

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Testování *in vitro* inhibičního účinku kmenů laktobacilů a  
bifidobakterií izolovaných z trávicího traktu včel  
medonosných (*Apis mellifera*) vůči bakteriálním  
patogenům v podobě původců moru a hniloby včelího  
plodu**

**Diplomová práce**

**Bc. Lucie Nová**

**Výživa a potraviny**

**doc. Ing. Jiří Killer, Ph.D.**

**© 2021 ČZU v Praze**

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Testování *in vitro* inhibičního účinku kmenů laktobacilů a bifidobakterií izolovaných z trávicího traktu včel medonosných (*Apis mellifera*) vůči bakteriálním patogenům v podobě původců moru a hniloby včelího plodu“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování doc. Ing. Jiřímu Killerovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné a podnětné rady, doporučení a připomínky a zároveň za velkou trpělivost a ochotu při konzultacích poskytnutých ke zpracování této práce.

Také bych ráda poděkovala své rodině a partnerovi za podporu nejen v poslední fázi studia, ale po celou jeho dobu.

# Testování *in vitro* inhibičního účinku kmenů laktobacilů a bifidobakterií izolovaných z trávicího traktu včel medonosných (*Apis mellifera*) vůči bakteriálním patogenům v podobě původců moru a hniloby včelího plodu

## Souhrn

Včely (*Apis mellifera*) patří mezi hmyz blanokřídlý (Hymenoptera). V přírodě i v ekologii mají nezastupitelné místo. Člověk je využívá zejména pro získání včelích produktů jako jsou med, pyl a mateří kašička. Obecně ale jakýkoliv produkt pocházející z včelího úlu je velmi nutričně přínosný pro zdraví člověka a je hojně využíván nejen v potravinářství, ale i v kosmetickém průmyslu nebo ve farmacii. Mezi další klíčovou funkci včel patří jejich role opylovače kulturních i volně rostoucích plodin. V současnosti však dochází k radikálnímu úbytku populace včel, což negativně ovlivňuje fungování celého ekosystému a způsobuje značné ekonomické ztráty ve včelařském průmyslu. Mor a hniloba včelího plodu jsou zničující nemoci včely medonosné rozšířené po celém světě. Jejich výskyt je jednou z příčin tak rozsáhlého vymírání včel, a proto je velmi důležité vyvinout bezpečnou a účinnou metodu vedoucí ke zlepšení zdraví včel. V této práci byl hodnocen potenciální *in vitro* inhibiční účinek 79 bakterií z kmenů laktobacilů a bifidobakterií izolovaných z trávicího traktu včel medonosných vůči 3 klinickým patogenním izolátům *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (původce moru včelího plodu) a jednomu patogennímu izolátu *Melissococcus plutonius* (původce hniloby včelího plodu). Výsledky ukázaly, že inhibiční aktivitu vůči alespoň jednomu klinickému kmeni vykazovalo 30 ze 79 testovaných kmenů. Polovina z aktivních kmenů náležela mezi bifidobakterie a polovina mezi laktobacily. Nejvyšší inhibiční aktivita byla stanovena zejména u laktobacilů druhu *L. apis* a *L. melliventris*. Mezi aktivní bifidobakterie patřily druhy *B. asteroides* a *B. indicum*. Ve většině případů však vykazaly pouze mírnou-vyšší inhibiční aktivitu. Určitá inhibice růstu *M. plutonia* byla zaznamenána pouze u 3 ze 79 testovaných kmenů.

**Klíčová slova:** *Laktobacillus*, *Bifidobacterium*, probiotika, mor včelího plodu, hniloba včelího plodu



# ***In vitro* testing of inhibitory effect of Lactobacilli and Bifidobacteria strains isolated from digestive tract of honey bees (*Apis mellifera*) towards bacterial pathogens in the form of causal agents of American and European foulbroods**

## **Summary**

Honey bees (*Apis mellifera*) are insects of the order Hymenoptera. They have an irreplaceable position in nature and ecology. Humans keep them especially for their ability to produce honey, but also for royal jelly and bee bread. Generally, any bee product is a very nutritious and healthy and is frequently used in food industry, cosmetic industry and pharmacy. Another key function of honey bees is pollination of cultural as well as wild plants. Nowadays, radical reduction of bee population occurs, which negatively affects whole ecosystem and causes severe economic losses in the beekeeping industry. American and European foulbroods are devastating diseases for European honey bee, the most common species worldwide. That may be the reason of the massive bee extinction and therefore it is crucial to develop an effective method to improve bee health. In this thesis a potential *in vitro* inhibitory effect of 79 bacteria of the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolated from bee gastrointestinal tract towards 3 pathogenic isolates *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* (causing American foulbrood) and 1 pathogenic isolate *Melissococcus plutonius* (causing European foulbrood) was evaluated. 30 bacteria species from 79 tested showed inhibitory effect towards at least 1 clinical species. Half of the active species were from bifidobacteria and half from laktobacilli. The strongest inhibitory effect was identified with species *L. apis* and *L. melliventris*. Active species from genus *Bifidobacterium* were *B. asteroides* and *B. indicum*. In most cases, the inhibitory activity was only slightly higher. Growth inhibition of *M. plutonia* was identified only with 3 from 79 tested species.

**Keywords:** *Laktobacillus*, *Bifidobacterium*, probiotics, American foulbrood, European foulbrood

# Obsah

1 Úvod.....	7
2 Vědecká hypotéza a cíle práce.....	8
2.1 Vědecká hypotéza.....	8
2.2 Cíle práce.....	8
3 Literární rešerše.....	9
3.1 Evoluce, systematika a bionomie včel.....	9
3.1.1 Stručný nástin evoluce a taxonomie včel.....	9
3.1.2 Systematika.....	10
3.1.3 Bionomie.....	11
3.2 Význam včel medonosných.....	14
3.2.1 Význam včel medonosných ve výživě člověka.....	14
3.3 Mikroorganismy trávicího traktu včel.....	19
3.3.1 Typy střevních mikroorganismů.....	19
3.3.2 Význam symbiotických bakterií trávicího traktu včel a opylovačů.....	20
3.3.3 Fyziologie trávení.....	21
3.4 Patogenní organismy včel.....	22
3.4.1 Bakteriální nákazy.....	22
3.4.2 Virové nákazy.....	23
3.4.3 Houbová onemocnění.....	24
3.5 Imunita včel.....	26
3.5.1 Sociální imunita.....	26
3.5.2 Individuální imunita.....	26
3.6 Mikrobiologické metody stanovení inhibičního účinku symbiotických-komenzálních bakterií TT včel s probiotickým potenciálem vůči bakteriálním patogenům včel.....	28
3.6.1 Metoda desková difúzní.....	28
3.6.2 Metoda disková difúzní s použitím sterilních vatových či papírkových terčíků uprostřed.....	28
4 Materiál a metodika.....	29
4.1 Bakteriální kmeny.....	29
4.2 Kokultivace bakteriálních izolátů s klinickými izoláty včel pro <i>in vitro</i> testování možného inhibičního účinku.....	31
5 Výsledky.....	34
5.1 Výsledky zobrazující hodnoty inhibičních zón.....	34
6 Diskuze.....	40
7 Závěr.....	43
Literatura.....	44

# 1 Úvod

Včely medonosné patří do řádu blanokřídlí (Hymenoptera), jedné z nejpočetnějších skupin hmyzu. Přesto včely v přírodě vidáme stále méně často. A jelikož jejich význam je nejen pro člověka naprosto neodmyslitelný, je třeba tuto problematiku začít důrazně řešit.

Jak už bylo naznačeno, význam včel je velice komplexní a široký pojem. Včely pomáhají zemědělcům, ovocnářům, zahradníkům nebo lesníkům, jelikož sklizeň plodů, semen, olejnin a píce je až z 90 % závislá na opylení živočichy, hlavně včelami. Nezbytné jsou ale i k opylování volně rostoucí vegetace, čímž pomáhají zachovat celkovou biodiverzitu. Z historického hlediska ale byly včely využívány zejména jako producenti medu, mateří kašičky, vosku nebo včelího jedu. Používání prvně jmenovaného produktu přitom není omezeno pouze na slazení jako náhrada cukru. Výrobky pocházející ze včelího úlu, ať už jde o med, mateří kašičku nebo propolis, jsou v dnešní době řazené mezi vysoce funkční potraviny, které se využívají nejen v potravinářství právě pro svoje pozitivní účinky na lidské zdraví.

V současnosti ale dochází k nebývale radikálnímu úbytku druhové rozmanitosti hmyzu. V dané souvislosti včelařství na celém světě čelí již několik desetiletí významným ekonomickým ztrátám. Významný vliv na tom nejspíše mají abiotické faktory, např. znečištění životního prostředí a aplikace insekticidů pro zemědělské účely. Ale také výskyt velkých ploch zemědělské monokultury, nenechávající prostor pro menší pole s rozmanitou nabídkou včelí potravy. Mezi biotické stresy, způsobující ztrátu kolonií, řadíme bakteriální původce (*Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*), houbové patogeny (*Ascosphaera apis*, *Nosema* spp.), parazity (*Varroa destructor*) a viry. V roce 2006 byl také poprvé hlášen tzv. syndrom rychlého vymizení kolonie dospělých včel. Definitivní příčina úbytku není zcela jasná, ale nejspíše se jedná o multifaktoriální problém, kombinaci výše zmíněných. Každopádně téma je to nepopíratelně/znatelně aktuální. Už Albert Einstein řekl: „když včely zmizí ze země, pak člověku zbývají jen čtyři roky života. Už nebude žádných včel, žádného opylení, žádných rostlin a žádných lidí“.

Jeden ze směrů výzkumu v dané problematice je zaměřen na využití hostitelsky specifických komenzálně-symbiotických bakterií trávicího traktu včel, které pozitivně ovlivňují fyziologii trávení. I tato diplomová práce je zaměřena na tento potenciální typ ochrany vůči vnějším patogenům.

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

### 2.1 Vědecká hypotéza

H1:

Trávicí trakt včel obývá celá řada komenzálních-symbiotických bakterií náležejících do skupiny bakterií mléčného kvašení (především rody *Lactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*) a rodu *Bifidobacterium*, které díky svým primárním metabolitům (těkavé organické kyseliny) a specifickým sekundárním metabolitům v podobě např. bakteriocinů mohou minimálně za *in vitro* podmínek inhibovat bakteriální patogeny včel. Mezi celou škálou rozličných kmenů druhů klasifikovaných do výše zmíněných rodů se vyskytují takové, které významně inhibují růst či způsobují usmrcení bakteriálních patogenů.

H2:

Bakteriální kmeny vykazující antagonistické působení budou inhibovat všechny klinické izoláty původce moru a hniloby včelího plodu.

H3:

Inhibice bude vázána především na hostitelsky specifické druhy v rámci čeledi *Lactobacillaceae*.

### 2.2 Cíle práce

C1: Otestovat inhibiční potenciál různých izolátů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií z trávicího traktu včel vůči aktuálním-virulentním izolátům bakteriálních patogenů včel prostřednictvím specifikovaných *in vitro* metod. V rámci tohoto nalézt, respektive navrhnout definované, vhodné kultivační médium pro obě skupiny testovaných bakterií, což je nezbytný předpoklad pro vypovídací hodnotu dosažených výsledků. Ty budou diskutovány, respektive konfrontovány s dosud publikovanými studiemi v dané badatelské oblasti.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Evoluce, systematika a bionomie včel

#### 3.1.1 Stručný nástin evoluce a taxonomie včel

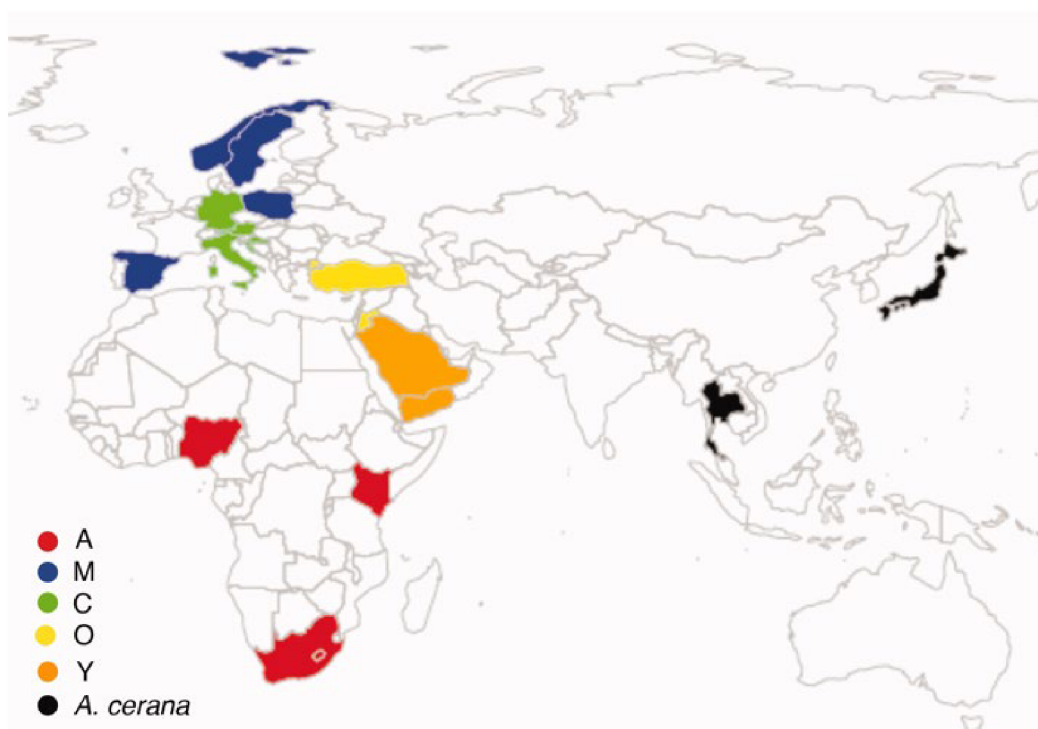
O původu včel není příliš mnoho přesných informací, jelikož jejich fosilní nálezy jsou vzácné. Na základě různých paleontologických studií vznikla ale řada hypotéz. Podle nich se poté vytvořila jednotná představa o vývoji včel. Včely se vyvinuly asi před 80 milióny let. Jejich předchůdkyně byly podobné vosám, které postupně měnily masitou stravu na stravu vegetariánskou. Postupně se včely vyvíjely ke sběru nektaru a pylu. Jejich tělo se přizpůsobilo vznikem pylových kartáčků a košíčků ke sběru pylu, pokrylo se chloupky, vyvinul se medný váček sloužící k přenášení nektaru a prodloužil se sosák (Veselý et al. 1985).

Rod *Apis* obsahuje sedm odlišných druhů, z nichž je většina rozšířena po celé Asii. Západní včela medonosná byla fylogeneticky rozšířena po subsaharské Africe, Evropě, části západní Asie a na Středním východě. Jednou z teorií je, že se tento druh oddělil od příbuzného *A. cerana* před 6ti až 25ti miliony let, když docházelo k přesouvání druhu na západ. Později, když evropští osadníci začínali s kolonizací ostatních částí zeměkoule, docházelo k transportování a zdejšímu usazování různých rodových linií *A. mellifera*, což vedlo k naturalizaci více křížících se linií (Cridland et al. 2017).

*A. mellifera* ve svém přirozeném prostředí vykazuje značné genetické a fenotypové variace jak behaviorálních, tak morfologických znaků. Bylo identifikováno minimálně 26 morfologicky a geograficky odlišných poddruhů. Podle autorů Cridland et al. (2017) morfometrické analýzy společně s genetickými studii podpořily existenci čtyř odlišných linií, nazývaných M, C, O a A. Později došlo k identifikaci ještě další linie Y ze severovýchodní Afriky a Středního východu. Výskyt těchto taxonů je zobrazen v obrázku č. 1. Naopak Franck et al. (1998) se shoduje s autory Garnery et al. (1992) a zmiňují, že rod *Apis mellifera* je složen pouze ze tří evolučních větví:

- Africká (A): *intermissa*, *monticola*, *scutellata*, *andansonii* a *capensis*
- západní Severoevropská (M): *mellifera subs.*
- jihovýchodní Evropská (C): *caucasica*, *carnica*, *ligustica*

Na přesném původu *Apis mellifera* se žádný z autorů neshoduje, ale nejpravděpodobněji se jedná o Střední východ nebo severovýchodní Afriku.



