



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra zootechnických věd

Diplomová práce

Screening biologických aktivit vláknitých hub izolovaných
z plástového pylu

Autor(ka) práce: Ing. Františka Trmalová

Vedoucí práce: Ing. Petr Tejml, Ph.D.

Konzultant práce: Ing. Karel Beneš, Ph.D.

České Budějovice 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

V rámci této diplomové práce byly izolovány mikroorganismy z plástového pylu včel a dva byly vybrány k analýze jejich biologické aktivity. Literární rešerše se zaměřuje na funkci včelích kast a vývoj včelího společenství. Dále popisuje potravu včel a s ní související mikrobiom a úlové mikroorganismy. Praktická část práce je zaměřena na vlastní kultivaci mikroorganismů, jejich určení pomocí 16S rRNA a izolaci biologicky aktivních látek produkovaných analyzovanými mikroorganismy. Zjištěné výsledky z molekulárně biologických metod potvrdily shodu se dvěma druhy hub rodu *Penicillium*, a to konkrétně *P. corylophilum* a *P. citrinum*. Extrakty získané z kultivačních médií neprokázaly žádné baktericidní ani fungicidní účinky. V extraktu pocházejícím z *Penicillium citrinum* byl potvrzen výskyt látek lovastatin a citrinin.

Klíčová slova: včela medonosná (*Apis mellifera*), mikroorganismy, plástový pyl, PCR metoda, *Penicillium*

Abstract

As part of this thesis, microorganisms from honeycomb pollen of bees were isolated and two were selected to analyze their biological activity. Literary research focuses on the function of bee castes and the development of the bee community. It also describes the food of bees microbiome and hive microorganisms associated with it. The practical part of the thesis is focused on the self-cultivation of microorganisms, their determination by 16S rRNA and isolation of biologically active substances produced by the analyzed microorganisms. The results obtained from molecular biological methods confirmed compliance with two types of fungi of the genus *Penicillium*, specifically *P. corylophilum* and *P. citrinum*. Extracts obtained from culture media showed no bactericid or fungicid effects. The presence of lovastatin and citrinin has been confirmed in the extract originating in *Penicillium citrinum*.

Keywords: honey bee (*Apis mellifera*), microorganisms, honeycomb pollen, PCR method, *Penicillium*

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Ing. Petru Tejmlovi, Ph.D. za odborné vedení a podporu při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Karlu Benešovi, Ph.D. jako konzultantovi a všem laboratorním pracovníkům za pomoc a možnost využívat laboratorní prostory při zpracovávání výsledků.

Obsah

Úvod.....	8
1. Literární přehled.....	9
1.1 Včelstvo.....	9
1.1.1 Kasty včel.....	9
1.1.2 Vývoj včelího společenstva.....	11
1.2 Včelí potrava	12
1.2.1 Nektar a medovice.....	13
1.2.2 Pyl	14
1.3 Včelí mikroorganismy	15
1.3.1 Včelí mikrobiom	16
1.3.2 Úlové mikroorganismy.....	18
2. Cíl práce	19
3. Materiál a metodika.....	20
3.1 Materiál.....	20
3.2 Metodika.....	21
3.2.1 Izolace a kultivace mikroorganismů	21
3.2.2 Izolace biologicky aktivních látek produkovaných izolovanými mikroorganismy	22
3.2.3 Identifikace izolovaných biologicky aktivních látek	23
3.2.4 Ověření biologické aktivity extrahovaných metabolitů	24
3.2.5 Identifikace mikroorganismů	24
4. Výsledky a diskuse.....	28
5.1 Izolované mikroorganismy	28
5.2 Identifikace izolovaných biologicky aktivních látek.....	32
5.3 Ověření biologické aktivity extrahovaných metabolitů	33
Závěr	35

Seznam použité literatury.....	37
Seznam obrázků	42
Seznam tabulek	43
Seznam použitých zkratk.....	44

Úvod

Chov včel lidmi je datován již do starověku, v Evropě pak k velkému rozvoji včelařství docházelo od středověku. I přes dlouhou interakci člověka a včel v současnosti existuje široce neprobádaný vztah včel k mikroorganismům, které se běžně v úlu vyskytují, ať už jako patogenní, komenzální nebo symbiotické mikroorganismy. Se vzrůstajícím poznáním zejména stoupá význam symbiotických mikroorganismů.

Aktuální výsledky výzkumu poměrně dobře popisují mikroorganismy (zejména bakterie), které se vyskytují v trávicí soustavě včel a s ní souvisejícími žlázami (zejména hltanové žlázy). Zjištění studií úlových mikroorganismů naznačují, že byť evropská včela medonosná (*Apis mellifera*) cílenou „kultivací“ mikroorganismů (zejména hub a kvasinek) v úlu neprovádí (resp. do dnešní doby není popsána), tak i přesto se ve včelích zásobách (resp. produktech využitelnými lidmi – plástovém pylu a medu) nachází velké množství různorodých mikroorganismů. Detailní popis interakce včel s většinou mikroorganismů ovšem chybí.

Dle předpokladů většiny prací je důležitá nejen zootechnická péče o vlastní včelstvo, ale důraz je kladen i na podporu rozvoje nepatogenních mikroorganismů, které se běžně v úlovém prostoru nachází. Tato podpora je většinou charakterizována jako udržení různorodosti včelí pastvy (a to zejména pylu a nektaru), ale i snižování vlivu vnějších xenobiotik (např. fungicidy), které pochází jak ze zemědělské činnosti, tak i činnosti malopěstitelů. Aktuální úroveň poznání pak popisuje hlavně negativní vliv agrochemikálií jak na samotný fyziologický stav včelstva, tak i prospěšné mikroorganismy.

Cílem práce bylo provést izolaci a kultivaci vybraných mikroorganismů nacházejících se v plástovém pylu a provést jejich druhové určení pomocí molekulárně biologických metod.

1. Literární přehled

1.1 Včelstvo

Stále častěji se objevuje názor, že včelstvo je komplexním organismem. Kromě rozdělení na jednotlivé kasty s přesně danými funkcemi (Veselý et al., 2013) lze ho chápat jako superorganismus. Dle Tautze (2009) právě tento superorganismus má specifické vlastnosti, protože je tvořený velkým množstvím mnohobuněčných organismů (včel), které spolu kooperují a uhynutí jednoho jedince (dle okolních podmínek, dělnice nebo trubce) významně fungování včelstva neovlivní. Dále zmiňuje, že superorganismus včelstva je přizpůsobivé komplexní společenství, které se skládá z tisíců jedinců, kteří jsou neustále aktivní a při svých činnostech reagují na okolní prostředí aktivity dalších jedinců v úle.

Obdobnou myšlenku charakterizovali Moritz a Fuchs (1998), kteří včelstvo popsali jako mnohobuněčný organismus, ve kterém neplodné dělnice mají srovnatelnou funkci jako somatické buňky se složitými a komplexními interakcemi. Tyto interakce jsou částečně kontrolovány hierarchickými signály (feromony) využívanými pro celkové informování včelstva.

1.1.1 Kasty včel

Včela medonosná (*Apis mellifera*) patří do skupiny eusociálního hmyzu. Tento hmyz se vyznačuje určitými vlastnostmi, které vedou k sociálnímu způsobu života a společnému fungování několika tisíc jedinců, z nichž má každý (resp. každá skupina) přesně specifickou úlohu. Celé společenství je stálé (nezimuje jen královna jako např. u vos), dospělí jedinci se starají o mladší vývojová stádia (larvy, pupy – kukly), v úle žije několik generací včel, jedinci ve společenství jsou rozdělení na neplodnou (dělnice) a plodnou kastu (královna, trubci). Všichni jedinci pak pracují na přežití celého superorganismu či kolonie a zároveň samotný jedinec bez ostatních není schopný přežít (Mortensen et al., 2013).

Z pohledu rozvoje včelstva a množství jedinců, kteří kolonii obývají je nejvýznamnější včelou matka. Jedná se o pohlavně dospělou samici s plně vyvinutými pohlavními orgány a pohlavními žlázami, které produkují vajíčka, aby vytvořila novou generaci včel. Vylučuje také feromon, který udržuje včelstvo pospolu (Gillespie, 2018).

Její vývojový cyklus trvá 16 dní (3 dny vajíčko, 9 dní larva a 3 dny kukla). Po celý larvální vývoj je krmena mateří kašičkou. Ta se skládá cca z 60 % z vody, z 13 % z bílkovin, z 11 % z jednoduchých cukrů dále z malého množství vit C a různých stopových minerálů a enzymů. Rozdíl mezi dělnicí a matkou je právě ve výživě v larválním období (Baer, 2018).

Další a zároveň nejpočetnější kastou jsou dělnice. Dělnice jsou pohlavně nevyvinutými samicemi. Jejich tělo obsahuje vaječníky, ale oproti matce jsou přibližně 10x menší a zároveň jejich pohlavní ústrojí neumožňuje plnohodnotné páření s trubci a zároveň znemožňuje uložení spermií (chybějící spermatéka). Jejich úkol v úlu je zajišťovat fungování včelstva, kromě rozmnožování (Mcgregor, 2017).

Vývoj dělnice trvá 21 dní (3 dny vajíčko, 10 dní larva a 8 dní kukla). V larválním stadiu jsou krmeny mateří kašičkou s přídavkem pylu a medu. Fyziologicky jsou uzpůsobeny na práci v úlu a mimo úl. Mají delší jazýček a velké medné váčky, na třetím páru končetin pylové koše pro přenos pylu. Mohou vytvářet mateří kašičku z hltanových žláz. Dále mají čtyři sady voskových žláz, umístěné uvnitř posledních čtyř ventrálních segmentů břicha a mají i žihadlo. Druh práce, kterou dělnice vykonává, do značné míry závisí na jejím věku. První tři týdny jejího dospělého života je v úlu a vykonává různé funkce, po třetím týdnu života se ze včely stává tzv. létavka a zajišťuje úl zevně, přínosem nektaru, vody, pylu a medovice (Adjare, 1990).

Dělnice má povinnosti v úle, nejdříve jako uklízečka (od vykuklení do 3. dne věku), kdy čistí plástové buňky. Další funkci má jako krmička (od 3. do 6. dne věku) kdy krmí starší plod a pečuje o matku. Následuje funkce kojčky (od 6. do 12. dne věku) to pečuje o matku a mladší plod. Dále je stavitelka (od 12. do 18. dne věku) to staví pláty. Pak je strážkyně česna (od 18. do 21. dne věku) (Morrison, 2014).

Kastou, která zajišťuje rozšiřování genetické informace včelstva, je matka oplodněná díky trubcům. Jedná se o haploidní samce, tj. jedince s poloviční sadou chromozomů. Když mladá matka má být oplozena, letí na tzv. snubní prolet a trubci s ní. Po spáření s matkou hynou, neboť se jejich kopulační orgán vytrhne. S matkou se spáří 10 až 30 trubců během proletu (Bentzien, 2008).

Vývoj u trubců trvá 24 dní (3 dny vajíčko, 14 dní larva a 7 dní kukla). Po vylíhnutí se zdržují v úlu, kde jim cca 14 dní dozrávají spermie. V úlu žijí od dubna do září, kde zahřívají plod a čekají na snubní prolet mladé matky (Czekońska a Tofilski, 2020).

