

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Výskyt fakultativně patogenní bakterie *Serratia marcescens* u včely medonosné (*Apis mellifera*)

Diplomová práce

Bc. Michaela Krupková

Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.

Konzultant: Ing. Hana Salmonová, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci „Výskyt fakultativně patogenní bakterie *Serratia marcescens* u včely medonosné (*Apis mellifera*)“ 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 12.4.2019

Poděkování

Touto formou bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Ing. Ivo Doskočilovi, PhD. za skvělou komunikaci, ochotu a vstřícnost. Dále bych chtěla poděkovat mé konzultantce Ing. Haně Salmonové, PhD., která mi byla velice nápomocná při práci v laboratoři a při zpracování praktické části mé diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat svojí rodině a příteli především za zázemí, psychickou a finanční podporu během mých studií. Děkuji také své kamarádce Nikole Šťastné za pomoc při finální gramatické a jazykové kontrole.

Výskyt fakultativně patogenní bakterie *Serratia marcescens* u včely medonosné (*Apis mellifera*)

Souhrn

V současné době dochází ke zhoršení zdravotního stavu včel a k celkovému poklesu jejich počtu. Důvody špatného zdravotního stavu včel se považují za multifaktoriální, může to zapříčínovat expozice insekticidům, slabý imunitní systém včel nebo složitý soubor patogenních agens.

Cílem této diplomové práce bylo otestovat trávicí trakt a hemolymfu izolované ze včely medonosné (*Apis mellifera*) odchycené na území České republiky na přítomnost bakterie *Serratia marcescens*, jejíž přítomnost byla v několika pracích dokázána a označena za patogenní. Hypotézou této práce bylo, že *S. marcescens* je fakultativním patogenem včely medonosné a podílí se na úhynech v podmínkách ČR.

Kultivační metodou byly studovány bakterie na několika různých kultivačních mediích citlivých na *S. marcescens* a bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*. Čisté izoláty byly identifikovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

Byly provedeny celkem tři pokusy – analýza směsných vzorků včel, analýza jednotlivých včel a analýza směsných vzorků včel v rámci jedné lokality. První analýza prokázala 100% výskyt bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* druhá analýza nebyla provedena z důvodu negativního nárůstu na všech agarových plotnách a třetí analýza ukázala výskyt čeledi *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Streptococcaceae* a *Carnobacteriaceae*. Konkrétně nejvíce zastoupenou bakterií byla *Morganella morganii* a bakterie *Providencia* spp.

Některé detekované bakterie se shodovaly s výsledky jiných studií, dosažené výsledky ale přítomnost bakterie *S. marcescens* neprokázaly a hypotéza tak nebyla potvrzena.

Předložená práce je pilotní studií v ČR pro exaktní stanovení významnosti infekce *S. marcescens* v chovech včely medonosné na našem území. Shrnuje dosavadní poznatky a poskytuje detailní metodický postup pro studium a detekci *S. marcescens* u včely medonosné.

Klíčová slova: *Serratia marcescens*; včela medonosná; oportunní patogen; kultivace; selektivní medium

Occurrence of facultative pathogenic bacteria *Serratia marcescens* in a honey bee (*Apis mellifera*)

Summary

At present, the health status of honey bees is worsening, and their number is falling. The reasons of poor health of bees are multifactorial, it can cause exposure to insecticides, a weak honey bee immune system or a complex set of pathogenic agents.

The aim of this thesis was to test the digestive tract and haemolymphs isolated from honey bees (*Apis mellifera*), which was caught in the Czech Republic, for the presence of the bacterium *Serratia marcescens*. The presence of this bacterium has been confirmed in several works and is considered pathogenic. The hypothesis of this work was that *S. marcescens* is an optional pathogen of honey bees and participates in their mortality in the Czech Republic.

Using cultivation methods, we tested bacteria on several different culture media that were sensitive to *S. marcescens* and *Enterobacteriaceae* family. Pure isolates were identified by MALDI-TOF mass spectrometry.

We did three analyses: analysis of mixed samples of bees, analysis of individual bees and analysis of mixed samples of bees from one locality. The first analysis revealed a 100% incidence of *Enterobacteriaceae* family. We did not do the second analysis because of the negative growth on all agar plates. The third analysis showed the presence of *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Streptococcaceae* and *Carnobacteriaceae* family. Overall, the most prevalent bacteria were *Morganella morganii* and *Providencia* spp.

Some of the bacteria found in the practical part were consistent with the results of other studies, but the results did not show the presence of *S. marcescens* and the hypothesis was not confirmed.

This thesis is a pilot study in the Czech Republic for the exact determination of the importance of *S. marcescens* infection in bee breeding in our country.

It summarizes current knowledge and provides a detailed methodology for the study and detection of *S. marcescens* in honey bees.

Key words: *Serratia marcescens*; honey bee; opportunistic pathogen; selective medium

Obsah	
1 Úvod	8
2 Cíl práce a vědecká hypotéza	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Včela medonosná	10
3.2 Historie využití včel	11
3.3 Vliv včel na produkci potravin	12
3.4 Včelí produkty	14
3.4.1 Med	14
3.4.2 Propolis	15
3.4.3 Mateří kašička	16
3.4.4 Včelí vosk	16
3.4.5 Pyl	17
3.4.6 Včelí jed	17
3.5 Nemoci ohrožující včelstva	18
3.5.1 Onemocnění způsobená parazity	18
3.5.2 Onemocnění způsobená viry	19
3.5.3 Onemocnění způsobená houbami	20
3.5.4 Onemocnění způsobená bakteriemi	21
4 Metodika	25
4.1 Materiál	25
4.1.1 Použitá kultivační media	25
4.2 Metodika	26
4.2.1 Analýza směsných vzorků včel	26
4.2.2 Analýza jednotlivých včel	27
4.2.3 Analýza směsných vzorků v rámci jedné lokality	28
5 Výsledky	29
5.1 Interpretace výsledků MALDI TOF MS	29
5.2 Výsledky analýzy směsných vzorků včel	29
5.2.2 Výsledky analýzy jednotlivých včel	34
5.2.3 Výsledky analýzy směsných vzorků včel v rámci jedné lokality	35
6 Diskuze	44
7 Závěr	47

8	Seznam použité literatury	48
9	Seznam obrázků a tabulek.....	57
9.1	Seznam obrázků	57
9.2	Seznam tabulek	58

1 Úvod

Včela medonosná (*Apis mellifera*) hraje důležitou roli v životě každého z nás. Nejenže produkuje širokou škálu produktů, ale především je důležitým opylovačem rostlin, čímž je odpovědna za posílení zemědělské produkce a za rozmanitost volně rostoucích květin.

V současné době se můžeme z mnoha různých zdrojů dozvědět o celosvětovém zhoršení zdraví včelstev. Tento jev je nazýván syndrom zhroucení včelstev (Colony collapse disorder, CCD). Vzhledem k tomu, že chov včel má významný přínos pro celou společnost a snaha o udržitelnost včelích kolonií je velmi důležitá, je snahou zjistit, co může být příčinou tohoto úhynu a jak mu předejít. Zkoumání tohoto fenoménu přináší různé výsledky a je předpokládáno, že tento jev může být způsoben například parazity, roztoči a jiným onemocněním včel, špatnou výživou dospělých včel, nedostatkem genetické rozmanitosti, vyšší mírou stresu u dospělých včel, chemickými rezidui či jinou kontaminací.

Některé studie naznačují, že *Serratia marcescens* je běžným patogenem včel medonosných a mohla by souviset s CCD. Z tohoto důvodu předložená diplomová práce shrnuje poznatky týkající se vzájemných vztahů mezi bakterií *S. marcescens* a včelou medonosnou. Tato práce se soustředí také na význam včely medonosné a biologii bakteriálního původce choroby.

2 Cíl práce a vědecká hypotéza

Cílem diplomové práce je v teoretické části zpracování literární rešerše, která se zaměřuje především na včelu medonosnou (*Apis mellifera*), její využití, na nemoci včelstva a shrnutí dosavadních poznatků o výskytu bakterie *Serratia marcescens* u včely medonosné a jejím vlivu na zdravotní stav hostitele.

Praktická část se zaměřuje na detekci *S. marcescens* v trávicím traktu včely medonosné z různých lokalit.

Testovanou hypotézou této práce je, že bakterie *S. marcescens* je fakultativním patogenem včely medonosné a podílí se na úhynech včel v podmínkách ČR.

3 Literární rešerše

3.1 Včela medonosná

Včela medonosná (*Apis mellifera*) (Obr. 1) je jednou z nejsledovanějších z rodu včel (*Apis*), který zahrnuje více než 20 poddruhů. Je to hmyz (Insecta) patřící do řádu blanokřídlých (Hymenoptera), čeledi včelovití (Apidae) (Cane 2008; Yadav et al. 2017).



Obrázek 1: Včela medonosná *Apis mellifera*
(<https://www.geograph.org.uk/photo/4591531>)

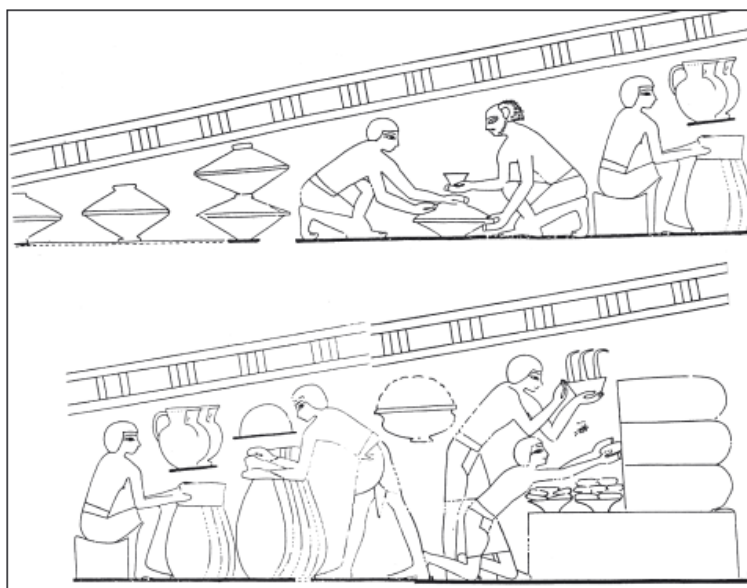
První výskyt včel se datuje na dobu asi před 30 miliony let (Tautz & Heilmann 2009). Tento společenský hmyz pochází původně z Evropy, Středního východu a Afriky. V 17. století začali lidé převážet včelstvo i na ostatní kontinenty a včela se tak rozšířila téměř po celém světě. Nyní ji najdeme v různých zeměpisných oblastech, včetně Ameriky, Asie nebo Austrálie (Bradbear 2009; vanEngelsdorp et al. 2010).

Včely hrají klíčovou roli při opylování plodin a pastvin, mají složitou společenskou strukturu, kdy jedna kolonie může obsahovat 30 000 až 100 000 včel (Bradbear 2009). Kromě společenskosti vykazují také jiné složité behaviorální rysy jako je jejich dorozumívání, rozdělení práce a výjimečné schopnosti učení a paměti. Včely jsou vývojově tvárné, což znamená, že se ze samičího jedince může podle typu potravy vyvinout dělnice nebo morfologicky odlišná královna (Dearden et al. 2009; Abou-Shaara & Hossam 2015).

3.2 Historie využití včel

První záznamy o využívání včelích produktů lidmi sahají do dávné historie. Nejstarší obrazový záznam, který dokumentuje sdružení lidí a včel pochází z období 7000 let př. n. l. Jsou ale důkazy, že již předchůdci samotného druhu *Homo sapiens* vytvářeli nástroje na roztrhání hnízd divokých včel, ze kterých pak vybírali samotný med (Kritsky 2017).

Vznik včelařství jako takového se těžko odhaduje, ale jsou dochovány obrazové záznamy z doby 2400 až 1450 let před naším letopočtem (Obr. 2), na kterých je vyobrazeno účelné sbírání medu ze včelích úlů (Crane 1999). Kritsky (2017) uvádí, že k domestikaci včel došlo před 2600 let př. n. l. Toto tvrzení potvrzuje fakt, že po medu byla vysoká poptávka vzhledem k tomu, že byl jediným dostupným sladidlem pro rané africké, evropské a středovýchodní civilizace (vanEngelsdorp et al. 2010).



Obrázek 2: Nástěnné malby v egyptské hrobce Rekhmire, 1450 let př. n. l. (Crane 1999)

Včelařská praxe byla předána starým Řekům přibližně v období 650 let př.n.l. a dále pak Římanům, kteří tuto praxi rozšířili po celé středověké Evropě. Potomci středověkých evropských včelařů nakonec rozšířili včelařství i včely po celém světě. I když nejsou z období 500 až 1000 let našeho letopočtu žádné doložené ilustrace úlů, předpokládá se, že v Evropě bylo včelařství v době středověku na vzestupu (vanEngelsdorp et al. 2010).

Až od 18. století se začalo praktikovat včelařství, jak ho známe teď, tedy sklizení medu bez ničení včelích kolonií. Správná praxe moderního včelařství je založena na lepší znalosti

biologie včel a zahrnuje například kočování se včelstvy a tím i vyšším výnosy medu anebo nástavkové včelaření, které umožňují extrakci medu se snížením poškozením včel (Künast et al. 2013; Toni et al. 2018).

Pro účelné opylování plodin se začaly včely používat na konci 19. a na začátku 20. století v některých státech USA (Toni et al. 2018).

3.3 Vliv včel na produkci potravin

Opylování rostlin je pro naši planetu důležité. Vzájemné biologické interakce probíhající mezi kvetoucími rostlinami a jejich opylovači jsou klíčovou složkou biologické rozmanitosti. I když opylování rostlin zajišťuje spoustu druhů opylovačů, včely jsou z nich absolutně nejdůležitější. Včely umožňují reprodukci kultivovaných i volně rostoucích druhů rostlin a tím se stávají zásadními účastníky při produkci mnoha druhů ovoce, zeleniny, semen a většiny vegetace v našem přirozeném prostředí, zahradách a parcích (Künast et al. 2013; FAO 2018a). Včely po miliony let zajišťují potravinovou bezpečnost, výživu, udržují biologickou rozmanitost a ekosystém pro rostliny a lidi (Stein et al. 2017; FAO 2018a).

Zvířecí opylovači, kam řadíme i včely, ve skutečnosti opylují přibližně 80 % všech rostoucích kvetoucích rostlin, tudíž i produkce plodin na celém světě je na nich vysoce závislá. Opylovači ovlivňují přibližně 35 % světové produkce plodin, přičemž přímo závislá je 5 až 8 % světové zemědělské produkce, což představuje 235 až 557 miliard amerických dolarů ročně (Sekhran 2016; Potts et al. 2016; FAO 2018b). V Evropské unii je finanční přínos z chovu včel ve výši 14,2 miliard až 22 miliard euro ročně (MZe 2017).

Použití včel je z ekologického, ale i z ekonomického hlediska nejúčinnější metodou pro opylování ovocných plodin (Toni et al. 2018). Potts et al. (2016) uvádí, že ze 107 předních celosvětových druhů plodin je 91 plodin (ovoce, semena, ořechy) různou měrou závislé na opylování zvířaty. Řada plodin, jako jsou například jablka, avokáda, borůvky, brusinky nebo chřest, jsou na opylovačích přímo závislá (Johnson & Corn 2015). Účinnost včel je dána jejich velkým počtem v kolonii a jejich společenským životem (FAO 2016).