Obrázek č. 1: Geografická mapa zahrnující různé taxony včel na mapě zeměkoule  
Zdroj: Cridland et al. 2017

### 3.1.2 Systematika

Včela medonosná (*Apis mellifera*) patří zoologicky do velmi početného řádu hmyzu blanokřídlého (*Hymenoptera*). Zoologické označení zavedl Carl Linné, když v roce 1758 vybudoval systém spojující živé organismy rostlinné i živočišné říše. Z hlediska systematiky, resp. taxonomie se jedná o samostatný druh patřící s dalšími druhy do rodu včela (*Apis*).

Tento rod dále patří s ostatními rody – čmelák, pačmelák, tropické bezžihadlové včely a samotářské včely - do čeledi včelovité (*Apidae*), nadčeledi *Apoidea*. Do této čeledi patří dalších asi 12 tisíc druhů hmyzu, který se živí stejně jako včela medonosná pylem a nektarem rostlin. Nadčeleď včel je s dalšími deseti nadčeleděmi součástí podřádu štíhlopasých (*Apocrita*), řádu blanokřídlého hmyzu (*Hymenoptera*). Společným znakem blanokřídlých jsou 2 páry blanitých křídel s charakteristickou žilnatinou, umístěných na hrudi. Proměna je u blanokřídlého hmyzu dokonalá, larvy tedy nejsou podobné dospělým jedincům. Tělo je členěné na hlavu, hrud' a zadeček. Hlava nese 3 páry ústních ústrojí, složené oči a tykadla. K hrudi jsou připojené 3 páry nožiček (Tomšík et al. 1953; Veselý et al. 1985).

Schéma:

Druh: *Apis mellifera*

Rod: *Apis*

Čeleď: Apidae

Nadčeleď: Apoidea

Podřád: Apocrita

Řád: Hymenoptera

Třída: Ectognatha

Podkmen: Tracheata

Kmen: Arthropoda

Na Zemi žije asi 20 000 druhů včel, ale tato hodnota může být i vyšší. Do rodu *Apis* patří sedm druhů: *A. mellifera*, *A. cerana*, *A. nigrocincta*, *A. koschevnikovi*, *A. dorsata*, *A. adreniformis* a *A. florea* (Engel 1999).

Včela medonosná (*A. mellifera*) je v současnosti rozšířená na všechny kontinenty s výjimkou Antarktidy, i když původně se vyskytovala pouze v Evropě, Africe a Asii. Do rodu *Apis* patří celá řada dalších podskupin (plemen). Tato plemena se dají rozdělit na skupinu plemen původem ze Středomoří, Blízkého východu a Africké oblasti.

Druh *A. cerana* se vyskytuje v Číně, Japonsku a Indii. Podobně jako včela medonosná si staví hnízda v dutinách skal nebo ve vykotlaných stromech. Dělnice jsou ale o něco menší než u včely medonosné.

Včely druhu *A. florea* se vyskytují v oblasti Indonesie a Indie. Staví si na stromech hnízdo v podobě jen jednoho plástu. Dělnice jsou také menší než u druhu *A. mellifera*.

Druh *A. dorsata* žije ve východní Asii, konkrétně v Indii a je větší než včela medonosná. Staví si hnízda v korunách stromů v podobě jednoho plástu o ploše více než 1 m<sup>2</sup> (Navrátil et al. 2022).

### 3.1.3 Bionomie

Včely medonosné jsou společenský hmyz, který žije v trvalých koloniích (včelstvech), skládajících se z královny snášející vajíčka, trubců, jejichž jedinou známou funkcí je pářit se s královnou a dělnic, které během svého života vykonávají různé povinnosti a jsou nejpočetnější skupinou v kolonii (Gilliam 1997).

Včelstvo je výsledkem přizpůsobování se životním podmínkám v dlouhé vývojové době včel medonosných. Výsledkem tohoto vývoje je pevný celek, který lze chápat jako vyšší biologickou jednotku, která se chová jako samostatný organismus. Nejlepším důkazem je způsob rozmnožování. Při rojení se včelstvo rozdělí přibližně na polovinu a množí se nepohlavně, přestože je tvořeno pohlavními jedinci. Rojení je způsobem kolektivního

rozmnožování, které je nejdokonaleji vyvinuté právě u včel. Čmeláci i mravenci se rozmnožují způsobem, kdy dochází ke spáření samců a samic a každá samice poté zakládá samostatně své hnízdo.

Každé včelstvo je i společenská jednotka a má své vnitřní a vnější ekologické zákonitosti. Organizace života ve včelstvu nevznikla náhodou, žádná medonosná včela nemůže žít delší dobu sama. Celý život jednotlivých včel a jejich práce, kterou vykonávají v úle – rozmnožování, výživa plodu, stavba plástů, přinášení potravy, pylu a nektaru, přezimování a opětovné zakládání plodu je možné pouze za vzájemné pomoci a spolupráce celého včelstva. Ve vrcholném období rozvoje je včelstvo tvořeno jednou matkou, 300-600 trubci, 50 000-60 000 dělnicemi, vajíčky a plody, zásoby medu a pylu, plodových a medných plástů (Tomšík et al. 1953; Veselý et al. 1985, Veselý et al. 2003).

### **Matka**

Matka dosahuje velikosti asi 20 mm. Obvykle žije 3-5 let. Vyvíjí se z oplozených vajíček v útvarech zvaných matečnický po 16 dní. Mateří plod je krmen plnohodnotnou výživou (mateří kašičkou) až do zavíčkování matečnicku. Mateří kašička je hlavní příčina správného vývoje ve včelu – matku. Vývoj plodu probíhá podobně jako u ostatních typů jedinců (trubci, dělnice). Po naklazení následuje rýhování vajíčka a za 3 dny vylíhnutí larvy (plodu). Larvy se během svého růstu a vývoje několikrát svléknou. Nejprve jsou krmeny dělnicemi v otevřených buňkách, po 5ti dnech je dělnice v matečnickách zavíčkují (plod dělnic po 6ti dnech a plod trubců po 7mi dnech). Po zavíčkování se larva začne měnit na kuklu. Dospělá včela se po dokočení proměny prokouše víčkem buňky ven. Po vylíhnutí matka dospívá, případně se spáří. Obvykle je oplodněna po celý život a úl již neopouští (s výjimkou případného rojení). Matka začíná klást vajíčka na přelomu ledna a února s vyvrcholením v květnu a červnu, kdy může naklást až 2500 vajíček za den (Navrátil et al. 2022).

### **Trubci**

Trubci jsou včelí samci bez žihadel. Dosahují velikosti 13-17 mm. Vyvíjejí se z neoplozených vajíček po 24-25 dní. Jejich úkolem je oplodnit včelí matku (Navrátil et al. 2022).

### **Dělnice**

Dělnice dosahují velikosti 9-13 mm. Vyvíjejí se ze stejných vajíček jako matka po 21 dní. Vajíčka jsou ale uložena v menších buňkách ve středu plástu. Jejich plody jsou krmeny plnohodnotnou výživou (mateří kašičkou) jen první tři dny. Po vylíhnutí prodělávají další vývoj, s nímž se jim mění i jejich role ve včelstvu. Během prvních třech dnů má mladá včela (mladuška) funkci tzv. čističky, jejím úkolem je čistit buňky. Od čtvrtého dne poté zastává funkci krmičky a začíná krmit plody smíšenou stravou z medu, pylu, vody a mateří kašičky. Po plném rozvinutí jejích hltanových žlázek, kolem šestého dne se mladá včela stane kojičkou. Její prací je krmit nejmladší plody a matku. Od dvanáctého dne se funkčnost hltanových žlázek zastavuje a rozvíjejí se žlázy voskotvorné. Po rozvinutí těchto žlázek se včela stává stavitelkou, staví včelí dílo a zavíčkává plodové buňky a buňky se zásobami. Během tohoto období se může včela dělnice také podílet na ukládání zásob jako konzervátorka. Mezi osmnáctým a dvacátým prvním dnem se včela přesouvá k česnu, který stráží a po dvacátém



prvním dni se stává létavkou. Dělnice žijí přibližně 30-40 dní od vylíhnutí, pouze dělnice vylíhnuté na podzim, přečkají zimu a žijí 8-9 měsíců (Navrátil et al. 2022).

### **Včely samotářky**

Některé včely jsou samotářské. Takové včely si samy staví hnízdo a poskytují potravu svému potomstvu, bez pomoci ostatních včel. Většinou zemřou dříve, než jejich potomstvo dospěje (Michener 2000).

## 3.2 Význam včel medonosných

Včely medonosné (*Apis mellifera*) jsou pro lidstvo zásadní z biologických, ekologických i hospodářských důvodů (Khan et al. 2020). Význam včel se s vývojem lidské společnosti výrazně měnil. Nejprve byly včely využívány hlavně kvůli produkci lidskému tělu prospěšných a biologicky cenných látek (med, pyl, propolis, mateří kašička, včelí vosk). V současné době si včel medonosných ceníme, protože jsou zodpovědné za opylení většiny kulturních plodin a volně rostoucí vegetace. Odhaduje se, že ostatní volně žijící hmyz (včely samotářky, čmeláci nebo jiné druhy hmyzu) opyluje jen asi 5 % vegetace (Navrátil et al. 2022).

Dlouhá historie domestikace a záměrného transportu včely medonosné lidmi způsobila její současné kosmopolitní rozšíření, které zahrnuje všechny kontinenty kromě Antarktidy a některé oceánské ostrovy. Z pohledu ekosystému je opylení prostřednictvím živočichů nesmírně důležité, jelikož se odhaduje, že 87,5 % druhů kvetoucích rostlin je opylováno živočichy. Opylování včelami může také zvyšovat produkci některých plodin a zachovat celkovou biodiverzitu. Bez včel by začaly převládat tzv. větrosprašné rostliny, které k opylení využívají pouze vítr. Následkem by bylo vymření živočichů, kteří byli na ostatních rostlinách závislí, což by se ve výsledku dotknulo i lidské populace (Klein et al. 2007; Hung et al. 2018).

Včely medonosné jsou považovány také za bioindikátory životního prostředí. Indikují znečištění těžkými kovy, radioaktivními prvky nebo perzistentními organickými polutanty, jako jsou pesticidy (Bargańska et al. 2016).

### 3.2.1 Význam včel medonosných ve výživě člověka

Nejdůležitější význam včel ve výživě člověka je v používání produktů získaných z včelích úlů, kterými jsou med, mateří kašička, včelí pyl, včelí chléb nebo propolis. V současnosti se výzkumu ohledně vlivu včelích produktů na lidské zdraví věnuje spousta studií a výsledky jsou pozitivní nejen pro běžného spotřebitele, ale i pro výrobce nutraceutik nebo ve farmakologickém průmyslu.

#### Med

Med je přírodní látka produkovaná včelou medonosnou (*Apis mellifera*). Jedná se o přesycený roztok sacharidů, vytvářený sběrem nektaru z květů a medovice. Med byl jako jediné dostupné přírodní sladidlo důležitou součástí potravy již pro *Homo sapiens*, jelikož vztah mezi včelami a člověkem začal již v době kamenné. Aby člověk získal sladký med, byl ochoten riskovat i svůj život ohrožený počtem případných včelích žihadel. První písemná zmínka o medu pochází z let 2100-2000 před n. l. a zmiňuje použití medu jako léku a masti. Už ve většině starověkých kultur byl med využíván nejen pro nutriční, ale i lékařské účely.

Po dlouhou dobu v historii lidstva byl důležitým zdrojem sacharidů a jediným široce dostupným sladidlem. Průmyslová výroba cukru jej začala nahrazovat až po roce 1800. Skutečnost, že ani dnes není med využíván pouze pro své nutriční hodnoty, se projevuje v alternativní medicíně. V posledních letech se v alternativní medicíně rozvinul nový obor zvaný apiterapie, který nabízí léčbu na bázi medu a dalších včelích produktů proti mnoha

nemocem. Mezi hlavní použití medu v lékařství je dnes jeho aplikace na rány, popáleniny a infekce. Med a jiné včelí produkty totiž inhibují růst mikroorganismů a plísní, má antibakteriální účinek (většinou proti grampozitivním bakteriím) a také bylo prokázáno, že inhibuje virus zarděnek *in vitro* (Alvarez-Suarez et al. 2010; Bogdanov et al. 2013).

Mezi další velký problém, proti kterému by mohl být med účinný, je vznik mnoha kmenů bakterií odolných vůči antibiotikům. Bylo zjištěno, že med je velmi účinný proti různým klinickým izolátům bakterií a zesiluje účinek současných antibiotik *in vitro*. Také se prokázalo, že je schopen zabíjet bakterie i v jejich stavu vysoce odolného biofilmu (Wang et al. 2012). Tuto antibakteriální účinnost medu pozitivně ovlivňuje produkce peroxidu vodíku, který je vytvářen enzymaticky pomocí enzymu glukózooxidázy. Dále díky přítomnosti včelího peptidu defensinu-1, vysoké osmolaritě a nízkému pH medu. Antibakteriální účinnost podporují také obsažené fenolické sloučeniny a flavonoidy (Almasaudi 2021). Během produkce medu jsou antibakteriální účinky podpořeny také přítomností symbiotických bakterií jako jsou bakterie mléčného kvašení nebo bifidobakterie, přítomné v trávicím traktu včel, v pylu a v nektaru. Tito komenzálové produkují antimikrobiální metabolity a celkově podporují imunitu svého hostitele (Voidarou et al. 2020).

V současnosti je roční světová produkce medu asi 1,2 milionů tun, což je méně než 1 % celkové produkce cukru. Spotřeba medu se v jednotlivých zemích výrazně liší, vyšší spotřeba je ve vyspělých zemích, kde domácí produkce ne vždy pokryje poptávku na trhu. Mezi státy s nejvyšší spotřebou patří Německo, Rakousko, Švýcarsko, Portugalsko nebo Řecko (Bogdanov et al. 2013).

Tabulka č. 1: Složení medu

<b>Složení medu (g/100 g)</b>		
	<b>Kvěťový med</b>	<b>Medovicový med</b>
<b>Voda</b>	17,2	16,3
<b>Monosacharidy</b>		
Fruktóza	38,2	31,8
Glukóza	31,3	26,1
<b>Disacharidy</b>		
Sacharóza	0,7	0,5
<b>Trisacharidy</b>	4,4	18
<b>Celkové sacharidy</b>	79,7	80,5
<b>Minerální látky</b>	0,2	0,9
<b>Aminokyseliny</b>	0,3	0,6
<b>pH</b>	3,9	5,2

Zdroj: upraveno dle Bogdanov et al. 2013

V tabulce č. 1 jsou uvedeny hlavní složky medu. Sacharidy tvoří cca 95 % sušiny medu. Kromě sacharidů med obsahuje také proteiny, aminokyseliny, organické kyseliny, minerální látky, polyfenoly a vitaminy.

Hlavními sacharidy jsou monosacharidy fruktóza a glukóza. Medovicový med navíc obsahuje mnohem více různých oligosacharidů (18 g/100 g medu), což je nutričně výhodnější v procesu trávení.

Dalšími látkami, které med obsahuje, jsou bílkoviny, především enzymy a volné aminokyseliny. Med jich obsahuje cca 0,5 %. Mezi hlavní enzymy, které med obsahuje, patří amyláza (rozkládající škrob nebo glykogen), sacharáza (rozkládající sacharózu na fruktosu a glukosu) a glukózooxidáza (produkující peroxid vodíku a kyselinu glukonovou z glukózy) (Bogdanov et al. 2013). Bílkoviny, aminokyseliny a enzymy v medu pocházejí z rostlinných i z živočišných zdrojů (sekrety slinných žláz a hltau včel, mikroorganismy nacházející se v trávicím traktu včel) (da Silva et al. 2016).

Tabulka č. 2: Mikronutrienty v medu

<b>Mikronutrienty v medu</b>	
<b>Nutrienty</b>	<b>Množství (mg ve 100 g)</b>
<b>Minerální látky</b>	
Sodík	1,6-17
Vápník	3,0-31
Draslík	40-3500
Hořčík	0,7-13
Fosfor	2,0-15
Zinek	0,05-2
Měď	0,02-0,6
Železo	0,03-4
Mangan	0,02-2
Chrom	0,01-0,3
Selen	0,002-0,01
<b>Vitaminy</b>	
K	0,025
B <sub>1</sub>	0-0,01
B <sub>2</sub>	0,01-0,02
B <sub>3</sub>	0,10-0,20
B <sub>5</sub>	0,02-0,11
B <sub>6</sub>	0,01-0,32
C	2,2-2,5

Zdroj: upraveno dle Bogdanov et al. 2013

Množství vitaminů a minerálních látek je vzhledem k doporučené denní dávce marginální. Nejvíce med obsahuje draslík a vápník z minerálních látek, a z vitaminů kyselinu askorbovou (vit C), jak lze vidět v tabulce č. 2. Navíc med obsahuje stopové sloučeniny. Cholin (0,3-25 mg/kg), který je nezbytný pro kardiovaskulární funkce, správné fungování mozku a také složení a opravu buněčné membrány a např. acetylcholin (0,06-5 mg/kg), který působí jako neurotransmitter.