1.1.2 Vývoj včelího společenstva

Veškerý vývoj včelstva závisí na přírodních podmínkách, neboť včely jsou odkázány na rostliny, které jim poskytují jejich přirozenou potravu. Včelař tedy nemůže včelstva ošetřovat mechanicky, či podle předem daného modelu chovu. Řídí se tedy rozkvětem vůdčích rostlin. Včelařský rok začíná podletím, podzimem, zimou, předjařím, jarem, časným létem a plným létem (Veselý et al., 2013).

Podletí – toto období charakterizují „žitné žně“, neboť hlavní plodinou je žito seté. Nyní se líhnou dlouhověké včely, které se budou starat o první jarní generaci. Včely by měly mít zimní zásoby už zpracované a uložené v plástvi. Vedle cukerných zásob mají včely v plástu uložený i dostatek pylových zásob, díky nim si vytvoří na zadečku tukové těleso, které jim umožní přežít zimní období. Včelař začíná s léčením včelstev proti roztoči *Varroa destructor* (Solčanský, 2017).

Podzim – je nejkratší období, v tuto dobu léčíme včelstva proti roztoči *Varroa destructor*. Včelař kontroluje stav úlu, sílu včelstva a zásoby medu, které by měly být minimálně 15 kg na přezimování (Cramp, 2016).

Zima – je období, kdy je vegetační klid. Teplota klesla dlouhodobě pod 10 °C, listy dřevin opadaly a včely v úlu začaly tvořit tzv. zimní chomáč. Jedná se o kompaktní masu včel, kdy včely vibrací svalů a křídel zvyšují teplotu a zahřívají plod. V tomto období by měly mít klid, neboť rušením včel se zvyšuje i příjem potravy a včely by mohly vyhladovět (Morrison, 2014).

Předjaří – jeho počátek se vyznačuje rozkvětem olše lepkavé. V teplejších dnech včely hromadně vylétají z úlu, aby si vyprázdnily výkalový vak. Pokud z úlu vylétají včely malátně či jednotlivě, může včelstvo být hladové. Jelikož se začínají líhnout nové včely, měl by včelař v teplejších dnech provést prohlídku včelstva. Při prohlídce zkontrolovat stav zásob, přítomnost matky, celkový stav plástů a sílu včelstva (Veselý et al., 2013).

Jaro – začínají rozkvétat třešně, včelstvo začíná sílit. Z jednoho plástu s plodem se vylíhnou mladušky a ty obsednou zhruba plochu tří plástů. U včel se začíná projevovat stavební pud. Toho včelař využívá a obnovuje včelí plásty, aby předešel nemocem včelstev (Gritsch, 2014).

Časné léto – je období, kdy včelstvo rychle roste, proto vyžaduje prostor v úlu. Pokud matka nemá kam klást vajíčka a dělnice nemají kam ukládat nektar, začne v úlu panovat tzv. rojová nálada. Včelař proto přidává další nástavky a vytváří dostatečný

prostor (Luke, 2020). Hlavní kvetoucí plodinou v tomto období je trnovník akát (Veselý et al., 2013).

Plné léto – začíná letním slunovratem, který je 21. června. Rojová nálada ustupuje, neboť výkon kladení matky je menší. Včelstva dosahují největšího vrcholu ve vývoji, jejich počet v úlu je mezi 20000 až 50000. V tuto dobu včelař odebírá včelám med, nastává medobraní. Pro včely je hlavní sezóna sběru medovice. Nektaru je v přírodě méně a proto včely začínají slídit a loupit. Objevuje se u nich i shromažďovací pud, v tomto období kvetou lípy (Bentzien, 2008).

1.2 Včelí potrava

Včely jsou vysoce sociální hmyz, který se neustále dělí o potravu ve svém společenství. Díky sběru a předávání potravy jsou včely vysoce náchylné na přenos parazitů a patogenů (Anderson et al., 2011).

Trávicí trakt včely slouží k přijímání, přenášení a zpracování potravy a společně s vyměšovacími ústrojími rovněž i k odstraňování nestrávených zbytků potravy z těla. Jakož i k jejich hromadění v době, kdy nemůže včela z úlu vylétat (Veselý et al., 2013).

Trávicí ústrojí můžeme rozdělit na tři části. První část je tvořena hltanem, jícnem a medným váčkem, druhou část tvoří žaludek a třetí tenké střevo a konečník neboli výkalový vak (Rada et al., 2009).

Z evolučního hlediska původní druhy blanokřídlého hmyzu nejspíše konzumovaly jiné druhy hmyzu, tj. potravu bohatou na bílkoviny a tuky. Evolučním vývojem včel pak došlo ke specializaci na rostlinné šťávy a pyl, které představují pro včely významný zdroj energie a bílkovin (Fejková, 2018).

Nektar a pyl sbíraný včelami se dále zpracovává a zraje v úlu prostřednictvím činností mikrobů a enzymů získaných od včel (Lee et al., 2015).

Přizpůsobení včely medonosné vychází ze vzájemného vztahu s entomogamními rostlinami (a především těch, jejichž květenství je dostupné včelám). Tomu odpovídá schopnost těchto rostlin produkovat za vhodných vnějších podmínek (teplota a vlhkost) nektar, který slouží jako atraktant pro hmyz, který následně provede opylení květů sběrem pylu z tyčinek a přenosem pylu z jedné rostliny na bliznu rostliny jiné (Hung et al., 2018).

1.2.1 Nektar a medovice

Nektar se začíná tvořit už v listech rostlin. Rostlina čerpá oxid uhličitý a vodu, produkuje cukr a využívá k tomu energii ze slunce. Tomuto procesu se říká fotosyntéza. Jednoduché sacharidy protékají rostlinou a vyživují ji. Kořeny, stonky, listy a plody používají tuto zásobu cukru k růstu. Přebytečný sacharidový roztok se vylučuje v nektariích květin, kde ji mohou pít včely a další opylovači, jako jsou motýli a kolibříci (Sartell, 2017).

Včely sbírají potravu (nektar, medovici, pyl) i když nemají hlad. V tzv. období kdy je snůška, vyhledávají potravu hlavně díky čichu a v případě nektaru i pomocí zraku, protože entomofilní rostliny produkující nektar mají většinou barevné okvětní lístky. Je-li snůška bohatá létavka pomocí včelích tanečků informuje o místě, kde se snůška nachází (Vorlová, 2002).

Nektar je produkován sekrečními žlázami květin zvanými nektarií. Květinový nektar se skládá hlavně z vody s vysokou koncentrací cukrů – hlavně sacharózy, glukózy a fruktózy. Nektar také obsahuje malé množství aminokyselin, organických kyselin, proteinů, lipidů, antioxidantů, minerálů a enzymů. Včely sají nektar z květů svými dlouhými trubkovitými jazyky. Během tohoto procesu jsou včely pokryty pylem. Včela sbírá pouze nektar a pyl květin stejného druhu, této vlastnosti se říká florokonzistentnost. Je tak zajištěno, že shromážděný nektar bude pouze z jednoho druhu a pyl na včele opylí stejné druhy rostlin (Brown, 2015).

Medovice je cukernatý výměšek, který vylučuje drobný hmyz, ten se živí mízou sítkovic, což je složka vodivého pletiva krytosemenných rostlin. Mezi nejvýznamnější producenty medovice patří mšice, červi a mery (Haragsim, 2005).

Včela sebere nektar či medovici do úst, na která navazuje hltan a jícen procházející hrudí. Jícen se pak v zadečku rozšiřuje v medný váček, který je od žaludku oddělen hruškovitým ventilem zvaným česlo. Díky němu může včela použít medný váček jako přepravní nádrž pro nektar či medovici (Titěra, 2013).

V medném váčku se pomocí výměšků žláz nektar nebo medovice zahušťuje v řídký med. Jedna včela ovšem není schopna přidat dostatečné množství výměškových žláz, aby byl med dostatečně hustý. Proto v úlu nektar či medovici vyvrhne na sosák a předává ho další včele. Tento proces se opakuje ještě několikrát, než je nektar či medovice dostatečně hustý (Veselý et al., 2013).

Nektar se přeměňuje na med procesem zrání. Nejvýznamnějším rysem tohoto procesu je značná ztráta vody, která se děje ve dvou stádiích: počáteční odpařování

prováděné včelou, což snižuje obsah vody na 40 až 50 % a konečné odpařování, které se provádí v buňce plástu, čímž se získá produkt s 15 až 18% vody (Collison, 2015).

1.2.2 Pyl

Pylové zrna jsou pohlavní buňky (samčích) kvetoucích rostlin. Ty se vytvářejí v květech v prašnicích, které jsou na konci nitkovitých tyčinek. Po dozrání prašníky prasknou a pylová zrna se dostanou na povrch tyčinek, odtud se přenášení na pestíky samičích květů pomocí vzduchu, vody a nejrůznějších živočichů, především hmyzu (Titěra, 2013).

Ke sběru pylových zrn včelám slouží hlavně nohy, které jsou vybaveny několika orgány – kartáčky, hřebeny, tlačítka a košíčky. V nich sebraný pyl hrudkuje na tzv. pylovou rousku, tu pak nosí na třetí páru nohy do úlu (Haragsim, 2004).

Včely sbírají pyl několika způsoby, Aktivní sběr pylu, kdy včely účelně přijímají pyl přímo z prašníků nebo jiných květinových povrchů a tvoří v košíčku tzv. pylovou rousku. Anebo pasivní sběr, kdy včely sají nektar a pyl se zachytí na jejich těle, které pak očistí. Společně s pylem včely sbírají i spory různých hub (Parish et al., 2020).

V úlu jsou obě pylové rousky dané do prázdné buňky, kde je další dělnice natlačí hlavou a kusadly do buňky tak, aby byl vytlačen vzduch. Začíná fermentace a vznik bakterií mléčného kvašení. Dělnice naplňují buňku ze dvou třetin udusaným pylem. Následně buňku zakonzervují medem a výměškem ze svých žláz (Titěra, 2013).

Symbionty mléčného kvašení se zapojují do udržování bezpečného mikrobiologického stavu ve včelstvu, tím že inhibují různé mykotické kontaminace včelího chlebu. Včely pak krmí plod takto zakonzervovaným pylem (Janashia et al., 2018).

Na fermentaci plástového pylu se podílejí také různé plísně, nejčastěji z rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* a *Cladosporium*. Díky těmto houbám se přeměňuje plástový pyl na tzv. včelí chléb, ten má příznivou potravní hodnotu pro larvy včely *Apis mellifera* (Yoder et al., 2013). Včelí chléb je směs pylových rousek, medu a bakterií mléčného kvašení (Bakour et al., 2019).

Pyl je prakticky hlavním zdrojem bílkovin, aminokyselin, lipidů, škrobu, sterolů, vitamínů a minerálů. Je také důležitý na úrovni včelstva, protože umožňuje produkci kašičky mladými dělnicemi, které jí používají jako krmivo pro larvy, matku, trubce a starší dělnice. Příмым důsledkem nedostatku výživy (nedostatek pylu) je pokles populace včelstva a pravděpodobně nedostatečné zdraví jedinců, což by mohlo také

ovlivnit práh rezistence včel vůči jiným stresům jako např.: patogeny nebo pesticidy (Pasquale et al., 2013). Podle Annoscia et al. (2017), je pyl nezbytnou součástí včelí potravy v boji proti ektoparazitům, zvláště pak s roztočem *Varroa destructor*.