V současné době dochází v různých agrosystémech k vymírání populací včel v důsledku ničení jejich stanovišť, používání pesticidů, snižování rozmanitosti rostlin, přílišné mechanizaci a špatných zemědělských postupů (Thakur 2012; Ferrier et al. 2018). Ztráta opylovačů by mohla navíc vést k nižší dostupnosti plodin a volně rostoucích rostlin, které poskytují vitaminy, minerální látky a stopové prvky (Potts et al. 2016). To vyvolává obavy, že produkce plodin

bude nižší, s čímž souvisí negativní dopad nejen na celosvětovou ekonomiku, ale zejména na potravinový řetězec (FAO 2018a).

Někteří farmáři musí opylování květin, z důvodu deficitu opylovačů, provádět alternativními způsoby. Například pěstitelé vanilky v Ugandě, pěstitelé maracuji v Brazílii nebo pěstitelé jablek v Číně jsou okolnostmi nuceni opylovat plodiny ručně (Obr. 3), i když je tato metoda velice obtížná a nákladná (Toni et al. 2018).



Obrázek 3: Ruční opylování maracuji
(<https://www.fairchildgarden.org/Events-Community-Outreach/Events-Details/passion-fruit>)

FAO (2016) uvádí, že včely zvyšují výnosnost některých plodin (Tab. 1). Výzkum ukázal, že pokud je opylování prováděno správnými postupy, mohou se výnosy farmy zvýšit až o 24 %. Dobře opyleným plodinám, kterým je dodáno poměrně velké množství pylu, se vyvine větší a jednotnější plod. V praxi to znamená, že kulatá jablka byla dostatečně opylena, zatímco jablka nedokonalého tvaru znamenají nedostatečné či nevyvážené opylení. Stejně tak to platí pro jahody, kdy plně vyvinutá jahoda potřebuje přibližně 21 návštěv včel. Pokud není dostatečně opylená, má menší a nerovnoměrný tvar. Výzkum s borůvkami ukázal, že sklizeň borůvek vypěstovaných v blízkosti včelích úlů byla téměř dvojnásobná, na rozdíl od borůvek pěstovaných v oblasti bez včel (Akratanakul 1990).

Tabulka 1: Percentuální nárůst výnosu některých plodin v důsledku opylení včel (Abrol 2012)

Plodina	Zvýšení výnosnosti (%)	Plodina	Zvýšení výnosnosti (%)
Jablko	18-69,5	Vojtěška	23-19733
Mandloň	50-75	Jetel	40-33150
Meruňka	5-10	Vikev	39-20000
Třešeň	56-1000	Štírovník	3-1000
Citron	77-223	Pohanka	63-100
Hrozen	23-54	Káva	17-39
Liči	453-10246	Bavlna	2-50
Švestka	536-1655	Bob	7-90
Košťálová zelenina	100-300	Hořčice	13-222
Ředkvičky	22-100	Světlice	4-114
Mrkev	9-135	Sezam	24-40
Vodnice	100-125	Lněné semeno	2-49
Okurky a tykve	21-6700		
Cibule	353-9878		
Zelí	100-300		

3.4 Včelí produkty

Používání včelích výrobků sahá do daleké historie. Ve všech tradičních medicínách naleznete použití včelích produktů jako je med, včelí vosk, propolis, pyl, mateří kašička a včelí jed (Jilo 2016; Aminimoghadamfarouj & Nematollahi 2017; Sforcin et al. 2017).

Léčba, která se zabývá terapií člověka pomocí včel a jejich produktů se nazývá apiterapie. Bylo prokázáno, že tyto produkty mají pozitivní vliv na zdraví. V současné době mají některé včelí produkty využití v odvětví doplňkové a alternativní medicíny a zájem o ně roste v souvislosti s jejich použitím při léčbě rakoviny, nebo při chorobách neurodegenerativních, kardiovaskulárních či gastrointestinálních (Sforcin et al. 2017; Kocot et al. 2018).

3.4.1 Med

Med je nejdéle využívaným produktem včel. Je také nejznámějším a nejdůležitějším primárním produktem včelařství ať už z kvantitativního nebo ekonomického hlediska. Celosvětově je zaznamenáno 81 milionů úlů, které ročně vyprodukují 1,6 milionu tun medu,

z čehož se s 518 tisíci tunami obchoduje (Potts et al. 2016). Hlavními producenty jsou Čína, Mexiko a Německo (Alvarez-Suarez 2017).

Jedná se o sladkou látku vytvářenou včelami z nektaru nebo medovice, které včely sbírají a s použitím výměšků hltanových žláz přetvářejí a následně ukládají v plástech, kde ho nechávají zrát. Med je viskózní kapalina, jejíž viskozita je závislá na spektru látek v medu obsažených. Medy různých rostlin vykazují odlišné viskozity (Veselý 2013). Požadavky na med stanovuje vyhláška č. 148/2015 Sb.

Med se skládá převážně ze směsi sacharidů (28–45 % fruktóza a 19–40 % glukóza, 10–12,9 % ostatní cukry). Celkově sacharidy představují 79,7–82,4 %, dalšími složkami jsou voda (15–20 %), bílkoviny 1–2,6 %, organické kyseliny, minerální látky, aminokyseliny, vitaminy, fenoly a jiné vedlejší sloučeniny. V medu nalezneme také bioaktivní sloučeniny zahrnující flavonoidy, fenolovou kyselinu a alfa tokoferol (Bogdanov et al. 2008; da Silva et al. 2016; Pasupuleti et al. 2017).

V současné době je med používán především jako potravina, přísada při tvorbě pokrmů, ale využití nalézá také v tradiční i alternativní medicíně a kosmetice (Krell & Nations 1996). Využití najde při ošetřování ran, ošetření diabetických nohou, gastrointestinálních potíží, gastroesofageálním refluxu, dyspepsii, peptických vředech, gastritidě, orální péči, kašli a faryngitidě, gastroenteritidě, zácpě, průjmů, onemocnění jater a ledvin, metabolických a kardiovaskulárních onemocněních, rakovině jater, kolorektálním karcinomu (Pasupuleti et al. 2017; Samarghandian et al. 2017).

3.4.2 Propolis

Propolis je přirozeně se vyskytující tmavě zbarvená pryskyřičná látka, kterou včely sbírají z různých rostlin, například z topolů, jehličnanů, olší, vrb nebo bříz. Jeho barva je závislá na původu a může mít různé barvy od hnědé až po červenou (Veselý 2013; Alvarez-Suarez 2017; Rivera-Yañez et al. 2018). Propolis včely používají k utěsnění trhlín v úlu, ale také k udržení vlhkosti a tepelné stability. Od starověku je používán pro jeho pozitivní účinky v lidové medicíně (Veselý 2013; Aminimoghadamfarouj & Nematollahi 2017).

Zhruba polovinu propolisu tvoří rostlinná pryskyřice, třetinu vosk a zbytek tvoří esenciální a aromatické oleje, pyly a další organické látky (Kuropatnicki et al. 2013; Huang et al. 2014). Mezi organickými látkami v propolisu nalezneme fenoly, estery, flavonoidy, terpeny, β -steroidy, aromatické aldehydy a alkoholy (Pasupuleti et al. 2017).

V současnosti je propolis díky svým pozitivním účinkům užíván v humánní medicíně, farmakologii a kosmetice, ale také například ve veterinární medicíně (Wagh 2013). Propolis se pro své zdravotní benefity používá při gastrointestinálních chorobách, v gynekologii, orální péči, kosmetice, ale také třeba v onkologické léčbě (Pasupuleti et al. 2017). Někteří autoři (Aminimoghadamfarouj & Nematollahi 2017; Rivera-Yañez et al. 2018) poukazují na antidiabetickou aktivitu propolisu a také na jeho důležitou roli v metabolismu lipidů, kdy má pozitivní vliv na oxidační stav a zlepšení HDL-c, což přispívá ke snížení rizika kardiovaskulárních chorob. Tyto výsledky byly prozatím získány pouze jen ze studií na zvířatech.

3.4.3 Mateří kašička

Mateří kašička je výměšek tvořený hltanovými a čelistními žlázami mladých včelích dělnic. Po staletí byla po staletí využívána pro její mimořádné zdravotní účinky (Pavel et al. 2011; Alvarez-Suarez 2017). Je nedílnou součástí výživy včel a hraje hlavní roli v rozlišování kast. První 2 až 3 dny je jedinou potravou, která je podávána larvám v procesu dozrávání, zatímco včelí matce je tato speciální výživa dodávána během celého její života (Pavel et al. 2011). Je tvořena z 50 až 60 % vodou, 18 % proteiny, 15 % sacharidy, 3–6 % lipidy, minerální soli a vitaminy tvoří přibližně 1,5 % obsahu (Pasupuleti et al. 2017).

Mateří kašička má velký potenciál v medicíně pro její terapeutické účinky. Některé studie (Pavel et al. 2011; Pasupuleti et al. 2017; Khazaei et al. 2018; Kocot et al. 2018) poukazují na její antimikrobiální, antioxidační, protinádorové a protizánětlivé účinky. Předpokládá se, že má vliv i na reprodukční zdraví, léčbu ran a neurodegenerativní onemocnění.

3.4.4 Včelí vosk

Včelí vosk je látka, která tvoří strukturu včelího hnízda. Včely ho vyměšují, aby vytvořily plástve pro vývoj plodu a uložení zásob. Je ceněn především pro jeho hydrofobní vlastnosti (Fratini et al. 2016). Jedná se o složitou směs látek, jejíž obsah se může lišit podle genetiky a stravy včel. Skládá se přibližně z 12–16 % uhlovodíků, 12–14 % tvoří volné mastné kyseliny, volné alkoholy asi 1 %, lineární voskové monoestery a hydroxyestery tvoří 35–45 % a 15–27 % tvoří komplexní voskové estery (Fratini et al. 2016).

Ročně se vyprodukuje přibližně 65 tisíc tun včelího vosku a je využíván především ve včelařství pro výrobu mezistěn i pro dekorační účely při výrobě svící. Včelí vosk zaujímá také

významné místo ve farmaceutickém, kosmetickém průmyslu a v potravinářství jako obalový materiál či jako přídatná látka v potravinách označená kódem E901 (Veselý 2013; Potts et al. 2016).

3.4.5 Pyl

Plástový pyl je směs pylu rostlin, nektaru a produktu sekrečních žláz včel. Tento významný včelí produkt má lékařský a výživový potenciál (Denisow & Denisow-Pietrzyk 2016; Kocot et al. 2018). Složení závisí především na jeho rostlinném a zeměpisném původu společně s dalšími faktory, jako jsou klimatické podmínky, typ půdy, druh a činnosti včel (Komosinska-Vassev et al. 2015). Průměrný obsah bílkovin v pylu je 32,8 %, z čehož je 11,5 % esenciálních aminokyselin. Redukující cukry se vyskytují v množství přibližně 40,7 % a lipidy v množství 12,8 %. Pyl obsahuje spoustu vitaminů a minerálních látek, za zmínku stojí vitamin C (0,19 %) a β -karoten (0,07 %) (Komosinska-Vassev et al. 2015).

V dnešní době nalézá včelí pyl uplatnění v potravinových doplncích, ale má také terapeutický přínos. Pro jeho antioxidační, imunomodulační, bakteriostatické i anestetické vlastnosti se využívá při hojení ran (Nascimento & Jr 2018).

3.4.6 Včelí jed

Včelí jed je hořká bezbarvá kapalina zajišťující obranu včelstva. Obsahuje směs bílkovin, které mají prozánětlivé a koagulační účinky. Jako lék se používal již ve starověkém Řecku a Číně (Hwang et al. 2015; Zolfagharian et al. 2015). Je tvořen z 88 % vodou (Jilo 2016). Obsahuje 13,6–16,6 % bílkovin (enzymů), 51,1–68,8 % peptidů, 1–3 % fosfolipidů, 0,8–3,5 % biogenních aminů, 1 % aminokyselin, 4–8 % feromonů a 3–4 % minerálních látek ve 100 % sušině (Bogdanov 2017). Z farmakologického hlediska jsou významné peptidy melitin, apamin a enzymy fosfolipáza A, fosfolipáza B a hyaluronidáza (Alvarez-Suarez 2017).

V tradiční medicíně se včelí jed používá pro léčbu mnoha onemocnění. Z tohoto důvodu jsou jeho farmaceutické vlastnosti předmětem mnoha výzkumů. Současné studie poukazují na jeho možné terapeutické účinky v léčbě artritidy, rakoviny, nemoci nervového systému, srdeční a cévní soustavy, ale i v léčbě kožních onemocnění (Hwang et al. 2015; Jilo 2016; Rady et al. 2017).

3.5 Nemoci ohrožující včelstva

Všechny žijící organismy jsou ohroženy na zdraví a ani včely nejsou výjimkou. Včely mohou být ohroženy jak nakažlivými, tak nenakažlivými nemocemi. V případě, že je včela ohrožena nakažlivou nemocí, šíří se potom tato nemoc velmi rychle vzhledem k tomu, že včely žijí společně v úzce propojené sociální organizaci. Výskyt včelího onemocnění závisí na přítomnosti patogenu, podmínkách prostředí, ale také na genetických predispozicích daného včelstva (Ritter & Akwatanakul 2006; FAO 2018c). I když počet chovaných včelstev za posledních 60 let celosvětově vzrostl o více než 45 %, objevují se obavy týkající se zdravotního stavu stávajících kolonií včel. Za posledních 15 let bylo hlášeno mnoho dramatických ztrát kolonií včel během zimních období (Gisder & Genersch 2015).

Podrobná znalost patogeneze infekcí je základem pro pochopení a předvídání dopadu infekčního patogenu na hostitele (Genersch et al. 2010). Dle FAO (2018b) je možné onemocnění včel rozdělit podle povahy činitele odpovědného za dané onemocnění na bakteriální, virové, parazitární či mykotické infekce, nebo dle funkce jedinců v postiženém úlu na choroby plodu a choroby dospělých včel.

3.5.1 Onemocnění způsobená parazity

Nejznámějším parazitárním onemocněním působícím celosvětově velké škody je varroáza. Postihuje včelí plod i dospělé včely a jejím původcem je roztoč *Varroa destructor* (Obr. 4) (Čermák et al. 2016). Tento parazit saje hemolymfu včelího plodu a dospělých včel. Z plodů se stávají poškozené včely nemohoucí vykonávat běžnou činnost a hynou. Napadené dospělé včely jsou oslabeny a tím náchylnější k dalším onemocněním, zejména virovým (Spivak & Reuter 2016; FAO 2018c).



Obrázek 4: Detail včely medonosné s *Varroa destructor* na povrchu těla (<https://www.flickr.com/photos/absoluteolly/8856545015>)

Roztočiková nákaza včel byla ve 20. století pozorována i na území ČR, ale od konce 80. let 20. století nebyl její výskyt v ČR zjištěn. Původcem tohoto onemocnění je *Acarapis woodi* (Čermák et al. 2016). Tento mikroskopický roztoč žije a rozmnožuje se uvnitř dýchacího ústrojí dospělých včel a živí se jejich hemolymfou (Spivak & Reuter 2016).