Další důležitou skupinou sloučenin, s ohledem na vzhled a funkční vlastnosti medu, jsou polyfenoly. Množství všech polyfenolů se v různých druzích medu objevuje od 56 do 500 mg/kg. Především jde o flavonoidy (kvercetin, luteolin, kempferol, apigenin, chrysin a galangin), fenolové kyseliny a deriváty kyseliny fenolové. Většina sloučenin je známá pro své antioxidační vlastnosti. Obsah flavonoidů se může pohybovat mezi 60 až 460 mg/100 g medu.

Termín „oxidační stres“ popisuje nerovnováhu mezi produkcí volných radikálů a antioxidační aktivitou v daném organismu. Antioxidační účinky jsou považovány za prevenci některých chronických onemocnění. Med tyto antioxidační účinky má díky obsahu glukózooxidázy, katalázy, kyseliny askorbové, flavonoidů, fenolových kyselin, derivátů karotenoidů a organických kyselin. Dále jsou medu připisovány i účinky antimutagenní a protinádorové (Alvarez-Suarez et al. 2010; Bogdanov et al. 2013).

Na druhou stranu stejně jako každá jiná potravina může být i med kontaminován z prostředí, např. těžkými kovy, pesticidy, antibiotiky apod. Obecně ale tyto druhy kontaminace nepředstavují v Evropě zdravotní riziko.

### **Mateří kašička**

Mateří kašička je bílá a viskózní rosolovitá látka. Vylučují ji včely ze svých hypofaryngeálních a mandibulárních žláz díky zpracování výchozí látky pro její výrobu – včelího pylu. Pylová zrna v žaludku včely vlivem přítomných enzymů popraskají a z jejich obsahu včela získá důležité složky pro tvorbu mateří kašičky. Mateří kašička je látka spojující tradiční čínskou i moderní medicínu, jelikož díky svým účinkům dokáže bojovat proti různým chronickým nemocem. Mezi její léčivé účinky patří antibakteriální, antimykotické, protinádorové, antialergické, protizánětlivé, antisklerotické a imunomodulační vlastnosti (Viuda-Martos et al. 2008; Pasupuleti et al. 2017).

Mateří kašička se skládá z 50-60 % vody, 18 % tvoří bílkoviny, 15 % sacharidy, 3 až 6 % lipidy a 1,5 % minerální soli a vitaminy. Důležitý faktor kvůli stabilizaci mateří kašičky má obsažená kyselina 10-hydroxy-2-decénová (Navrátil et al. 2022). Pasupuleti et al. (2017) ve své studii provedli moderní spektrometrickou analýzu, kde bylo detekováno přibližně 185 organických sloučenin nacházejících se v mateří kašičce. Obsahuje také významný počet bioaktivních sloučenin, mastné kyseliny, acetylcholin, polyfenoly a hormony jako je testosteron, progesteron, prolaktin a estradiol. Významný vliv na vznik a složení mateří kašičky má také působení komenzálně-symbiotických mikroorganismů, nacházejících se v trávicím traktu včel.

### **Včelí pyl**

Pyly jsou samčí gametofyty kvetoucích rostlin. Včely poté, co pylová zrna seberou z květů, smíchají je s vlastními sekrety. Tento produkt vytvořený včelami se nazývá včelí pyl (Aylanc et al. 2021). Včelí pyl pro včely slouží především jako zdroj bílkovin. V současnosti se ale včelí pyl využívá stále častěji i v potravinářství díky svým nepostradatelným nutričním a léčivým vlastnostem. Obsahuje vysokou koncentraci sacharidů, esenciálních aminokyselin, nasycené i nenasycené mastné kyseliny, minerální látky (zinek, měď, železo, draslík, hořčík, fosfor aj.) a řadu vitaminů jako provitamin A, vitamin E a vitaminy skupiny B. Hlavními biologicko aktivními sloučeninami jsou flavonoidy a fytosteroly. Příjem včelího pylu se může zvýšit přidáním do běžných potravin (mléko, smoothies, jogurt). Mezi léčivé účinky pylu

můžeme dle různých studií řadit např. zlepšení imunitního systému, protirakovinné účinky, snížení hladiny cholesterolu v krvi, snížení vysokého krevního tlaku, léčbu horních cest dýchacích nebo podpůrnou léčbu při senné rýmě (Campos et al. 2010; Thakur & Nanda 2020).

### **Propolis**

Propolis je známý jako tzv. „včelí lepidlo“. Název odkazuje na pryskyřičnou látku nahromaděnou včelami z různých druhů rostlin. Včely jej vyrábějí smísením nasbírané pryskyřice s výměšky hlavových žláz a voskem. Propolis je pro včely prospěšný při utěšňování děr a prasklin při opravách úlu. Také se používá pro vyhlazení vnitřního povrchu úlu, zachování vnitřní teploty a zabraňuje invazi predátorům. Díky propolisu tvrdne buněčná stěna a přispívá k aseptickému vnitřnímu prostředí v úlu. Po zahřátí se propolis stává měkkým a lepkavým s příjemnou vůní. Je užitečný pro svoje antiseptické, protizánětlivé, antioxidantní, antibakteriální, antimykotické, protirakovinné, protivředové a imunomodulační účinky. Pro tyto své účinky lze propolis využívat vnitřně i zevně. Propolisové kapky nebo tinktury lze nakapat do vody, mléka nebo jej konzumovat společně s medem.

Propolis se skládá převážně z pryskyřice (50 %), vosku (30 %), esenciálních olejů (10 %), pylu (5 %) a dalších organických sloučenin (5 %) jako jsou fenolové sloučeniny, estery, flavonoidy, terpeny, aromatické aldehydy a alkoholy. Propolis také obsahuje důležité vitaminy skupiny B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>), vitamin C a vitamin E. Mezi minerální látky nacházející se v propolisu patří hořčík, vápník, draslík, sodík, měď, zinek, mangan a železo. Obsahuje také několik enzymů, např. glukóza-6-fosfatázu, trifosfatázu nebo sukcinátdehydrogenázu (Viuda-Martos et al. 2008; Pasupuleti et al. 2017).

### **Včelí chléb**

Včelí chléb vzniká řadou biochemickou přeměn z včelího pylu. Biochemický proces trvá asi 7 dní a jednotlivé fáze zahrnují:

- Množení bakterií mléčného kvašení, *Escherichie*, aerobních bakterií a kvasinek
- Využití živin bakteriemi a pokles pH
- Snížení počtu bakterií *Streptococcus* na úkor růstu bakterií *Lactobacillus*
- Smrt bakterií mléčného kvašení a některých kvasinek důsledkem kyseliny mléčné

Včelí chléb obsahuje bílkoviny, aminokyseliny, sacharidy, lipidy, vitaminy, minerální látky, fenolové kyseliny a polyfenoly. Obsahuje ještě více živin než samotný včelí pyl. Neméně důležitým bodem v jeho nutriční hodnotě je i lepší stravitelnost, díky již proběhlé fermentaci. Působí protizánětlivě, proti obezitě, proti rakovině, antimikrobiálně a antioxidantně (Aylanc et al. 2021).

### 3.3 Mikroorganismy trávicího traktu včel

Symbiotický mikrobiom trávicího traktu dospělých včel (*A. mellifera*) se skládá z gramnegativních, grampozitivních a gramvariabilních bakterií, plísní a za určitých podmínek i z kvasinek. Získávají ho konzumací pylu, konzumací další potravy nebo prostřednictvím kontaktů se staršími včelami v kolonii. Mezi typické střevní mikroby včely patří bakterie *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Bacillus* (Kačániová et al. 2009). V trávicím traktu včel dominuje asi 9 konzistentních druhů, jejichž množství ovlivňuje vývojová fáze včely medonosné, konkrétní umístění ve střevě, počasí a geografická poloha (Khan et al. 2020). Tento symbiotický mikrobiom včel může ale významně proměnit podávání antibiotik včelám. Po podání dochází k narušení mikrobioty a rozmnožení kvasinek a plísní na úkor prospěšných bakterií. To může vést k poškození trávení a celkově zhoršené imunitě. Funkcí mikroorganismů je převážně účast na biochemickém procesu během trávení (úprava a konzervace pylu) (Rada et al. 1997).

Získání stálého střevního mikrobiomu dochází se zmiňovanou konzumací potravy. Tato střevní mikrobiota dospělých včelích dělnic se může lišit v závislosti na věku včely, ročním období a geografické poloze (Rada et al. 1997; Gilliam 1997; Kačániová et al. 2004; Khan et al. 2020).

#### 3.3.1 Typy střevních mikroorganismů

Trávicí trakt včel je bohatým zdrojem mikroorganismů. Vyskytuje se zde asi 1 % kvasinek, 29 % grampozitivních bakterií a 70 % gramnegativních a gramvariabilních bakterií (Rada et al. 2009). Charakteristické střevní bakterie dospělých včel kolonizují larvu během prvních několika dnů po vylíhnutí z kukly. Počty bakterií u larev jsou nízké a skládají se především z čeledi *Acetobacteraceae* a rodu *Lactobacillus* (Moran 2015).

Mezi endemické bakteriální skupiny, které se často nacházejí v mikrobiomu dospělých včel patří bakterie mléčného kvašení a bakterie octového kvašení. Bakterie mléčného kvašení jsou grampozitivní, acidorezistentní a mikroaerofilní bakterie. Běžně se vyskytují v trávicím traktu mnoha druhů hmyzu i obratlovců. Jsou prospěšné pro svého hostitele díky jejich imunomodulačním účinkům, prostřednictvím antimikrobiálních metabolitů a udržováním zdravého střevního mikrobiomu. Bakterie octového kvašení jsou velkou skupinou aerobních gramnegativních bakterií (vyskytují se např. rody *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Saccha ribacter*). Právě u těchto dvou skupin bakterií lze předpokládat pozitivní účinky na zdraví včel, díky potenciálu pro inhibici růstu patogenních bakterií citlivých na kyseliny (Hamdi et al. 2011).

Mikrobiota včel se skládá z grampozitivních druhů (*Firmicutes* rod *Lactobacillus* a *Actinobacteria* rod *Bifidobacterium*) a gramnegativních druhů (proteobakterie *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola* a *Frischella perrara*) (Moran 2015).

Z rodu *Lactobacillus* dominuje *Lactobacillus kunkeei* a dále *L. melliventris* a *L. helsingborgensis* (Moran 2015), a z rodu *Bifidobacterium* se u včel objevují *B. asteroides*, *B. indicum* a *B. coryneforme* (Wu et al. 2013). Mezi další symbionty patří aerobní sporotvorné bakterie, příbuzné rodu *Bacillus* spp., u kterých byla podle autorů Hamdi et al. (2011) prokázána schopnost vylučování peptidových antibiotik.

Podle Kwong et al. (2017) patří mezi stabilní zástupce v mikrobiomu včel bakterie *Snodgrassella*, *Gilliamella*, *Lactobacillus Firm-4*, *Lactobacillus Firm-5* a *Bifidobacterium*. Mezi speciální druhy, vyskytující se pouze u rodu *Apis*, autoři uvádějí bakterie *Bartonella apis* a *Frischella* a mezi další bakterie vyskytující se v mikrobiomu zmiňují *Apibacter*, *Lactobacillus Firm-3*, *Alpha2.1*, *Parasaccharibacter*, *Pseudomonas*, *Leuconostocaceae*, *Acetobacteriaceae*, *Lactobacillus* spp. a další.

Mezi nejčastěji se vyskytujícími plísněmi v trávicím traktu jsou rody *Penicillium* a *Aspergillus*, mezi běžně identifikovatelné druhy patří *P. freventans*, *P. cyclopium*, *A. flavus* a *A. niger*. Mezi méně často se objevující se řadí *Cladosporium cladosporioides* a *Alternaria tenuissima*. Kvasinky se vyskytují u včelích dělnic nejspíše pouze v případě nemoci, při krmení nedostatečnou stravou, antibiotiky nebo v případě styku s pesticidy. Jedná se o druhy *Torulopsis magnoliae*, *T. glabrata*, *Candida parapsilosis* a *Hansenula anomala*. Ve zdravém plodu jsou kvasinky vzácné (Gilliam 1997).

### 3.3.2 Význam symbiotických bakterií trávicího traktu včel a opylovačů

Dobře vyvážené spektrum mikrobiálních druhů, označované jako gastrointestinální mikrobiota, tvoří nedílnou součást každého dobře fungujícího zdravého organismu (Kačániová et al. 2004). Význam symbiotických bakterií trávicího traktu včel spočívá převážně v podpoře biochemického procesu během trávení živin, přeměně a konzervaci pylu uloženého v buňkách plástu, složení a zpracování medu, výkonnosti včelstev a podpoře odolnosti včelího organismu vůči patogenům a různým chorobám.

Některé typy enzymů (alkalická fosfatáza,  $\alpha$ -glukosidáza,  $\beta$ -glukosidáza) se v trávicím traktu včel objevují ve zvýšeném množství právě díky přítomnosti *Enterobacteriaceae* a *Bacillus*. Vlivem mikroorganismů jsou zvýšené i hladiny celkových a většiny jednotlivých aminokyselin. Symbiotické bakterie způsobují přeměnu pylu na včelí chléb, především mléčným kvašením způsobeným bakteriemi a kvasinkami. Tato fermentace způsobí prodloužení trvanlivosti a zlepšení chuti, stravitelnosti i nutriční hodnoty.

Symbiotické bakterie jsou prospěšné i v podpoře imunity. Včely, které do pylu během jeho sběru a skladování přidají bakterie z rodu *Bacillus* spp. (nacházející se v jejich trávicím traktu), dokáží inhibovat patogen (*Ascospaera apis*) způsobující houbové onemocnění, které končí mumifikací larev včel (Gilliam 1997; Khan et al. 2020).

Četné studie také berou v úvahu možnost využití včelích mikrobiálních symbiontů v boji proti včelím patogenům a parazitům, nebo k posílení imunity včel při onemocněních. Bakterie mléčného kvašení jsou pravděpodobně nejefektivnější působícími bakteriemi s probiotickým účinkem stimulujícím imunitu včel. Právě účinek kyseliny mléčné u bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* má nejspíše schopnost inhibovat růst *P. larvae* a dalších včelích patogenů, jako je *A. apis*. Tyto poznatky potvrzují, že probiotické bakterie mohou formovat střevní mikrobiom tak, aby chránil včelí larvy před patogeny. Mechanismy, kterými je tato ochrana zprostředkována jsou různé, od přímého antagonismu s patogenem až po aktivaci nebo stimulaci vrozené imunitní odpovědi (Hamdi et al. 2011).



### 3.3.3 Fyziologie trávení

Včely medonosné se živí sbíráním květinového nektaru jako hlavního zdroje sacharidů a pylu, který poskytuje zdroj dalších sacharidů, aminokyselin, lipidů a vitamínů. Trávicí soustava plní funkci přijímání potravy, zpracování živin, vylučování nestrávených zbytků potravy (nebo jejich hromadění během zimního období) a také přenosu a zpracování sladiny, která má důležitou roli při vzniku medu (Rada et al. 2009).

