reports* [online]. **12**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-022-23287-6
- [35] HOTCHKISS, Michelle Z, Alexandre J POULAIN a Jessica R K FORREST, 2022. Pesticide-induced disturbances of bee gut microbiotas. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. **46**(2). ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1093/femsre/ruab056
- [36] ALMASRI, Hanine et al., 2022. Mild chronic exposure to pesticides alters physiological markers of honey bee health without perturbing the core gut microbiota. *Scientific Reports* [online]. **12**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-022-08009-2
- [37] LANH, Pham Thi et al., 2022. The Gut Microbiota at Different Developmental Stages of *Apis cerana* Reveals Potential Probiotic Bacteria for Improving Honeybee Health. *Microorganisms* [online]. **10**(10). ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10101938
- [38] LESKA, Aleksandra et al., 2023. Characterization and Protective Properties of Lactic Acid Bacteria Intended to Be Used in Probiotic Preparation for Honeybees (*Apis mellifera* L.)—An In Vitro Study. *Animals* [online]. **13**(6). ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi:10.3390/ani13061059

- [39] TRUONG, A-Tai et al., 2023. Probiotic candidates for controlling *Paenibacillus larvae*, a causative agent of American foulbrood disease in honey bee. *BMC Microbiology* [online]. **23**(1). ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-023-02902-0
- [40] ABDI, Khaoula et al., 2023. The promise of probiotics in honeybee health and disease management. *Archives of Microbiology* [online]. **205**(2). ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-023-03416-z
- [41] ROY, Nazish et al. Probiotic Potential of *Bacillus subtilis* Strain I3: Antagonistic Activity Against Chalkbrood Pathogen and Pesticide Degradation for Enhancing Honeybee Health. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* [online]. ISSN 1867-1306. Dostupné z: doi:10.1007/s12602-024-10248-w
- [42] MUREŞAN, Carmen Ioana et al., 2022. Biological properties and activities of major royal jelly proteins and their derived peptides. *Journal of Functional Foods* [online]. **98**. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2022.105286
- [43] BAGAMERI, Lilla, Gabriela-Maria BACI a Daniel Severus DEZMIREAN, 2022. Royal Jelly as a Nutraceutical Natural Product with a Focus on Its Antibacterial Activity. *Pharmaceutics* [online]. **14**(6). ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics14061142
- [44] MAŽELIENĖ, Žaneta et al., 2022. Antimicrobial activity of royal jelly, honey, and their mixture. *Biologija* [online]. **68**(3). ISSN 2029-0578. Dostupné z: doi:10.6001/biologija.v68i3.4786
- [45] UTHAIBUTRA, Vitchayaporn et al., 2023. Inhibition of Skin Pathogenic Bacteria, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Royal Jelly from Northern Thailand. *Molecules* [online]. **28**(3). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules28030996
- [46] FENG, Mao et al., 2021. Mechanistic Insight into Royal Protein Inhibiting the Gram-Positive Bacteria. *Biomolecules* [online]. **11**(1). ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom11010064
- [47] ŠEDIVÁ, Mária et al., 2018. 10-HDA, A Major Fatty Acid of Royal Jelly, Exhibits pH Dependent Growth-Inhibitory Activity Against Different Strains of *Paenibacillus larvae*. *Molecules* [online]. **23**(12). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23123236
- [48] PRADO, Alberto et al., 2022. Honey bees change the microbiota of pollen. *Botanical Sciences* [online]. **101**(1), 127-133. ISSN 2007-4476. Dostupné z: doi:10.17129/botsci.3125
- [49] ARSERIM UCAR, Dilhun Keriman et al., 2022. Identification of Bacterial Diversity of Bee Collected Pollen and Bee Bread Microbiota by Metagenomic Analysis. *Acta Veterinaria Eurasia* [online]. **48**(3), 189-199. Dostupné z: doi:10.5152/actavet.2022.22031
- [50] KAHRAMAN-ILIKKAN, Özge, 2023. Bacterial Profile and Fatty Acid Composition of Anatolian Bee Bread Samples by Metataxonomic and Metabolomic Approach. *Current Microbiology* [online]. **80**(3). ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-023-03195-2