Dalším parazitárním onemocněním je měňavková nákaza, jež se v ČR několik let nevyskytuje. Toto onemocnění způsobuje parazit *Malpighamoeba mellificae*, který parazituje v malpighických trubicích včel (Čermák et al. 2016; FAO 2018c). Toto onemocnění způsobuje průjem, zduření břicha, neschopnost létat a vede k postupnému úhynu včel (FAO 2018c).

3.5.2 Onemocnění způsobená viry

Virová onemocnění včel způsobují především RNA viry. Škody způsobené viry se liší v závislosti na řadě faktorů, které zahrnují typ a kmen viru, odolnost kolonie včel nebo povětrnostní podmínky. Vzhledem k tomu, že včely jsou svou stavbou před viry dobře chráněny, virové infekce je postihují většinou v kombinaci se sáním krve parazitárními roztoči (Ritter & Akrotanakul 2006). Přenos virů probíhá buď horizontálně, což znamená že k přenosu virů dochází uvnitř jedné generace včel, nebo vertikálně, tedy přenos virů z generace na generaci. Viry jsou ve včelách přítomny v latentní nebo asymptomatické formě a k rozvoji infekce dochází většinou až po spuštění jiných faktorů, jako jsou jiné choroby anebo stres (FAO 2018c).

Mezi virová onemocnění včel řadíme virovou nákazu včelího plodu, která je způsobená virem označovaným jako *Morator aetatulae*. Toto onemocnění nazývané také jako Sackbrood

virus se v ČR vyskytuje spíše ojediněle (Ritter & Akwatanakul 2006; Veselý 2013; Čermák et al. 2016). Celosvětově byl zjištěn virus chronické paralýzy včel, který má často asymptomatický průběh. Klinicky se projevuje paralýzou nebo černáním včel (Ribièere et al. 2010).

V Evropě a Austrálii se vyskytuje virus akutní paralýzy včel, který je dáván do souvislosti se včelím roztočem *Varroa destructor*, ale i *Acarapis woodi* (Čermák et al. 2016).

Další, virus deformovaných křídel (Obr. 5), postihuje včelí plod i včely samotné. Vyskytuje se celosvětově a objevuje se zejména u včel postižených varoázou (Daníhlík & Petřivalský 2015; FAO 2018c).



Obrázek 5: Virus deformovaných křídel
(<http://www.modernivcelar.eu/clanky/virus-deformovanych-kridel.html>)

Ostatní viry včel jsou například virus černání matečnicku, virus zakalených křídel, virus F, včelí virus X nebo včelí virus Y nebo (Daníhlík & Petřivalský 2015).

3.5.3 Onemocnění způsobená houbami

Mezi mykotická onemocnění postihující včelí plod patří zkamenění včelího plodu a zvápenatění včelího plodu. Zvápenatění včelího plodu, které způsobuje mikroskopická houba *Ascospaera apis*, se v ČR vyskytovalo v minulosti poměrně často a postihuje především včelstva se špatným hygienickým chováním (Čermák et al. 2016). Zkamenění včelího plodu, jinak také aspergilózu, vyvolávají plísňe rodu *Aspergillus*, zejména *A. flavus*, ale například i *A.*

fumigatus. Toto onemocnění může postihnout výjimečně i dospělé včely (Čermák et al. 2016; FAO 2018c).

Za nejrozšířenější chorobu včel vůbec je považována nosematóza. Je to mykotické onemocnění dospělých včel, které mohou způsobovat dva druhy mykotických organismů *Nosema apis* (Obr. 6) a *Nosema ceranae* (Čermák et al. 2016; Spivak & Reuter 2016). Prevalence tohoto onemocnění v ČR je 50–70 % (Papežíková et al. 2015).



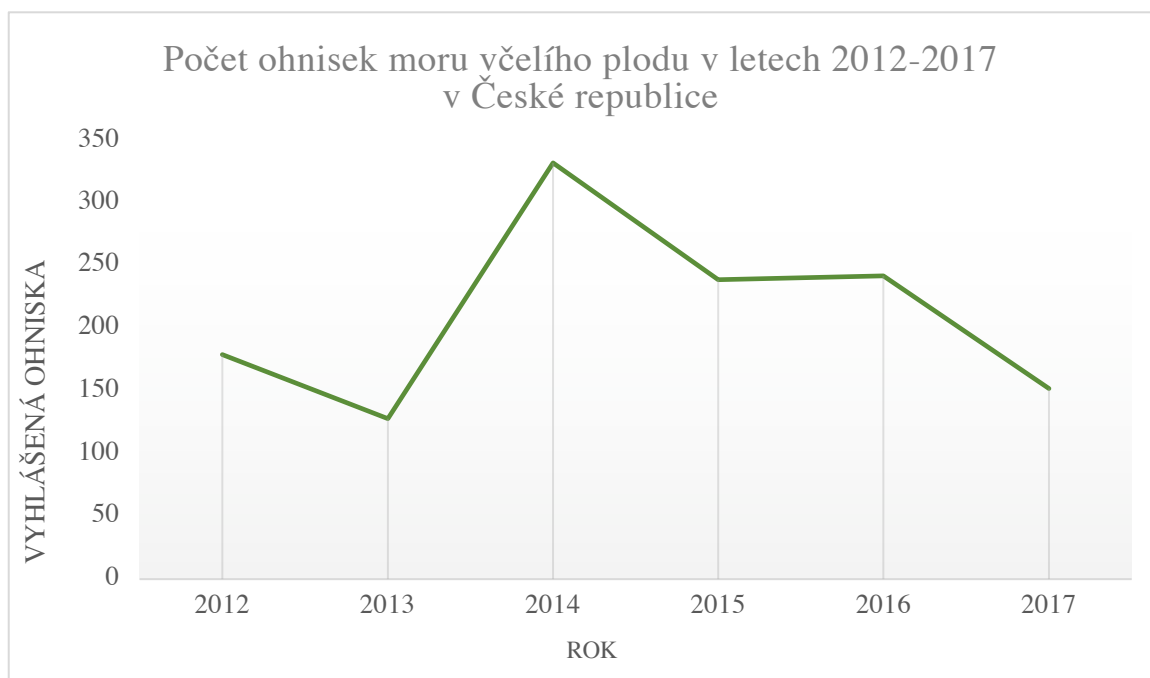
Obrázek 6: Příznaky infekce *N. Apis* ukazující tmavě hnědě zbarvenou stolicí při vstupu do úlu
(www.nationalbeeunit.com/downloadDocument.cfm?id=947)

Další mykotické onemocnění, zvané melanóza matky, vyvolává houba *Aureobasidium pullulans* a postihuje především matky, někdy může postihovat i dělnice (Čermák et al. 2016).

3.5.4 Onemocnění způsobená bakteriemi

Bakteriální infekce se u včely medonosné projevují především jako choroby plodů, jedná se zejména o mor včelího plodu a hnilobu včelího plodu (Burritt et al. 2016). Mezi bakteriální onemocnění dospělých včel patří hniloba včelího plodu, kterou způsobuje bakteriální původce grampozitivní, anaerobní, nesporogenní kokobakterie *Melissococcus plutonius* (Čermák et al. 2016). Pro toto onemocnění je charakteristický ostře kyselý zápach. Napadené larvy hynou před tzv. zavíčkovaním buněk (Spivak & Reuter 2016). V ČR je výskyt této nákazy spíše ojedinělý (Lokajová 2015).

Mor včelího plodu, který je znám již od starověku, způsobuje sporogenní, grampozitivní bakterie *Paenibacillus larvae*. Toto závažné, velmi nakažlivé onemocnění postihuje včelstva po celém světě včetně ČR (Obr. 7) (Le Conte & Navajas 2008; Čermák et al. 2016). Pro tuto infekci je typické hynutí larev po zavíčkování buněk a změna jejich barvy (Spivak & Reuter 2016).



Obrázek 7: Počet ohnisek moru včelího plodu v letech 2012–2017 v ČR

3.5.4.1 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens (Obr. 8) je gramnegativní, fakultativně anaerobní patogenní bakterie rodu *Serratia*, patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jsou tyčinkovitého tvaru se zaoblenými konci o velikosti 0,5-0,8 μm x 0,9-2,0 μm a jsou pohyblivé. Některé druhy *S. marcescens* jsou schopny produkovat pigment nazývaný prodigiosin, který má světle růžové až tmavě červené zbarvení (Golemi-Kotra 2008; Forsythe et al. 2015). Vyskytuje se ve vodě, byla izolována

například z řeky, ale také v půdě či rostlinách. Izolovaná byla také u zvířat a lidí. Optimální teplota pro růst je 10-40 °C, pH 5-9 a přítomnost NaCl do 0,5 % (Grimont & Grimont 2006).



Obrázek 8: *Serratia marcescens*

(https://www.123rf.com/photo_97203520_stock-illustration-serratia-marcescens-bacteria-gram-negative-rod-shaped-bacteria-causative-agents-of-hospital-acquired-.html)

Tuto bakterii poprvé objevil Bartolomeo Bizio v roce 1819, oficiální výsledky zveřejnil až roku 1823. Bakterii považoval za houbu a pojmenoval ji *Serratia marcescens* po italském fyzikovi Serafino Serrati. V průběhu let byla tato bakterie byla považována za různé typy organismů a byla popsána různými názvy. Až v roce 1980 byl přijat název *S. marcescens* v prvním vydání seznamu Approved List of Bacterial Names (Mahlen 2011).

S. marcescens je na živném agaru většinou neprůhledná, některé druhy se díky produkci pigmentu prodigiosinu mohou zbarvovat od světle růžové až po tmavě červenou (Garrity et al. 2005; Climaco 2018).

Vzhledem k tomu, že *S. marcescens* má předpoklady k růstu na potravinách zejména škrobovitého původu, pigmentové kolonie se v historii zaměňovaly za kapky krve. Již v roce 332 př. n. l. předpovídal makedonský vizionář pád Tyru z „krve“ vytékající z chleba. V průběhu celé historie se ještě objevilo mnoho dalších událostí týkajících se „krváčejícího“ chleba, mnohé z nich jsou spojeny s křesťanskými hostiemi kvůli události, která se stala r. 1263 v italském městě Bolsanu. Německý kněz, který údajně pochyboval o pohledu na svátost, spatřil „krev“ prosakující z posvěcených hostií a jeho víra byla upevněna. Tato událost se začala nazývat Bolsanským zázrakem (Haluzík 1994; Yu 2006; Mahlen 2011).

S. marcescens se vyskytuje jako oportunní patogen, což znamená, že je patogenní pouze za určitých okolností, např. oslabení hostitele. Najdeme ji u lidí, ale i zvířat včetně hmyzu (Grimont & Grimont 2006; Raymann et al. 2018). U lidí způsobuje oportunní infekce dýchacího traktu, močového systému, mozku anebo například infekce, a s tím spojené špatné hojení ran (Fünfhaus et al. 2018). U většiny zvířat je virulentní pouze za předpokladu, že se dostane do krevního řečiště. Včelí imunitní systém se může změnit například expozicí antibiotikům či pesticidům, což vede ke zvýšení rizika napadení oportunním patogenem (Raymann et al. 2018).

Raymann et al. (2018) uvádí, že byl zjištěn výskyt *S. marcescens* u nemocných larev včely medonosné a sporadicky se tento druh vyskytoval ve střevech dospělých včel, kde je považován za atypický. Současně byl druh *S. marcescens* izolovaný ze střeva včely medonosné, a ukázal se jako ukazatel zvyšující úmrtnost dospělých včel vystavených antibiotikům či pesticidům. Dále *S. marcescens* izoloval z roztoče *Varroa destructor* a hemolymfy imobilizovaných a mrtvých včel, zejména u přezimujících včelstev. Fünfhaus et al. (2018) zmiňuje, že bakterie *S. marcescens* jsou hmyzem vychytávány pravděpodobně z rostlin, prostupují do hemocoelu a hemolyfy, čímž způsobují letální septikémii. Nový poddruh *S. marcescens*, poddruh *Sicaria*, který byl izolován z mrtvých včel pocházejících z úlů, které se v zimě zhroutily, ale byl také nalezen u živých dospělých včel. Tento poddruh byl nalezen u trubců a dělnic. Infikované včely byly nehybné a nalezeny odděleně od ostatních včel. Symptomy u dělnic se projevovaly pouze v zimní sezóně, zatímco symptomy u trubců se objevily v letní sezóně. Tento poddruh se objevoval také u larev medonosných včel (Burritt et al. 2016).

4 Metodika

V praktické části diplomové práce byly kultivační metodou studovány bakterie včely medonosné (*Apis mellifera*). Byla použita kultivační média, která slouží pro selektivní stanovení a diferenciaci *Serratia* spp. a bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*. Po kultivaci byl popsán vzhled jednotlivých kolonií a z každého typu odebrány čisté izoláty pro následnou identifikaci pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Odběr vzorků, kterými byly včely druhu *A. mellifera*, byl proveden na území ČR ve dvou lokalitách – Klíčany a Suchdol. Vzorky v lokalitě Klíčany, kde byly včelařem detekovány úhyny v důsledku varoázy, byly odebrány 9. dubna 2018 do sterilního plastového sáčku, transportovány do mikrobiologické laboratoře a tam skladovány do následné analýzy v mrazničce o teplotě -18 °C. Vzorky z lokality Suchdol byly odebrány 9. května 2018 a také zmraženy na teplotu -18 °C.

4.1 Materiál

4.1.1 Použitá kultivační media

Pro analýzu směsných vzorků včel byla použita selektivní media MacConkey agar (Oxoid, UK), DCLS agar (Oxoid, UK) a *Serratia* differential agar (Himedia, Indie). MacConkey agar (Oxoid, UK) je diferenciální medium používané pro detekci, izolaci a stanovení koliformních a intestinálních patogenů vody, mléčných produktů a biologických vzorků. DCLS agar (Oxoid, UK) je modifikovaná forma desoxycholát citrátového agaru obohacená o sacharózu. Přidání sacharózy zvyšuje užitečnost tohoto media, protože nepatogenní organismy fermentující sacharózu, například *Proteus* spp. či *Enterobacter* spp., mohou být rozpoznávány díky tvorbě červených kolonií. *Serratia* differential agar (Himedia, Indie) je vhodným mediem pro kultivaci a diferenciaci bakterií rodu *Serratia* na základě fermentace arabinózy a dekarboxylace ornitinu.

Pro rozbor jednotlivých včel bylo z výše uvedených použito medium, které se v předešlém rozboru ukázalo jako nejvíce selektivní, a to *Serratia* differential agar (Himedia, Indie). Navíc byl použit *Bacillus cereus* agar base (Himedia, Indie), obohacený o Polymyxin B selektivní suplement (2 vialky/l) a žloutkovou emulzi (50 ml/l), který se dle normy ČSN ISO 7932 z roku 2005 používá pro izolaci *Bacillus cereus* z potravin, ale mimo to je na této živné půdě prokázán dobrý nárůst *S. marcescens*.