Celá trávicí soustava se skládá ze tří částí:

- *Stomodeum*: hltan (*pharynx*), jícen (*oesophagus*), medný váček/volátka (*ingluvies, proventriculus*)
- *Mesenteron*: žaludek (*ventriculus*)
- *Proctodeum* (zadní střevo): vrátník (*pylorus*), tenké střevo (*ileum*), Malpighiovy žlázy (*vasa Malpighii*), výkalový vak, konečník (*rectum*), konečnickové žlázy (*glandulae rectales*)

Začíná ústním otvorem, kde se nachází kusadla a sosák a pokračuje do hltanu. Pod kořenem jazyka se v ústech nachází také pysková (slinná) žláza, jejíž sekret slouží k navlhčování tuhé potravy (Navrátil et al. 2022). Do hltanu vyúsťují hltanové žlázy (hypofaryngeální žlázy), které jsou znakem charakteristickým pro rod *Apis*. Nejdokonaleji jsou vyvinuté u tzv. kojiček. Tyto specializované párové žlázy slouží jako sekreční orgán zapojený do zpracování a distribuce výživy včelstva. Jejich sekret včely využívají ke krmení plodů a matky (Ricigliano et al. 2017). Jícen, navazující na hltan, má podobu dlouhé tenké trubice. Z nektaru a medovice zde dochází ke vzniku řídkého medu, který včely mezi sebou opakovaně vyvrhávají a polykají, aby zajistily dostatečné množství různých enzymů (Rada et al. 2009). Jícen se rozšiřuje v medný váček, který plní funkci rezervoáru potravy nebo k přenášení nektaru a vody. Mezi jeho vlastnosti patří, že jej včela dle potřeby může zpětně vyvrhnout. Během doby, kdy je potrava v medném váčku, začíná probíhat její přeměna na med za účasti hypofaryngeálních žláz. Sekrety těchto žláz obsahují enzymy jako je invertáza a glykosidové hydrolázy, které se podílejí na hydrolýze glykosidických vazeb ve složitých cukrech. Celé zpracování květinového nektaru zahrnuje využití i dalších sekretů včel obsahující  $\alpha$ -glukosidázu a  $\beta$ -glukosidázu, které katalyzují hydrolýzu neredukujících sacharidů, jako je sacharóza a maltóza (Ricigliano et al. 2017).

Další částí trávicí trubice je žaludek. Od medného váčku je oddělen česlem (*valvula cardiaca*) z důvodu zabránění pronikání obsahu žaludku zpět. Žaludek má podobu ohnutého váčku, ve kterém jsou za účasti proteolytických enzymů (chymotrypsin, pepsin, trypsin) tráveny proteiny. Zadní střevo je odděleno od žaludku pylorickou chlopní, za kterou se nachází vrátník. V tomto místě ústí do trávicí trubice Malpighiovy žlázy (trubice), což je exkreční orgán včel, který odvádí škodlivé látky z hemolymfy do střeva. Na vrátník navazuje tenké střevo, které přechází ve výkalový vak (přední část konečníku). Tento vak má schopnost značného rozšíření, aby mohlo docházet k hromadění výkalů během zimního období. Výkalový vak obsahuje konečnickové žlázy, jejichž sekret inhibuje rozvoj hnilobných bakterií nacházejících se ve vaku. Trávicí soustava je ukončena análním otvorem (Navrátil et al. 2022).

### 3.4 Patogenní organismy včel

Zvýšené povědomí o důležitosti opylujícího hmyzu vedlo ke zvýšenému zájmu o zdraví včel. Zdraví včel určuje mimo jiné nepřítomnost virových, bakteriálních nebo plísňových patogenů. Pro rozvoj opatření k zajištění zdravých včel a udržitelného opylení je nezbytnou podmínkou znalost těchto patogenů a nemocí které způsobují.

#### 3.4.1 Bakteriální nákazy

##### *Paenibacillus larvae subsp. larvae*

*Paenibacillus larvae* je nejlépe prozkoumaným bakteriálním patogenem larev včely medonosné. *P. larvae* je grampozitivní, aerobní až mikroaerofilní tyčinka. Za nepříznivých podmínek tvoří endospory. Tyto spory jsou jedinou infekční formou *P. larvae* a jediným známým hostitelem tohoto patogenu jsou larvy včely medonosné (Fünfhaus et al. 2018).

Tento patogen způsobuje nemoc zvanou mor včelího plodu (American foulbrood – AFB) a způsobuje ohromné ekonomické ztráty po celém světě. Podle Státní veterinární správy bylo v České republice v roce 2020 potvrzeno celkem 108 ohnisek moru včelího plodu, v roce 2019 pak 134 ohnisek. Včelí plod bývá infikován do tří dnů po vylíhnutí z vajíčka. Takto napadená larva většinou uhynie před zakuklením a zavičkováním buňky. Mezi typické symptomy patří příškvary na dně buněk, propadlá víčka a táhnoucí se hmota z buněk s napadenými plody. Za méně než deset dní obsahuje infikovaná larva více než 2,5 miliardy spor (Rada et al. 2005).

##### *Melissococcus plutonius*

*Melissococcus plutonius* je původcem smrtelného bakteriálního onemocnění včelích larev, známého jako hniloba včelího plodu (European foulbrood – EFB). Podle Státní veterinární správy bylo v České republice potvrzeno v roce 2020 celkem 5 ohnisek nákazy touto nemocí, v roce 2019 to bylo 16 ohnisek. K onemocnění nejsou náchylné pouze larvy včely medonosné (*A. mellifera*), ale také larvy *Apis cerana* a *Apis laboriosa*. *M. plutonius* je celosvětově rozšířená mikroaerofilní až anaerobní, grampozitivní, nesporetvorná bakterie, patří do čeledi Enterococcaceae. Infekční formou této bakterie jsou nepohyblivé koky *M. plutonius*.

Larvy se nakazí požitím kontaminované larvální potravy. Přestože jsou k nákaze nejvíce náchylné mladé larvy do 48 hod po vylíhnutí z vajíček, mohou se nakazit i larvy starší. Většina uhynulých larev se ve včelstvu nachází v otevřených buňkách, čtyři až pět dní po vylíhnutí z vajíček. K rozkladu mrtvých larev dochází za pomoci saprofytů *Paenibacillus alvei* nebo *Enterococcus faecalis*. Rozložené mrtvé larvy nakonec vyschnou na snadno odstranitelné nahnědlé vločky, které lze nalézt v zavičkováných buňkách. Patogeneze infekcí *M. plutonius* je zatím nevysvětlená (Fünfhaus et al. 2018).

##### *Spiroplasma spp.*

*Spiroplasma* patří do třídy Mollicutes a zahrnuje skupinu bakterií, které postrádají peptidoglykanovou buněčnou stěnu. Původně byla izolovaná jako patogen z rostlin. Hmyzí patogenita je spojená se schopností infikovat epitel středního střeva s narušením epiteliální

vrstvy. *Spiroplasma apis* a *Spiroplasma melliferum* jsou druhy patogenní pro včely. *Spiroplasma apis* byla izolována ve Francii z trávicího traktu a hemolymfy nemocných dospělých včel vykazujících příznaky nemoci, vyskytující se převážně v květnu nebo v červnu, a proto se často označuje jako „májová nemoc“. Takto postižené včely nejsou schopné létat, ale pouze lezou po zemi a chvějí se. Za normálních okolností se včelstva zotavují spontánně. Počáteční zájem o studium *Spiroplasma* v 80. letech rychle vyprchal a až teprve nedávno se zájem znovu objevil v důsledku obecně zvýšeného povědomí o důležitosti zdraví včel medonosných. Dosavadní výzkumné úsilí se ale nezaměřovalo na pochopení patogeneze, ale spíše na studium prevalence těchto patogenů. Je tedy potřeba dalšího zkoumání (Fünfhaus et al. 2018).

### ***Serratia marcescens***

*Serratia marcescens* je tyčinkovitá gramnegativní bakterie z čeledi Enterobacteriaceae. Jedná se o častý hmyzí bakteriální patogen. Patogeneze infekcí *S. marcescens* u hmyzu zahrnuje příjem bakterií pravděpodobně z rostlin a následného proniknutí bakterií do hemocoelu a proliferaci v hemolymfě vedoucí ke smrti. *S. marcescens* napadá nejen dospělé jedince včely medonosné, ale byla izolována i z nemocných larev (Fünfhaus et al. 2018).

### **3.4.2 Virové nákazy**

Diagnóza infekcí včelími viry je obtížná, protože viry včely medonosné obvykle přetrvávají jako inaparentní infekce a nezpůsobují žádné zjevné příznaky onemocnění. Nejčastější virové infekce jsou ve Spojených státech. Většina virů včely medonosné jsou izometrické picoviry (velikosti 30 nm) typu RNA a postihuje larvy, kukly i dospělé jedince včel (Chen et al. 2004). První objevené virové onemocnění včel způsoboval vir pytlíčkovitého plodu. Později se zjistilo, že šlo o „filtrovatelný vir“ poprvé identifikovaný u hmyzu (Rada et al. 2009).

### **Virus deformovaných křídel (Deformed wing virus – DWV)**

Virus deformovaných křídel je jednovláknový RNA virus včely medonosné přenášený parazitickým roztočem *Varroa destructor*. Přestože DWV představuje celosvětově velkou hrozbu pro zdraví včel, patogeneze není dobře objasněna. Včely postižené tímto virem jsou pomalejší než normální včely a asi o 30 % se v nakaženém včelstvu zvýší úmrtnost. Hypofaryngeální žlázy u postižených včel jsou hypoplastické s menším počtem sekrečních váčků. Mandibulární žlázy jsou také hypoplastické.

*Varroa destructor* je ektoparazitický roztoč. Má dvě fáze životního cyklu. Během reprodukční fáze, kdy se roztoči rozmnožují, se živí včelími plody. Během druhé fáze roztoči parazitují na dospělých včelách. Včely tedy ovlivňují několika způsoby – konzumují hemolymfu vyvíjejících se i dospělých včel, snižují imunitu a přenášejí viry (např. DWV).

Mezi příznaky infekce viru deformovaných křídel patří odumření kukly a nově narozené včely, deformovaná křídla a nafouklá, odbarvená a zkrácená břicha včel (Koziy et al. 2019).

### **Virus akutní paralýzy včel (Acute bee paralysis virus – ABPV)**

Virus akutní paralýzy včel je stejně jako virus kašmírských včel (KBV) a virus izraelské akutní paralýzy (IAPV) způsobován blízce příbuznými viry z čeledi Dicistroviridae. Všechny tyto viry byly objeveny podobným způsobem, jako důsledek šíření viru v medu.

Mezi příznaky nakažení virem akutní paralýzy včel patří rychle postupující paralýza, chvění, neschopnost létat, postupné tmavnutí a ztráta chloupků z břicha, a nakonec smrt včely (De Miranda et al. 2010). Virus se šíří sekretem slinných žláz, které se dostávají do uskladňovaných zásob. Napadá larvy i dospělé jedince. Přenašečem opět může být roztoč *Varroa destructor* (Rada et al. 2010).

### **Virus chronické paralýzy včel (Chronic bee paralysis virus – CBPV)**

Virus chronické paralýzy včel byl jedním z prvních virů, které byly izolovány ze včel medonosných. Způsobuje infekční onemocnění vyznačující se shluky nelétavých, třesoucích se a plazících včel vyskytujících se u česna úlu. Zdravé včely napadají nemocné jedince, okusují je, a tím nákazu šíří dále. Symptomy nemoci jsou podobné průběhu otravy způsobené pesticidy (Rada et al. 2010). CBPV je vysoce nakažlivým onemocněním, které způsobuje značné ztráty ve včelstvu. Nákazu podporují špatné podmínky jako je nevyhovující počasí v létě, těžké zimy nebo nedostatečná výživa včel (Ribiére et al. 2002).

### **Virová nákaza včelího plodu (Sacbrood virus – SBV)**

Virová nákaza včelího plodu je onemocněním larev včely medonosné. Onemocnění bývá také nazýváno jako pytlíčkovitý plod (Rada et al. 2010). Onemocnění se objevuje hlavně na jaře. Nemoc se projevuje po zavíčkovaní plodu. Larvální pokožka se oddělí od nové pokožky kukly, ale nedojde ke svléknutí hmyzu, ale k akumulaci ekdysialní tekutiny pod takto uvolněnou pokožkou. V této tekutině se nachází velké množství SBV (Bailey 1969). Napadené larvy mají bledě žlutou barvu, a jejich tělo vysychá do tmavě hnědé šupiny. Dospělé včely takto napadenou larvu rozpoznají a odstraní (Rada et al. 2010). Tento vir se množí v dospělých jedincích včelích dělnic, které jsou většinou bez příznaků. Nejvíce viru se hromadí v hypofaryngeálních žlázách infikovaných dělnic, a ty infekci šíří dále krměním plodu (Bailey & Fernando 1972).

### **3.4.3 Houbová onemocnění**

#### ***Ascospaera apis***

*Ascospaera apis* je heterotalická houba způsobující houbové onemocnění včel nazývané zvápenatění včelího plodu (chalkbrood disease). Napadá pouze včelí plody. U nemocných larev dochází k mumifikaci a změně barvy z lesklé bílé, na žlutavou, šedou nebo černou (Gilliam et al. 1988). Spory této houby přijímá larva potravou, kde poté vyklíčí v jejích střevech a mycelium začne pronikat dále do organismu. K dalšímu roznášení spor poté dochází na povrchu mrtvé larvy, kde vznikají nové plodnice. Tato houba se vyskytuje hlavně u včelstev, kde nedochází k dostatečnému zahřívání zavíčkovaných plodů (Rada et al. 2010).

### ***Aspergillus***

*Aspergillus* je rod hub, které způsobují onemocnění zvané zkamenění včelího plodu (stonebrood). *Aspergillus* spp. jsou všudypřítomné houby, které jsou spojované s mnoha chorobami hmyzu, rostlin, zvířat i lidí. Jsou považovány za oportunní patogeny, které ke vzniku infekce potřebují imunokompromitované hostitele (Foley et al. 2014). Onemocnění způsobuje především *Aspergillus flavus*. K infekci dochází proniknutím této houby do gastrointestinálního traktu včelího plodu. Patogenní jsou toxiny této plísně (Rada et al. 2010).

### ***Nosema apis* a *Nosema ceranae***

*Nosema apis* a *Nosema ceranae* jsou intracelulární parazité (česky hmyzomorky), infikující epitelální buňky středního střeva dospělých včel (Forsgren & Fries 2010). Způsobují infekční onemocnění zvané nose móza, která je celosvětově rozšířená. V České republice je podle výzkumného včelařského ústavu dlouhodobě 30-50 % pozitivních včelstev.

*Nosema apis* a *Nosema ceranae* jsou malí jednobuněční živočichové, kteří patří do kmene Mikrosporidia. Ten je klasifikován jako primitivní sesterská větev hub. Jak je již podle názvu zjevné, mikrosporidia jsou sporotvorné organismy, u kterých spora slouží k rozmnožování a jako agens, kterým se parazit šíří mezi hostiteli. Nejvýraznějším charakteristickým znakem mikrosporidií je duté polární vlákno svinuté ve výtrusu, kterým parazit vstupuje do hostitelské buňky (Fries 1993). Pozřená spora vyklíčí v žaludku a svým dutým polárním vláknem proniká do plazmy epitelálních buněk, kde probíhá vývojový cyklus. Uvnitř hostitelské buňky dochází k množení mikrosporidií, dokud buňka nepraská a neuvolní se do okolí velké množství nových spór. V úle se nákaza šíří koprofagií (pojídání výkalů). Koprofagie je přirozené chování včel, které je v případě nákazy podpořeno sladkou chutí (Rada et al. 2010).

### 3.5 Imunita včel

Sociální hmyz je schopen vytvořit obranu proti patogenům na skupinové i individuální úrovni. Péče o povrch těla, hygiena úlu a další faktory objevené u sociálního hmyzu mohou snížit dopady patogenních bakterií, hub a parazitických roztočů. Klasickým příkladem sociální ochrany je „hygienické chování“ poprvé popsané u včel medonosných. Včely identifikují a odstraňují infikované larvy ze zdravého potomstva. Mezi další obranu patří stavba úlů z antimikrobiálních materiálů.

Hmyz má různé mechanismy boje proti infekci patogeny. Většina hmyzu je chráněna vrstvou antimikrobiálních sekretů na těle a v prostředí střev, které je nepřátelské vůči patogenům. Když se patogeny dostanou i přes epitel a překonají morfologickou bariéru, setkají se s účinnou buněčnou a humorální imunitní odpovědí. Hmyzí imunita vykazuje mnoho paralel k vrozeným imunitním reakcím lidí a jiných obratlovců (Evans et al. 2006).

#### 3.5.1 Sociální imunita

Kolektivní obranou proti parazitům a patogenům je „sociální imunita“. Spočívá v behaviorální spolupráci mezi jednotlivci v celé kolonii, jelikož každý jedinec má svoji funkci, která má poté vliv na celou kolonii a omezení šíření patogenů a parazitů. Mezi tyto funkce patří již zmiňované hygienické chování. Dále se jedná o termoregulační chování, zprostředkované především včelími dělnicemi. Jejich snahou je vyvolat „sociální horečku“ účinnou proti patogenům citlivým na teplo (např. *Ascophaera apis*). Antibakteriální a antivirový obal úlu je vytvořen pomocí rostlinné pryskyřice (propolis) (DeGrandi-Hoffman & Chen 2015).