- [51] GHOSH, Sampat, Saeed Mohamadzade NAMIN a Chuleui JUNG, 2022. Differential Bacterial Community of Bee Bread and Bee Pollen Revealed by 16s rRNA High-Throughput Sequencing. *Insects* [online]. **13**(10). ISSN 2075-4450. Dostupné z: doi:10.3390/insects13100863
- [52] ANDERSON, Kirk E. a Brendon M. MOTT, 2023. Ecology of Pollen Storage in Honey Bees: Sugar Tolerant Yeast and the Aerobic Social Microbiota. *Insects* [online]. **14**(3). ISSN 2075-4450. Dostupné z: doi:10.3390/insects14030265
- [53] FRIEDLE, Carolin et al., 2021. Changes of microorganism composition in fresh and stored bee pollen from Southern Germany. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **28**(34), 47251-47261. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-021-13932-4
- [54] DIMOV, Svetoslav G. et al., 2021. A Snapshot Picture of the Fungal Composition of Bee Bread in Four Locations in Bulgaria, Differing in Anthropogenic Influence. *Journal of Fungi* [online]. **7**(10). ISSN 2309-608X. Dostupné z: doi:10.3390/jof7100845
- [55] DIDARAS, Nikos Asoutis et al., 2020. Antimicrobial Activity of Bee-Collected Pollen and Beebread: State of the Art and Future Perspectives. *Antibiotics* [online]. **9**(11). ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics9110811
- [56] ČERMÁK, Květoslav et al., 2016. Nemoci včel – prevence a terapie. In: Včelařství, Svazek I. PSNV, s. 101 - 156. ISBN 978-80-260-9090-8.
- [57] MORFIN, Nuria, Paul H. GOODWIN a Ernesto GUZMAN-NOVOA, 2023. *Varroa destructor* and its impacts on honey bee biology. *Frontiers in Bee Science* [online]. **1**. ISSN 2813-5911. Dostupné z: doi:10.3389/frbee.2023.1272937
- [58] FLORES, José M. et al., 2021. Impact of *Varroa destructor* and associated pathologies on the colony collapse disorder affecting honey bees. *Research in Veterinary Science* [online]. **135**, 85-95. ISSN 00345288. Dostupné z: doi:10.1016/j.rvsc.2021.01.001
- [59] BILIK, Simon et al., 2021. Visual Diagnosis of the *Varroa Destructor* Parasitic Mite in Honeybees Using Object Detector Techniques. *Sensors* [online]. **21**(8). ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s21082764
- [60] BEAUREPAIRE, Alexis et al., 2020. Diversity and Global Distribution of Viruses of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Insects* [online]. **11**(4). ISSN 2075-4450. Dostupné z: doi:10.3390/insects11040239
- [61] ZHANG, Zhening et al., 2024. Seasonal Variability in the Prevalence of DWV Strains in Individual Colonies of European Honeybees in Hawaii. *Insects* [online]. **15**(4). ISSN 2075-4450. Dostupné z: doi:10.3390/insects15040219
- [62] WEI, Ruike et al., 2022. Sacbrood Virus: A Growing Threat to Honeybees and Wild Pollinators. *Viruses* [online]. **14**(9). ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v14091871
- [63] YAÑEZ, Orlando et al., 2020. Bee Viruses: Routes of Infection in Hymenoptera. *Frontiers in Microbiology* [online]. **11**. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.00943

- [64] SCHITTNY, Dominik, Orlando YAÑEZ a Peter NEUMANN, 2020. Honey Bee Virus Transmission via Hive Products. *Veterinary Sciences* [online]. **7**(3). ISSN 2306-7381. Dostupné z: doi:10.3390/vetsci7030096
- [65] MRÁZ, Petr et al., 2021. Screening of Honey Bee Pathogens in the Czech Republic and Their Prevalence in Various Habitats. *Insects* [online]. **12**(12). ISSN 2075-4450. Dostupné z: doi:10.3390/insects12121051
- [66] NIKULIN, Sofia Levin et al., 2024. A semi-automated and high-throughput approach for the detection of honey bee viruses in bee samples. *PLOS ONE* [online]. **19**(3). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0297623
- [67] MILBRATH, Meghan O'Grady et al., 2021. Validation of Diagnostic Methods for European Foulbrood on Commercial Honey Bee Colonies in the United States. *Journal of Insect Science* [online]. **21**(6). ISSN 1536-2442. Dostupné z: doi:10.1093/jisesa/ieab075
- [68] PIETROPAOLI, Marco et al., 2022. Use of *Lactobacillus plantarum* in Preventing Clinical Cases of American and European Foulbrood in Central Italy. *Applied Sciences* [online]. **12**(3). ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app12031388
- [69] DE LEÓN-DOOR, Adrián Ponce et al., 2020. Pathogenesis, Epidemiology and Variants of *Melissococcus plutonius* (Ex White), the Causal Agent of European Foulbrood. *Journal of Apicultural Science* [online]. **64**(2), 173-188. ISSN 2299-4831. Dostupné z: doi:10.2478/jas-2020-0030
- [70] THEBEAU, Jenna M. et al., 2022. Investigation of *Melissococcus plutonius* isolates from 3 outbreaks of European foulbrood disease in commercial beekeeping operations in western Canada. *The Canadian veterinary journal* [online]. **63**(9), 935-942 [cit. 2024-04-24]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36060490/>
- [71] SOPKO, Bruno et al., 2020. Detection and quantification of *Melissococcus plutonius* in honey bee workers exposed to European foulbrood in Czechia through conventional PCR, qPCR, and barcode sequencing. *Journal of Apicultural Research* [online]. **59**(4), 503-514. ISSN 0021-8839. Dostupné z: doi:10.1080/00218839.2019.1685148
- [72] ZABRODSKI, Michael W. et al., 2022. Comparison of individual hive and apiary-level sample types for spores of *Paenibacillus larvae* in Saskatchewan honey bee operations. *PLOS ONE* [online]. **17**(2). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0263602
- [73] ERBAN, Tomas et al., 2017. Honeybee (*Apis mellifera*)-associated bacterial community affected by American foulbrood: detection of *Paenibacillus larvae* via microbiome analysis. *Scientific Reports* [online]. **7**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-05076-8
- [74] CRUDELE, Simone et al., 2020. Quantitative PCR (qPCR) vs culture-dependent detection to assess honey contamination by *Paenibacillus larvae*. *Journal of Apicultural Research* [online]. **59**(2), 218-222. ISSN 0021-8839. Dostupné z: doi:10.1080/00218839.2019.1689900