1.3 Včelí mikroorganismy

Mikroorganismus a mikrobiom je skupina nejrůznějších jednoduchých forem života, které obecně zahrnují bakterie, archea, řasy, houby, prvoky a viry. Nejvýznamnější skupinou mikroorganismů u včel jsou hlavně bakterie, viry a houby, ty mohou být jednobuněčné (kvasinky) nebo mnohobuněčné (vláknité houby). Mnohobuněčné houby tvoří buňky válcovitého tvaru, ty na sebe navazují a tvoří vláknitá vlákna neboli hyfy, ty mohou nést výtrusy. Jestliže se namnoží dostatek hyf vytvoří se neurčitá hmota zvaná mycelium (Pelczar a Pelczar, 2020).

Určité vztahy mezi mikroorganismy lze definovat jako symbiotické, v nezúženém smyslu je to označení vztahů mezi organismy, v nichž jedinci určitých druhů žijí ve společenství s jedinci jiných druhů. Tyto vztahy lze rozdělit z hlediska prostorových vztahů na ektosymbiózu (na buňkách) a na endosymbiózu (uvnitř buněk). Nebo z hlediska působení mikroorganismů na hostitele, určujeme tedy stupeň tělesně blízkých vztahů mezi organismy, rovnováhy výhod a míru závislosti (Rosypal et al, 1981).

- Neutralismus – organismy se navzájem neovlivňují,
- Komenzalismus – jeden organismus získává a druhý není ovlivňován,
- Mutualismus – oba organismy získávají, oboustranně pozitivní vztah,
- Soutěžní – boj o živiny a prostor,
- Amenzalismus – metabolity jednoho organismu inhibují rozvoj jiného organismu,
- Parazitismus – jeden organismus cizopasí na druhém,
- Predace – jeden organismus požírá druhý (Rosypal et al., 1981).

Vědci zjistili, že ve střevě včely žije symbiotická bakterie *Snodgrassella alvi*, ta včelám neškodí a ve větší míře působí negativně na roztoče *Varroa destructor*, ten v posledních letech působí značné ztráty včel. *Varroa destructor* se živí hemolymfou včel a je také přenašečem nejrůznějších virů. Nelze však tvrdit, že léčení včel pomocí *S. alvi* se může účinně provádět plošně, protože záleží i na stanovišti

včelstva a s ním i spojenou rozmanitost pylu. Ten je velice důležitý z hlediska odolnosti včelstva (Leonard et al., 2020).

Symbiózu mezi včelou a mikroorganismem zaevidovala také skupina entomologů z Brazílie. Konkrétně se jednalo o vztah mezi brazilskou včelkou *Scaptotrigona depilis* a houbou rodu *Monascus*. Tato houba působí příznivě na plod včel a míra přežití včel v laboratorních podmínkách s touto houbou je 76 %. Zatím co včel bez této houby přežilo pouze 8 %. Jelikož houby tohoto druhu vylučují chemikálie s antimikrobiálními účinky (Menezes et al., 2015).

1.3.1 Včelí mikrobiom

Ve střevě včely medonosné žijí symbiotické bakterie, které jsou sdíleny a rozšiřovány mezi včelami a včelstvy. Tyto bakterie nazýváme jako mikrobiom, proto mikrobiom lze chápat jako společenství mikroorganismů, které žijí uvnitř těl jiných organismů na povrchu sliznic. Mikrobiom je důležitý z hlediska výživy a imunity včel. Jelikož včelí mikrobiom může chránit včely před patogeny vlivy či parazity, zkoumají se různé probiotické látky k ochraně včel (Fraindová, 2017). Podle Erbana (2020) může u včel docházet také díky symbiotickým bakteriím k vzájemnému působení s různými pesticidy.

Mikroorganismy ve střevě včel zanikají, neboť včely jsou vystaveny různým abiotickým a biotickým stresovým faktorům. Používání antibiotik jako terapeutických látek je v EU zakázáno, a tak se vědci snaží aplikovat na včely „probiotický komplex“ pro podporu jejich imunity. Většina mikroorganismů z „probiotického komplexu“ pochází z kmenů *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Bacillus*. Tyto bakterie jsou izolovány z plodin či střev včel. Přestože celkové výsledky ukazují příznivý účinek při použitých mikrobiálních kmenů u včel, nelze dojít k závěru že tento „probiotický komplex“ bude pozitivně působit plošně (Alberoni et al., 2016).

Díky netradičnímu přístupu a sekvenování úseků nukleových kyselin, metodou NGS (Next Generation Sequencing) popřípadě celých genomů, výrazně zlepšuje schopnost identifikovat mikrobiální komunity u včel. Důležité jsou ovšem i kultivační metody, které umožňují izolovat sledované bakterie pro další studium nebo identifikaci genů. Podmínky kultivace pro bakterie z trávicího traktu včel vyžadují nízký obsah kyslíku a vyšší teploty (Engel et al., 2013).

Ve střevě včely žije asi 50 miliard bakterií, kdy jejich vzájemné zastoupení určuje kondici včely. Během vývoje včely (vajíčko, larva, kukla, dospělec) se zastoupení

bakterií mění. V prvních dnech vývoje ve střevě převažují tzv. gamaproteobakterie. Od pátého a šestého dne vývoje dojde ke změně a u larvy se namnoží počet laktobacilů. Když se včela zakuklí, začne se její trávicí trakt přetvářet na podobu jakou má dospělec. V závislosti na této změně se začnou množit gamaproteobakterie. Když se včela prokouše z plástu ven, tak se během týdne v jejím traktu pomnoží opět laktobacily a gammaproteobakteriemi v poměru přibližně 1:9. V tomto období má včela nejvíce bakterií, které postupně zanikají (Sekaninová, 2015).

Hlavními druhy bakterií zažívacího traktu jsou spíše anaerobní než aerobní bakterie, kde u včely byly nalezeny koliformní bakterie, enterokoky, stafylokoky, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, mikroskopické houby a kvasinky. Většinu těchto bakterií včela získává z mikroflóry zažívacího traktu, která se utváří z pylu, prachu a vzduchu, proto mikroflóra gastrointestinálního traktu je u letních a zimních včel statisticky odlišná (Kacániová et al., 2009).

Mikroflóra včel létavek, tedy nejstarších včel nosících do úlu pyl, nektar nebo vodu je velmi pestrá, s vysokým obsahem laktobacilů, zejména z květů (Havlík, 2015).

Mimořádně důležitou funkci tvoří střevní mikroorganismy a mikroorganismy v plástovém pylu. Hlavními druhy MO ve střevě jsou *Enterobacteriaceae*, *Rickettsiaceae*, *Spiroplasmataceae* a *Bacillaceae*. V plástovém pylu určují specifičnost MO z rodu *Neisseriaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Acetobacteraceae* a *Lactobacillaceae*. Přičemž mezi včelím střevem a plástovým pylem je sdíleno pouze 7 % skupin MO na úrovni druhů (Saraiva et al., 2015).

Kondici a zdravotní stav včel ovlivňuje mnoho enviromentálních vlivů (stanoviště, podnebí, snůška), nemocí (varroóza, mor včelího plodu a virózy) a v neposlední řadě i řada lidských aktivit (pesticidy – insekticidy, špatné ošetření včel). Včely nemají adaptivní (získanou) imunitu, mají tzv. sociální imunitu a díky různým mechanismům (hygienické chování, zahřívání plodu, sběr propolisu, kálení a úhyn včel mimo úl) jsou schopny potlačit tlak patogenů ve společenství (Daníhlík a Petřivalský, 2015).

1.3.2 Úlové mikroorganismy

Stejně jako včelí mikrobiom je významné i úlové mikroklíma, které včely vytvářejí, když přinášejí sladinu, pyl, medovici, pryskyřici, vodu a další suroviny do úlu, společně s těmito surovinami nosí i mikroorganismy z okolí. Proto lze úlové mikroorganismy chápat jako rozšířený organismus, v kterém symbiotická mikrobiální společenství napomáhají včelám ve výživě a chrání je i před patogeny (Anderson et al., 2011).

Mikroorganismy mohou být do úlu i zavlečeny, tehdy se většinou jedná o patogeny. Nejčastější přenašeč patogenů v úle je parazitický roztoč *Varroa destructor*. Ten sají hemolymfu včel a přenáší viry. Jeden z prvních známých virů je virus deformovaných křídel (DWV – Deformed Wing Virus). Dále pak virus akutní paralýzy včel, virus pytlíčkovitého plodu, virus černání matečnicků, kašmírský virus a další. Všechny tyto viry patří dle taxonomického zařazení do řádu *Picornavirales*. Nemají lipoproteinový obal a proto jsou velmi citlivé k dezinfekci fyzikální a zvláště pak k chemické (Holejšovský, 2020).

V úlu může být i přítomná bakterie *Paenibacillus larvae* (původce včelího moru), tato bakterie napadá včelí plod (vyznačuje se mezerovitostí plodu) a tak včelstvo hyne, neboť se nelíhne nová generace včel. Pokud se odhalí v úlu v předklinickém stadiu, lze ještě včelstvo „vyléčit“ většinou díky eliminování negativních vlivů (léčení na varroázu, nové stavební dílo) a zesílení včelstva (výměna matky). Pokud ovšem včelstvo uhynie, musí se neprodleně odstranit veškeré materiály, které nejdou dezinfikovat. Ty se pak později pálí, protože spóry bakterie *Paenibacillus larvae* jsou velice odolné a nakažlivé (Štipl, 2015).

2. Cíl práce

Cílem práce bylo izolovat přítomné biologicky aktivní mikroorganismy z plástového pylu, sledovat a vyhodnotit jejich růst a prokázat případnou přítomnost biologicky aktivních látek (enzymů apod.) se zřetelem na možnou antimykotickou či antibakteriální aktivitu.

3. Materiál a metodika

3.1 Materiál

Analyzované vzorky plástového pylu a medu, které byly do práce zařazeny dle následných zjištění v průběhu prováděných analýz, se odebíraly z vybraných včelstev v jižních Čechách.

Včelstva byla umístěna na okraji obce Kamenný Malíkov (okres Jindřichův Hradec) v otevřené včelnici. Chovaným plemen byla včela medonosná kraňská (*Apis mellifera carnica*) blíže nespécifikovaného ekotypu.

Odběry materiálu pro kultivaci (plástový pyl) byly provedeny v měsíci dubnu 2019. Odběry vzorků medu byly provedeny v měsících červenec, srpen a září. Výběr včelstev byl proveden dle počtu obsazených rámků celkem z 5 včelstev (měsíc duben a následné odběry).

Na sledovaném stanovišti jsou včely chovány v nástavkových (11 rámkové nástavky) úlech s rámkovou mírou 39x24 cm. Doplnění zásob probíhá po ukončení květu, pro uvedené stanoviště poslední významné včelařské plodiny, lípy malolisté (*Tilia cordata*). V roce 2018 to bylo v měsíci červenci. Tou dobou je včelám podáván cukerný, sacharózový sirup (v první dávce 1:1, v dalších dávkách pak 2:1) ad libitum do celkové průměrné dávky na včelstvo 15-20 kg. Po doplnění zásob v měsíci září došlo k léčbě včelstva a snížení infestace roztočem *Varroa destructor*. Dle metodik uvedených v návodech k použití jednotlivých přípravků byla v měsíci září provedena kontaktní aplikace gabonovými pásky (Gabon PF 90, účinná látka tau-fluvalinát), při poklesu denních teplot pak byla provedena fumigace přípravku Varidol 125 mg/ml a shodný přípravek byl v prosinci aplikován certifikovaným vyvíječem aerosolu. Z rozborů zimní měli pak na stanovišti byl zjištěn průměrný spád 2 kleštici na jedno včelstvo, což nevyžadovalo žádné jarní ošetření.