#### 3.5.2 Individuální imunita

Na individuální úrovni mají včely několik linií vrozené imunitní obrany proti cizím patogenům. Fyzikální a chemické bariéry, včetně kutikuly exoskeletu a peritrofických membrán lemujících trávicí trakt, jsou první linií imunitní obrany, která brání patogenům přilnout k tělu nebo do něj vstoupit. Pokud patogen poruší fyzikální a chemické bariéry, včely se mohou před infekcí chránit buněčnými a humorálními imunitními odpověďmi, které představují druhou linii imunitní obrany.

Vliv na individuální imunitu včel má také výživa. Mezi primární zdroj potravy včel patří nektar a pyl. Nektar obsahuje velké množství sacharidů a je hlavním energetickým substrátem. Pyl poskytuje včelám důležitý zdroj bílkovin a živin potřebných pro fyziologické procesy jako je chov mláďat, růst a imunita. Právě pyl poskytuje nezbytné esenciální aminokyseliny potřebné pro syntézu peptidů využitých během humorální imunity. Sacharidy poskytují energii pro metabolické procesy spojené s vrozenými humorálními a buněčnými imunitními reakcemi a sekundární rostlinné metabolity jsou rovněž využitelné svými antimikrobiálními vlastnostmi (DeGrandi-Hoffman & Chen 2015). Buněčnou imunitu zajišťují hemocyty, tedy buňky podílející se na enkapsulaci, nodulaci či fagocytóze mikroorganismů proniknuvších do těla včely. Důležitou funkcí hemocytů je produkce látek účastnících se humorální imunitní odpovědi, tudíž buněčná a humorální imunita jsou spolu úzce svázány. Jako hlavní složky

humorální imunity se obvykle řadí aglutininy (lektiny), lysiny, antimikrobiální peptidy/polypeptidy a fenoloxidázová kaskáda (Danihlík & Petřivalský 2015).

Komenzální-symbiotické bakterie trávicího traktu včel přispívají k žádoucí imunitní odpovědi inhibicí nežádoucích-patogenních mikroorganismů především syntézou antimikrobiálních látek v podobě bakteriocinů, organických kyselin aj., ale rovněž např. vytěsněním z dané ekologické niky při soupeření o zdroje živin (tzv. „competitive exclusion effect“) (Schmid-Hempel 2005).

### **3.6 Mikrobiologické metody stanovení inhibičního účinku symbiotických-komenzálních bakterií TT včel s probiotickým potenciálem vůči bakteriálním patogenům včel**

#### **3.6.1 Metoda desková difúzní**

Tato metoda je založena na principu, kdy se antibiotika či jiné inhibičně působící látky, bakteriální kultury aj. umístí do pravidelného důlku uprostřed polotuhého agarového média, které je předem naočkované testovanou bakterií. Antagonisticky působící látka se postupně uvolní a difunduje radiálně ven přes agarové médium. Koncentrace antibiotik je nejvyšší uvnitř důlku. Se zvětšující se vzdáleností od důlku, se koncentrace postupně zmenšuje až do místa, kde přestává být inhibítorem pro bakterie. V těchto místech začínají bakterie volně růst. Pokud činidlo inhibuje bakteriální růst, vytvoří se kolem důlku po inkubaci čirá zóna nebo prstenec. Čím pomaleji se daný kmen bakterií rozmnožuje, tím je zóna při stejné citlivosti kmene větší.

Desková difúzní metoda se většinou provádí pomocí Mueller-Hinton agaru (MHA), který je nejvhodnějším médiem pro klasické testy citlivosti. Je dobře reprodukovatelný, má nízký obsah sulfonamidových, trimethoprimových a tetracyklinových inhibitorů a poskytuje efektivní prostředí pro většinu bakteriálních patogenů. Inokulum pro diskovou difúzní metodu se připravuje pomocí vhodného bujónu, jako je tryptický sójový vývar (Tendencia 2004). Nutno dodat, že pro dané účely lze využít celé spektrum různých kultivačních médií.

#### **3.6.2 Metoda disková difúzní s použitím sterilních vatových či papírkových terčků uprostřed**

Tato metoda je založena na podobném principu jako již výše popsaná desková difúzní metoda. Na polotuhé agarové médium, které je předem naočkované testovanou bakterií, se doprostřed umístí disk, v tomto případě sterilní vatové či papírkové terčiky, které jsou naimpregnované antagonisticky působícím roztokem látek, bakteriální kulturou apod. Tyto látky se postupně uvolní a difundují radiálně ven přes agarové médium. Nejvyšší koncentrace antibiotik je na okrajích disku a postupně se zmenšuje se zvětšující se vzdáleností od disku až do místa, kde přestává být inhibítorem pro bakterie. V těchto místech začínají bakterie volně růst. Pokud činidlo inhibuje bakteriální růst, vytvoří se kolem důlku po inkubaci čirá zóna neboli prstenec, inhibiční zóna. Čím se daný kmen bakterií pomaleji rozmnožuje, tím je zóna při stejné citlivosti kmene větší (Tendencia 2004).

Existuje ovšem celá řada dalších metod umožňujících *in vitro* odhalit inhibici jedné ze dvou složek roztoku. V souvislosti s tématem práce je myšleno vzájemné ovlivnění mikrobiálního patogenu a komenzálního-symbiotického mikroorganismu. Při určení počáteční koncentrace buněk lze v kokultivaci za vhodných podmínek pro obě sledované entity po určitém čase stanovit konečný počet buněk prostřednictvím selektivních médií. V rámci kokultivačních metod je možno využít celou řadu modifikací, počínaje složením kultivačních médií a konče vhodně zvolenými metodami pro stanovení počtu živých buněk.



## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Bakteriální kmeny

Pro splnění cílů práce bylo testováno 79 kmenů bifidobakterií (36) a laktobacilů (43) (Tabulka č. 3) izolovaných dříve z trávicího traktu včel. Pro zvýšení lokální rozmanitosti byly bakterie izolovány z 5 různých lokalit: Suchdol, Dol, Kralupy nad Vltavou, Postřizín a Větrušice, přičemž lokální původ kmenů je zaznamenán prvním písmemem v označení kmenů (Tabulka č. 3). Bakteriální kmeny jsou součástí interní sbírky mikroorganismů Laboratoře anaerobní mikrobiologie, ÚŽFG AV ČR, v.v.i. Izolovány byly prostřednictvím 3 médií:

modifikovaný TPY agar (g/L: trypton 10, glukóza 10, kvasničný extrakt 5, sójový pepton 5, beef extrakt 2, NaCl 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5; MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O 1, cystein x HCl 0,5; bakteriologický agar 14, mupirocin 0,1; Tween 80 1 mL a ledová kyselina octová 1 mL) pro izolaci bifidobakterií, M.R.S. agar (g/L: glukóza 20, pepton 9, NaCl 6, kvasničný extrakt 5, sójový pepton 5, acetát sodný 5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2, Tween 80 1 mL) pro neselektivní izolaci bakterií mléčného kvašení a Rogosa agar (Oxoid, VB) pro selektivní izolaci zástupců čeledi *Lactobacillaceae*.

Tabulka č. 3: Kmeny bifidobakterií a laktobacilů

č.	Kmen	Klasifikace na základě 16S rRNA sekvencí
1	SMTP/2	<i>Bifidobacterium indicum</i>
2	SMTP/4	<i>B. indicum</i>
3	SMTP/6	<i>B. asteroides</i>
4	STP/4	<i>Lactobacillus apis</i>
5	STP/6	<i>L. melliventris</i>
6	STP/2	<i>L. helsingborgensis</i>
7	STP/3	<i>L. apis</i>
8	STP/5	<i>L. apis</i>
9	SR1/4	<i>L. helsingborgensis</i>
10	SR2/2	<i>Lactobacillus sp.</i>
11	SR2/8	<i>L. melliventris</i>
12	SMTP/6	<i>B.asteroides</i>
13	D1/TP2	<i>B. asteroides</i>
14	D1/TP4	<i>B. indicum</i>
15	D1/MR6	<i>B. asteroides</i>
16	D1/RO5	<i>L. apis</i>
17	D1/MR12	<i>L. melliventris</i>
18	D1/TP6	<i>B. asteroides</i>
19	D1/TP9	<i>B. asteroides</i>
20	DZH	<i>L.melliventris</i>
21	D1/TP1	<i>B. asteroides</i>
22	D1/MR11	<i>L. kullabergensis</i>
23	D1/TP12	<i>B. asteroides</i>
24	D1/TP5	<i>B. indicum</i>
25	D1/MR2	<i>B. asteroides</i>
26	D1/MR3	<i>B. indicum</i>
27	D1/MR4	<i>B. indicum</i>
28	D1/RO1	<i>L. melliventris</i>
29	D1/RO2	<i>L. melliventris</i>

Tabulka č.3: Kmeny bifidobakterií a laktobacilů (pokračování)

č.	Kmen	Klasifikace na základě 16S rRNA sekvencí
30	D1/MR9.	<i>L. kullabergensis</i>
31	D1/MR10	<i>B. indicum</i>
32	D1/TP7	<i>B. asteroides</i>
33	D1/TP11	<i>B. indicum</i>
34	D1/TP13	<i>B. indicum</i>
35	KR10	<i>L. helsingborgensis</i>
36	KM1	<i>L. kimbladii</i>
37	KT2	<i>B. asteroides</i>
38	KM3	<i>B. asteroides</i>
39	KR2	<i>L. melliventris</i>
40	KR3	<i>L. apis</i>
41	KR7	<i>L. melliventris</i>
42	KR9	<i>L. helsingborgensis</i>
43	KT3	<i>L. kimbladii</i>
44	KT8	<i>L. melliventris</i>
45	KM2	<i>L. helsingborgensis</i>
46	KM10	<i>L. helsingborgensis</i>
47	KR4	<i>L. helsingborgensis</i>
48	KR5	<i>L. helsingborgensis</i>
49	KR8	<i>L. helsingborgensis</i>
50	KR1	<i>L. melliventris</i>
51	P1/TP8	<i>Bifidobacterium</i> sp.
52	P1/RO2	<i>L. apis</i>
53	P1/RO4	<i>L. melliventris</i>
54	P1/TP11	<i>Bifidobacterium</i> sp.
55	P1/TP3	<i>B. asteroides</i>
56	P1/TP2	<i>B. asteroides</i>
57	P1/MR10	<i>L. apis</i>
58	P1/MR11	<i>L. melliventris</i>
59	P1/MR10	<i>L. apis</i>
60	P1/MR1	<i>B. indicum</i>
61	P1/MR2	<i>L. melliventris</i>
62	P1/TP1	<i>Bifidobacterium</i> sp.
63	P1/TP7	<i>B. indicum</i>
64	P1/TP9	<i>B. indicum</i>
65	P1/TP10	<i>B. indicum</i>
66	P1/TP12	<i>B. asteroides</i>
67	P1/MR8	<i>L. apis</i>
68	P1/MR12	<i>L. apis</i>
69	VM9	<i>B. asteroides</i>
70	VM10	<i>B. asteroides</i>
71	VM11	<i>Bifidobacterium</i> sp.
72	VR8	<i>L. helsingborgensis</i>
73	VT3	<i>B. indicum</i>
74	VT6	<i>B. indicum</i>
75	VT9	<i>L. melliventris</i>
76	VM7	<i>L. melliventris</i>
77	VR5	<i>L. helsingborgensis</i>
78	VR9	<i>L. melliventris</i>
79	VT5	<i>L. apis</i>

Zdroj: vlastní

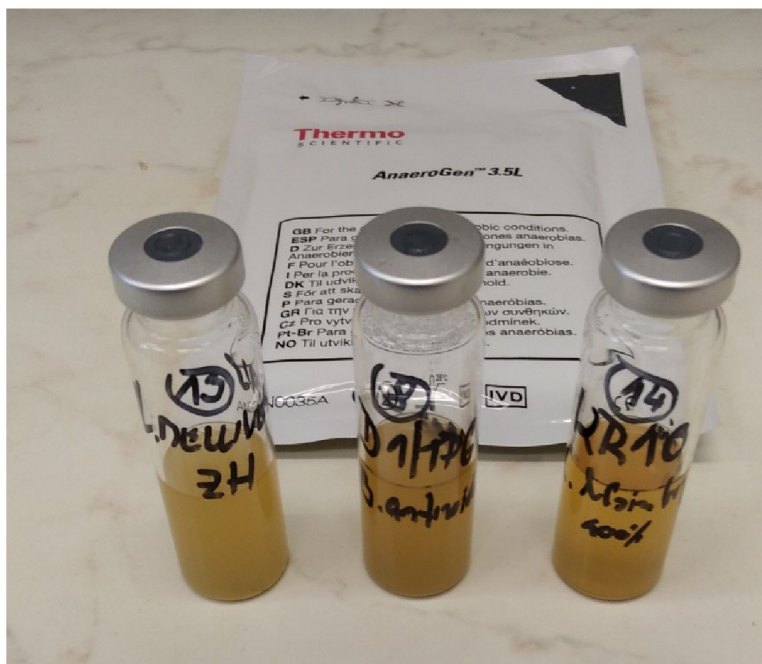
Izoláty byly poté klasifikovány na základě 16S rRNA genové komparativní analýzy (Killer et al. 2018) a uchovávány ve 20% roztoku glycerolu při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Možný *in vitro* inhibiční účinek kmenů byl testován vůči 4 klinickým izolátům *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* VÚV 2, VÚV 41, VÚV 48 a *Melissococcus plutonius* CZ2020. Ty byly získány z mikrobiologické laboratoře Výzkumného ústavu včelařského v Dole.

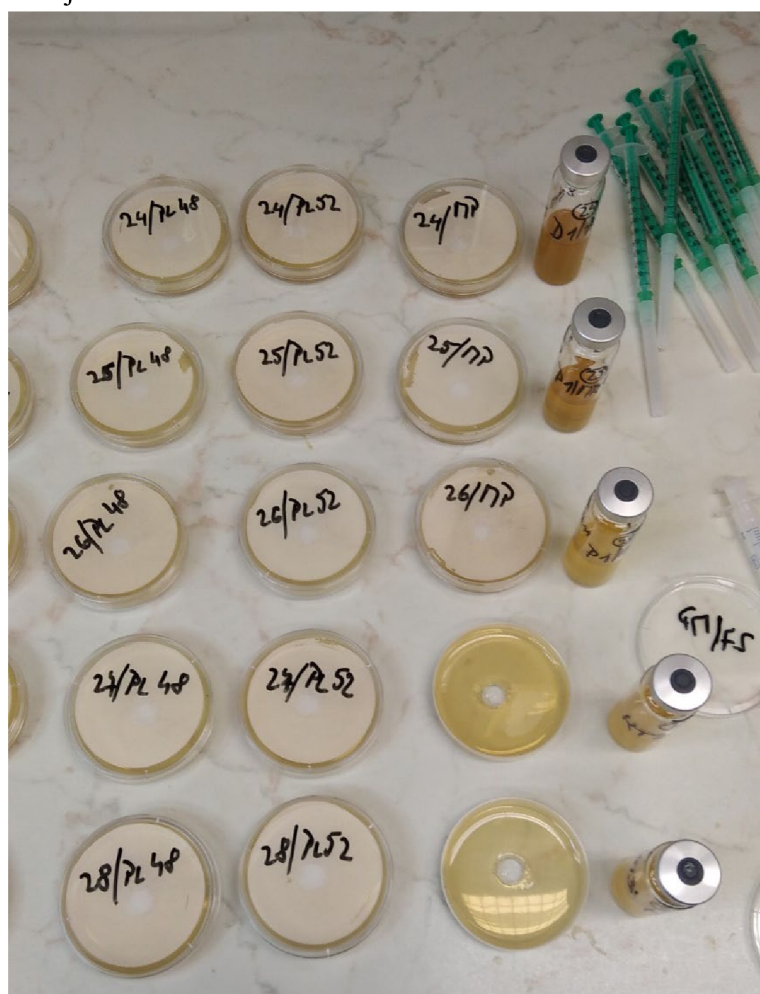
#### **4.2 Kokultivace bakteriálních izolátů s klinickými izoláty včel pro *in vitro* testování možného inhibičního účinku**

Pro tyto účely bylo nutno empiricky zjistit výchozí fyziologické a metabolické charakteristiky obou skupin bakterií, aby byly schopné kultivace ve stejném médiu, ve stejné atmosféře a za stejné teploty. Jako nejvhodnější kultivační médium byl zvolen modifikovaný BHI (ang. Brain Heart Infusion) bujón (Roth, Německo) doplněný o (g/L) glukózu 13, kvasničný extrakt (yeast extract, Merck, Německo) 3, sójový pepton (soybean peptone, Roth, Německo) 3, beef extract (Oxoid, Anglie) 2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  1, cystein  $\times$  HCl 0,3 a Tween80 1 mL. Hodnota pH byla po promíchání komponent upravena na hodnoty mezi 7,0 - 7,2 pomocí 5M NaOH. Kultivační médium bylo poté povařeno 10 minut ve vodní lázni. Čistý  $\text{CO}_2$  (čistota  $> 99,995\%$ ) byl použit pro zajištění mírně anaerobní atmosféry (oxidačně-redukční potenciál  $E_h = -70$  do  $-55$  mV) před sterilací za mírných podmínek ( $107\text{ }^{\circ}\text{C}$  / 50 minut).