- [75] BAŃK, Beata et al., 2021. Recording the Presence of *Paenibacillus larvae larvae* Colonies on MYPGP Substrates Using a Multi-Sensor Array Based on Solid-State Gas Sensors. *Sensors* [online]. **21**(14). ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s21144917
- [76] TAXONOMY. Taxonomy browser (*Vairimorpha apis*). Online. Nenalezený vydavatel. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=35231&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>. [cit. 2024-04-24].
- [77] TAXONOMY. Taxonomy browser (*Vairimorpha ceranae*). Online. Nenalezený vydavatel. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=40302&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>. [cit. 2024-04-24].
- [78] ESKOV, E. K. et al., 2022. Damage to the Intestinal Medium of Honey Bees with *Nosema*. *Cell and Tissue Biology* [online]. **16**(1), 92-96. ISSN 1990-519X. Dostupné z: doi:10.1134/S1990519X22010023
- [79] MAZUR, Ewa Danuta a Anna Maria GAJDA, 2022. Nosemosis in Honeybees: A Review Guide on Biology and Diagnostic Methods. *Applied Sciences* [online]. **12**(12). ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app12125890
- [80] GALAJDA, Richard et al., 2021. *Nosema* Disease of European Honey Bees. *Journal of Fungi* [online]. **7**(9) [cit. 2024-04-24]. ISSN 2309-608X. Dostupné z: doi:10.3390/jof7090714
- [81] CASTAGNINO, Guido Laércio Bragança et al., 2020. Etiology, symptoms and prevention of chalkbrood disease: a literature review. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* [online]. **21**. ISSN 1519-9940. Dostupné z: doi:10.1590/s1519-9940210332020
- [82] SHEHABELDINE, Amr M., Amr H. HASHEM a Ahmed I. HASABALLAH, 2022. Antagonistic effect of gut microbiota of the Egyptian honeybees, *Apis mellifera* L. against the etiological agent of Stonebrood disease. *International Journal of Tropical Insect Science* [online]. **42**(2), 1357-1366. ISSN 1742-7592. Dostupné z: doi:10.1007/s42690-021-00654-w
- [83] URBAN-CHMIEL, Renata et al., 2022. Antibiotic Resistance in Bacteria — A Review. *Antibiotics* [online]. **11**(8). ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics11081079
- [84] LARSSON, D. G. Joakim a Carl-Fredrik FLACH, 2022. Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **20**(5), 257-269. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-021-00649-x
- [85] UDDIN, Tanvir Mahtab et al., 2021. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health* [online]. **14**(12), 1750-1766. ISSN 18760341. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiph.2021.10.020
- [86] AKIMOWICZ, Monika a Joanna BUCKA-KOLENDO, 2020. MALDI-TOF MS – application in food microbiology. *Acta Biochimica Polonica* [online]. ISSN 1734-154X. Dostupné z: doi:10.18388/abp.2020\_5380

- [87] EREN, Kubra, Nursema TAKTAKOGLU a Ibrahim PIRIM, 2023. DNA Sequencing Methods: From Past to Present. *The Eurasian Journal of Medicine* [online]. **54**(Suppl), S47-S56. ISSN 13088742. Dostupné z: doi:10.5152/eurasianjmed.2022.22280
- [88] JARDAK, Marwa et al., 2022. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic properties of prodigiosin produced by a newly isolated *Serratia* sp. C6LB from a milk collection center. *Microbial Pathogenesis* [online]. **164**. ISSN 08824010. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2022.105449
- [89] GAJIC, Ina et al., 2022. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics* [online]. **11**(4). ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics11040427
- [90] COUFALOVÁ, Martina, 2023. *Skrining antibiotické rezistence u vybraných gramnegativních tyčinek izolovaných z vodní drůbeže a z prostředí jejich chovu* [online]. Zlín [cit. 2024-05-09]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/aj2gy4/>. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [91] HESS, J. F. et al., 2020. Library preparation for next generation sequencing: A review of automation strategies. *Biotechnology Advances* [online]. **41**. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107537
- [92] HU, Taishan et al., 2021. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology* [online]. **82**(11), 801-811. ISSN 01988859. Dostupné z: doi:10.1016/j.humimm.2021.02.012
- [93] BODOR, Attila et al., 2020. Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* [online]. **19**(1), 1-22. ISSN 1569-1705. Dostupné z: doi:10.1007/s11157-020-09522-4
- [94] PEŁKA, Karolina et al., 2021. Bee Pollen and Bee Bread as a Source of Bacteria Producing Antimicrobials. *Antibiotics* [online]. **10**(6). ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics10060713
- [95] *NanoDrop Lite: User Guide* [online]. In: Thermo Fisher Scientific Technical Support [cit. 2024-05-09]. Dostupné z: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/User-Guide-2752-NanoDrop-Lite-UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/User-Guide-2752-NanoDrop-Lite-UG.pdf)
- [96] BOĞ, Emine Şeyma, Ömer ERTÜRK a Mustafa YAMAN, 2020. Pathogenicity of aerobic bacteria isolated from honeybees (*Apis mellifera*) in Ordu Province. *TURKISH JOURNAL OF VETERINARY AND ANIMAL SCIENCES* [online]. **44**(3), 714-719. ISSN 1303-6181. Dostupné z: doi:10.3906/vet-1905-67
- [97] HORAK, Richard D., Sean P. LEONARD a Nancy A. MORAN, 2020. Symbionts shape host innate immunity in honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **287**(1933). ISSN 0962-8452. Dostupné z: doi:10.1098/rspb.2020.1184
- [98] ROMANISHINA, T. A. et al., 2024. Study of disinfectant activity against bee pathogenic enterobacteria in vitro. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences* [online]. **7**(1), 41-45. ISSN 2617-6149. Dostupné z: doi:10.32718/ujvas7-1.07