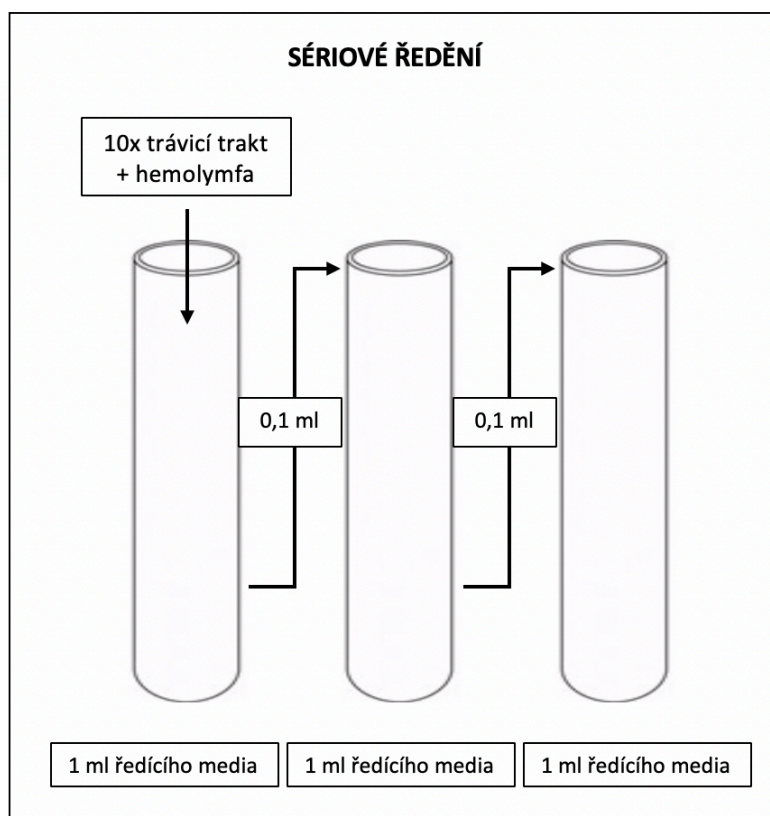
Vzorky byly ředěny v tekutém médiu o následujícím složení: Nutrient broth (5 g/l, Oxoid, UK), trypton (5 g/l, Oxoid, UK), 0,0075 g kvasničný extrakt (Oxoid, UK), 0,0015 ml tween (Sigma-Aldrich, USA) a 0,0075 g cystein (Sigma, USA).

Vybrané izoláty byly před identifikací subkultivovány v Tryptone soya broth (Oxoid, UK), který je doporučený pro obecné laboratorní použití. Toto medium podporuje růst mnoha organismů bez nutnosti přidání dalších přísad.

4.2 Metodika

4.2.1 Analýza směsných vzorků včel

V první fázi byly analyzovány směsné vzorky včel z obou lokalit. Vzorek obsahoval 5 včel z lokality Suchdol a 5 včel z lokality Klíčany. Trávicí trakt a hemolymfa každé včely byly převedeny do 1 ml ředícího media, homogenizovány a sériově naředěny (Obr. 9).



Obrázek 9: Sériové ředění

Pro selektivní stanovení byla použita různá kultivační media MacConkey agar (Oxoid, UK), DCLS agar (Oxoid, UK) a Serratia differential agar (Himedia, Indie). Na předem

připravené agarové plotny bylo nanášeno 0,1 ml vzorku a rozetřeno pomocí sterilní skleněné mikrobiologické hokejky. Kultivace probíhala aerobně po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C. Následně byly narostlé kolonie, lišící se tvarem, velikostí a barvou převedeny do Tryptone soya broth (Oxoid, UK) připraveného anaerobně metodou dle Hungate & Macy (1973) a kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin.

U plně narostlých kultur byla ověřena čistota a popsána morfologie pomocí mikroskopu (Nikon Instruments Europe B.V., Nizozemí).

Vybrané kmeny byly identifikovány na základě analýzy ribozomálních proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonik GmbH, Německo) dle pokynů výrobce. Jeden mililitr plně narostlé kultury byl přenesen do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a odstředěn při 14 500 ot/min po dobu 3 minut. Následně byl slit supernatant a pelet resuspendován v 70% ethanolu. Tento krok byl opakován dvakrát pro zajištění dostatečného odstranění kultivačního media. Pelet byl několik minut ponechán při laboratorní teplotě a po vyschnutí k němu bylo přidáno 10 µl 70% kyseliny mravenčí a důkladně promícháno, poté bylo přidáno 10 µl 100% acetonitrilu a vzorek byl centrifugován při maximálních otáčkách po dobu 2 minut. Jeden mikrolitr supernatantu byl pomocí pipety převeden na čistou MTP 384 MALDI destičku (Bruker Daltonik GmbH, Německo). Po zaschnutí byl každý vzorek překryt 1 µl HCCA matrice (nasycený roztok kyseliny α -kyano-4-hydroxycinnamové v 50% acetonitrilu s 2,5% kyselinou trifluoroctovou) (Bruker Daltonik GmbH, Německo). Spektra byla měřena automaticky pomocí softwaru FlexControl. Identifikace a analýza mikroorganismů byla provedena na základě získaných údajů importovaných do softwaru BioTyper verze 2.0 (Bruker Daltonik GmbH, Německo). Měření každého kmene bylo provedeno ve dvou opakováních.

4.2.2 Analýza jednotlivých včel

Pro rozbor jednotlivých včel bylo použito Serratia differential medium (Himedia, Indie), které se ukázalo jako nejvíce selektivní. Dále byl použit Bacillus cereus agar base (Himedia, Indie). Analyzováni byli 2 jedinci z každé lokality, přičemž každý vzorek obsahoval pouze jedno kompletní tělo včely. To bylo převedeno do 1 ml bujonu a důkladně homogenizováno sterilní skleněnou tyčinkou. Následně bylo 0,1 ml vzorku rozetřeno na Petriho misky s předem připravenými agary a kultivováno 24 hodin o teplotě 30 °C.

4.2.3 Analýza směsných vzorků v rámci jedné lokality

U analýzy směsných vzorků včel v rámci jedné lokality byly použity totožné agary jako v předchozím pokusu. Jednotlivé vzorky obsahovaly pět trávicích traktů včel s hemolymfou. Bylo provedeno sériové ředění pro Serratia differential medium (Himedia, Indie). Na Bacillus agar base (Himedia, Indie) byl aplikován pouze neředěný vzorek. Kultivace probíhala aerobně při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Narostlé kolonie byly přeočkovány do Trypton soya broth (Oxoid, UK) a kultivovány anaerobně při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin.

Morfologie a čistota kolonií byla ověřena a popsána pomocí mikroskopu (Nikon Instruments Europe B.V., Nizozemí).

Vybrané kmeny byly identifikovány, stejně jako v analýze směsných vzorků, pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonik GmbH, Německo).

5 Výsledky

5.1 Interpretace výsledků MALDI TOF MS

Rodová a druhová příslušnost mikroorganismů byla hodnocena na základě výsledných hodnot skóre. Software Biotyper 2.0 (Bruker Daltonik GmbH, Německo) za pomoci algoritmů porovnává naměřená hmotnostní spektra analyzovaných kmenů se spektry referenčních kmenů uložených v databázi a vypočítává logaritmickou hodnotu od 0,00 do 3,00. Čím vyšší je hodnota skóre, tím vyšší je stupeň podobnosti daného organismu (Tab. 2).

Tabulka 2: Význam hodnot skóre

Rozmezí	Interpretace	Barva
2,300 - 3,000	Vysoká pravděpodobnost identifikace na úroveň druhu	Zelená
2,000 - 2,299	Vysoká pravděpodobnost identifikace na úroveň rodu, pravděpodobná identifikace na úroveň druhu	
1,700 - 1,999	Pravděpodobná identifikace na úroveň rodu	Žlutá
<1,70	Nespolehlivá identifikace	Červená

Příručka MALDI Biotyper dostupná na:

ftp://ftp.bdal.de/data/support/tof/compass-flex/Service/Crosstraining/Part1/MALDI_Biotyper_ebook.pdf

5.2 Výsledky analýzy směsných vzorků včel

Na MacConkey agaru byly narostlé dva typy kolonií, sytě růžové a světle růžové až oranžové kolonie. Nárůst bakterií byl příliš intenzivní a znemožnil pro identifikaci odebrat všechny kolonie. DCLS agar obsahoval také dva typy kolonií, růžové a světle růžové až oranžové. Nárůst na tomto agaru byl méně intenzivní než na MacConkey agaru. Na Serratia differentialním agaru se objevily jednotné kolonie žluto-zelené barvy.

Výsledky identifikace bakterií izolovaných na jednotlivých agarech jsou uvedeny v Tabulkách 3, 4, 5 a 6. Nejčastěji izolovanými bakteriemi na MacConkey agaru byly bakterie rodů *Providencia* a rodu *Escherichia*. U DCLS agaru to byly bakterie rodu *Proteus* a u Serratia differentialního agaru to byly bakterie rodu *Providencia*. Všechny identifikované bakterie patřily do čeledi *Enterobacteriaceae*.

Tabulka 3: Výsledky identifikace bakterií izolovaných z MacConkey agaru (analýza směsných vzorků včel), část první

Kmen	Výsledky dané laboratoří	Hodnoty skóre	Výsledky dané laboratoří	Hodnoty skóre
A1	<i>Raoultella planticola</i>	2.423	<i>Raoultella planticola</i>	2.421
A2	<i>Escherichia coli</i>	2.396	<i>Escherichia coli</i>	2.346
B1	<i>Escherichia coli</i>	2.421	<i>Escherichia coli</i>	2.350
B2	<i>Raoultella planticola</i>	2.439	<i>Raoultella planticola</i>	2.438
B3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.335	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.321
B4	<i>Escherichia coli</i>	2.384	<i>Escherichia coli</i>	2.360
C1	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.409	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.353
C2	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.391	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.313
C3	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.337	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.320
D1	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.318	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.314
D2	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.383	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.369
E1	<i>Providencia rettgeri</i>	2.444	<i>Providencia rettgeri</i>	2.404
E2	<i>Providencia rettgeri</i>	2.358	<i>Providencia rettgeri</i>	2.353
E3	<i>Providencia rettgeri</i>	2.238	<i>Providencia rettgeri</i>	2.237

Pozn. k Tab. 3: A = světlejší růžové kolonie, B = červené, pravidelně ohraničené kolonie, C = červené nepravidelné kolonie, D = světle růžové, nepravidelně ohraničené kolonie, E = světle růžové, pravidelně ohraničené kolonie, F = sytě růžové kolonie

Tabulka 4: Výsledky identifikace bakterií izolovaných z MacConkey agaru (analýza směsných vzorků včel), část druhá

Kmen	Výsledky dané laboratoří	Hodnoty skóre	Výsledky dané laboratoří	Hodnoty skóre
F1	<i>Escherichia coli</i>	2.382	<i>Escherichia coli</i>	2.344
F2	<i>Escherichia coli</i>	2.385	<i>Escherichia coli</i>	2.335
F3	<i>Escherichia coli</i>	2.480	<i>Escherichia coli</i>	2.338
F4	<i>Escherichia coli</i>	2.421	<i>Escherichia coli</i>	2.351
F5	<i>Escherichia coli</i>	2.444	<i>Escherichia coli</i>	2.360
E-F	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.049	<i>Providencia alcalifaciens</i>	1.907

Pozn. k Tab. 4: E = světle růžové, pravidelně ohraničené kolonie, F = sytě růžové kolonie

Tabulka 5: Výsledky identifikace bakterií izolovaných z DCLS agaru (analýza směsných vzorků včel)

Kmen	Identifikace MALDI-TOF	Hodnoty skóre	Identifikace MALDI-TOF	Hodnoty skóre
A1	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.379	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.297
B1	<i>Providencia rettgeri</i>	2.328	<i>Providencia rettgeri</i>	2.319
B2	<i>Raoultella planticola</i>	2.372	<i>Raoultella planticola</i>	2.371
C1	<i>Proteus vulgaris</i>	2.215	<i>Proteus vulgaris</i>	2.202
C2	<i>Morganella morganii</i>	2.272	<i>Morganella morganii</i>	2.179
D1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.388	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.214
E1	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.413	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.377
E2	<i>Morganella morganii</i>	2.416	<i>Morganella morganii</i>	2.398
E3	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.370	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.361
F1	<i>Proteus vulgaris</i>	2.216	<i>Proteus vulgaris</i>	2.174
F2	<i>Proteus vulgaris</i>	2.183	<i>Proteus vulgaris</i>	2.600
G1	<i>Proteus hauseri</i>	2.115	<i>Proteus vulgaris</i>	2.101
G2	<i>Morganella morganii</i>	2.571	<i>Morganella morganii</i>	2.405
G3	<i>Morganella morganii</i>	2.490	<i>Morganella morganii</i>	2.380
G4	<i>Raoultella planticola</i>	2.428	<i>Raoultella planticola</i>	2.414

Pozn. k Tab. 5: A = červené kolonie, B = světle růžové kolonie s lehce červeným středem, C = krémové kolonie, D = velmi drobné bílé až krémové kolonie, E = světle růžové kolonie, F = velké krémové kolonie, G = krémové až bílé drobné kolonie

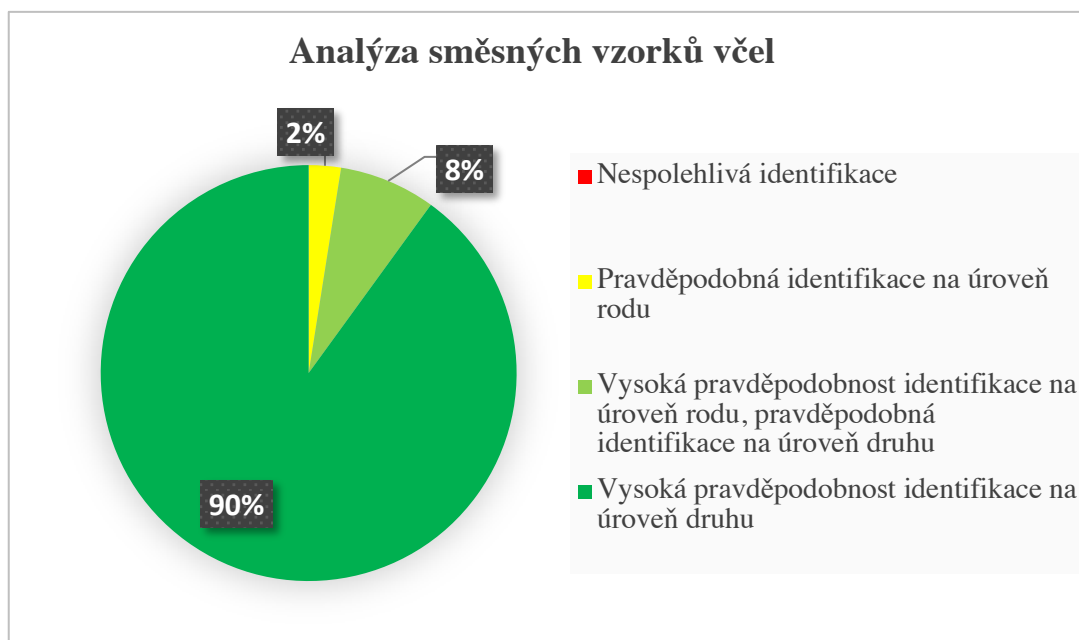
Tabulka 6: Výsledky identifikace bakterií izolovaných ze Serratia diferenciálního agarů (analýza směsných vzorků včel)

Kmen	Identifikace MALDI-TOF	Hodnoty skóre	Identifikace MALDI-TOF	Hodnoty skóre
A1	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.413	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.346
A2	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.429	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.338
A3	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.376	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.297
A4	<i>Providencia rettgeri</i>	2.272	<i>Providencia rettgeri</i>	2.197
A5	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.315	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.246
B1	<i>Morganella morganii</i>	2.328	<i>Morganella morganii</i>	2.324
C1	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.398	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.345
C2	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.333	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.251
C3	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.228	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.205
D1	<i>Citrobacter murliniae</i>	2.353	<i>Citrobacter freundii</i>	2.346
D2	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.387	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.348
D3	<i>Providencia rettgeri</i>	2.258	<i>Providencia rettgeri</i>	2.246
D4	<i>Providencia rettgeri</i>	2.344	<i>Providencia rettgeri</i>	2.232
D5	<i>Providencia rettgeri</i>	2.289	<i>Providencia rettgeri</i>	2.265
E1	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.387	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.339

Pozn. k Tab. 6: A = sytě žluté až žlutozelené kolonie, B = světlé rozptýlené kolonie se žlutým středem, C = světlé kolonie se žlutým středem, D = světlé kolonie se světle žlutým středem, E = světlé kolonie se sytě žlutým středem

5.2.1.1 Úspěšnost MALDI TOF MS identifikace analýzy směsných vzorků včel

Obr. 10 ukazuje úspěšnost identifikace analýzy směsných vzorků včel. V ani jednom případě testování nedošlo k nespolehlivé identifikaci. Pravděpodobná identifikace na úrovni rodu byla pozorována v jednom případě. Tři případy zahrnovaly vysokou pravděpodobnost identifikace na úrovni rodu a pravděpodobnou identifikaci druhu. Nejlepší identifikace, tedy identifikace o vysoké pravděpodobnosti na úrovni druhu, byla pozorována ve 36 případech.