Po rozmrazení byly kultury 2 x pasážovány při  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$  v modifikovaném BHI médiu pro zajištění čerstvosti, resp. co nejvyšší vitality buněk před založením experimentů. Pro vlastní *in vitro* testování bylo použito modifikované BHI médium s přidavkem bakteriologického agaru (14 g /L), přičemž i v tomto případě bylo zajištěno mírně anaerobní prostředí prostřednictvím  $\text{CO}_2$ . Do sterilních Petriho misek bylo aplikováno 0,5 mL narostlé kultury ve 20 mL penicilínkách (Obrázek č. 2) klinických izolátů (koncentrace buněk  $2,2 \times 10^6$  -  $5,9 \times 10^7/\text{mL}$ ). Po zatuhnutí byl uprostřed vytvořen kulatý důlek o průměru 10 mm (Obrázek č. 3) do kterého bylo aplikováno 0,2 mL (koncentrace  $1,1 \times 10^7$  -  $4,7 \times 10^8/\text{mL}$ ) čerstvých kultur bakteriálních izolátů z trávicího traktu včel. Vzorky byly vloženy do anaerostatu (Obrázek č. 4.; Oxoid, Anglie) a v přítomnosti vyvíječe (Campygen 3,5L; Oxoid, Anglie) mikroaerofilní atmosféry (po 24 hodinách:  $\text{O}_2$  dosahující koncentrace 6,2 - 10% a  $\text{CO}_2$  od 4,0 do 10%) kultivovány při  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 96 hodin. Po vyjmutí byla měřena (mm) inhibiční zóna (čirá oblast okolo důlku) tak, že byl do výsledných hodnot zahrnut průměr důlků. V principu se jedná o difuzní deskovou metodu. Inhibice bakteriemi mléčného kvašení čeledi *Lactobacillaceae* a bifidobakterií vůči klinickým bakteriálním izolátům byla zaznamenána takto (inhibiční zóna, mm): žádná  $\leq 16$ , mírná 17-20, vyšší 21-25 (označeno ve výsledné tabulce s !), vysoká 26-30 (označeno ve výsledné tabulce s !!) a značná  $\geq 31$  (označeno ve výsledné tabulce s !!!).



Obrázek č. 2: Narostlá kultura klinických izolátů v penicilínkách  
Zdroj: vlastní



Obrázek č. 3: Vytvoření kulatého důlku uprostřed zatuhlého media  
Zdroj: vlastní



Obrázek č. 4: Vložení vzorků do anaerostatu  
Zdroj: vlastní

## 5 Výsledky

### 5.1 Výsledky zobrazující hodnoty inhibičních zón

V následné Tabulce č. 4 jsou zahrnuty hodnoty (mm) stanovených inhibičních zón 79 testovaných kmenů včel 5 klinickým izolátům bakteriálních patogenů včel.

Tabulka č. 4: Výsledky stanovení inhibičních zón. – označuje vzorky, které nevykázaly žádnou inhibiční aktivitu.

Kmen	Klasifikace na základě 16S rRNA sekvencí	<i>Paenibacillus larvae</i> VÚV 2	<i>Paenibacillus larvae</i> VÚV 41	<i>Paenibacillus larvae</i> VÚV 48	<i>Paenibacillus larvae</i> VÚV 52	<i>Melissococcus plutonius</i> CZ2020
SMTP/2	<i>Bifidobacterium indicum</i>	-	-	-	-	-
SMTP/4	<i>B. indicum</i>	-	-	-	-	-
SMTP/6	<i>B. asteroides</i>	24!	21!	17	18	-
STP/4	<i>Lactobacillus apis</i>	-	-	-	-	-
STP/6	<i>L. melliventris</i>	-	-	-	-	-
STP/2	<i>L. helsingborgensis</i>	-	-	-	-	-
STP/3	<i>L. apis</i>	-	-	-	-	-
STP/5	<i>L. apis</i>	-	-	-	-	-
SR1/4	<i>L. helsingborgensis</i>	-	-	-	-	-
SR2/2	<i>Lactobacillus</i> sp.	-	-	-	16	-
SR2/8	<i>L. melliventris</i>	-	-	-	-	-
SMTP/6	<i>B. asteroides</i>	-	-	16	-	-
D1/TP2	<i>B. asteroides</i>	-	21	-	-	-
D1/TP4	<i>B. indicum</i>	-	-	-	-	-
D1/MR6	<i>B. asteroides</i>	-	-	-	-	-
D1/RO5	<i>L. apis</i>	-	-	-	-	-
D1/MR12	<i>L. melliventris</i>	-	-	-	-	-
D1/TP6	<i>B. asteroides</i>	-	-	-	-	-
D1/TP9	<i>B. asteroides</i>	-	16	24!!	-	-
DZH	<i>L. melliventris</i>	-	-	-	-	-
D1/TP1	<i>B. asteroides</i>	-	-	-	-	-
D1/MR11	<i>L. kullabergensis</i>	-	-	-	-	-
D1/TP12	<i>B. asteroides</i>	-	-	-	-	-
D1/TP5	<i>B. indicum</i>	-	-	-	-	-
D1/MR2	<i>B. asteroides</i>	18	16	20	22!	-
D1/MR3	<i>B. indicum</i>	-	-	-	-	-
D1/MR4	<i>B. indicum</i>	-	-	-	-	-
D1/RO1	<i>L. melliventris</i>	21!	36!!!	-	22!	-
D1/RO2	<i>L. melliventris</i>	32!!!	22!	32!!!	34!!!	-
D1/MR9	<i>L. kullabergensis</i>	-	-	-	36!!!	-
D1/MR10	<i>B. indicum</i>	-	33!!!	34!!!	42!!!	-
D1/TP7	<i>B. asteroides</i>	-	20	38!!!	38!!!	-
D1/TP11	<i>B. indicum</i>	-	-	-	-	-
D1/TP13	<i>B. indicum</i>	-	36!!!	-	-	-
KR10	<i>L. helsingborgensis</i>	-	-	-	-	-
KM1	<i>L. kimbladii</i>	-	-	-	-	-
KT2	<i>B. asteroides</i>	-	-	-	-	-
KM3	<i>B. asteroides</i>	-	-	-	-	-
KR2	<i>L. melliventris</i>	-	-	-	-	-
KR3	<i>L. apis</i>	-	-	-	-	-
KR7	<i>L. melliventris</i>	-	-	-	-	-

Tabulka č. 4: Výsledky stanovení inhibičních zón. – označuje vzorky, které nevykázaly žádnou inhibiční aktivitu (pokračování)

Kmen	Klasifikace na základě 16S rRNA sekvencí	<i>Paenibacillus larvae</i> VÚV 2	<i>Paenibacillus larvae</i> VÚV 41	<i>Paenibacillus larvae</i> VÚV 48	<i>Paenibacillus larvae</i> VÚV 52	<i>Melissococcus plutonius</i> CZ2020
KR9	<i>L. helsingborgensis</i>	-	-	-	-	-
KT3	<i>L. kimbladii</i>	-	-	-	-	-
KT8	<i>L. melliventris</i>	-	-	-	-	-
KM2	<i>L. helsingborgensis</i>	-	-	-	-	-
KM10	<i>L. helsingborgensis</i>	-	-	-	-	-
KR4	<i>L. helsingborgensis</i>	-	-	-	-	-
KR5	<i>L. helsingborgensis</i>	20	18	-	24!	26!!
KR8	<i>L. helsingborgensis</i>	-	-	21!	17	-
KR1	<i>L. melliventris</i>	-	-	36!!!	22!	-
P1/TP8	<i>Bifidobacterium</i> sp.	-	-	-	-	-
P1/RO2	<i>L. apis</i>	-	-	-	-	-
P1/RO4	<i>L. melliventris</i>	-	-	-	-	-
P1/TP11	<i>Bifidobacterium</i> sp.	-	-	-	-	-
P1/TP3	<i>B. asteroides</i>	17	18	18	-	-
P1/TP2	<i>B. asteroides</i>	-	-	-	-	-
P1/MR10	<i>L. apis</i>	-	-	-	-	-
P1/MR11	<i>L. melliventris</i>	-	-	-	-	-
P1/MR10	<i>L. apis</i>	-	31!!!	-	-	18
P1/MR1	<i>B. indicum</i>	18	19	18	18	-
P1/MR2	<i>L. melliventris</i>	-	17	-	17	-
P1/TP1	<i>Bifidobacterium</i> sp.	-	-	21!	-	-
P1/TP7	<i>B. indicum</i>	-	44!!	-	-	-
P1/TP9	<i>B. indicum</i>	-	-	-	40!!!	-
P1/TP10	<i>B. indicum</i>	-	46!!!	-	-	-
P1/TP12	<i>B. asteroides</i>	-	-	-	-	-
P1/MR8	<i>L. apis</i>	-	24!	42!!!	42!!!	-
P1/MR12	<i>L. apis</i>	-	44!!!	34!!!	40!!!	-
VM9	<i>B. asteroides</i>	19	-	25!	20	-
VM10	<i>B. asteroides</i>	20	28!	20	17	-
VM11	<i>Bifidobacterium</i> sp.	-	-	-	-	-
VR8	<i>L. helsingborgensis</i>	-	-	-	-	-
VT3	<i>B. indicum</i>	-	-	-	-	-
VT6	<i>B. indicum</i>	-	-	-	-	-
VT9	<i>L. melliventris</i>	-	-	-	-	-
VM7	<i>L. melliventris</i>	-	-	18	-	-
VR5	<i>L. helsingborgensis</i>	22!	22!	24!	26!!	22!
VR9	<i>L. melliventris</i>	-	-	-	-	-
VT5	<i>L. apis</i>	26!!	34!!!	26!!	24!	-

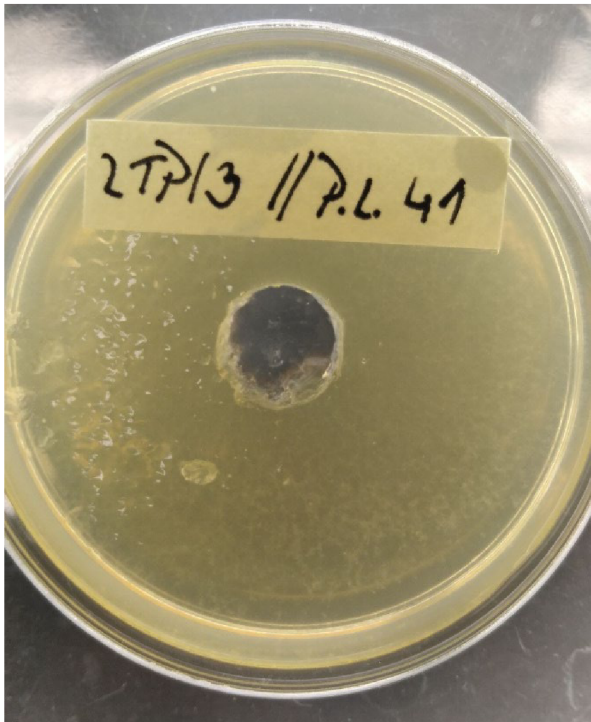
Zdroj: vlastní

Po zhlédnutí tabulky je patrné, že inhibiční aktivitu vůči alespoň jednomu klinickému kmeni vykazalo 30 ze 79 testovaných kmenů, tedy téměř 38 %. Šestnáct z aktivních kmenů náleželo mezi bifidobakterie a čtrnáct do rodu *Lactobacillus*. Tudiž kmenově specifická inhibiční aktivita byla zaznamenána u necelých 45 % testovaných bifidobakterií a 33 % laktobacilů. Určitá inhibiční aktivita vůči alespoň 3 klinickým kmenům byla zaznamenána u 15 kmenů a vůči 4 pouze u 8 kmenů, z nichž polovinu tvořili bifidobakterie a polovinu laktobacily. Vyšší, vysoká a značná inhibiční aktivita byla ovšem stanovena zejména u laktobacilů druhu *L.*

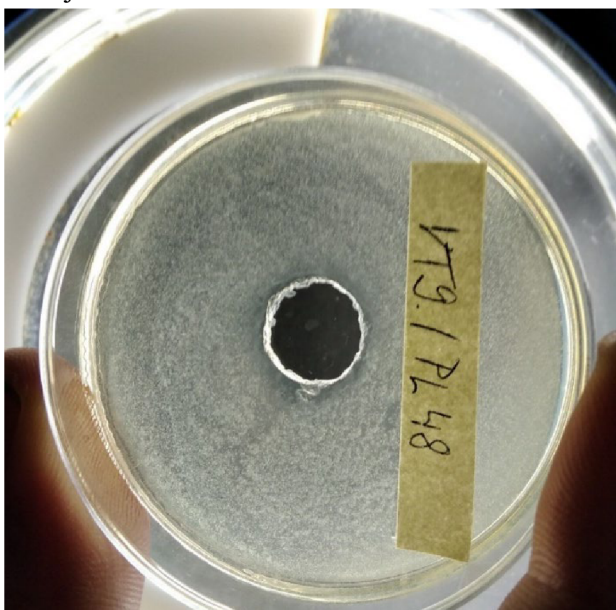


*apis* a *L. melliventris*. Aktivní bifidobakterie druhů *B. asteroides* a *B. indicum* vykázaly ve většině případů mírnou-vyšší inhibiční aktivitu. Určitá inhibice růstu *M. plutonia* byla zaznamenána pouze u 3 ze 79 testovaných kmenů.

Na Obrázcích č. 5-8 jsou ilustrovány vzorky nevykazující žádnou inhibiční aktivitu, naopak v Obrázcích č. 9-12 jsou zahrnuty vzorky kmenů vykazující vysokou-značnou inhibiční aktivitu.