- [99] KAČÁNIOVÁ, Miroslava et al., 2020. In Vitro Antagonistic Effect of Gut Bacteriota Isolated from Indigenous Honey Bees and Essential Oils against *Paenibacillus larvae*. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(18). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21186736
- [100] TSADILA, Christina, Chiara AMOROSO a Dimitris MOSSIALOS, 2023. Microbial Diversity in Bee Species and Bee Products: Pseudomonads Contribution to Bee Well-Being and the Biological Activity Exerted by Honey Bee Products: A Narrative Review. *Diversity* [online]. **15**(10). ISSN 1424-2818. Dostupné z: doi:10.3390/d15101088
- [101] KANSO, Sungwan, Anthony C GREENE a Bharat K C PATEL, 2002. *Bacillus subterraneus* sp. nov., an iron- and manganese-reducing bacterium from a deep subsurface Australian thermal aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **52**(3), 869-874. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-52-3-869
- [102] MENG, Lu et al., 2020. Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated From Raw Milk Revealed by Whole Genome Sequencing. *Frontiers in Microbiology* [online]. **11**. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.01005
- [103] KUMAR, Adarsh et al., 2021. Synergistic effect of ACC deaminase producing *Pseudomonas* sp. TR15a and siderophore producing *Bacillus aerophilus* TR15c for enhanced growth and copper accumulation in *Helianthus annuus* L. *Chemosphere* [online]. **276**. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2021.130038
- [104] ALLEN, Joanne L. et al., 2022. Healthcare-associated infections caused by chlorhexidine-tolerant *Serratia marcescens* carrying a promiscuous IncHI2 multi-drug resistance plasmid in a veterinary hospital. *PLOS ONE* [online]. **17**(3). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0264848

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

$A_{260}/A_{280}$	Poměr absorbancí při 260 a 280 nm
AK 30	Amikacin 30 $\mu\text{g}$
AMK	Aminokyselina
AMP 25	Ampicilin 25 $\mu\text{g}$
APV	Virus akutní paralýzy (Acute paralysis virus)
AS	Aerobní sporuláty
ATB	Antibiotikum
BHI	Mozkosrdcová infuze (Brain Heart Infusion)
BLAST	The Basic Local Alignment Search Tool
BMK	Bakterie mléčného kvašení
C 30	Chloramfenikol 30 $\mu\text{g}$
CAZ 10	Ceftazidim 10 $\mu\text{g}$
cDNA	DNA vzniklá reverzní transkripcí
CFU	Kolonie tvořící jednotka (Colony forming units)
CIP 5	Ciprofloxacin 5 $\mu\text{g}$
CPM	Celkový počet mikroorganismů
CPV	Virus chronické paralýzy (Chronic paralysis virus)
ČR	Česká republika
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxyribonukleotid
ddNTP	Dideoxyribonukleotid
DWV	Virus deformovaných křídel (Deformed wing virus)
EUCAST	Evropský výbor pro testování antimikrobní citlivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
FEP 30	Cefepim 30 $\mu\text{g}$

G+	Grampozitivní
G-	Gramnegativní
GIT	Gastrointestinální trakt
CHYGA	Agar s glukózou, kvasničným extraktem a chloramfenikolem (Chloramphenicol Yeast Glucose Agar)
I	Kmen citlivý k antibiotiku při zvýšené expozici (Susceptible, increased exposure)
IPM 10	Imipenem 10 µg
ISM	Identifikační skóre MALDI-TOF MS
ISS	Identifikační skóre Sangerova sekvenování
KSBHI	Mozkosrdcová infuze s KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> a škrobem (Brain Heart Infusion with KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> and starch)
MALDI-TOF MS	Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice s analyzátozem doby letu a hmotnostní spektrometrií (Matrix-assisted laser desorption/ionization, time of flight, mass spektrometry)
MO	Mikroorganismus
MRJP	Hlavní proteiny mateří kašičky (Major royal jelly protein)
MRSA	Meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MYPGP	Mueller Hinton bujón, kvasničný extrakt, pyruvát sodný, glukóza, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , agar
NGS	Sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing)
PCA	Agar pro stanovení celkového počtu mikroorganismů (Plate Count Agar)
PCA-S	Stanovení sporulátů na PCA
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
PK	Plísně a kvasinky
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce
R	Rezistentní kmen k antibiotiku (Resistant)

---

RNA	Ribonukleová kyselina
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
RT-qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
S	Citlivý kmen k antibiotiku (Susceptible)
SBV	Virus pytlíčkovitosti plodu (Sacbrood virus)
sp.	Druh (species)
spp.	Druhy (species)
TAE	Tris, acetát, kyselina ethylendiamintetraoctová
TE 10	Tetracyklin 10 µg
USA	Spojené státy americké
10-HDA	10-hydroxy-2-decenoic acid
16S rRNA	Gen pro část malé ribozomální podjednotku prokaryot
18S rRNA	Gen pro část malé ribozomální podjednotky eukaryot



**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Výskyt mikroorganismů v jednotlivých částech GITu včely [19] .....	18
Obrázek 2: Detekovaný počet mikroorganismů u jednotlivých vzorků .....	45
Obrázek 3: Elektroforetický gel s amplifikovaným genem pro 16S rRNA .....	48
Obrázek 4: Elektroforetický gel s PCR produkty pro NGS (bakteriální primery) .....	54
Obrázek 5: Elektroforetické gely s PCR produkty pro NGS (houbové primery) .....	55
Obrázek 6: Výsledky sekvenace NGS (bakterie) .....	57
Obrázek 7: Výsledky sekvenace NGS (houby) .....	59
Obrázek 8: Křížové roztěry vybraných izolátů .....	77
Obrázek 9: Gramovo barvení vybraných izolátů .....	78
Obrázek 10: Inhibiční zóny u <i>Pseudomonas</i> spp. ....	79
Obrázek 11: Inhibiční zóny u zástupců řádu <i>Enterobacterales</i> .....	80