Rozšiřování na jaře pak bylo prováděno dle květu významných včelařských plodin. První rozšíření včelstev celým nástavkem bylo provedeno v první polovině dubna (po odebrání vzorků), před květem ovocných stromů. Další rozšíření pak následovalo před květem řepky ozimé. Po odkvětu řepky (začátek června) došlo k prvnímu vytočení medu. Druhé vytočení bylo provedeno jen u některých včelstev, květ lip byl omezen vnějšími podmínkami (nedostatečné množství srážek).

3.2 Metodika

3.2.1 Izolace a kultivace mikroorganismů

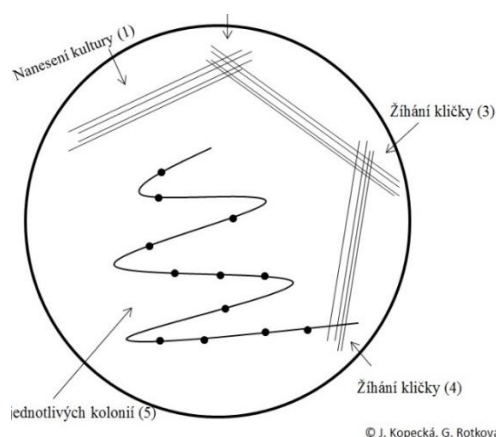
Vzorky plástového pylu a medu (uloženého v plástech) byly odebrané sterilními nástroji (špachtle, pinzety, sterilizace 70 % ethanolem) a umístěny do plastových, sterilních vzorkovnic. Před zpracováním byly uloženy v chladničce při teplotě 4 °C z důvodu zpomalení množení možných kontaminujících mikroorganismů, které se na vzorky mohly z vnějšího prostředí dostat v průběhu odběru.

Ke kultivaci byly použity následující pevná média: PDA (potato-dextrose agar, VWR 84651.0500P, navážka 39 g.l⁻¹ dle výrobce, pH 5,6), SDA (saboraoud-dextrose agar, 40 g.l⁻¹ dextrózy, 10 g.l⁻¹ bakteriologického peptonu, 20 g.l⁻¹ agaru, pH 5,6), MY50G (ATCC 2093) (glukóza 500 g.l⁻¹, yeast extract 2,5 g.l⁻¹, malt extract 10 g.l⁻¹, agar 10 g.l⁻¹, pH 4) a modifikované médium MY50G – GLU 30 (glukóza 300 g.l⁻¹, yeast extract 30 g.l⁻¹, malt extract 30 g.l⁻¹, agar 20 g.l⁻¹, pH 4,5). K úpravě pH byl použit roztok 1M NaOH a 1M HCl.

Sterilizace médií byla prováděna v parním autoklávu po dobu 15 minut při 121 °C. Kultivace izolátů probíhala v laboratorním inkubátoru Binder BD 56 při teplotě 28 °C. Doba kultivace se lišila dle růstové schopnosti izolátu, minimální doba kultivace byla 5 dní.

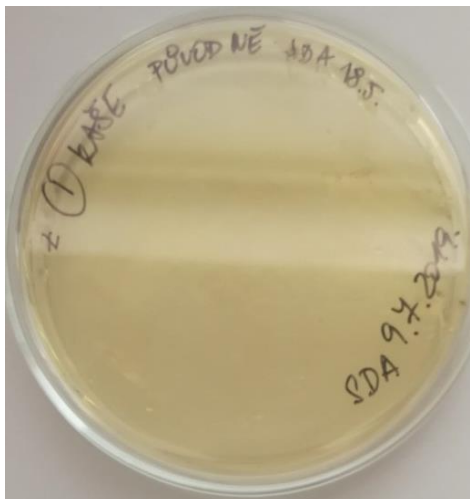
Vlastní práce probíhala ve vertikálním laminárním boxu (biohazard 2 s uzavřeným oběhem vzduchu). Z odebraných plástů byly náhodně vybrány vzorky pylu či medu pomocí mikrobiologické kličky a materiál byl inokulován křížovým roztěrem (podle obrázku 1) na plochu média.

Obrázek 1- Křížový roztěr (Kopecká a Rotková, 2017)



Petriho miska s mediem byla popsána (dle obrázku 2) základními údaji, pro pozdější identifikaci.

Obrázek 2- Popis Petriho misky



Vzorky plástového pylu byly očkovány na všechna výše uvedená kultivační média, vzorky medu pouze na média MY50G a GLU 30 z důvodu vyšší selektivity na glukózu bohatých médií, resp. vysokého osmotického tlaku glukózy.

Z prvních médií byla provedena izolace morfologicky odlišných kolonií na shodné médium, kde byl proveden první záchyt a kultura byla dále přeočkovávána, dokud nedošlo k jejímu přečištění a na celé misce rostla jedna, morfologicky shodná kultura. Průměrně bylo třeba použít 5 pasáží k odstranění dalších kontaminantů.

Po získání čistých kultur byly tyto přeočkovány na nové Petriho misky se shodným médiem a dále do zkumavek na šikmé agary, ve kterých byly izoláty uloženy do chladničky (4 °C) pro pozdější možnost přeočkování. V této práci byly vybrány k identifikaci a ověření možné bakteriocidní a fungicidní aktivity dva takto přečištěné izoláty mikroorganismů, které byly izolovány ze získaného biologického materiálu pocházejícího ze sledovaných včelstev v roce 2019.

3.2.2 Izolace biologicky aktivních látek produkovaných izolovanými mikroorganismy

Metabolity produkované izolovanými mikroorganismy byly získány z pevných kultivačních médií uvedených výše. Základní zpracování bylo kvantitativní převedení agaru do laboratorní lahve Duran GL45 o objemu 250 ml. Z předchozích postupů v laboratoři byl k izolaci rovnou použit ethylacetát (VWR Chemicals, 99 % p.a.) v nadbytku (200 ml). Za účelem zvýšení protonizace a zlepšení extrakčního procesu

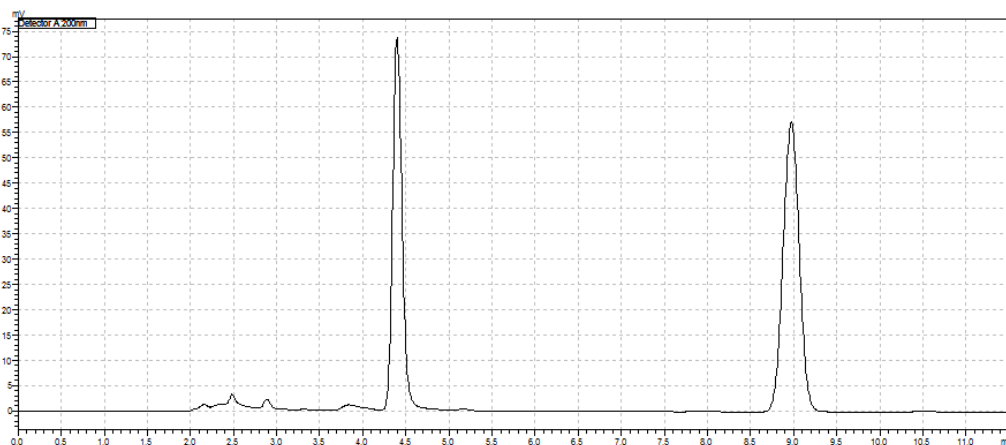
byla směs agaru a rozpouštědla okyselena pomocí 1M H₃PO₄ na pH 2. Extrakce do organického rozpouštědla probíhala po dobu 48 hodin, zpočátku za silného míchání směsi, poté se lahev nechala stát v laboratoři bez přístupu světla. Po dvou dnech byl supernatant převeden do centrifugačních zkumavek a pevné části byly odděleny. Supernatant byl převeden do odparné baňky a pomocí vakuové odparky byl extrakt zakoncentrován (do úplného odpaření rozpouštědla). Extrakt byl poté resuspendován pomocí acetonu (VWR Chemical, HPLC grade) a převeden do 10 ml skleněné vialky pro další použití.

3.2.3 Identifikace izolovaných biologicky aktivních látek

K identifikaci získaných extraktů byla použita HPLC (vysoce účinná kapalinová chromatografie). Z hlediska identifikovaných mikroorganismů (viz část Výsledky a diskuse) byly hledány pouze dvě látky, které by měl daný mikroorganismu produkovat, a to citrinin a lovastatin.

Použitá metoda byla společná pro obě látky. Kolona C18, izokratická eluce s rychlostí průtoku 1 ml.min⁻¹. Mobilní fáze 0,01M H₃PO₄ a acetonitrilu v poměru 45:55 (při poměru 30:70 je možné metodu použít také, ale rozlišení chromatogramu je horší). Detekce obou metabolitů byla při 200 nm a retenční čas lovastatinu byl cca 4,5 minut, resp. 9 minut v případě citrininu. Na přiloženém obrázku 3 je průběh chromatogramu pro standardy obou látek.

Obrázek 3- Chromatogram standardů lovastatinu (retenční čas 4,5 minuta) a citrininu (retenční čas 9 minuta)



První pík znázorňuje lovastatin a druhý pík pak citrinin. Koncentrace standardů byla 0,1 mg.ml⁻¹.

3.2.4 Ověření biologické aktivity extrahovaných metabolitů

Pro ověření baktericidní a fungicidní aktivity získaných extraktů byla použita metoda kultivace testovacích mikroorganismů za přítomnosti známého množství extraktu. Aktivita byla testována na gram negativní bakterii (G-) *E.Coli* (použit byl izolát využívaný pro klonování na Katedře genetiky a zemědělských biotechnologií ZF JU), gram pozitivní bakterii (G+) *Bacillus cereus* a rychle rostoucí, silně sporulující houbě *Mucor spp.* (ze shodného zdroje) k ověření fungicidního účinku.

Pro kultivaci *B. cereus* a *E.Coli* byl použit LB agar (10 g.l⁻¹ pepton, 5 g.l⁻¹ yeast extract, 5 g.l⁻¹ NaCl, 12 g.l⁻¹ agar, pH 7,1), pro kultivaci *Mucor spp.* pak PDA. Kultivační podmínky pro *E.Coli* byly 36 °C a doba kultivace 48 hodin. Teplota kultivace *Mucor spp.* a *B. cereus* byla 28 °C a hodnocení inhibice růstu proběhlo taktéž během 48 hodin od inokulace.

Extrakty byly naneseny v množství 5, 10 a 20 µl na vyseknuté terčíky o průměru 5 mm z filtračního papíru (Whatmann, no. 2). Rozpouštědlo (aceton) se nechalo odpařit (po nanesení se čekalo přibližně 10 minut), a na plně naočkovanou misku (roztěrem 20 µl čerstvě vytvořené buněčné/sporové suspenze) se umístil terčík. Po 24 hodinách (ve výjimečných případech po 48 hodinách při pomalejším růstu mikroorganismu) byla zjištěna růstová schopnost testovaných mikroorganismů. Aktivita izolovaných látek z agaru by se projevila inhibiční zónou v okolí umístěného terčíku.

3.2.5 Identifikace mikroorganismů

Pro identifikaci kmenů vláknitých hub a kvasinek bylo kromě morfologického hodnocení využito i molekulárního přístupu na základě amplifikace a sekvenování specifických úseků DNA. Pro tyto účely jsme zvolili sekvenování ITS regionu.