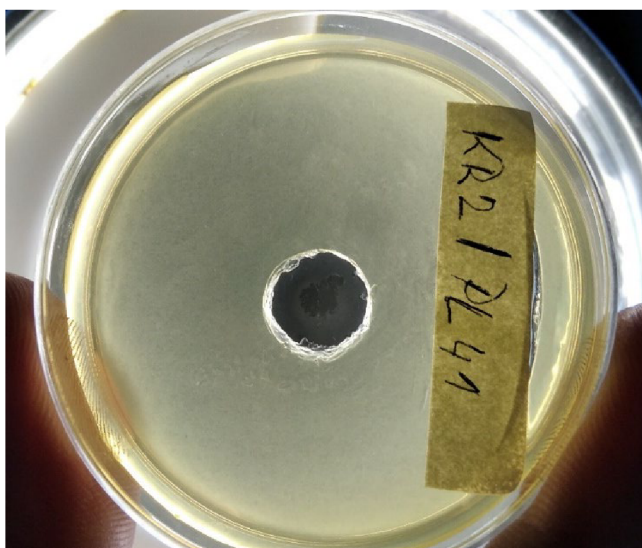


Obrázek č. 5: Vzorek nevykazující žádnou inhibiční aktivitu č.1  
Zdroj: vlastní

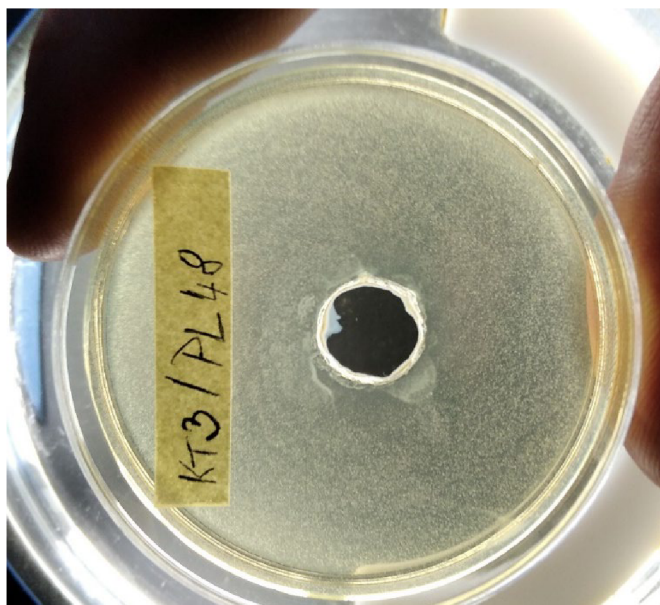


Obrázek č. 6: Vzorek nevykazující žádnou inhibiční aktivitu č. 2  
Zdroj: vlastní

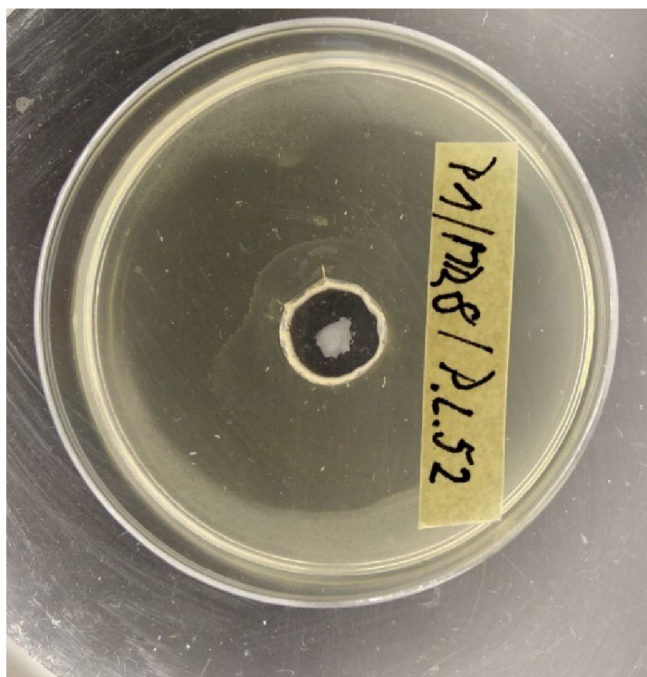




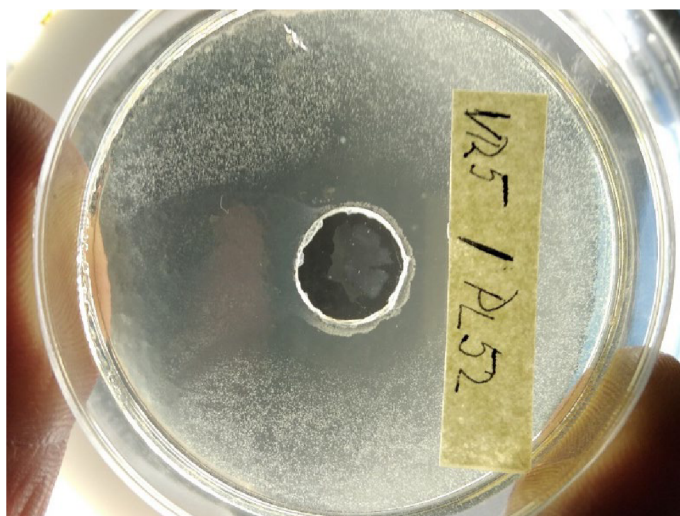
Obrázek č. 7: Vzorek nevykazující žádnou inhibiční aktivitu č. 3  
Zdroj: vlastní



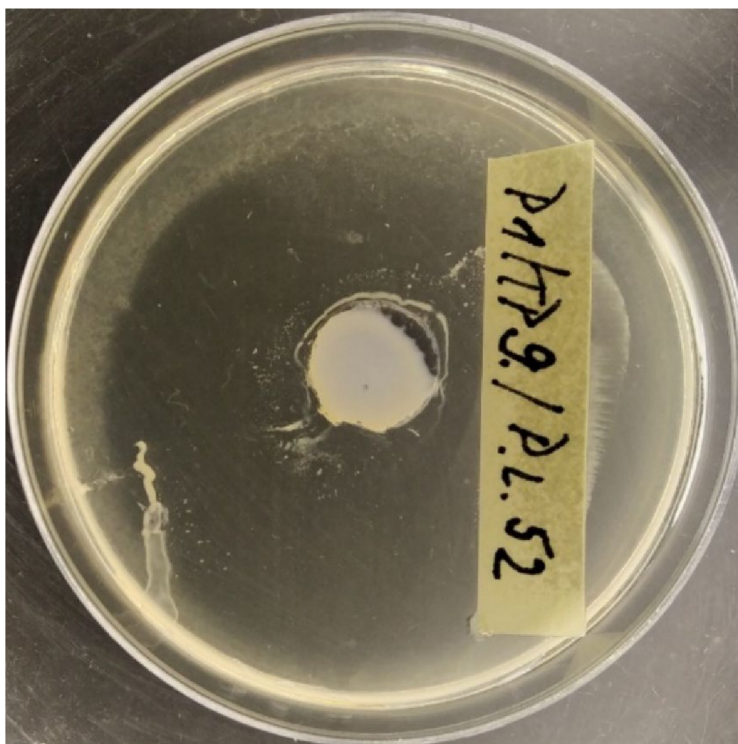
Obrázek č. 8: Vzorek nevykazující žádnou inhibiční aktivitu č. 4  
Zdroj: vlastní



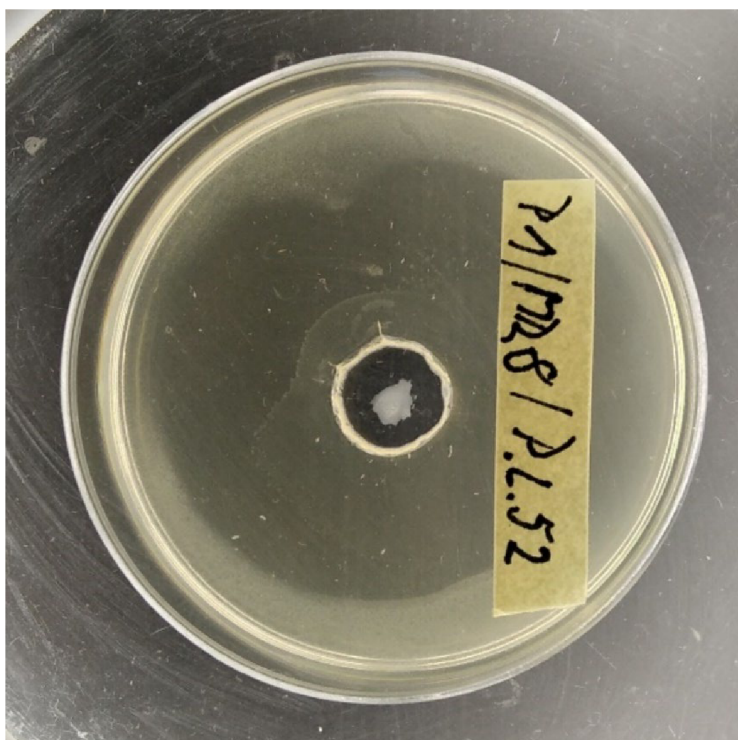
Obrázek č. 9: Vzorek vykazující vysokou-značnou inhibiční aktivitu č. 1  
Zdroj: vlastní



Obrázek č. 10: Vzorek vykazující vysokou-značnou inhibiční aktivitu č. 2  
Zdroj: vlastní



Obrázek č. 11: Vzorek vykazující vysokou-značnou inhibiční aktivitu č. 3  
Zdroj: vlastní



Obrázek č. 12: Vzorek vykazující vysokou-značnou inhibiční aktivitu č. 4  
Zdroj: vlastní

## 6 Diskuze

Používání antibiotik proti včelím patogenům je ve většině zemí na světě, včetně celé Evropy, zakázáno. Navíc v zemích, kde se antibiotika používají, dochází k rezistenci těchto patogenů. Existují opatření ke kontrole výskytu moru včeliho plodu, jako selektivní šlechtění včel pro hygienické chování, aplikace bioaktivních esenciálních olejů, bakteriofágová terapie nebo podávání syntetických indolů k inhibici klíčení *P. larvae*. Tyto přístupy k léčbě onemocnění jsou užitečné, ale bohužel často neúčinné (Daisley et al. 2020). Stále častěji tedy dochází ke snaze nalézt dlouhodobé a účinné terapeutické či vyloženě léčebné řešení. Na důležitosti nabývá inovativní přístup využívající přirozenou inhibici těchto patogenů pomocí fyziologické mikrobioty (probiotik). Tyto pozitivní inhibiční vlastnosti se projevují díky schopnosti prospěšných bakterií uvolňovat antimikrobiální látky (organické kyseliny, reaktivní formy kyslíku, antibiotické peptidy) (Lazzeri et al. 2020).

V našem experimentu jsme zjišťovali potenciální *in vitro* inhibici tří klinických izolátů *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* a jednoho izolátu *Melissococcus plutonius*, pomocí testovaných prospěšných bakterií z kmenů laktobacilů a bifidobakterií izolovaných z trávicího traktu včel medonosných. Ačkoli podobnému tématu se v poslední době věnovalo vícero studií, jen minimum z nich (např. autoři Pachla et al. 2014 nebo Zeid et al. 2021) využívalo bakterie izolované právě z trávicího traktu včel. Ve většině studií se setkáme s bakteriemi izolovanými z externích zdrojů. Autoři Yoshiyama et al. (2012) využívali bakterie mléčného kvašení izolované z fermentovaných krmiv a potravin, autoři Alippi & Reynaldi (2006) stejně jako Bielik et al. (2021) zase bakterie obsažené v medu. Objevují se i studie zabývající se pouze patogenem *Melissococcus plutonius*. Autoři Wu et al. (2012) testovali izolované bifidobakterie z trávicího traktu *Apis cerana japonica* na jeho potenciální *in vitro* inhibiční efekt a Vezetev et al. (2017) zkoumali antibiotické účinky mateří kašičky proti *M. plutonius*.

Velmi klíčové bylo zajistit společný růst bakteriálních izolátů s klinickými izoláty včel pro *in vitro* testování. A pro tyto účely jsme pracovali, jako úplně první, s nově navrženým kultivačním médiem, které zajišťovalo fyziologické a metabolické podmínky pro obě skupiny bakterií. Za tímto účelem jsme zvolili BHI (ang. Brain Heart Infusion) bujón a vhodně se jej snažili modifikovat. Doplnili jsme jej o glukózu, kvasničný extrakt, sójový pepton, beef extract,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , cystein x HCl a Tween80. Ve studii Yoshiyami et al. (2012) byl pro kultivaci použit klasický BHI bujón, ale bakterie mléčného kvašení, jimi testované, pocházely z fermentovaných potravin a krmiv. Ve studii autorů Pachla et al. (2014) všechny izolované bakterie mléčného kvašení vykazovaly typické fruktofilní vlastnosti a za anaerobních podmínek rostly dobře na fruktóze, ale špatně na glukóze. Rychlý růst bakterií na glukóze byl zaznamenán pouze v přítomnosti kyslíku. Bakterie izolované ze střev včel, ale při růstu na glukóze, produkovaly kyselinu mléčnou, kyselinu octovou a stopová množství ethanolu, čímž docházelo k inhibici *P. larvae*. Většina jiných autorů používala pro růst bakterií mléčného kvašení a patogenních organismů různé typy agarů. Což znamená, že jednotlivé bakterie mají ideální podmínky k růstu, ale takové podmínky jsou *in vivo* nereálné a výsledky tedy nejsou zcela relevantní. Např. autoři Forsgren et al. (2010) bakteriální kmeny *P. larvae* kultivovaly v jiném typu agaru, konkrétně MYPGP podle Nordströma & Friese (1995). Tento agar obsahoval g/L destilované vody: Muller-Hinton broth 10, kvasničný extrakt 15,  $\text{HPO}_4$  3, pyruvát sodný 1, agar 20 a glukózu 2. Dále jak už bylo zmíněno, autoři použili pro jednotlivé bakterie mléčného



kvašení různé typy bujónů nejen při kultivaci, ale i později při samotném testování inhibice. Zkumavky a Petriho misky poté většina výše zmíněných autorů inkubovala v anaerobním prostředí.

Jak je již zmíněno v kapitole výsledky, z tabulky č. 4 je patrné, že vůči klinickým izolátům včelích patogenů působila *in vitro* inhibičně pouze část z testovaných kmenů bifidobakterií a laktobacilů. Inhibiční aktivitu proti alespoň jednomu klinickému kmeni vykazalo necelých 38 % testovaných kmenů. Výsledky tedy demonstrují, že zkoumané inhibiční vlastnosti jsou kmenově, nikoliv druhově závislé. Tuto informaci potvrzuje i studie autorů Forsgren et al. (2009), kteří na možnou inhibiční aktivitu testovali jednotlivé druhy bakterií mléčného kvašení i kombinaci všech testovaných fylogrup. Výsledky ukázaly rozdílnou účinnost jednotlivých druhů, podobně jako u nás, ale při působení všech 11 druhů bakterií zároveň nezaznamenal ani jeden ze čtyř zkoumaných kmenů *P. larvae* nárůst. Z našich výsledků lze také vyčíst, že mezi aktivními kmeny, potvrzujícími inhibiční patogenů, se nacházely z poloviny bifidobakterie a z poloviny laktobacily. Určité vlastnosti potřebné k inhibici mají tedy obě testované skupiny. Ovšem větší inhibiční zóny byly zjištěny u testovaných laktobacilů, což bylo pravděpodobně způsobeno specifickými vlastnostmi laktobacilů. Je známo, že bakterie rodu *Lactobacillus* svým metabolismem produkují antimikrobiální sloučeniny, mezi které patří organické kyseliny, peptidové látky podobné antibiotikům, peroxid vodíku a baktericidní proteiny. U těchto látek se ukázalo, že mají antagonistickou aktivitu i proti *P. larvae* a *M. plutonius* (Forsgren et al. 2009, Hamdi et al. 2010). Ve studii autorů Zeid et al. (2021) výsledky prokázaly jako nejúčinnější kmen *Fructobacillus fructosus*. Autoři dále analyzovali bioaktivní metabolity *F. fructosus* a mezi možné vlastnosti způsobující nebo podporující inhibiči odhalili tři sloučeniny produkované bakteriemi (kyselina hydrexicholová, 1,2-benzendikarboxylová kyselina a heptyl-2-methylbutyrát).

Zároveň je třeba zmínit námi testovaný počet kmenů laktobacilů a bifidobakterií. Když zohledníme podmínky našeho experimentu, dá se říci, že jsme se vyrovnali zahraničním autorům. Na potenciální inhibiční aktivitu jsme otestovali téměř 80 testovaných kmenů. U autorů Zeid et al. (2021) se lze dočíst, že během 3 let odebrali a otestovali 120 izolátů ze vzorků včel medonosných.

Je třeba zdůraznit značný význam inhibičního testování klinických patogenních izolátů, které podobně jako typové kmeny opakovaným pasážováním ve sbírkách neztrácejí virulenci. Pokud by případně došlo k selekci kmenů bakterií vhodných pro potenciální probiotika, je nutno vzít v úvahu, že naše vzorky patogenních organismů nebyly opakovaným pasážováním nejspíše tak oslabeny. Tuto informaci potvrzují i studie autorů Cao et al. (2021) zabývající se vlivem počtu pasáží na buněčnou linii. Výsledky potvrdily, že zvýšený počet pasáží buněk má negativní vliv. Ovlivňuje distribuci buněčného cyklu a snižuje proliferační a migrační schopnosti buněk. Metabolická analýza také potvrdila zřejmý metabolický rozdíl mezi buňkami s různým počtem pasáží. Je tedy potřeba, aby kmeny, které se nám podařilo během našeho testování vyselektovat jako účinné, byly dále zkoumány a testovány ve striktnějších podmínkách.