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Složení mateří kašičky [15] .....	15
Tabulka 2: Složení čerstvého pylu [14] .....	16
Tabulka 3: Soupis použitých nástrojů a vybavení .....	31
Tabulka 4: Soupis použitých chemikálií a materiálů .....	32
Tabulka 5: Označení analyzovaných vzorků včel a dalších produktů .....	33
Tabulka 6: Použitá ředění jednotlivých vzorků .....	34
Tabulka 7: Sekvence použité dvojice primerů pro 16S rRNA gen .....	37
Tabulka 8: Složení PCR směsi pro přípravu DNA amplikonu k sekvenaci 16S rRNA genu .....	38
Tabulka 9: Průběh PCR pro přípravu DNA amplikonu k sekvenaci 16S rRNA genu .....	38
Tabulka 10: Použitá ATB pro diskovou difúzní metodu .....	39
Tabulka 11: Sekvence použitých dvojic primerů (1. PCR pro přípravu vzorků pro NGS) .....	41
Tabulka 12: Složení 1. PCR směsi pro přípravu vzorků pro NGS .....	41
Tabulka 13: Průběh 1. PCR pro přípravu vzorků pro NGS .....	42
Tabulka 14: Složení 2. PCR směsi pro přípravu vzorků pro NGS s použitím příslušných dvojic primerů s indexy .....	43
Tabulka 15: Stanovení CFU/g u vzorků včel a pylu .....	44
Tabulka 16: Koncentrace a čistota izolované DNA pro amplifikaci genu pro 16S rRNA .....	47
Tabulka 17: Koncentrace a čistota amplikonu pro 16S rRNA po purifikaci .....	49
Tabulka 18: Výsledky identifikace bakterií (Sangerovo sekvenování) .....	49
Tabulka 19: Výsledky identifikace bakterií (metoda MALDI-TOF MS) .....	50
Tabulka 20: Průměry inhibičních zón u <i>Pseudomonas</i> spp. ....	52
Tabulka 21: Průměry inhibičních zón u zástupců řádu <i>Enterobacterales</i> .....	53
Tabulka 22: Koncentrace DNA využitou při 1. PCR pro přípravu vzorků pro NGS .....	54
Tabulka 23: Sekvence indexů i5 a i7 u konkrétních vzorků .....	76

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Přehled indexů použitých při 2. PCR

Příloha P II: Křížové roztěry vybraných izolátů

Příloha P III: Gramovo barvení vybraných izolátů

Příloha P IV: Antibiotická rezistence (1)

Příloha P V: Antibiotická rezistence (2)

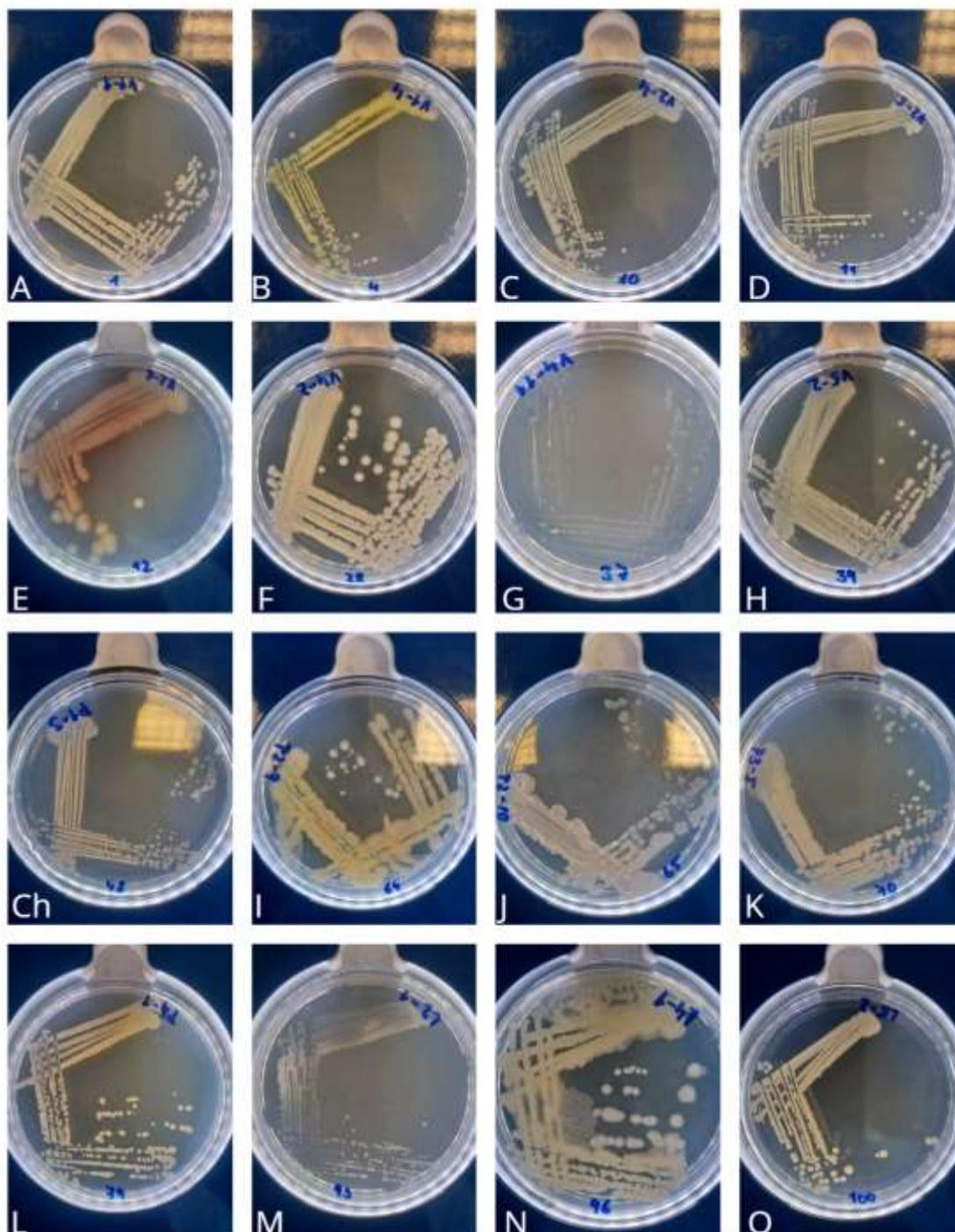
## PŘÍLOHA P I: PŘEHLED INDEXŮ POUŽITÝCH PŘI 2. PCR