Izolace DNA z čistých kultur

Kultury hub byly přeneseny do tekutého SDA media v 12 jamkové destičce (2ml/jamka), po 7 dnech byla sterilně odebrána mycelia a byla použita na izolaci DNA, cca 100-200 mg mycelia bylo homogenizováno v tekutém dusíku, vlastní izolace DNA proběhla podle protokolu pro CTAB-PVP.

Izolace DNA pomocí CTAB

Metoda CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) je založena na schopnosti vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný, ale při snížené koncentraci solí vytváří sraženinu. CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA je lze oddělit a získat dostatečně čistou DNA.

K 500 μl roztoku (2 díly CTAB a 1 díl 1 % 2-merkptoethanolu), který předeřtát na 65°C, dále se přidal vzorek, který byl rozdrcen v tekutém dusíku. Nechal se 45 minut inkubovat při 65°C. Během inkubace se každých cca 15 min. lehce promíchal. Následně byl přidán 500 μl směsi fenol–chloroform–IAA (IAA – izoamylalkohol, Isopentylalkohol, 3-metyl-1-butanol, 3-metyl–butan-1-ol) a 10 minut se protřepával tak, aby se vše promíchalo. Potom se centrifugovalo 5 minut při maximální rychlosti a v pokojové teplotě.

Do nových mikrocentrifugačních zkumavek se odpipetovala vodná fáze. Přidalo se 500 μl směsi chloroform:IAA a 10 minut se třepalo a 5 minut centrifovalo při maximální rychlosti a v pokojové teplotě. Opět se přepipetovala vodní fázi do nových mikrocentrifugačních zkumavek. Přidal se isopropanolu, tak 2/3 objemu (přibližně 250 μl) a 2–3x lehce se vše promíchalo. Vzorek se dal na 30 minut do mrazáku (-20 °C). Poté se vzorek centrifugoval 5 minut při 4 °C na maximální rychlost.

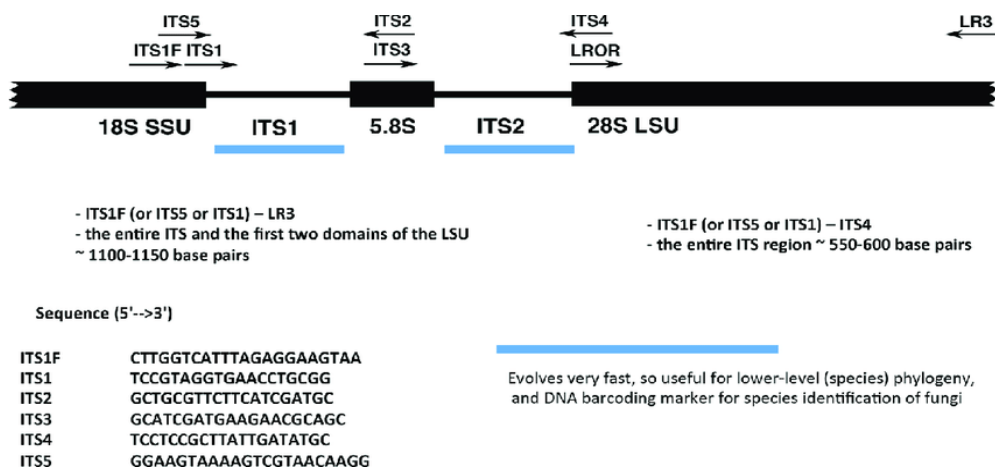
DNA se zachytila na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstranil se supernatant a pelet usušil. Přidalo se 300 μl 1x TE pufr a nechali jsme 30–60 minut inkubovat při 37°C. Potom se přidala 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 600 μl ledového 96 % ethanolu všechno jsme 2–3x lehce promíchali. Vzorky se daly do mrazáku (-20 °C) minimálně na 20 min., maximálně na 12 hodin.

Posléze se vzorky vyndaly z mrazáku a 10 minut se centrifugovalo na maximální rychlost při 4°C. DNA vytvořila pelet na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstranil se supernatant (opatrně pipetou). Přidalo se 400 μl ledového 70 % ethanolu a 2 – 3x se lehce zamíchalo. Centrifugovalo se 2 minuty při maximální rychlosti a v teplotě 4°C. Okamžitě se odstranil všechn supernatant. Vzorky se nechali dobře usušit (cca 10 min.). Podle množství peletu (DNA) se přidalo 20–200 μl 1x TE pufru nebo sterilní vody (ČURN et al., 2019).

Použité primery pro identifikaci mikroorganismů

Na identifikaci vláknitých hub, jako je barcode se oficiálně schvaluje a využívá ITS úsek, (White et. al., 1990). K identifikaci byli použité primery ITS1F a ITS4.

Obrázek 4- Mapa jaderné oblasti ITS s pozicemi primerů a sekvencemi primerů



Černé rámečky na obrázku 4, označují čtecí rámce a čáry spojující rámečky, označují nekódující úseky DNA.

Amplifikace vybraných úseku DNA

Použité primery pro PCR analýzu jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1- Řetězec DNA (počáteční místo replikace DNA)

Název	Sekvence 5'-3'	Publikováno
<u>ITS</u>		
ITS1F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	Gardes and Bruns, 1993 White at al. 1990
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	Gardes and Bruns, 1993 White at al. 1990

PCR analýza

Amplifikace cílových úseků DNA, byla provedena pomocí PPP MasterMixu (TopBio) za podmínek uvedených v tabulce 2:

Tabulka 2- Postup namnožení ITS úseků

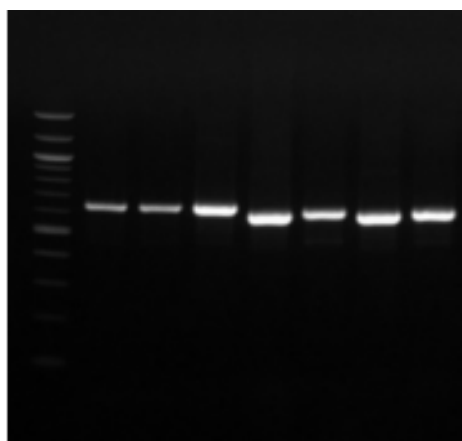
Proces	Čas	Teplota
Počáteční denaturace	5 minut	95 °C
35x	30 sekund	95 °C
	30 sekund	55 °C
	1 minuta	72 °C
Konečná elongace	10 minut	72 °C
	∞	4 °C

Roztok pro PCR reakci měl následující složení: 12,5 μ l MasterMixu, 0,5 μ l forward primeru (10pmol), 0,5 μ l reverse primeru (10pmol), 0,2 μ l BSA, 10,3 μ l PCR H₂O, 1 μ l DNA (50ng).

Produkty z PCR reakce byly separovány na 1 % agarosovém gelu (5 minut při 40V a 1 hodinu a 25 minut při 120V).

Na obrázku 5 je znázorněná amplifikace ITS úseku u vzorků, které byly později zaslány k osekvenování do externí firmy SEQme, s.r.o.

Obrázek 5- Úsek namnoženého ITS úseku analyzovaných vláknitých hub o velikosti cca 600–650 bp



Gel byl obarvený pomocí ethidium bromid a vizualizace probíhala pod UV světlem. Výsledky byly zaznamenány pomocí programu GeneSys.

Sekvenování amplifikovaných fragmentů

PCR reakce s namnoženými fragmenty byla enzymaticky přečištěna, použitím ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent, tento přípravek hydrolyzuje přebytečné primery a nukleidy. Přečištěné vzorky byly osekvenovány pomocí metody dle Sanger v externí firmě SEQme, s.r.o.

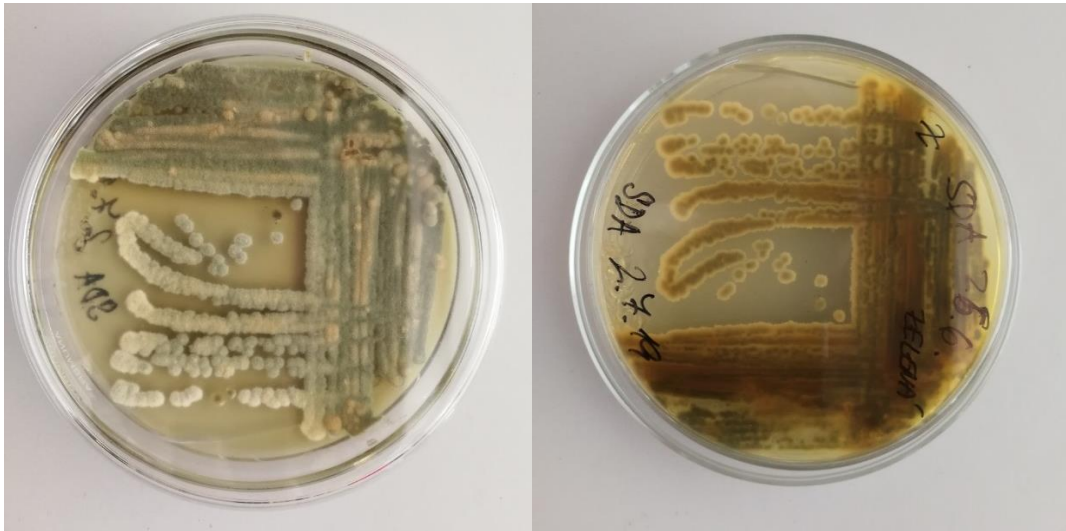
Na základě sekvenčních analýz byly klasifikovány kmeny vláknitých hub porovnáním s dostupnými sekvencemi v databázi BLAST Nucleotide (Basic Alignment Search Tool).

4. Výsledky a diskuse

5.1 Izolované mikroorganismy

Pomocí křížového roztěru byl kultivován a později izolován MO, který byl barvy světlezelené a časem odstín měnil do zelenošedého zbarvení se světlejšími okraji. Tvar kolonií byl okrouhlý a profil zvýšený.

Obrázek 6- Kultivace *Penicillium corylophilum* křížovým roztěrem (vlevo popis Petriho misky)



Na obrázku 6 je vyfotografovaný MO, který byl později osekvenován a identifikován v databázi BLAST jako *Penicillium corylophilum*.

Obrázek 7- Morfologická stavba *Penicillium corylophilum*



Na obrázku 7 je znázorněná standartní morfologická stavba *Penicillium corylophilum*.

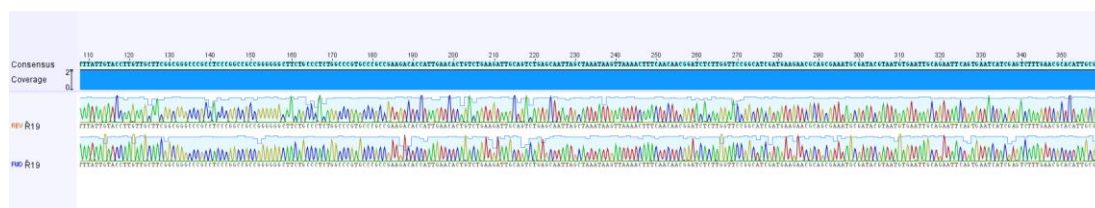
V tabulce 3 je ITS úsek, který jsme získali metodou Sangerového sekvenování, Úsek byl vložen do webového rozhraní BLAST. Porovnáním s databází byla zjištěna 100% shoda se záznamy odpovídajícími *Penicillium corylophilum*.