Mezi další úskalí, která ovlivňují relevanci našich výsledků, patří testování *in vitro*. Tyto výsledky nemusí být vzhledem k mnoha faktorům směrodatné. Bakterie přirozeně se vyskytující v trávicím traktu žijí v obrovském vlastním ekosystému, který je charakterizován vzájemnými interakcemi s jinými vyskytujícími se mikroorganismy i se samotným

makroorganizmem včely. V umělých, *in vitro* systémech pouze napodobujeme jejich chování ve zjednodušené formě a nejsme schopni napodobit podmínky panující v přirozeném prostředí. Kultivací za vhodných a konstantních podmínek podporujeme optimalizaci růstu (rychlou proliferaci), která je v živém organismu nereálná. Tím ale dochází ke vzniku buněčné monokultury a ztrácíme pozitivní efekt interakcí různých typů buněk, ke kterým dochází v organismu. *In vitro* testování má samozřejmě také vliv na chování patogenních organismů v porovnání s živým prostředím hostitele. Ve sterilním prostředí dochází k rychlejší proliferaci a změně metabolismu. Mezi nové trendy v *in vitro* testování patří např. buněčné sferoidy (shluky buněk), kultivace v hypoxických podmínkách, mikrofluidní kultivace nebo 3D kultivace (Novák 2015). Testování probiotických bakterií na patogenní organismy by mělo být dále *in vivo* zkoumáno, aby bylo možné pochopit celý rozsah probiotických vlastností. Ve studii autorů Forsgreen et al. (2010) byl potvrzen účinek některých bakterií mléčného kvašení na snížení počtu infikovaných larev *P. larvae*. Abychom zjistili, jaké účinky bude mít případné podávání probiotik celým koloniím včel, je třeba dalšího výzkumu.

Hypotéza 1 nebyla vyvrácena, jelikož se potvrdil předpoklad, že trávicí trakt včel obývají komenzálně-symbiotické bakterie náležející do skupiny bakterií mléčného kvašení, které díky svým vlastnostem dokázaly za *in vitro* podmínek inhibovat bakteriální patogeny včel.

Hypotéza 2 byla vyvrácena. Bakteriální kmeny vykazující antagonistické působení neinhibovaly všechny klinické izoláty původce moru a hniloby včelího plodu. Určitá inhibiční aktivita vůči alespoň 3 klinickým kmenům byla zaznamenána u 15 kmenů a vůči 4 pouze u 8 kmenů. Výsledky lze interpretovat možností, že se citlivost *P. larvae* a *M. plutonius* na kmeny bakterií mléčného kvašení značně liší.

Hypotéza 3 nebyla vyvrácena. Potvrdil se náš odhad, že hostitelsky specifické druhy v rámci čeledi *Lactobacillaceae* způsobují větší inhibici než bifidobakterie. To ovšem platí pouze pro míru velikosti inhibiční zóny. Z pohledu distribuce antagonistické aktivity pouze mezi kmeny laktobacilů byla ovšem tato hypotéza vyvrácena. Polovina z pozitivně testovaných kmenů totiž náležela mezi laktobacilové taxony, polovina mezi bifidobakterie.

## 7 Závěr

V poslední době se lze v mnoha studiích dočíst o potenciálním podávání probiotik živočichům, např. včelám, a to za účelem hledání nového způsobu ochrany nebo podpory zdraví, případně nahrazení nutnosti podávání antibiotik na bakteriální choroby (ve státech, kde je to vůbec povoleno) vyvolané stále více rezistentními druhy bakterií. Nejprve je ale potřeba potvrdit případnou inhibici patogenních organismů.

Cílem mé diplomové práce bylo otestovat potenciální *in vitro* inhibiční účinek 79 testovaných kmenů laktobacilů a bifidobakterií izolovaných z trávicího traktu včel medonosných vůči 3 klinickým patogenním izolátům *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (původce moru včelího plodu) a jednomu patogennímu izolátu *Melissococcus plutonius* (původce hniloby včelího plodu). Pro tento cíl byly dříve izolovány kmeny laktobacilů a bifidobakterií z trávicího traktu včel. Izolovány byly prostřednictvím 3 médií (modifikovaný TPY agar, M.R.S, Rogosa agar). Izoláty byly poté klasifikovány na základě 16S rRNA genové komparativní analýzy a uchovávány ve 20% roztoku glycerolu při – 70 °C. Patogenní klinické izoláty *P. larvae* a *M. plutonius* byly získány z mikrobiologické laboratoře Výzkumného ústavu včelařského v Dole. Pro kokultivaci bakteriálních izolátů s klinickými izoláty bylo nutno zjistit výchozí fyziologické a metabolické charakteristiky obou skupin bakterií, aby byly schopné kultivace ve stejném médiu, ve stejné atmosféře a za stejné teploty. K zajištění těchto podmínek byl zvolen modifikovaný BHI bujón. Poté pro vlastní *in vitro* testování bylo použito modifikované BHI médium s přidavkem bakteriologického agaru a bylo zajištěno mírné anaerobní prostředí prostřednictvím CO<sub>2</sub>. Pro změření potenciální inhibice byla využita desková difúzní metoda. Po zatuhnutí média byl uprostřed vytvořen důlek, do kterého byla aplikována čerstvá kultura bakteriálních izolátů z trávicího traktu včel.

Výsledky ukázaly, že inhibiční aktivitu vůči alespoň jednomu klinickému kmeni vykazala část z testovaných kmenů (necelých 38 %). Polovina z aktivních kmenů náležela mezi bifidobakterie a polovina mezi laktobacily. Avšak nejvyšší inhibiční aktivita byla stanovena zejména u laktobacilů druhu *L. apis* a *L. melliventris*. Určitá inhibice růstu *M. plutonia* byla zaznamenána pouze u 3 ze 79 testovaných kmenů. Výsledky tedy demonstrují, že zkoumané inhibiční vlastnosti jsou kmenově, nikoliv druhově, závislé a vlastnosti potřebné k inhibici mají jak některé kmeny bifidobakterií, tak laktobacilů.

Je třeba zdůraznit, že vypovídací hodnota *in vitro* testování má své limity a je třeba dalšího *in vivo* zkoumání, aby bylo možné pochopit celý rozsah probiotických vlastností. Je tedy třeba dalšího výzkumu, abychom zjistili, jaké účinky bude mít případné podávání probiotik na reálná venkovní či laboratorní včelstva. Práce ale přináší velmi cenné informace v ohledu selekce potenciálních včelích probiotik, která by zvýšila odolnost a zdraví včelstev. Cíle práce, které byly stanoveny, byly splněny.

## Literatura

Alippi AM, Reynaldi FJ. 2006. Inhibition of the growth of *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. *Journal of invertebrate pathology* **91**:141-146.

Almasaudi S. 2021. The antibacterial activities of honey. *Saudi journal of biological sciences* **28**:2188-2196.

Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, Battino M. 2010. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterr J Nutr Metab* **3**:15–23.

Aylanc V, Falcão SI, Ertosun S, Vilas-Boas M. 2021. From the hive to the table: Nutrition value, digestibility and bioavailability of the dietary phytochemicals present in the bee pollen and bee bread. *Trends in Food Science & Technology* **109**:464-481.

Bailey L. 1969. The multiplication and spread of sacbrood virus of bees. *Annals of Applied Biology* **63**:483-491.

Bailey L, Fernando EFW. 1972. Effects of sacbrood virus on adult honeybees. *Annals of Applied Biology* **72**:27-35.

Bargańska Ż, Ślebioda M, Namieśnik J. 2016. Honey bees and their products: Bioindicators of environmental contamination. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **46**:235-248.

Bielik B, Molnár L, Vrabec V, Andrášiová R, Maruščáková ICO, Nemcová R, Toporčák J, Mudroňová D. 2021. Biofilm-forming lactic acid bacteria of honey bee origin intended for potential probiotic use. *Acta Veterinaria Hungarica* **68**:345-353.

Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. 2008. Honey for Nutrition and Health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition* **27**:677–689.

Campos MGR, Frigerio C, Lopes J, Bogdanov S. 2010. What is the future of Bee-Pollen. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* **4**:131-144.

Cao J, Wu X, Qin X, Li Z. 2021. Uncovering the Effect of Passage Number on HT29 Cell Line Based on the Cell Metabolomic Approach. *Journal of Proteome Research* **20**:1582-1590.



- Cridland JM, Tsutsui ND, Ramírez SR. 2017. The Complex Demographic History and Evolutionary Origin of the Western Honey Bee. *Apis Mellifera*, Genome Biology and Evolution **9**:457–472.
- Daisley BA, Pitek AP, Chmiel JA, Al KF, Chernyshova, AM, Faragalla KM, Reid G. 2020. Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. The ISME journal **14**:476-491.
- Danihlík J, Petřivalský M. 2015. Aktuální vědecké poznatky o imunitě a zdraví včel. Health **65**:434-431.
- DeGrandi-Hoffman G, Chen Y. 2015. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. Current Opinion in Insect Science **10**:170-176.
- Engel MS. 1999. The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: *Apidae*; *Apis*). Journal of Hymenoptera research **8**:165-196.
- Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Hultmark D. 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. Insect molecular biology **15**:645-656.
- Foley K, Fazio G, Jensen AB, Hughes WOH. 2014. The distribution of *Aspergillus* spp. opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. Veterinary Microbiology **169**:203-210.
- Forsgren E, Fries I. 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. Veterinary parasitology **170**:212-217.
- Franck P, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM. 1998. The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*), new insights from microsatellite and mitochondrial data. Evolution **52**:1119-1134.
- Fries I. 1993. *Nosema apis*-a parasite in the honey bee colony. Bee World **74**:5-19.
- Funfhaus A, Ebeling J, Genersch E. 2018. Bacterial pathogens of bees. Current opinion in insect science **26**:89-96.
- Garnery L, Cornuet JM, Solignac M. 1992. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. Molecular Ecology **1**:145-154.
- Gilliam M. 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. FEMS Microbiology Letters **155**:1–10.

- Gilliam M, Taber S, Lorenz BJ, Prest DB. 1988. Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascosphaera apis*. Journal of Invertebrate Pathology **52**:314-325.
- Hamdi C, et al. 2011. Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. Journal of applied entomology **135**:524-533.
- Hung KLJ, Kingston JM, Albrecht M, Holway DA, Kohn JR. 2018. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. Proc. R. Soc. B. **285**:2017-2140.
- Chen Y, Zhao Y, Hammond J, Hsu H, Evans J, Feldlaufer M. 2004. Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. Journal of invertebrate pathology **87**:84-93.
- Kačániová M, Chlebo R, Kopernický M, Trakovická A. 2004. Microflora of the honeybee gastrointestinal tract. Folia Microbiol **49**:169–171.
- Kačániová M, Pavličová S, Haščík P, Kociubinski G, Kňazovická V, Sudzinová J, Fikselová M. 2009. Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica **56**:285-295.
- Khan K, et al. 2020. Structural diversity and functional variability of gut microbial communities associated with honey bees. Microbial pathogenesis (e103793) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103793>.
- Killer J, Mekadím C, Pechar R, Bunešová V, Mrázek J, Vlková E. 2018. Gene encoding the CTP synthetase as an appropriate molecular tool for identification and phylogenetic study of the family Bifidobacteriaceae. MicrobiologyOpen (e00579) DOI: <https://doi.org/10.1002/mbo3.579>
- Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc. R. Soc. B. **274**:303-313.
- Koziy RV, Wood SC, Kozii IV, Rensburg CJ, Moshynskyy I, Dvylyuk I, Simko E. 2019. Deformed wing virus infection in honey bees (*Apis mellifera* L.). Veterinary pathology **56**:636-641.
- Kwong WK, Medina LA, Koch H, Sing KW, Soh EJY, Ascher JS, Jaffé R, Moran NA. 2017. Dynamic microbiome evolution in social bees. Science Advances (e1600513) DOI: [10.1126/sciadv.1600513](https://doi.org/10.1126/sciadv.1600513).

- Lazzeri AM, Mangia NP, Mura ME, Floris I, Satta A, Ruiu L. 2020. Potential of novel food-borne *Lactobacillus* isolates against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Biocontrol Science and Technology* **30**:897-908.
- Michener CD. 2000. *The bees of the world*. Md: Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Miranda JR, Cordoni G, Budge G. 2010. The acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of invertebrate pathology* **103**:30-47.
- Moran NA. 2015. Genomics of the honey bee microbiome. *Current opinion in insect science* **10**:22-28.
- Navrátil S, Klíma Z, Palíková M. 2022. Choroby včel. *Multimediální pomůcka*. Available from <https://fvhe2.vfu.cz/static/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvozp/choroby-vcel/index.html> (accessed January 2022).
- Nordström S, Fries I. 1995. A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. *Journal of Apicultural Research* **34**:97-103.
- Novák J. 2015. Studium buněk I kultivace. Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí. Available from [https://is.muni.cz/el/1431/podzim2015/Bi5596/um/METHODS-Class03-cell\\_lines\\_I.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/podzim2015/Bi5596/um/METHODS-Class03-cell_lines_I.pdf) (accessed March 2022).
- Pachla A, Wicha M, Ptaszyńska AA, Borsuk G, Trokenheim LL, Małek W. 2018. The molecular and phenotypic characterization of fructophilic lactic acid bacteria isolated from the guts of *Apis mellifera* L. derived from a Polish apiary. *Journal of applied genetics* **59**:503-514.
- Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH. 2017. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (e1259510) DOI: 10.1155/2017/1259510.
- Quigley TP, Amdam GV, Harwood GH. 2019. Honey bees as bioindicators of changing global agricultural landscapes. *Current Opinion in Insect Science* **35**:132-137.
- Rada V, Máchová M, Huk J, Marounek M, Dušková D. 1997. Microflora in the honeybee digestive tract: counts, characteristics and sensitivity to veterinary drugs. *Apidologie* **28**:357-365.

- Rada V, Havlík J, Flesar J. 2009. Biologicky aktivní látky ve výživě včel. Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha.
- Ribiére M, Triboulot C, Mathieu L, Aurieres C, Faucon JP, Pépin M. 2002. Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* **33**:339-351.
- Ricigliano VA, Fitz W, Copeland DC, Mott BM, Maes P, Floyd AS, Dockstader A, Anderson KE. 2017. The impact of pollen consumption on honey bee (*Apis mellifera*) digestive physiology and carbohydrate metabolism. *Archives of insect biochemistry and physiology* (e21406) DOI: <https://doi.org/10.1002/arch.21406>.
- Schmid-Hempel P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.* **50**:529-551.
- Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. 2016. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food chemistry* **196**:309-323.
- Tomšík B, Lisý E, Svoboda J, Hejtmánek J. 1953. Včelařství. Československá akademie věd, Praha.
- Tendencia E. 2004. Disk diffusion method. Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Thakur M, Nanda V. 2020. Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science & Technology* **98**:82-106.
- Vásquez A, Forsgren E, Fries I, Paxton RJ, Flaberg E, Szekely L, Oloffson TC. 2012. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PloS one* (e33188) DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033188>.
- Veselý V. 1985. Včelařství. Státní zemědělský nakladatelství, Praha.
- Vezetu TV, Bobiş O, Moritz RF, Buttstedt A. 2017. Food to some, poison to others-honeybee royal jelly and its growth inhibiting effect on European Foulbrood bacteria. *MicrobiologyOpen* (e00397) DOI: <https://doi.org/10.1002/mbo3.397>.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA. 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science* **9**:117-124.

Voidarou C, Alexopoulos A, Tsinas A, Rozos G, Tzora A, Skoufos I, Bezirtzoglou E. 2020. Effectiveness of bacteriocin-producing Lactic acid bacteria and Bifidobacterium isolated from honeycombs against spoilage microorganisms and pathogens isolated from fruits and vegetables. *Applied Sciences* **10**:7309.

Wang R, Starkey M, Hazan R, Rahme LG. 2012. Honey's ability to counter bacterial infections arises from both bactericidal compounds and QS inhibition. *Frontiers in microbiology* **3**:144.

Wu M, Sugimura Y, Takaya N, Takamatsu D, Kobayashi M, Taylor D, Yoshiyama M. 2013. Characterization of bifidobacteria in the digestive tract of the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*. *Journal of invertebrate pathology* **112**:88-93.

Yoshiyama M, Wu M, Sugimura Y, Takaya N, Kimoto-Nira H, Suzuki C. 2013. Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. *Journal of invertebrate pathology* **112**: 62-67.

Zeid AAA, Khattaby AM, El-Khair IAA, Gouda HI. 2021. Detection Bioactive Metabolites of Fructobacillus fructosus Strain HI-1 Isolated from Honey Bee's Digestive Tract Against *Paenibacillus larvae*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **1**:1-10.