Tabulka 23: Sekvence indexů i5 a i7 u konkrétních vzorků

Kód vzorku**	i7 index	Sekvence	i5 index	Sekvence
HB_1_b	2_712	GTAGAGGA	2_505	GTAAGGAG
HB_2_b	2_712	GTAGAGGA	2_506	ACTGCATA
HB_3_b	2_712	GTAGAGGA	2_507	AAGGAGTA
HB_4_b	2_712	GTAGAGGA	2_508	CTAAGCCT
HB_5_b	2_714	GCTCATGA	2_501	TAGATCGC
L_1_b	2_714	GCTCATGA	2_502	CTCTCTAT
L_2_b	2_714	GCTCATGA	2_503	TATCCTCT
L_3_b	2_714	GCTCATGA	2_504	AGAGTAGA
L_4_b	2_714	GCTCATGA	2_505	GTAAGGAG
L_5_b	2_714	GCTCATGA	2_506	ACTGCATA
BB_1_b	2_714	GCTCATGA	2_507	AAGGAGTA
BB_2_b	2_714	GCTCATGA	2_508	CTAAGCCT
BB_3_b	2_715	ATCTCAGG	2_501	TAGATCGC
BB_4_b	2_715	ATCTCAGG	2_502	CTCTCTAT
BB_5_b	2_715	ATCTCAGG	2_503	TATCCTCT
RJ_1_b	2_715	ATCTCAGG	2_504	AGAGTAGA
RJ_2_b	2_715	ATCTCAGG	2_505	GTAAGGAG
RJ_3_b	2_715	ATCTCAGG	2_506	ACTGCATA
RJ_4_b	2_715	ATCTCAGG	2_507	AAGGAGTA
RJ_5_b	2_715	ATCTCAGG	2_508	CTAAGCCT
HB_1_f	2_716	ACTCGCTA	2_501	TAGATCGC
HB_2_f	2_716	ACTCGCTA	2_502	CTCTCTAT
HB_3_f	2_716	ACTCGCTA	2_503	TATCCTCT
HB_4_f	2_716	ACTCGCTA	2_504	AGAGTAGA
HB_5_f	2_716	ACTCGCTA	2_505	GTAAGGAG
BB_1_f	2_718	GGAGCTAC	2_503	TATCCTCT
BB_2_f	2_718	GGAGCTAC	2_504	AGAGTAGA
BB_3_f	2_718	GGAGCTAC	2_505	GTAAGGAG
BB_4_f	2_718	GGAGCTAC	2_506	ACTGCATA
BB_5_f	2_718	GGAGCTAC	2_507	AAGGAGTA
RJ_1_f	2_718	GGAGCTAC	2_508	CTAAGCCT
RJ_2_f	2_719	GCGTAGTA	2_501	TAGATCGC
RJ_3_f	2_719	GCGTAGTA	2_502	CTCTCTAT
RJ_4_f	2_719	GCGTAGTA	2_503	TATCCTCT
RJ_5_f	2_719	GCGTAGTA	2_504	AGAGTAGA