Obrázek 10: Úspěšnost MALDI TOF MS identifikace analýzy směsných vzorků včel

5.2.2 Výsledky analýzy jednotlivých včel

U této analýzy nebyla provedena MALDI-TOF identifikace z důvodu negativního nárůstu na všech agarových plotnách.

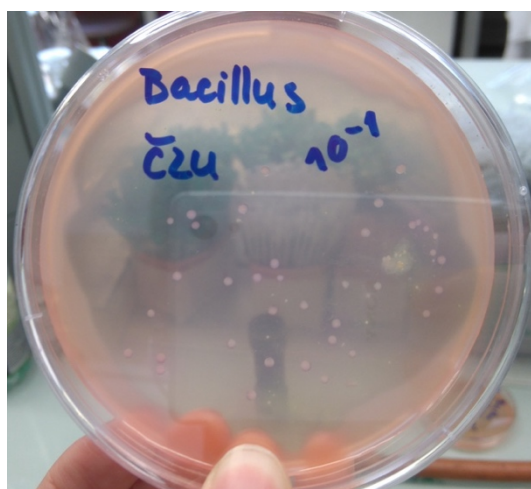
5.2.3 Výsledky analýzy směsných vzorků včel v rámci jedné lokality

V případě lokality Suchdol na Serratia diferenciálním mediu narostly dva typy kolonií (Obr. 11), ve větším zastoupení to byly velké světle fialové kolonie s modrým středem a v menším zastoupení malé žluto-zelené kolonie. Výsledky identifikace MALDI-TOF vzorků ukazuje Tab. 7 a 8. Nejčastěji izolovanou bakterií byla *Morganella* sp. Nárůst bakterií na stejném živném mediu v případě lokality Klíčany byl negativní.



Obrázek 11: Nárůst kolonií na Serratia diferenciálním agaru (Suchdol)

Na živné půdě Bacillus cereus agar base u vzorků z lokality Suchdol (Obr. 12) byly pozorovány růžové kolonie o různé sytosti a velikosti a kolonie žluto-zelené barvy. Nejčastěji identifikovanou bakterií, jak ukazuje Tab. 9, byla *Morganella* sp. V případě lokality Klíčany byly pozorovány kolonie světle růžových barev a žluto-zelené kolonie. Všechny bakterie byly identifikovány jako rod *Bacillus* spp. (Tab. 10).



Obrázek 12: Nárůst kolonií na Bacillus cereus agar base (Suchdol)

Tabulka 7: Výsledky identifikace bakterií izolovaných ze Serratia differentialního agaru (Suchdol, analýza směsných vzorků včel v rámci jedné lokality), část první

Kmen	Identifikace MALDI-TOF	Hodnoty skóre	Identifikace MALDI-TOF	Hodnoty skóre
A1	<i>Morganella morganii</i>	2.429	<i>Morganella morganii</i>	2.346
A2	<i>Morganella morganii</i>	2.455	<i>Morganella morganii</i>	2.332
A3	<i>Morganella morganii</i>	2.444	<i>Morganella morganii</i>	2.425
A4	<i>Morganella morganii</i>	2.404	<i>Morganella morganii</i>	2.354
A5	<i>Morganella morganii</i>	2.373	<i>Morganella morganii</i>	2.357
A6	<i>Morganella morganii</i>	2.430	<i>Morganella morganii</i>	2.396
A7	<i>Morganella morganii</i>	2.399	<i>Morganella morganii</i>	2.344
A8	<i>Morganella morganii</i>	2.379	<i>Morganella morganii</i>	2.376
A9	<i>Morganella morganii</i>	2.361	<i>Morganella morganii</i>	2.353
A10	<i>Morganella morganii</i>	2.376	<i>Morganella morganii</i>	2.363
A11	<i>Morganella morganii</i>	2.392	<i>Morganella morganii</i>	2.311
A12	<i>Morganella morganii</i>	2.418	<i>Morganella morganii</i>	2.364
A13	<i>Morganella morganii</i>	2.398	<i>Morganella morganii</i>	2.361
A14	<i>Morganella morganii</i>	2.408	<i>Morganella morganii</i>	2.391
A15	<i>Morganella morganii</i>	2.409	<i>Morganella morganii</i>	2.356

Pozn. k Tab. 7: A = velké, fialové kolonie s tmavě modrým středem, B = menší, pravidelně ohraničené žluto-zelené kolonie

Tabulka 8: Výsledky identifikace bakterií izolovaných ze Serratia differentialního agaru (Suchdol, analýza směsných vzorků včel v rámci jedné lokality), část druhá

Kmen	Identifikace MALDI-TOF	Hodnoty skóre	Identifikace MALDI-TOF	Hodnoty skóre
A16	<i>Morganella morganii</i>	2.415	<i>Morganella morganii</i>	2.369
A17	<i>Morganella morganii</i>	2.457	<i>Morganella morganii</i>	2.366
A18	<i>Morganella morganii</i>	2.425	<i>Morganella morganii</i>	2.353
A19	<i>Morganella morganii</i>	2.376	<i>Morganella morganii</i>	2.364
A20	<i>Morganella morganii</i>	2.313	<i>Morganella morganii</i>	2.299
A21	<i>Morganella morganii</i>	2.365	<i>Morganella morganii</i>	2.339
B1	<i>Citrobacter freundii</i>	2.418	<i>Citrobacter freundii</i>	2.382
B2	<i>Citrobacter freundii</i>	2.408	<i>Citrobacter freundii</i>	2.364
B3	<i>Citrobacter freundii</i>	2.454	<i>Citrobacter murlinae</i>	2.360
B4	<i>Citrobacter freundii</i>	2.437	<i>Citrobacter freundii</i>	2.437
B5	Nesp. identifikace	1.476	Nesp. identifikace	1.430

Pozn. k Tab. 8: A = velké, fialové kolonie s tmavě modrým středem, B = menší, pravidelně ohraničené žluto-zelené kolonie

Tabulka 9: Výsledky identifikace bakterií izolovaných z *Bacillus cereus* agar base (Suchdol, analýza směsných vzorků včel v rámci jedné lokality)

Kmen	Identifikace MALDI-TOF	Hodnoty skóre	Identifikace MALDI-TOF	Hodnoty skóre
A1	<i>Morganella morganii</i>	2.403	<i>Morganella morganii</i>	2.367
A2	<i>Morganella morganii</i>	2.478	<i>Morganella morganii</i>	2.453
A3	<i>Morganella morganii</i>	2.438	<i>Morganella morganii</i>	2.419
A4	<i>Morganella morganii</i>	2.401	<i>Morganella morganii</i>	2.355
A5	<i>Morganella morganii</i>	2.402	<i>Morganella morganii</i>	2.367
A6	<i>Morganella morganii</i>	2.480	<i>Morganella morganii</i>	2.468
A7	<i>Morganella morganii</i>	2.431	<i>Morganella morganii</i>	2.426
B1	Nespolehlivá identifikace	1.417	Nespolehlivá identifikace	1.386
B2	Nespolehlivá identifikace	1.464	Nespolehlivá identifikace	1.454
B3	Nespolehlivá identifikace	1.499	Nespolehlivá identifikace	1.403
B4	Nespolehlivá identifikace	1.501	Nespolehlivá identifikace	1.497
C1	<i>Lactococcus garvieae</i>	2.140	<i>Lactococcus garvieae</i>	1.949
C2	<i>Enterococcus durans</i>	2.387	<i>Enterococcus durans</i>	2.340
C3	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	2.387	Nespolehlivá identifikace	1.676
C4	<i>Lactococcus garvieae</i>	2.100	<i>Lactococcus garvieae</i>	2.003
C5	<i>Enterococcus durans</i>	2.226	<i>Enterococcus durans</i>	2.148

Pozn. k Tab. 9: A = pravidelné, průhledné, růžové kolonie; B = velmi drobné, průhledné, žluté kolonie; C = drobné, průhledné, bílo-růžové kolonie

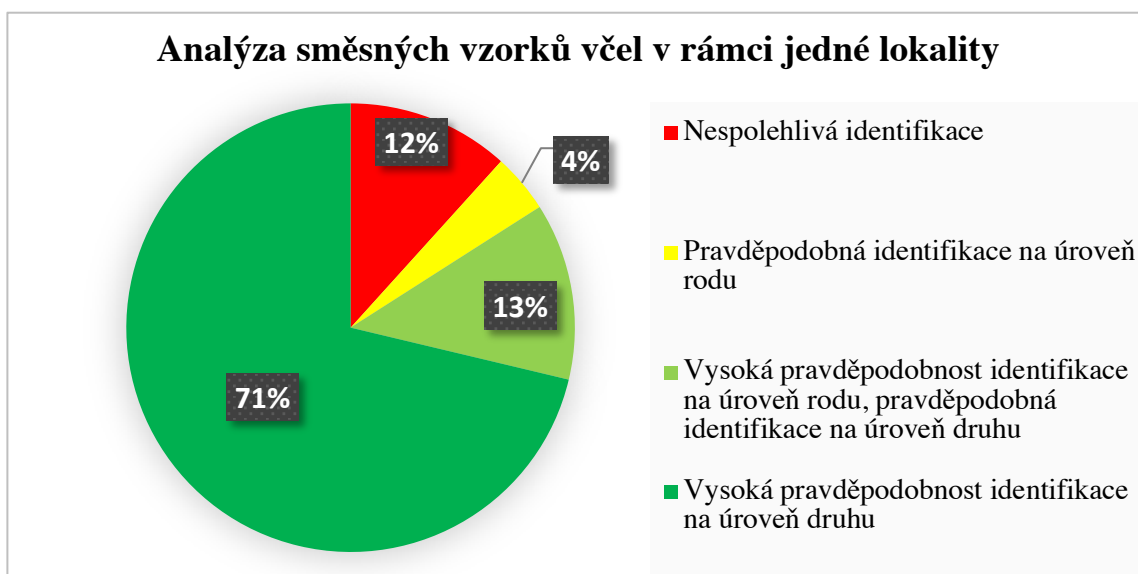
Tabulka 10: Výsledky identifikace bakterií izolovaných z *Bacillus cereus* agar base (Klíčany, analýza směsných vzorků včel v rámci jedné lokality)

Kmen	Identifikace MALDI-TOF	Hodnoty skóre	Identifikace MALDI-TOF	Hodnoty skóre
A1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2.247	<i>Bacillus cereus</i>	2.188
A2	<i>Bacillus cereus</i>	2.242	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2.224
B1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2.003	<i>Bacillus cereus</i>	1.982
C1	<i>Bacillus altitudinis</i>	2.600	<i>Bacillus pumilus</i>	1.971
C2	<i>Bacillus pumilus</i>	2.073	<i>Bacillus pumilus</i>	1.972

Pozn. k Tab. 10: A = velké nepravidelně ohraničené světle růžové kolonie se zónovou precipitací; B = menší nepravidelně ohraničené kolonie světlejší barvy než A; C = malé žluto-zelené pravidelně ohraničené kolonie

5.2.3.1 Úspěšnost MALDI TOF MS identifikace analýzy směsných vzorků včel v rámci jedné lokality

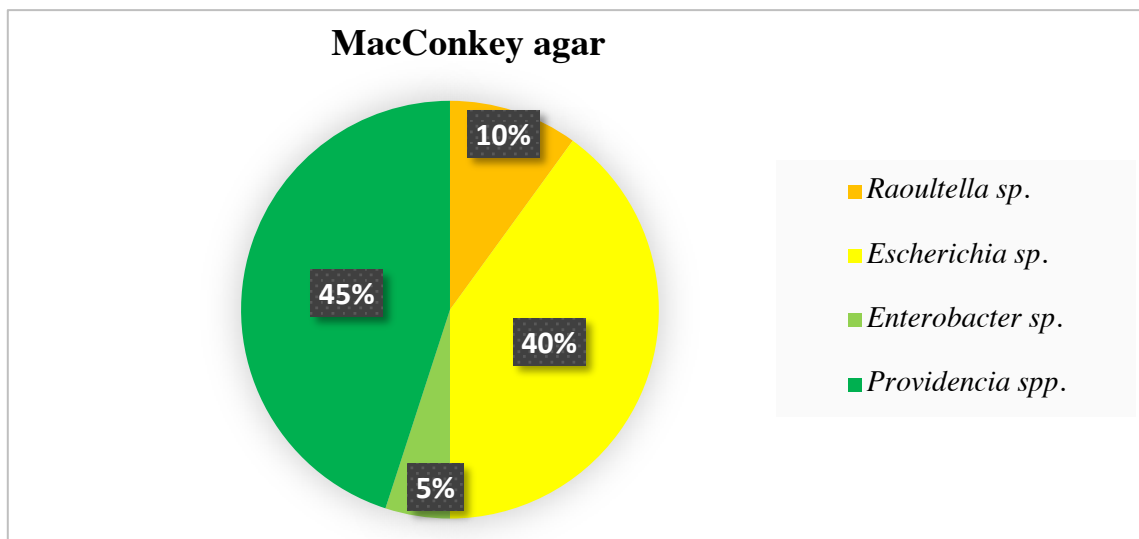
Úspěšnost identifikace analýzy směsných vzorků včel v rámci jedné lokality ukazuje Obr. 13. V tomto případě byla již identifikace oproti prvnímu testování nespolehlivá ve více případech, konkrétně v jedenácti. Čtyři identifikace byly pravděpodobnou identifikací na úroveň rodu a ve dvanácti případech byla pozorována vysoká pravděpodobnost identifikace na úroveň rodu a pravděpodobná identifikace na úroveň druhu. Vysoká pravděpodobnost identifikace na úrovni druhu byla pozorována v 67 případech.