Tabulka 3- ITS úsek *Penicillium corylophilum*

I	AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT
T	CCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTNCCCACCCATGTTTATTGT
S	ACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCCCGGCCGCCGGGGGGCTTC
	TGCCCTCTGGCCCGTGCCCGCCGAAGACACCATTGAACACTGTCTG
Ú	AAGATTGCAGTCTGAGCAATTAGCTAAATAAGTTAAACTTTCAAC
S	AACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
E	GATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTG
K	AACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGA
	GCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTNGTGTGTTGGGCCCCGTC
	TCCTTCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTC
	CGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTTGTAGGCCCG
	GCCGGCGCTTGCCGACAACCATCAATCTTTTTTCAGGTTGACCTCGG
	ATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGC

Na obrázku 8 je graficky znázorněna sekvence *Penicillium corylophilum*

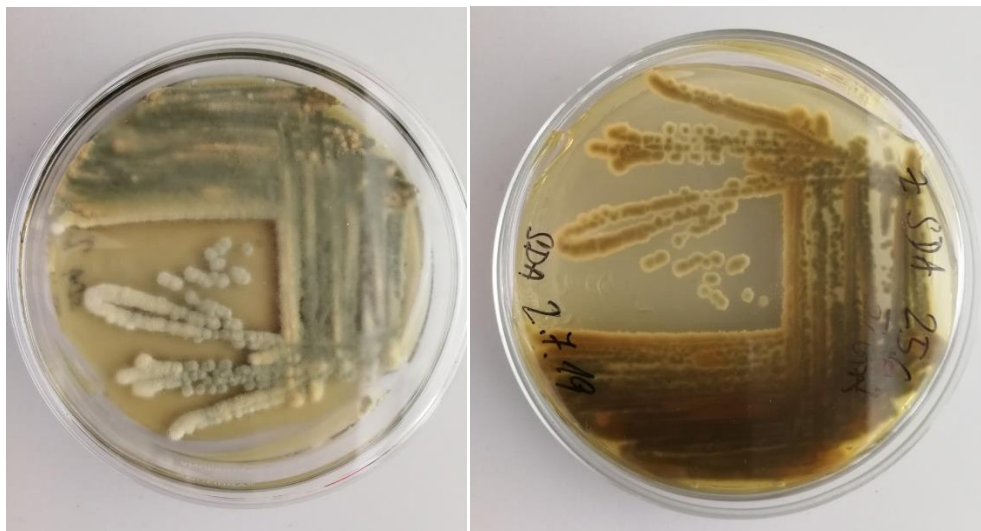
Obrázek 8- Sekvence *Penicillium corylophilum*



Tento organismus se vyskytuje ve vlhkých prostředích budov v USA, Kanadě a západní Evropě. Produkuje nízké dávky fungálních metabolitů, které mohou způsobovat zvýšené neatopické astma a onemocnění horních cest dýchacích (Mcmullin et al., 2017). Podle zdroje Schimmel-schimmelpilze.de (2021), tato forma nevede k infekcím, ani neprodukuje důležité toxické látky. Vědecké studie prokázaly, že kmeny *Penicillium corylophilum* jsou schopny štěpit uhlovodíky z ropných produktů. Proto může být *Penicillium corylophilum* použito spolu s jinými mikroorganismy k sanaci kontaminovaných půd.

Pomocí křížového roztěru byl kultivován a později izolován MO, který byl barvy světlezelené se žlutým odstínem a časem změnil barvu do olivově zelené se světlejšími okraji. Tvar kolonií byl okrouhlý a profil zvýšený.

Obrázek 9- Kultivace *Penicillium citrinum* křížovým roztěrem (vlevo popis Petriho misky)



Na obrázku 9 je vyfotografováný MO, který byl později identifikován jako *Penicillium citrinum*.

Obrázek 10- Morfologická stavba *Penicillium citrinum*



Na obrázku 10 je znázorněná standartní morfologická stavba *Penicillium citrinum*.

V tabulce 4 je ITS úsek, který jsme získali metodou Sangerového sekvenování. Získaný úsek byl pomocí nástroje BLAST použit k porovnání s jejími záznamy. Shoda s úsekem odpovídajícím *Penicillium citrinum* byla nižší, 88,16 %. S přihlédnutím k morfologii izolátu, produkci silně žlutého pigmentu, který výrazně zbarvoval kultivační médium a zároveň s ohledem na produkci citrininu a lovastatinu (viz další kapitola) byl mikroorganismus ve spolupráci s konzultanty diplomové práce zařazen právě jako *Penicillium citrinum*.

Tabulka 4- ITS úsek *Penicillium citrinum*

I	CGCTCCCCTGACCAGCCGCAACGCCCGCGAGTACCGCCAGATCAGC
T	GTTCCCGAGCTGACCCAGCAGATGTTTCGACCCCAAGAACATGATGG
S	CTGCTTCTGACTTCCGTAACGGCCGTTACCTCACCTGCTCCGCTCTC
	TTCCGCGGTAAGGTCTCCATGAAGGAGGTTCGAGGACCAGATGCGCA
Ú	ACGTCCAGAACAAGAACCAGGCCTACTTCGTTGAGTGGATCCCCAA
S	CAACGTGCAGACCGCTCTCTGCTCCGTTCCCCCGTGGCCTCAAG
E	ATGTCCTCCACCTTCGTTGGCAACTCCACCTCCATCCAGGAGCTCTT
K	CAAGCGTGTCGGTGACCAGTTCAGTGCCATGTTCCGTCGCAAGGCT
	TTCTTGC ACTGGTACTGGT GAGGGTATGGACGAGATGGAGTTCA
	CTGAGGCT

Na obrázku 11 je graficky znázorněna sekvence *Penicillium citrinum*

Obrázek 11- Sekvence *Penicillium citrinum*

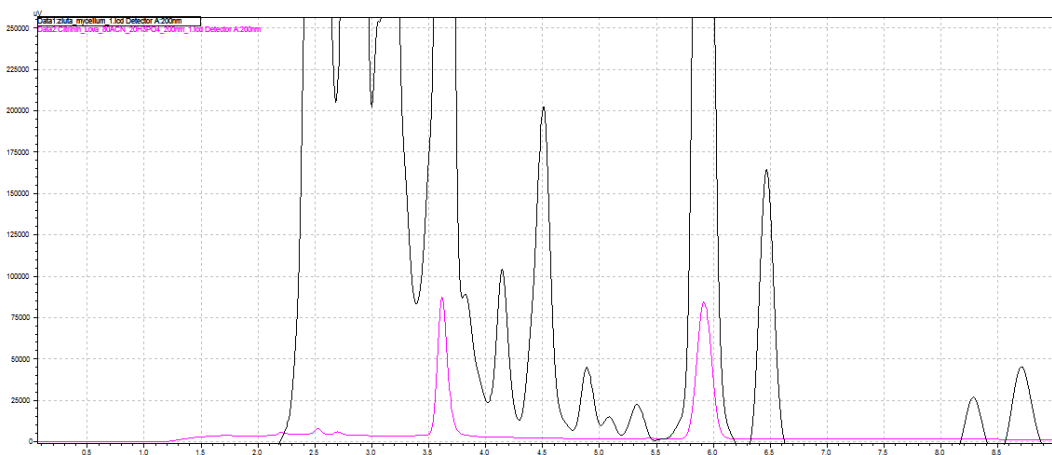


Penicillium citrinum je jedna z nejčastěji vyskytujících se forem *Penicillium* na Zemi (Pitt, 1980). Podle Houbraken, J. et al. (2011) se tento druh běžně vyskytuje ve vnějším prostředí, zvláště pak v (sub)tropických půdách, ale vyskytuje se i v mírných oblastech.

5.2 Identifikace izolovaných biologicky aktivních látek

Pomocí metody HPLC byl izolován extrakt kultivačního média mikroorganismu *Penicillium citrinum*. Extrakt *Penicillium corylophilum* analyzován nebyl, protože nevykazoval žádnou baktericidní, ani fungicidní aktivitu (viz kapitola 5.3) a zároveň nedocházelo ani k produkci pigmentů, které by měnily barvu kultivačního média. U analyzovaného extraktu byla sledována přítomnost dvou metabolitů, citrininu a lovastatinu. Na obrázku 12 jsou patrné píky v retenčním čase 4,5 minuty pro lovastatin a 9 minut pro citrinin.

Obrázek 12- Výsledky HPLC analýzy



Na obrázku 12 je růžovou barvou zobrazena křivka standardu metabolitů pro citrinin a lovastatin. Černá křivka představuje zkoumaný extrakt. Z chromatogramu je patrná produkce jak citrininu tak lovastatinu. Jednalo se pouze o kvalitativní hodnocení (viz metodika) a potvrzení produkce metabolitů sledovaným mikroorganismem.

Mykotoxin citrinin, je neurotoxický, produkuje ho několik druhů plísní z rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Monascus*. Ty napadají hlavně uskladněné potraviny, zejména obilí (Houdková, 2012).

Citrinin se nachází i v jiných rostlinných produktech, jako jsou fazole, ovoce, ovocné a zeleninové šťávy, byliny a koření, ale i zkažené mléčné výrobky. K růstu penicilia nejčastěji dochází při skladování. Optimální teplotní rozsah pro produkci citrininu je mezi 12 ° C a 25 ° C. Produkce je nejpravděpodobnější, když obsah vlhkosti přesáhne 16 % (Dalefield, 2017).

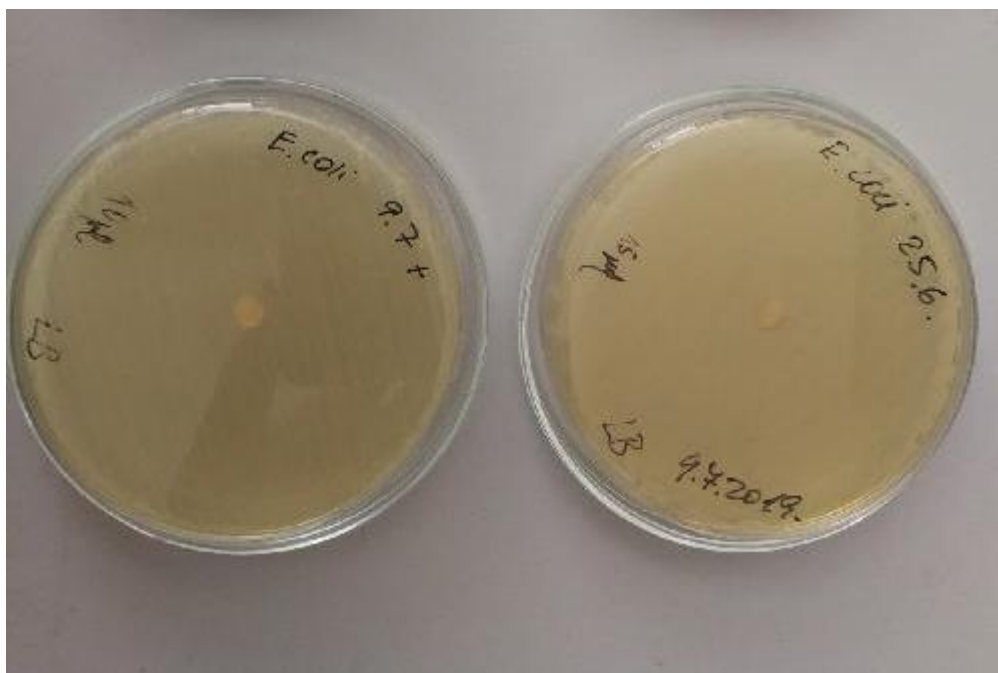
Lovastatin patří do skupiny tzv. přírodních statinů. Získávají se z různých rodů a druhů vláknitých hub. Lovastatin je nejčastěji produkován kmeny *Aspergillus terreus*.