\*\*\_b – použití bakteriálních primerů; \_f – použití houbových primerů

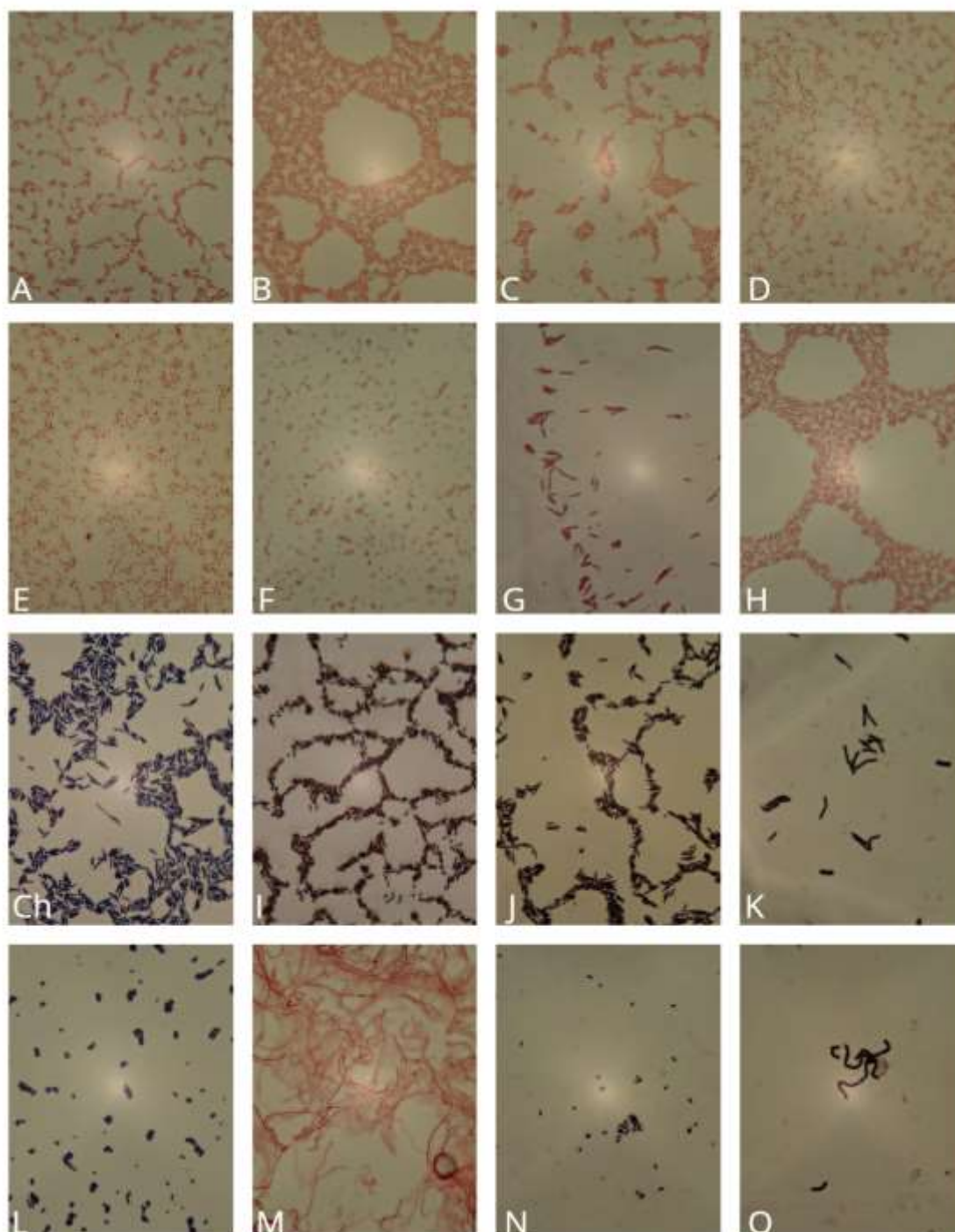
## PŘÍLOHA P II: KŘÍŽOVÉ ROZTĚRY VYBRANÝCH IZOLÁTŮ



Obrázek 8: Křížové roztěry vybraných izolátů

A – *Serratia fonticola* (1); B – *Pantoea agglomerans* (4); C – *Erwinia persicina* (10); D – *Hafnia alvei* (11);  
E – *Pseudomonas marginalis* (12); F – *Klebsiella variicola* (28); G – *Paenibacillus amylolyticus* (37);  
H – *Kluyvera cryocrescens* (39); Ch – *Lysinibacillus fusiformis* (48); I – *Bacillus altitudinis* (64);  
J – *Bacillus licheniformis* (65); K – *Peribacillus butanolivorans* (70); L – *Staphylococcus epidermidis* (79);  
M – *Mesobacillus subterraneus* (93); N – *Bacillus pumilus* (96); O – *Priestia megaterium* (100)

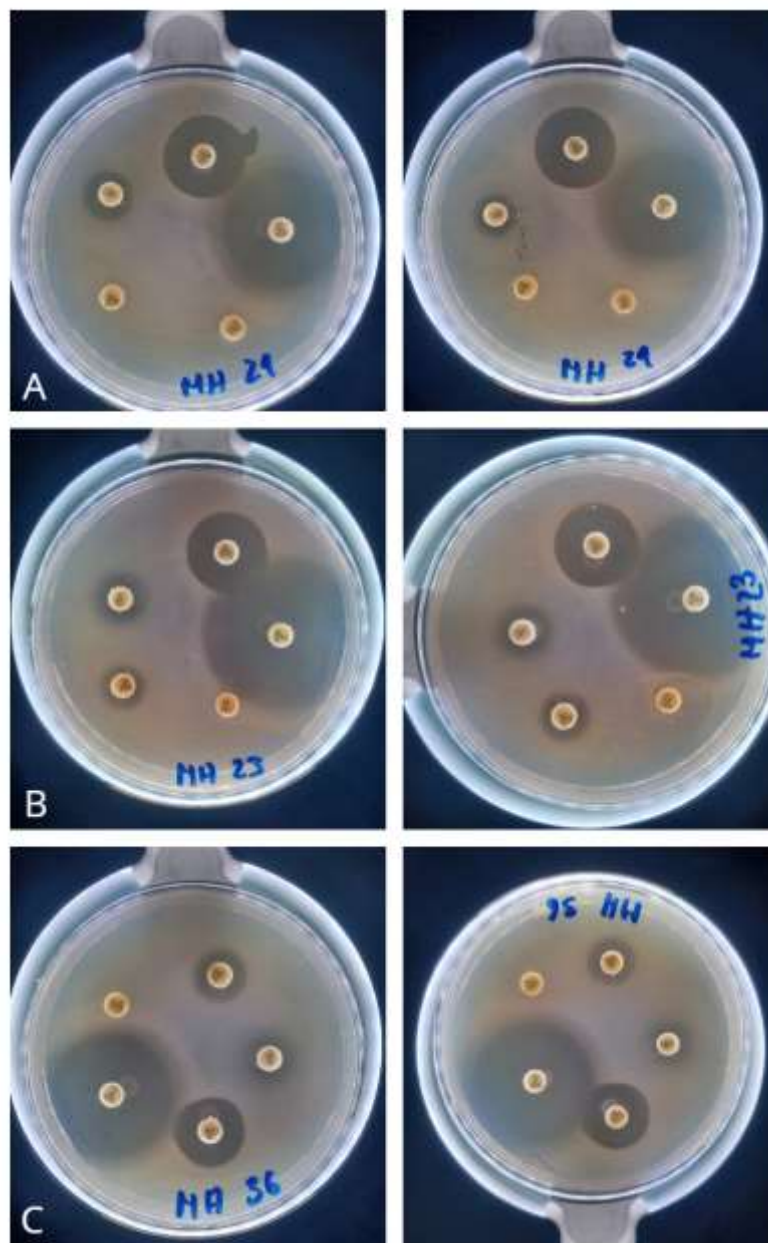
## PŘÍLOHA P III: GRAMOVO BARVENÍ VYBRANÝCH IZOLÁTŮ