Obrázek 13: Úspěšnost MALDI TOF MS identifikace analýzy směsných vzorků včel v rámci jedné lokality

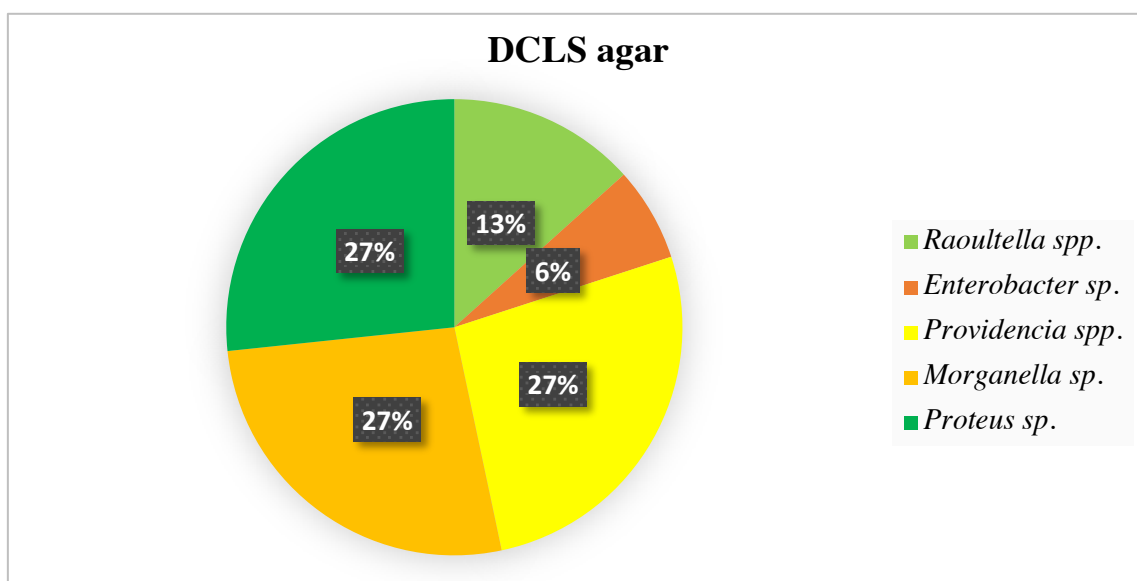
5.2.3.2 Rodová diverzita bakterií na jednotlivých mediích

MacConkey agar byl použit pouze v první analýze a jak ukazuje Obr. 14, celkem se na něm vyskytovaly 4 bakteriální druhy. Všechny tyto druhy náležely do skupiny gramnegativních bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*. Na tomto agaru se nejčastěji vyskytovaly bakterie rodu *Enterobacter* a *Escherichia*.



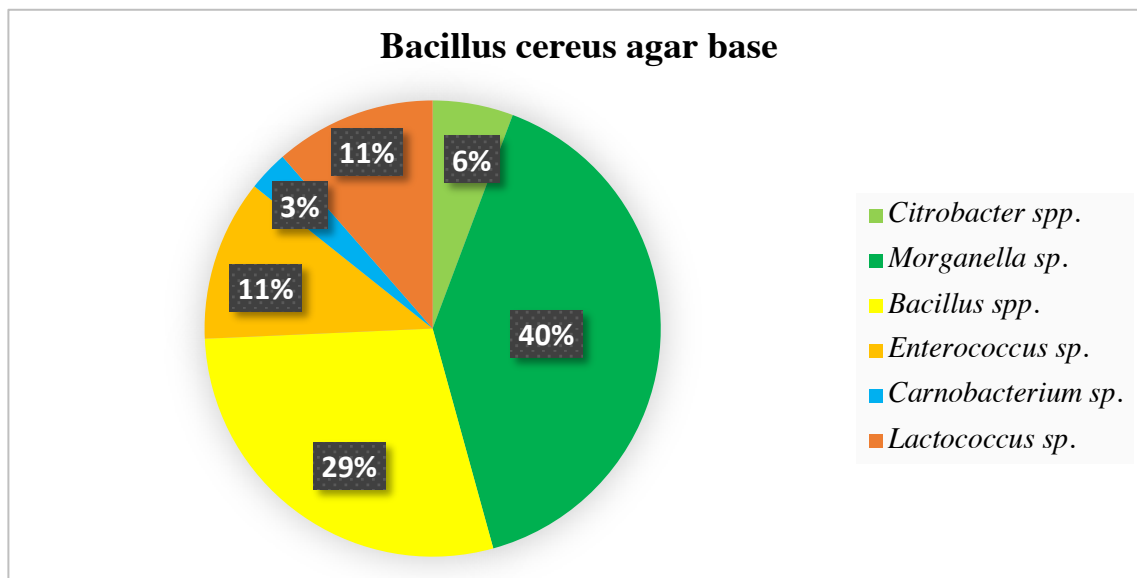
Obrázek 14: Rodová diverzita bakterií na MacConkey agaru

DCLS agar byl také použit pouze v první analýze a vyskytovalo se na něm celkem 5 bakteriálních druhů. Všechny tyto bakterie patřilo do skupiny gramnegativních bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*. Nejčastěji se vyskytujícími bakteriemi, jak ukazuje Obr. 15, byly *Proteus sp.*, *Morganella sp.* a *Providencia spp.*



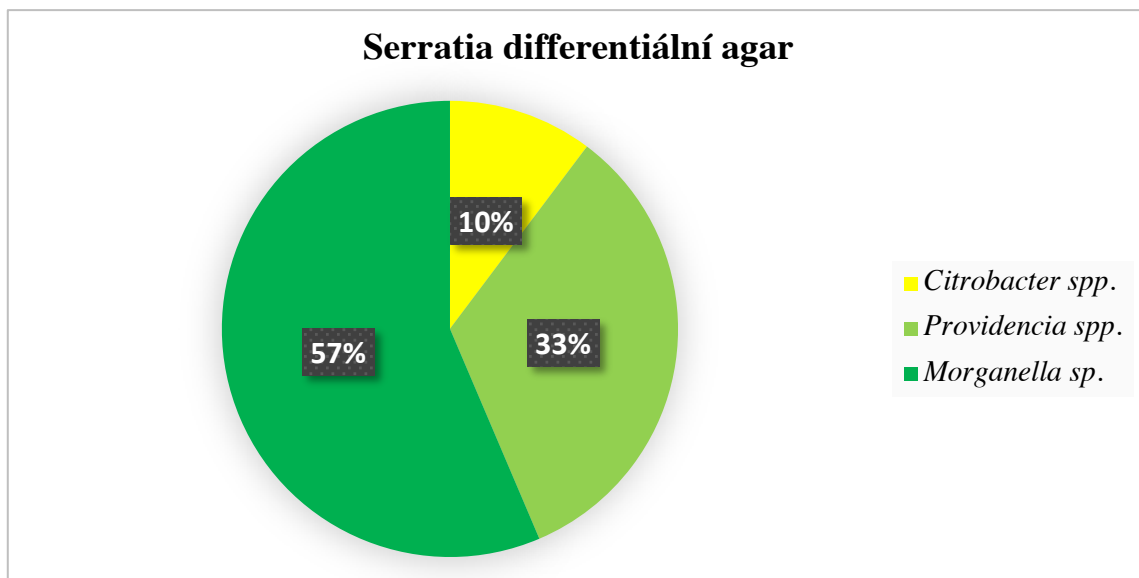
Obrázek 15: Rodová diverzita bakterií na DCLS agaru

Rodovou diverzitu bakterií na *Bacillus cereus* agar base ukazuje Obr. 16. Tento agar obsahoval nejvíce bakteriálních druhů. Kromě očekávaného grampozitivního druhu *Bacillus* narostly na agaru gramnegativní bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, konkrétně *Citrobacter* spp., *Morganella* sp. a *Enterococcus* sp. Dalšími identifikovanými grampozitivními bakteriemi mimo čeleď *Bacillaceae* byly *Lactococcus* sp. patřící do čeledi *Streptococcaceae* a *Carnobacterium* sp. patřící do čeledi *Carnobacteriaceae*. Nejčastěji se vyskytujícími bakteriemi byly *Morganella* sp. a *Bacillus* spp.



Obrázek 16: Rodová diverzita bakterií na *Bacillus cereus* agar base

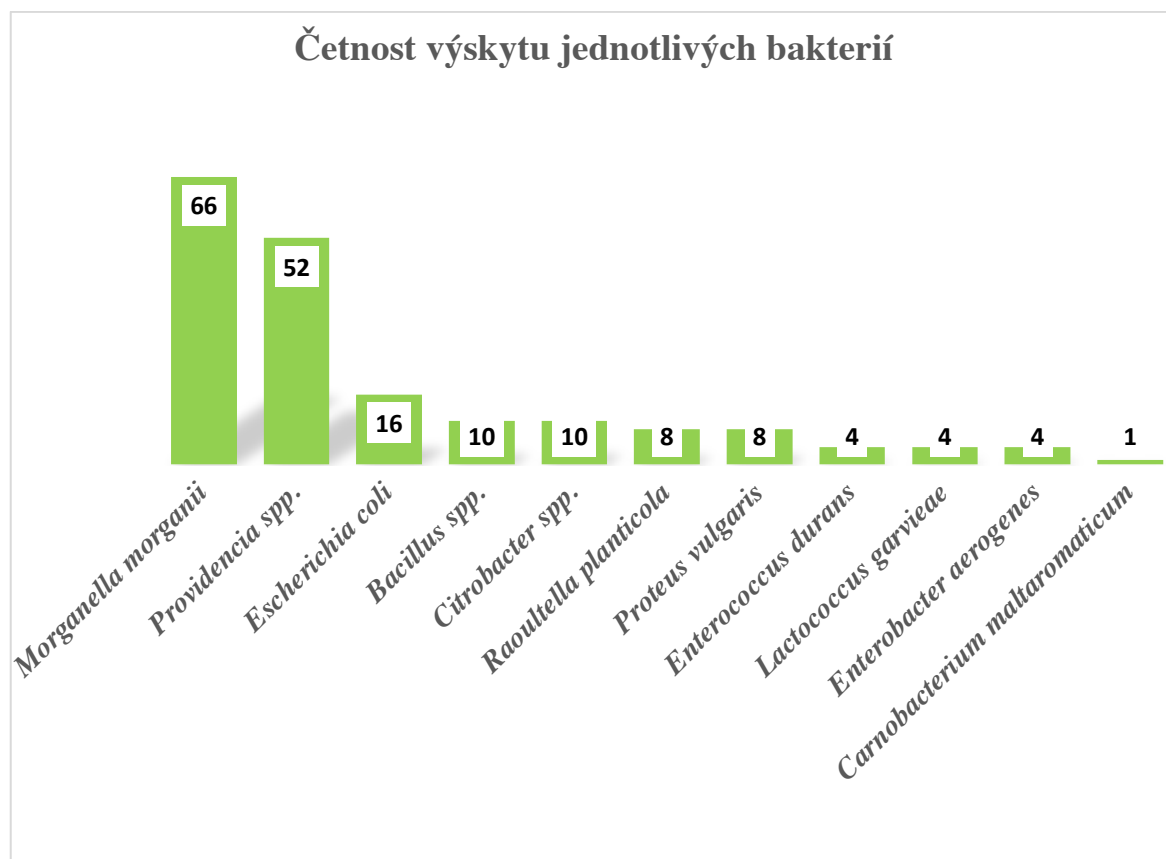
Obr. 17 znázorňuje rodovou diverzitu bakterií na *Serratia* diferenciálním agaru. Tento agar obsahoval pouze gramnegativní bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*. Nejvíce zastoupenou bakterií byla *Morganella* sp.



Obrázek 17: Rodová diverzita bakterií na Serratia diferenciálním agaru

5.2.3.3 Četnost výskytu jednotlivých bakterií

Obr. 18 ukazuje počet jednotlivých bakterií nalezených ve všech testováních. Nejčastěji objevenou bakterií byla *M. morganii* a bakterie rodu *Providencia*. Nejčastěji zastoupenou čeledí byla čeleď *Enterobacteriaceae*.



Obrázek 18: Počet jednotlivých bakteriálních rodů z celého testování

6 Diskuze

Včela medonosná má nezastupitelnou roli v opylování kulturních i volně rostoucích rostlin, ale také ve tvorbě včelích produktů. Celosvětová ztráta včelstev je proto ohrožením pro zásobování lidské populace potravinami. Včely jsou obkloповány velkou spoustou mikrobů, ať už v pozitivním či negativním smyslu. S některými mikroby žijí v symbióze, jinými mikroby mohou být ohrožovány, čímž může být snižována jejich odolnost (Burritt et al. 2016). Proto je snahou zjistit, které bakterie mohou být pro včely patogenní a které protektivní. Pochopení souvislostí mezi patofyziologií a symptomy je důležitým krokem k pochopení mechanismu tohoto problému. Hledání patogenů může být ztíženo faktem, že infikované včely obvykle opouštějí úl nebo jsou z úlu odstraněny (Raymann et al. 2018).

Cílem této diplomové práce byla detekce *Serratia marcescens* ve vybraných českých včelstvech celkem ze dvou lokalit. Testováno bylo celkem 24 vzorků včel, po 12 vzorcích z každé lokality. Výskyt *S. marcescens* ve včele medonosné, na kterou se tato práce zaměřovala, byl již v několika studiích (Jeyaprakash et al. 2003; Burritt et al. 2016; Raymann et al. 2018) prokázán, v našem testování se ji ale prokázat nepodařilo.

Gaspar & Kačániová (2017) zkoumali čeleď *Enterobacteriaceae* ve střevě včely medonosné a antibiotickou resistenci těchto izolátů. Kultivace probíhala na McConkey agaru a masopeptonovém bujonu a izoláty byly identifikovány pomocí MALDI-TOF MS Biotyper. Izolovanými bakteriálními rody čeledi *Enterobacteriaceae* byly *Enterobacter* sp., *Morganella* sp., *Raoultella* spp., což koresponduje s našimi výsledky. Autorům se podařilo prokázat výskyt bakterií *Serratia* spp., nicméně nám se tuto bakterii prokázat nepodařilo. Bakterii *Serratia* sp. objevil ve včelstvech východního Slovenska i Gaspar et al. (2017), který zkoumal a charakterizoval bakteriální diverzitu trávicího traktu včely medonosné za použití MALDI-TOF MS Biotyper. Obsah střevního traktu kultivoval pro izolaci gramnegativních a grampozitivních bakterií a kvasinek. Kačániová et al. (2017) se ve své studii zabývala identifikací bakteriálních druhů v intestinálním traktu včely medonosné. Střevní obsah kultivovala na MacConkey agaru a trypton-sojovém agaru a identifikace izolátů probíhala taktéž pomocí MALDI-TOF MS Biotyper. Některé bakteriální druhy se shodují s námi objevenými, jako je například *Morganella* sp., *Raoultella* spp. nebo *Lactococcus* sp. V její práci uvádí i výskyt bakterie *Serratia* sp.