Dále je pak přírodní statiny houbového původu pravastatin (odvozený od mevastatinu) ten produkuje *Penicillium citrinum* (Manzoni a Rollini, 2002).

5.3 Ověření biologické aktivity extrahovaných metabolitů

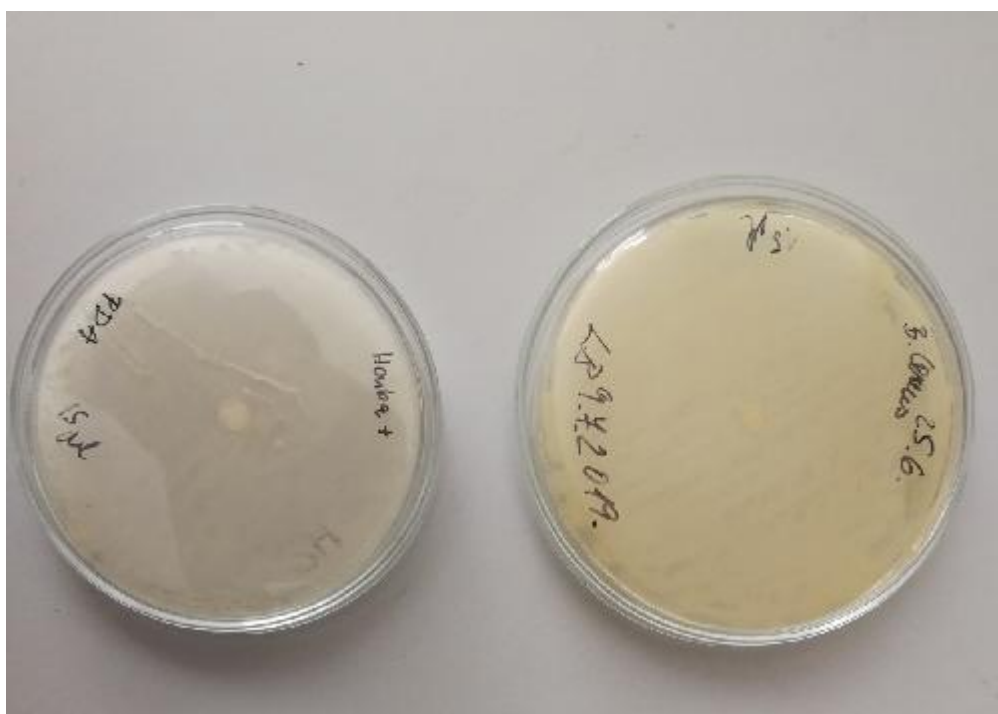
Bakteriocidní a fungicidní účinek byl proveden jak z extraktu *Penicillium citrinum*, tak i *Penicillium corylophilum*. Ani jeden z testovaných extraktů neprojevil žádnou biologickou aktivitu – inhibici růstu (při aplikaci v množství 15 µl na testovací terčik) u všech testovaných mikroorganismů (*E. coli*, *B. cereus* a *Mucor spp.*).

Obrázek 13- Biologická aktivita *P. citrinum* na *E.coli*



Na obrázku 13 je zobrazení testované biologické aktivity extraktu z kultivačního média *P. citrinum* (vlevo) a *P. corylophilum* (vpravo), na kultivačním mediu LB s gram negativní bakterií *E.Coli*. Na naočkovanou misku byl po inokulaci vložen papírový terčik obsahující extrakt kultivačního média sledovaných mikroorganismů. Ani v jednom případě se okolo terčíku nevytvořila žádná inhibiční zóna, a tak byla biologická aktivita *P. citrinum* i *P. corylophilum* vůči gram negativní bakterii *E. coli* neprůkazná. Shodné výsledky pak byly zjištěny při stejném postupu i u gram pozitivní bakterie *Bacillus cereus* a to při shodném množství extraktu (15 µl).

Obrázek 14- Biologická aktivita *P. citrinum* na *Mucor spp.* a *B. cererus*



Na obrázku 14 je zobrazená testovaná biologická aktivita extraktu z kultivačního média *P. citrinum* (vlevo) a *P. corylophylum* (vpravo). Sledovaná bakterie *P. citrinum* byla na kultivačním mediu PDA s gram pozitivní bakterií *Mucor spp.* Na naočkovanou misku, byl po inokulaci vložen papírový terčík obsahující extrakt kultivačního média sledovaného mikroorganismu. Okolo terčíku se však nevytvořila žádná inhibiční zóna, a tak byla biologická aktivita *P. citrinum* vůči gram pozitivní bakterii *Mucor spp* neprůkazná. Dalším sledovanou bakterií byl *P. corylophylum* na kultivačním mediu LB s gram pozitivní bakterií *B. cererus*. Na naočkovanou misku, byl po inokulaci vložen papírový terčík obsahující extrakt kultivačního média sledovaného mikroorganismu. Okolo terčíku se však nevytvořila žádná inhibiční zóna, a tak byla biologická aktivita *P. corylophylum* vůči gram pozitivní bakterii *B. cererus* neprůkazná. Množství extraktu u obou bakterií byl 15 µl.

Závěr

Z odebraných vzorků plástového pylu byla provedena izolace mikroorganismů, v práci pak byly analyzovány dva, z takto získaných mikroorganismů. Opakovanou kultivací byly získány čisté izoláty, které byly následně identifikovány a byla hodnocena biologická aktivita extraktů z kultivačních médií, které by indikovaly baktericidní nebo fungicidní účinek.

Základní identifikace mikroorganismů byla provedena pomocí molekulárně biologických metod. Základem byla amplifikace úseků DNA, pomocí metody PCR a sekvenace specifických ITS úseků DNA. Výsledné sekvence byly pomocí nástroje BLAST porovnány s databází nukleotidů a zjištěna shoda s existujícími záznamy.

První sledovaný mikroorganismus byl identifikován jako *Penicillium corylophilum*. To je běžně vyskytující se MO ve vlhkém prostředí, který produkuje fungální metabolity, o jeho škodlivosti se vedou spory. Databáze BLAST stanovila tento MO se 100 % shodou při celkové kvalitě sekvence 89 %.

Druhý sledovaný mikroorganismus byl identifikován jako *Penicillium citrinum*. Což je nejčastěji vyskytující se druh z rodu *Penicillium*, je to obvyklý MO nacházející se ve vnějším prostředí, zvláště pak v (sub)tropických půdách, ale vyskytuje se i v mírných oblastech. Databáze BLAST stanovila tento MO se 88,16 % shodou při celkové kvalitě sekvence 99,3 %. K přesnějšímu určení byla použita morfologie kolonií při kultivaci na pevném médiu, produkce žlutého pigmentu a potvrzení produkce metabolitů citrinin a lovastatin, které dle dostupné literatury tato houba produkuje.

Při identifikaci izolovaných biologicky aktivních látek byla použita metoda HPLC, pomocí ní byly zjištěny dva metabolity citrinin a lovastatin, oba metabolity byly získány z *Penicillium citrinum*. To je běžně vyskytující se mikroorganismus ve vnějším prostředí.

Při ověřování biologické aktivity extrahovaných metabolitů byly použity mikroorganismy *E. coli*, *B. cereus*, *Mucor spp.* Ani jeden z testovaných mikroorganismů neprodukoval extrahovatelný metabolit, který by měl baktericidní či fungicidní účinek na výše uvedené zkušební MO.

Množství takto izolovaných mikroorganismů ze včelstev může být obrovské, přitom se nemusí jednat jen o organismy vyskytující se v plástovém pylu, ale i o organismy, které se objevují na těle i uvnitř těl včel a jejich celkové množství je velice

malé. Ovšem metabolity, které mohou produkovat budou velice důležité pro funkční stav včelího společenství, zejména s ohledem na vývoj včelího plodu, syntézu různých hormonů a dalších esenciálních látek, které včely nejsou schopné získat jiným způsobem. Dostupné studie naznačují silně negativní vliv aplikace fungicidních látek v okolí včelstev, přestože se může jednat o látky, které nejsou přímo nebezpečné pro včely. I tak dochází ke snížení pestrosti včelího mikrobiomu, což ve spojení s méně různorodou potravní základnou vede ke snížení vitality včelstev, snížení úrovně jejich zdravotního stavu a celkově nižší odolnosti včelstev.

Seznam použité literatury

- Adjare, S. O. (1990). *Beekeeping in Africa* [online]. Ghana: FAO Agricultural Services Bulletin 68/6 Food and Agriculture Organisation of the United Nations Rome [cit. 2020-05-26]. Dostupné z: <http://www.fao.org/3/t0104e/T0104E05.htm#The%20worker>
- Alberoni, D. et al. (2016). Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(22), 9469–9482.
- Anderson, K. E. et al. (2011). An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*. 58, 431
- Annoscia, D. et al. (2017). Elucidating the mechanisms underlying the beneficial health effects of dietary pollen on honey bees (*Apis mellifera*) infested by *Varroa* mite ectoparasites. *Sci Rep* 7, 6258.
- Baer, B. (2018). What it takes to make a queen bee. *Australian Academy of Science* [online]. Austrálie: Australian Academy of Science, [cit. 2020-05-26]. Dostupné z: <https://www.science.org.au/curious/earth-environment/what-it-takes-make-queen-bee>
- Bakour, M. et al. (2019). Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties. *LWT*, 109 (7): 276-282
- Bentzien, C. (2008). *Ekologický chov včel: včelaření podle pravidel přírody*. 1. vydání. Víkend, Praha. ISBN 978-80-86891-86-6.
- Brown, R. (2015). Meet the Nectar Collecting Bee. *Bee pollen* [online]. Phoenix: Bee Pollen, [cit. 2020-05-26]. Dostupné z: <http://www.beepollen.com/blog/the-nectar-collecting-bee/>
- Collison, C. (2015). A closer look: nectar collection / processing. *Bee culture: The magazine of American Beekeeping* [online]. Ohio: Bee culture: The magazine of American Beekeeping, [cit. 2020-05-26]. Dostupné z: <https://www.beeculture.com/a-closer-look-nectar-collection-processing/>
- Cramp, D. (2016). *Včelařství: obrazový průvodce: od pořízení včelstev po medobraní*. 3. vydání. Přeložil Kateřina PISKOVÁ. Rebo International CZ, Praha. ISBN 978-80-255-0947-0.
- Czekońska, K. a Tofilski, A. (2020). Body mass of honey bee drones developing in constant and in changing temperatures. *Apidologie*. 51:510–518