Obrázek 9: Gramovo barvení vybraných izolátů

A – *Serratia fonticola* (1); B – *Pantoea agglomerans* (4); C – *Erwinia persicina* (10); D – *Hafnia alvei* (11);  
E – *Pseudomonas marginalis* (12); F – *Klebsiella variicola* (28); G – *Paenibacillus amylolyticus* (37);  
H – *Kluyvera cryocrescens* (39); Ch – *Lysinibacillus fusiformis* (48); I – *Bacillus altitudinis* (64);  
J – *Bacillus licheniformis* (65); K – *Peribacillus butanolivorans* (70); L – *Staphylococcus epidermidis* (79);  
M – *Mesobacillus subterraneus* (93); N – *Bacillus pumilus* (96); O – *Priestia megaterium* (100)

## PŘÍLOHA P IV: ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE (1)



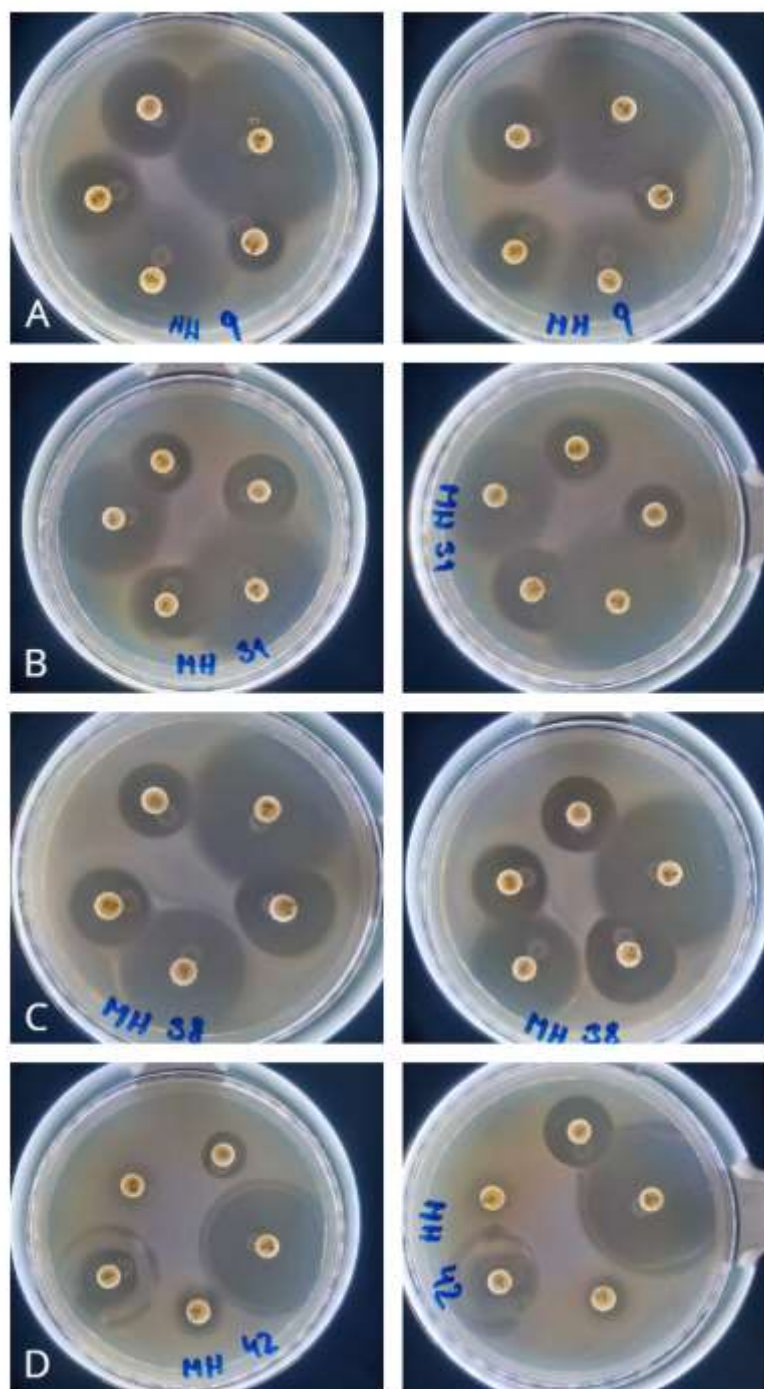
Obrázek 10: Inhibiční zóny u *Pseudomonas* spp.

Řada A – *Pseudomonas libanensis* (21)

Řada B – *Pseudomonas marginalis* (23)

Řada C – *Pseudomonas extremorientalis* (36)

## PŘÍLOHA P V: ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE (2)



Obrázek 11: Inhibiční zóny u zástupců řádu *Enterobacterales*

Řada A – *Erwinia persicina* (9)

Řada B – *Hafnia alvei* (31)

Řada C – *Escherichia coli* (38)

Řada D – *Serratia marcescens* (42)