Bakteriální diverzitu včel *Apis mellifera capensis* a *Apis mellifera scutellata* zkoumal Jeyaprakash et al. (2003). Pomocí 16S rRNA sekvenace objevil v trávicím traktu včel rody

Bifidobacterium, *Lactobacillus*, *Gluconacetobacter*, *Simonsiella* a *Bartonella*, byli objeveni i zástupci rodu *Serratia*.

Předpokládá se, že *S. marcescens* je u včel patogenní. Tuto patogenitu testoval Burritt et al. (2016). Zkoumal několik trubců a dělnic na přítomnost bakterií rodu *Serratia* dle tří kritérií. Prvním kritériem byly symptomatické versus asymptomatické včely, společným nálezem symptomatických trubců a dělnic byla ztráta normálního pohybu a jejich oddělení od aktivního úlu. Druhým kritériem byly infikované včely v porovnání s neinfikovanými včelami dle kultivačního stanovení. Třetím kritériem porovnávalo pohlaví – dělnice a trubce. Na základě těchto kritérií zkoumal následující 4 experimentální skupiny – symptomatické infikované dělnice, asymptomatické infikované dělnice, asymptomatické neinfikované dělnice a symptomatické infikované trubce. První skupina včel vykazovala přítomnost *S. marcescens* v hemolymfě. Kultivace hemolymfy druhé skupiny včel ukázala také přítomnost *S. marcescens*. Třetí skupina včel nevykazovala žádné známky *S. marcescens* v hemolymfové kultuře. U poslední skupiny včel byla také *S. marcescens* v hemolymfě přítomna. Tyto poznatky poukazují na možnou patogenitu *S. marcescens*. Vzorky včel ze stanoviště Klíčany byly mrtvé včely v nadměrném množství během zimování včelstva. Symptomaticky tedy odpovídají popisu, který ve své práci uvedl Burritt et al. (2016). To by znamenalo, že *S. marcescens* není běžnou součástí trávicího traktu včel a je oportunním patogenem pouze na určitých místech.

Patogenitu *S. marcescens* u včel testoval také Raymann et al. (2018). V jeho studii charakterizoval virulenci tří kmenů *S. marcescens*, které byly izolované ze střev včel a porovnával je s kmeny *S. marcescens* izolovaných z roztoče *Varroa destructor* a z hemolymfy mrtvých či umírajících včel. Bakterie izolované ze střeva byly patogenní jak při orální inokulaci, tak v případě injektování do hemolymfy. Bakterie izolované z hemolymfy a roztoče *V. destructor* byly virulentní pouze v případě injektování do hemolymfy. To poukázalo na fakt, že různé kmeny *S. marcescens* mohou mít různé mechanismy virulence. Celkový výsledek studie představuje bakterii *S. marcescens* jako hrozbu včel, která by neměla být přehlížena.

Důvodů, proč v našem testování nebyla objevena hledaná bakterie, může být několik. Významnou roli zde může hrát věk testovaných jedinců a vliv na jeho přežití, imunitu a intenzitu infekce. Při vystavení starších včel parazitům *Nosema ceranae* došlo k závažnější infekci než u mladších včel Robertse & Hughese (2014). Je tedy pravděpodobné, že i šíření *S. marcescens* může souviset s věkem včel, a proto by bylo vhodné pro příští pokus znát věk testovaných včel.

Dalším důvodem neobjevení *S. marcescens* může být vliv antibiotik. Studie Raymanna et al. (2017) se zabývala expozicí včel medonosných antibiotikům a jejich vyšší mortalitě. Tato

studie poukazuje na fakt, že u včel vystavených antibiotické léčbě se ve složení střeva zmenšilo množství některých bakterií, ačkoliv přítomnost *S. marcescens* byla naopak prokázána ve větším množství. Za účelem zjištění, zda oportunitní bakterie přispívají ke zvýšené mortalitě u včel léčených antibiotiky, provedl experiment s použitím *S. marcescens*, který byl izolován ze střev včel. Včely vystavené léčbě antibiotiky a zároveň bakterii *Serratia* sp. vykazovaly vyšší mortalitu než včely vystavené pouze léčbě antibiotiky nebo pouze bakterii *Serratia* sp. V ČR se však ve včelařské praxi antibiotika nepoužívají.

I když v našem testování nebyl prokázán výskyt *S. marcescens*, byly objeveny jiné druhy bakterií, které korespondují s výsledky jiných studií (Lyapunov et al. 2008; Hubert et al. 2015; Wang et al. 2015; Khan et al. 2017; Erban et al. 2017; Al-Ghamdi et al. 2018; Mathialagan et al. 2018). Mezi tyto druhy patřila i *Morganella morganii*, která patří mezi nejčastější bakterie objevené naším testováním. U této bakterie byl již sledován možný vliv na snížení úmrtnosti larev včely medonosné v důsledku infikování *Paenibacillus larvae*. *M. morganii* však nemá vliv na snížení úmrtnosti (Al-Ghamdi et al. 2018). Kromě trávicího traktu se *M. morganii* vyskytuje také u roztoče *V. destructor* odebraného ze zimní měli (Hubert et al. 2015). Přítomnost této bakterie je prokázána také u hibernujících včel. Během zimování vzrostl poměr včel obsahujících enterobakterie z 92,3 % na 100 %. Včely po zimním období obsahovaly více bakterií *Providencia rettgeri*, *M. morganii* a *Proteus vulgaris* (Lyapunov et al. 2008), což koreluje s našimi výsledky. Dále byla u vzorků včel z lokality Praha Suchdol potvrzena přítomnost *Citrobacter freundii*. Je uváděno, že tato bakterie je patogenní pro včely (Lyapunov et al. 2008). Mimo to je *C. freundii* asociována s vyšším výskytem moru včelího plodu, zatímco *M. morganii* byla asociována se včelami, které byly na mor včelího plodu negativní (Erban et al. 2017). V našich výsledcích převažovala *M. morganii*, což by mohlo naznačovat, že včelí larvy by mohly být odolnější proti *P. larvae* a to přesto, že nebyl prokázán vliv na snižování úmrtnosti (Al-Ghamdi et al. 2018).

Mathialagan et al. (2018) ve své práci týkající se izolace, charakteristiky a identifikace probiotických bakterií mléčného kvašení uvádí, že bakterie *Carnobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp. či *Streptococcus* spp. se běžně vyskytují ve střevech hmyzu, včetně včel. Naše výsledky také prokázaly jejich přítomnost.

Naše analýza poukázala také na přítomnost bakterií *Bacillus* spp. Tímto bakteriálním rodem ve střevě včely medonosné se zabýval Wang et al. (2015) a došel k závěru, že tyto bakterie pomáhají při zpracování květinového nektaru v med, což nepředstavuje patogenitu, ale jakousi formu pozitivní symbiózy. Můžeme souhlasit s tvrzením Hroncové et al. (2015), že aktivní mikrobiota včel se liší lokací úlu, ontogenetickým stadiem a věkem včely.

7 Závěr

Přítomnost patogenních bakterií je považována za možnou příčinu zhoršení zdravotního stavu a celkového poklesu počtu včel. Některé druhy bakterií již byly za patogeny včel několikrát prokázány a zájem o zjištění přítomnosti a patogenity těchto bakterií roste. Mezi takové bakterie patří i *Serratia marcescens*.

Předložená práce je pilotní studií v ČR pro exaktní stanovení významnosti infekce *S. marcescens* v chovech včely medonosné na našem území. Včely v našem pokusu pocházely pro srovnání ze dvou lokalit. Na stanovišti Klíčany byly včelařem zaznamenané úhyny v důsledku varroázy a proto byla u tohoto oslabeného včelstva větší pravděpodobnost detekce *S. marcescens*. Nicméně ani u jednoho z včelstev se přítomnost této bakterie neprokázala. Vzhledem k tomu, že *S. marcescens* nebyla v našem testování objevena, se hypotézu, že *S. marcescens* je fakultativním patogenem včely medonosné a podílí se na úhynech včel v podmínkách ČR, nepodařilo prokázat. Práce však shrnuje dosavadní poznatky a poskytuje detailní metodický postup pro studium a detekci *S. marcescens* u včely medonosné.

8 Seznam použité literatury

- Abou-Shaara, Hossam F. 2015. The origin of honey bees' life: A viewpoint. *Journal of Entomology and Zoology Studies* **3**(1):239–341.
- Akratanakul P. 1990. Beekeeping in Asia. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, Italy. Available from <http://www.fao.org/docrep/x0083e/X0083E00.htm#Contents> (accessed November 26, 2018).
- Al-Ghamdi A, Ali Khan K, Javed Ansari M, Almasaudi SB, Al-Kahtani S. 2018. Effect of gut bacterial isolates from *Apis mellifera jemenitica* on *Paenibacillus larvae* infected bee larvae. *Saudi Journal of Biological Sciences* **25**(2):383–387. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.07.005>.
- Alvarez-Suarez JM, editor. 2017. Bee Products - Chemical and Biological Properties. Springer International Publishing. Available from www.springer.com/la/book/9783319596884 (accessed October 24, 2018).
- Aminimoghadamfarouj N, Nematollahi A. 2017. Propolis Diterpenes as a Remarkable Bio-Source for Drug Discovery Development: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **18**(6):E1290. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18061290>.
- Bogdanov S. 2017. Bee venom: Composition, health, medicine: A review. *Bee Product Science*: 1–24. Available from <http://www.bee-hexagon.net/files/fileE/Health/VenomBookReview.pdf> (accessed October 24, 2018).
- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. 2008. Honey for Nutrition and Health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition* **27**(6):677–689. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19155427> (accessed December 13, 2018).
- Bradbear N. 2009. Bees and their role in forest livelihoods. A Guide to the Services Provided by Bees and the Sustainable Harvesting, Processing and Marketing of Their Products. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Available from <http://www.fao.org/3/a-i0842e.pdf> (accessed December 13, 2018).
- Burritt NL, Foss NJ, Neeno-Eckwall EC, Church JO, Hilger AM, Hildebrand JA, Warshauer DM, Perna NT, Burritt JB. 2016. Sepsis and Hemocyte Loss in Honey Bees (*Apis mellifera*) Infected with *Serratia marcescens* Strain Sicaria. *PLoS ONE* **11**(12):e0167752. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167752>.

- Cane JH. 2008. Bees (Hymenoptera: Apoidea: Apiformes). Pages 419–434 in J. L. Capinera, editor. *Encyclopedia of Entomology*. Springer Netherlands, Dordrecht. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_264.
- Čermák K, Gruna B, Hajdušková J, Holub P, Klíma Z, Kovařík I, Navrátil S, Rytina L, Texl P, Tůma Z. 2016. *Včelařství*. Svazek I: Zootechnika včelařství, Nemoci včel - prevence a terapie. PSNV, České Budějovice.
- Climaco AB. 2018. *Serratia*: Background, Pathophysiology, Epidemiology. Medscape. Available from <https://emedicine.medscape.com/article/228495-overview#a6> (accessed November 10, 2018).
- Crane E. 1999. Recent research on the world history of beekeeping. *Bee World* **80**(4):174–186. DOI: <https://doi.org/10.1080/0005772X.1999.11099453>.
- da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. 2016. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry* **196**:309–323. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>.
- Danihlík J, Petřivalský M. 2015. Aktuální vědecké poznatky o imunitě a zdraví včel. *Veterinářství* **2015**:434–440.
- Dearden PK, Duncan EJ, Wilson MJ. 2009. The Honeybee *Apis mellifera*. Cold Spring Harbor Protocols **2009**:1-7. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.emo123>.
- Denisow B, Denisow-Pietrzyk M. 2016. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **96**(13):4303–4309. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7729>.
- Erban T, Ledvinka O, Kamler M, Nesvorna M, Hortova B, Tyl J, Titera D, Markovic M, Hubert J. 2017. Honeybee (*Apis mellifera*)-associated bacterial community affected by American foulbrood: detection of *Paenibacillus larvae* via microbiome analysis. *Scientific Reports* **7**(1): 5084. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05076-8>.
- FAO. 2016. The power of pollinators: why more bees means better food. Available from <http://www.fao.org/zhc/detail-events/en/c/428504/> (accessed November 2, 2018).
- FAO. 2018a. Why bees matter: The importance of bees and other pollinators for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Available from www.fao.org/3/i9527en/I9527EN.PDF (accessed November 2, 2018).

- FAO. 2018b. Biodiversity: Pollinators. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Available from <http://www.fao.org/biodiversity/components/pollinators/en/> (accessed November 6, 2018).
- FAO. 2018c. Main bee diseases: Good beekeeping practices. Page Thematic catalogue for smallholder farmers to promote innovation. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Available from <http://www.fao.org/3/i9466en/I9466EN.pdf> (accessed November 6, 2018).
- Ferrier P, Rucker RR, Thurman WN, Burgett M. 2018. Economic Effects and Responses to Changes in Honey Bee Health. Economic Research Report **246**:1-48. Available from <https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/88117/err-246.pdf?v=0> (accessed November 6, 2018).
- Forsythe SJ, Abbott SL, Pitout J. 2015. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Cronobacter, Serratia, Plesiomonas, and other Enterobacteriaceae*. Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition:714–737. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/9781555817381.ch38>.
- Fratini F, Cilia G, Turchi B, Felicioli A. 2016. Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine **9**(9): 839–843. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.07.003>.
- Fünfhaus A, Ebeling J, Genersch E. 2018. Bacterial pathogens of bees. Current Opinion in Insect Science **26**:89–96. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.008>.
- Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR. 2005. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2: *The Proteobacteria*, Part B: *The Gammaproteobacteria*, 2nd edition. Springer US. Available from www.springer.com/la/book/9780387241449 (accessed November 10, 2018).
- Gasper J, Kačániová M. 2017. *Enterobacteriaceae* in gut of honey bee (*Apis mellifera*) and the antibiotic resistance of the isolates. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies **50**(2):69–72. Available from <http://www.spasb.ro/index.php/spasb/article/view/2314> (accessed March 9, 2019).
- Gasper J, Terentjeva M, Kántor A, Ivanišová E, Kluz M, Kačániová M. 2017. Identification of *Apis mellifera* Gut Microbiota with MALDI-TOF MS Biotyper. Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies **50**(1):192–196. Available from <http://www.spasb.ro/index.php/spasb/article/view/2311/pdf> (accessed March 19, 2019).

- Genersch E, Evans JD, Fries I. 2010. Honey bee disease overview. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**(1):S2-S4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.015>.
- Gisder S, Genersch E. 2015. Special Issue: Honey Bee Viruses. *Viruses* **7**(10):5603–5608. DOI: <https://doi.org/10.3390/v7102885>.
- Golemi-Kotra D. 2008. *Serratia*, *Edwardsiella* and *Morganella* Infections. Pages 1–6 in S. J. Enna and D. B. Bylund, editors. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier, New York. DOI: <http://10.03.248/B978-008055232-3.63827-9>.
- Grimont F, Grimont PAD. 2006. The Genus *Serratia*. Pages 219–244 in M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt, editors. *The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. Springer New York, New York. DOI: https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_11.
- Haluzík M. 1994. Zázrak, nebo mikrob? *Vesmír* **73**:656. Available from <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1994/cislo-11/zazrak-nebo-mikrob.html> (accessed November 10, 2018).
- Hroncova Z et al. 2015. Variation in Honey Bee Gut Microbial Diversity Affected by Ontogenetic Stage, Age and Geographic Location. *PLOS ONE* **10**(3):e0118707. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118707>.
- Huang S, Zhang C-P, Wang K, Li GQ, Hu F-L. 2014. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* **19**(12):19610–19632. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules191219610>.
- Hubert J, Erban T, Kamler M, Kopecky J, Nesvorna M, Hejdankova S, Titera D, Tyl J, Zurek L. 2015. Bacteria detected in the honeybee parasitic mite *Varroa destructor* collected from beehive winter debris. *Journal of Applied Microbiology* **119**(3):640–654. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12899>.
- Hungate RE, Macy J. 1973. The Roll-Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. *Bulletins from the Ecological Research Committee* **1969**:123–126. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70503-8](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70503-8).
- Hwang D-S, Kim SK, Bae H. 2015. Therapeutic Effects of Bee Venom on Immunological and Neurological Diseases. *Toxins* **7**(7):2413–2421. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins7072413>.
- Jeyaprakash A, Hoy MA, Allsopp MH. 2003. Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA

- sequences. *Journal of Invertebrate Pathology* **84**(2):96–103. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14615218> (accessed November 11, 2018).
- Abdela N, Jilo K. 2016. Bee Venom and Its Therapeutic Values: A Review. *Advances in Life Science and Technology* **44**:18-22. Available from <https://pdfs.semanticscholar.org/1b0c/f2b1328665fea05f64241a0812a60749ac31.pdf> (accessed November 11, 2018).
- Johnson R, Corn ML. 2015, January 20. Bee Health: Background and Issues for Congress. Congressional Research Service. Available from <https://digital.library.unt.edu/ark:/67531/metadc817167/m1/1/> (accessed November 8, 2018).
- Kačániová M, Gasper J, Brindza J, Schubertová Z, Ivanišová E. 2017. Bacteria Of *Apis Mellifera* Gastrointestinal Tract: Counts, Identification And Their Antibiotic Resistance. *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality*. Available from <http://agrobiodiversity.uniag.sk/scientificpapers/article/view/65> (accessed March 19, 2019).
- Khan KA, Ansari MJ, Al-Ghamdi A, Nuru A, Harakeh S, Iqbal J. 2017. Investigation of gut microbial communities associated with indigenous honey bee (*Apis mellifera jemenitica*) from two different eco-regions of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* **24**:1061–1068. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.01.055>.
- Khazaei M, Ansarian A, Ghanbari E. 2018. New Findings on Biological Actions and Clinical Applications of Royal Jelly: A Review. *Journal of Dietary Supplements* **15**(5):757–775. DOI: <https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1363843>.
- Kocot J, Kielczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I. 2018. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2018**:7074209. DOI: [10.1155/2018/7074209](https://doi.org/10.1155/2018/7074209).
- Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Kaźmierczak J, Mencner L, Olczyk K. 2015. Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2015**:297425. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/297425>.
- Krell R, Nations F and AO of the U. 1996. Value-added Products from Beekeeping. *FAO Agricultural services bulletin* 124. Available from <http://www.fao.org/3/w0076e/w0076e00.htm> (accessed October 23, 2018).
- Kritsky G. 2017. Beekeeping from Antiquity Through the Middle Ages. *Annual Review of Entomology* **62**:249–264. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035115>.

- Künast C, Riffel M, de Graeff R, Whitmore G. 2013. Pollinators and agriculture: Agricultural productivity and pollinator protection. European Landowners' Organization (ELO) and the European Crop Protection Association (ECPA). Available from https://www.ecpa.eu/sites/default/files/Pollinators%20brochure_B%C3%A0T2.pdf.
- Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W. 2013. Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2013**:964149. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/964149>
- Le Conte Y, Navajas M. 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* **27**(2):485–497, 499–510. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18819674> (accessed October 23, 2018).
- Lokajová E. 2015. Hniloba včelího plodu. *Veterinářství*. Available from <https://vetweb.cz/hniloba-vceliho-plodu/> (accessed November 27, 2018).
- Lyapunov YE, Kuzyaev RZ, Khismatullin RG, Bezgodova OA. 2008. Intestinal *Enterobacteria* of the hibernating *Apis mellifera* L. bees. *Microbiology* **77**(3):421-428. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026261708030181>.
- Mahlen SD. 2011. Serratia Infections: from Military Experiments to Current Practice. *Clinical Microbiology Reviews* **24**(4):755–791. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-11>.
- Mathialagan M, Thangaraj Edward YSJ, David PMM, Senthilkumar M, Srinivasan MR, Mohankumar S. 2018. Isolation, Characterization and Identification of Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) from Honey Bees. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **7**:894–906. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.704.096>.
- Ministerstvo zemědělství. 2015. Vyhláška č. 148/2015 Sb. ze dne 19. června 2015, kterou se mění vyhláška č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony, ve znění vyhlášky č. 43/2005 Sb. Pages 1917-1918 in *Sbírka zákonů České republiky, 2015, částka 61. Česká republika*.
- Ministerstvo zemědělství. 2017. Situační a výhledová zpráva: Včely. Ministerstvo zemědělství, Praha. Available from http://www.apic-ak.cz/data_ak/18/k/VcelySVZ2017.pdf (accessed November 11, 2018).

- Nascimento AMCB, Jr GEL. 2018. Bee pollen properties: uses and potential pharmacological applications-a review. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research* **7(4)**:513–515. Available from <http://medcraveonline.com/JAPLR/JAPLR-07-00276> (accessed November 11, 2018).
- Papežíková I, Palíková M, Navrátil S, Pecková L. 2015. Nosematóza - přetrvávající a podceňovaný problém u včel. *Veterinářství* **2015(6)**:446–448.
- 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* **2017**:1259510. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>.
- Pavel CI, Mărghitaş LA, Bobiş O, Dezmirean DS, Şapcaliu A, Radoi I, Mădaş MN. 2011. Biological activities of royal jelly - review. *Animal Science and Biotechnologies* **44(2)**:108–118. Available from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123107697> (accessed October 24, 2018).
- Potts SG, Imperatriz-Fonseca V, Ngo HT, Biesmeijer JC, Breeze TD, Dicks LV, Garibaldi LA, Hill R, Settele J, Vanbergen AJ. 2016, August. The assessment report on pollinators, pollination and food production: summary for policymakers. Available from http://www.ipbes.net/sites/default/files/downloads/pdf/SPM_Deliverable_3a_Pollination.pdf (accessed November 8, 2018).
- Rady I, Siddiqui IA, Rady M, Mukhtar H. 2017. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer letters* **402**:16–31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.010>.
- Raymann K, Coon KL, Shaffer Z, Salisbury S, Moran NA. 2018. Pathogenicity of *Serratia marcescens* Strains in Honey Bees. *mBio* **9**:e01649-18. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001861>.
- Raymann K, Shaffer Z, Moran NA. 2017. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLOS Biology* **15(3)**:e2001861. Available from <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.2001861> (accessed March 8, 2019).
- Ribière M, Olivier V, Blanchard P. 2010. Chronic bee paralysis: A disease and a virus like no other? *Journal of Invertebrate Pathology* **103**:S120–S131. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.013>.

- Ritter W, Akwatanakul P. 2006. Honey bee diseases and pests: a practical guide. Page Agricultural and food engineering technical reports. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Available from <http://www.fao.org/3/a-a0849e.pdf>.
- Rivera-Yañez N, Rodriguez-Canales M, Nieto-Yañez O, Jimenez-Estrada M, Ibarra-Barajas M, Canales-Martinez MM, Rodriguez-Monroy MA. 2018. Hypoglycaemic and Antioxidant Effects of Propolis of Chihuahua in a Model of Experimental Diabetes. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2018**:4360356. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/4360356>.
- Roberts KE, Hughes WO. 2014. Immunosenescence and resistance to parasite infection in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* **121**:1–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.06.004>.
- Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F. 2017. Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research. *Pharmacognosy Research* **9**(2):121–127. DOI: <https://doi.org/10.4103/0974-8490.204647>.
- Sekhran N. 2016. Pollinators vital to our food supply under threat. FAO, Rome. Available from <http://www.fao.org/news/story/en/item/384726/icode/> (accessed November 6, 2018).
- Sforcin JM, Bankova V, Kuropatnicki AK. 2017. Medical Benefits of Honeybee Products. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2017**:2702106. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/2702106>.
- Spivak M, Reuter GS. 2016. Honey Bee Diseases & Pests: A Companion To Beekeeping In Northern Climates. University of Minnesota Bookstores. Available from https://www.beelab.umn.edu/sites/beelab.umn.edu/files/_2016_disease_pdf_version_s.pdf (accessed November 22, 2018).
- Stein K, Coulibaly D, Stenchly K, Goetze D, Porembski S, Lindner A, Konaté S, Linsenmair EK. 2017. Bee pollination increases yield quantity and quality of cash crops in Burkina Faso, West Africa. *Scientific Reports* **7**(1): 17691. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17970-2>.
- Tautz J, Heilmann HR. 2009. Fenomenální včely: biologie včelstva jako superorganizmu. Vydání 1. Brázda, Praha.

- Thakur M. 2012. Bees as pollinators - biodiversity and conservation. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science* **2**(1):001-007. Available from <https://www.interestjournals.org/articles/bees-as-pollinators--biodiversity-and-conservation.pdf> (accessed November 7, 2018).
- Toni CH, Djossa BA, Yedomonhan H, Zannou ET, Mensah GA. 2018. Western honey bee management for crop pollination. *African Crop Science Journal* **26**(1):1–17. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/acsj.v26i1.1>.
- vanEngelsdorp D, Meixner MD, Meixner M, van Lieshout ECDM. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**:S80-S95. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.011>.
- Veselý V. 2013. *Včelařství*. Vydání 3. Brázda, Praha.
- Wagh VD. 2013. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences* **2013**:308249. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/308249>.
- Wang M, Zhao W-Z, Xu H, Wang Z-W, He S-Y. 2015. *Bacillus* in the guts of honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae) mediate changes in amylase values. *European Journal of Entomology* **112**(4):619–624. DOI: <https://doi.org/10.14411/eje.2015.095>.
- Yadav S, Kumar Y, Jat BL. 2017. Honeybee: Diversity, Castes and Life Cycle. Pages 5–34 in Omkar. *Industrial Entomology*. Springer, Singapore. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-10-3304-9_2.
- Yu VL. 2006. *Serratia marcescens*: Masquerader of Blood. Available from <https://www.semanticscholar.org/paper/Serratia-marcescens-%3A-Masquerader-of-Blood-Yu/72b87f159b44a2885d2a1e90171416d9a1cce1e6> (accessed December 18, 2018).
- Zolfagharian H, Mohajeri M, Babaie M. 2015. Honey Bee Venom (*Apis mellifera*) Contains Anticoagulation Factors and Increases the Blood-clotting Time. *Journal of Pharmacopuncture* **18**(4):7–11. DOI: <https://doi.org/10.3831/KPI.2015.18.031>.

9 Seznam obrázků a tabulek

9.1 Seznam obrázků

Obrázek 1: Včela medonosná <i>Apis mellifera</i> (https://www.geograph.org.uk/photo/4591531)	10
Obrázek 2: Nástěnné malby v egyptské hrobce Rekhmire, 1450 let př. n. l. (Crane 1999)...	11
Obrázek 3: Ruční opylování maracuju (https://www.fairchildgarden.org/Events-Community-Outreach/Events-Details/passion-fruit)	13
Obrázek 4: Detail včely medonosné s <i>Varroa destructor</i> na povrchu těla (https://www.flickr.com/photos/absoluteolly/8856545015).....	19
Obrázek 5: Virus deformovaných křídel (http://www.modernivcelar.eu/clanky/virus-deformovanych-kridel.html)	20
Obrázek 6: Příznaky infekce <i>N. Apis</i> ukazující tmavě hnědě zbarvenou stolicí při vstupu do úlu (www.nationalbeeunit.com/downloadDocument.cfm?id=947)	21
Obrázek 7: Počet ohnisek moru včelího plodu v letech 2012–2017 v ČR.....	22
Obrázek 8: <i>Serratia marcescens</i> (https://www.123rf.com/photo_97203520_stock-illustration-serratia-marcescens-bacteria-gram-negative-rod-shaped-bacteria-causative-agents-of-hospital-acquired-.html)	23
Obrázek 9: Sériové ředění	26
Obrázek 10: Úspěšnost MALDI TOF MS identifikace analýzy směsných vzorků včel.....	34
Obrázek 11: Nárůst kolonií na <i>Serratia</i> diferenciálním agaru (Suchdol).....	35
Obrázek 12: Nárůst kolonií na <i>Bacillus cereus</i> agar base (Suchdol).....	35
Obrázek 13: Úspěšnost MALDI TOF MS identifikace analýzy směsných vzorků včel v rámci jedné lokality	40
Obrázek 14: Rodová diverzita bakterií na MacConkey agaru.....	41
Obrázek 15: Rodová diverzita bakterií na DCLS agaru.....	41
Obrázek 16: Rodová diverzita bakterií na <i>Bacillus cereus</i> agar base.....	42
Obrázek 17: Rodová diverzita bakterií na <i>Serratia</i> diferenciálním agaru.....	43
Obrázek 18: Počet jednotlivých bakteriálních rodů z celého testování.....	43

9.2 Seznam tabulek

Tabulka 1: Percentuální nárůst výnosu některých plodin v důsledku opylení včel (Abrol 2012)	14
Tabulka 2: Význam hodnot skóre	29
Tabulka 3: Výsledky identifikace bakterií izolovaných z MacConkey agaru (analýza směsných vzorků včel), část první	30
Tabulka 4: Výsledky identifikace bakterií izolovaných z MacConkey agaru (analýza směsných vzorků včel), část druhá	31
Tabulka 5: Výsledky identifikace bakterií izolovaných z DCLS agaru (analýza směsných vzorků včel)	32
Tabulka 6: Výsledky identifikace bakterií izolovaných ze Serratia differentiálního agaru (analýza směsných vzorků včel)	33
Tabulka 7: Výsledky identifikace bakterií izolovaných ze Serratia differentialního agaru (Suchdol, analýza směsných vzorků včel v rámci jedné lokality), část první	36
Tabulka 8: Výsledky identifikace bakterií izolovaných ze Serratia differentialního agaru (Suchdol, analýza směsných vzorků včel v rámci jedné lokality), část druhá.....	37
Tabulka 9: Výsledky identifikace bakterií izolovaných z Bacillus cereus agar base (Suchdol, analýza směsných vzorků včel v rámci jedné lokality)	38
Tabulka 10: Výsledky identifikace bakterií izolovaných z Bacillus cereus agar base (Klíčany, analýza směsných vzorků včel v rámci jedné lokality)	39