-
- Čurn, V. et al. (2019). *Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů u hub* [online]. České Budějovice [cit. 2021-04-23]. Dostupné z: <http://biocentrum.zf.jcu.cz/docs/lab/Methodiky-Metodika-v-41d09e916f.pdf>.
- Dalefield, R. (2017). Chapter 21 - Mycotoxins and Mushrooms, *Veterinary Toxicology for Australia and New Zealand*, Pages 373-419, ISBN 9780124202276
- Danihlík, J. a Petřivalský M. (2015). Aktuální vědecké poznatky o imunitě a zdraví včel. *Veterinářství* [online]. 2015(6), 1-8 [cit. 2021-02-01]. Dostupné z: [http://hosting.workplace.cz/DZS/Aktion.nsf/fd0107ef0867588ac1257a2c003ad879/f5f0f1116ca2e844c1257d6a004b1233/\\$FILE/71p6_Danihl%20J.,%20Pet%20C5%99ivalsk%20M.%20Aktu%20A1ln%20v%20v%20C4%9Bdec%20k%20A9%20poznatky%20o%20imunit%20a%20zdrav%20v%20v%20C4%8Del.%20Veterin%20A1%20C5%99stv%20AD.pdf](http://hosting.workplace.cz/DZS/Aktion.nsf/fd0107ef0867588ac1257a2c003ad879/f5f0f1116ca2e844c1257d6a004b1233/$FILE/71p6_Danihl%20J.,%20Pet%20C5%99ivalsk%20M.%20Aktu%20A1ln%20v%20v%20C4%9Bdec%20k%20A9%20poznatky%20o%20imunit%20a%20zdrav%20v%20v%20C4%8Del.%20Veterin%20A1%20C5%99stv%20AD.pdf)
- Engel, P. et al. (2013). Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1–24.
- Erban, T. et al. (2020). Význam interakce patogenů a mikrobiomu včel s pesticidy. *Veterinářství* 2020; 70(6):365-372.
- Fejková, K. (2018). Sršni proti včelám: jak dopadne souboj v poměru 1:1000? *National Geographics Česko* [online]. 2018(9) [cit. 2021-4-19]. Dostupné z: <https://www.national-geographic.cz/clanky/srsni-proti-vcelam-jak-dopadne-souboj-v-pomeru-1-1000-kdo-zvitezi-20180921.html>
- Fraindová, K. (2017). Parazitické organismy, které decimují včely, mají vliv i na jejich symbiotické bakterie. *Přírodovědná fakulta Univerzita Karlova* [online]. Praha: Přírodovědná fakulta Univerzita Karlova [cit. 2021-02-06]. Dostupné z: <https://www.natur.cuni.cz/fakulta/veda-a-vyzkum/popularizace/clanky/paraziticke-organismy-ktere-decimuji-vcely-maji-vliv-i-na-jejich-symbioticke-bakterie>
- Gardes, M. a Bruns T. (1993). "ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts." *Molecular ecology* vol. 2,2: 113-8.
- Gillespie, C. (2018). "How Does a Bee Become a Queen Bee?". [online] *Sciencing.com* [cit. 2020-05-19]. Dostupné z: <https://sciencing.com/bee-become-queen-bee-5200755.html>
- Gritsch, H. (2014). *Silná včelstva po celý rok*. 2. vydání. Přeložil Titěra D. Ve spolupráci s Českým svazem včelařů vydalo nakl. Brázda, Praha. ISBN 978-80-209-0408-9
-

Haragsim, O. (2004). *Včelařské dřeviny*. Česká zahrada, Grada, Praha. ISBN 80-247-0833-7.

Haragsim, O. (2005). *Medovice a včely*. Ve spolupráci s Českým svazem včelařů vydalo nakl. Brázda, Praha. ISBN 80-209-0332-1.

Havlík, J. (2015). Nové poznatky o imunitě včel. *Česká zemědělská univerzita v Praze* [online]. Praha [cit. 2021-03-04]. Dostupné z: <https://www.czu.cz/cs/r-7212-veda-a-vyzkum/r-7653-aktuality-vav/nove-poznatky-o-imunitě-vcel.html>

Holejšovský, J. (2020). Zamyšlení nad současnými ztrátami včelstev. [online]. *Včelařství* [cit. 2021-03-02]. Dostupné z: <https://www.vcelarstvi.cz/aktuality/zamysleni-nad-soucasnymi-ztratami-vcelstev/>

Houbraken, J. et al. (2011). Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*, *Studies in Mycology*, 70: 53-138.

Houdková, M. (2012). Citrinin – mykotoxin v potravinách a krmivech. [online] *Bezpečnost potravin* [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/citrinin-mykotoxin-v-potravinach-a-krmivech.aspx>

Hung, K.J. et al. (2018). The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proc. R. Soc. B*.285: 28520172140

Janashia, I. (2018). Beneficial Protective Role of Endogenous Lactic Acid Bacteria Against Mycotic Contamination of Honeybee Beebread. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* [online]. 10(4), 638-646.

Kacániová M. et al. (2009). Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2009 Sep;56(3):285-95.

Kopecká, J. a Rotková G. (2017). *Křížový roztěr* [online]. In: Brno: Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity [cit. 2021-03-15]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/steril_p_race_ockovani_uchovavani.html

Lee, F. J. et al. (2015). Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Environmental microbiology*, 17(3), 796–815.

Leonard, S. P. et al. (2020). Engineered symbionts activate honey bee immunity and limit pathogens. *Science*, 367(6477): 573-576

Luke, J. (2020). *Rok včelaře: praktický průvodce domácím včelařením*. Přeložil Dagmar EISENMANNOVÁ. Rebo International CZ, Praha. ISBN 978-80-255-1207-

-
- Manzoni, M. a Rollini M. (2002). Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied microbiology and biotechnology*. 58. 555-64.
- Mcgregor, S. E. (2017). Beekeeping. *Encyclopædia Britannica* [online]. Encyclopædia Britannica [cit. 2020-05-19]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/topic/beekeeping>
- Mcmullin, D. R. et. al. (2017) Secondary metabolites from *Penicillium corylophilum* isolated from damp buildings. *Mycologia*, 106(4): 621-628
- Menezes, C. et al. (2015). A Brazilian Social Bee Must Cultivate Fungus to Survive. *Current Biology* 25 [online]. *Sci-news*, 2015(10) [cit. 2021-03-09]. Dostupné z: <http://www.sci-news.com/biology/science-brazilian-stingless-bee-monascus-fungus-03372.html>
- Moritz, R. a Fuchs S. (1998). Organization of honeybee colonies: characteristics and consequences of a superorganism concept. *Apidologie*, 29(1-2): 7-21.
- Morrison, A. (2014). *Včelaření krok za krokem: obrazový průvodce chovem včel: od nákupu včelstva do první sklizně medu*. Knižní klub, Praha. ISBN 978-80-242-4215-6
- Mortensen, A. N. et al. (2013). *Apis mellifera* and subspecies Linnaeus. <http://entnemdept.ufl.edu/creatures/> [online]. Florida University: Florida [cit. 2020-05-19]. Dostupné z: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/MISC/BEES/euro_honey_bee.htm
- Parish, J. B. et al. (2020). Nutritional benefit of fungal spores for honey bee workers. *Scientific Reports* [online]. 10(1) [cit. 2021-03-29]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-72758-1
- Pasquale, D. G. et al. (2013). Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLoS ONE* 8(8): e72016.
- Pelczar, M. J. a Pelczar, R. M. (2020). "Microbiology". *Encyclopedia Britannica*, [online] [cit. 2020-08-26]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/microbiology>
- Pitt, J. (1980). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*, Academic Press, London. ISBN 0125577507
- Rada, V. et al. (2009). *Biologicky aktivní látky ve výživě včel* [online]. Praha: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i [cit. 2021-03-09]. Dostupné z: <https://vuzv.cz/wp-content/uploads/2018/03/V%C4%8Dely-2009.pdf>
-

-
- Rosypal, S. et al. (1981). *Obecná bakteriologie*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 749 str. ISBN 14-549-81.
- Saraiva, M. A. et al. (2015). Relationship between honeybee nutrition and their microbial communities. 107(4): 921-33.
- Sartell, J. (2017). The Role of Nectar, Honey and Pollen in the Hive. *Keeping backyard bees* [online]. Kansas: Ogden Publications [cit. 2020-05-26]. Dostupné z: <https://www.keepingbackyardbees.com>
- Sekaninová, I. (2015). Včelí mikroflóra může být klíčem k prevenci onemocnění [online] *Veterinářství* [cit. 2021-03-04]. Dostupné z: <https://www.vetweb.cz/vceli-mikroflora-muze-byt-klicem-k-prevenci-onemocneni/>
- Schimmel-schimmelpilze.de (2021). Penicillium-corylophilum. [online] [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: <http://www.schimmel-schimmelpilze.de/penicillium-corylophilum.html>
- Solčanský, M. (2017). Srpen – první měsíc včelařského roku. *Včelařství*. 70(152): 256-257
- Štipl, D. (2015). Vymyslel, jak odhalit včelí mor. Včas a levněji než doposud. [online] *Česká hlava* [cit. 2021-03-03]. Dostupné z: <http://www.ceskahlava.cz/cz/napsali-o-nas/vymyslel-jak-odhalit-vceli-mor.-vcas-a-levneji-nez-doposud-222/>
- Tautz, J. (2009). *Fenomenální včely: biologie včelstva jako superorganismu*. Ve spolupráci s Českým svazem včelařů vydalo nakl. Brázda, Praha. ISBN 9788020903761.
- Titěra, D. (2013). *Včelí produkty mýtů zbavené: med, vosk, pyl, mateří kašička, propolis, včelí jed*. 2. vydání. Brázda, Praha. ISBN 978-80-209-0398-3.
- Veselý, V. et al. (2013). *Včelařství*. 3. vydání. Brázda, Praha. ISBN 9788020903990.
- Vorlová, L. (2002). *Med: souborná analýza*. Veterinární a farmaceutická univerzita, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Brno. ISBN 80-7305-450-7.
- White, T. et al. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols*, 315-322
- Yoder, J. A. et al. (2013). Fungicide Contamination Reduces Beneficial Fungi in Bee Bread Based on an Area-Wide Field Study in Honey Bee, *Apis mellifera*, Colonies. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76(10): 587-600

Seznam obrázků

Obrázek 1- Křížový roztěr (Kopecká a Rotková, 2017)	21
Obrázek 2- Popis Petriho misky.....	22
Obrázek 3- Chromatogram standardů lovastatinu (reteční čas 4,5 minuta) a citrininu (retenční čas 9 minuta)	23
Obrázek 4- Mapa jaderné oblasti ITS s pozicemi primerů a sekvencemi primerů	26
Obrázek 5- Úsek namnoženého ITS úseku analyzovaných vláknitých hub o velikosti cca 600–650 bp	27
Obrázek 6- Kultivace <i>Penicillium corylophilum</i> křížovým roztěrem (vlevo popis Petriho misky)	28
Obrázek 7- Morfologická stavba <i>Penicillium corylophilum</i>	28
Obrázek 8- Sekvence <i>Penicillium corylophilum</i>	29
Obrázek 9- Kultivace <i>Penicillium. citrinum</i> křížovým roztěrem (vlevo popis Petriho misky)	30
Obrázek 10- Morfologická stavba <i>Penicillium citrinum</i>	30
Obrázek 11- Sekvence <i>Penicillium citrinum</i>	31
Obrázek 12- Výsledky HPLC analýzy	32
Obrázek 13- Biologická aktivita <i>P. citrinum</i> na <i>E.coli</i>	33
Obrázek 14- Biologická aktivita <i>P. citrinum</i> na <i>Mucor spp.</i> a <i>B. cererus</i>	34

Seznam tabulek

Tabulka 1- Řetězec DNA (počáteční místo replikace DNA).....	26
Tabulka 2- Postup namnožení ITS úseků.....	26
Tabulka 3- ITS úsek <i>Penicillium corylophilum</i>	29
Tabulka 4- ITS úsek <i>Penicillium citrinum</i>	31

Seznam použitých zkratek

PDA – Potato Dextrose Agar (Bramborový dextrózový agar)

SDA – Sabouraud Dextrose Agar (Sabouraudův dextrózový agar)

MY50G – Malt Yeast Extract 50 % Glucose Agar (Sladový kvasnicový extrakt 50% agar s glukózou)

GLU 30 – Glucose 30% Agar (Glukózový 30% agar)

NaOH – Hydroxid sodný

HCl – Kyselina chlorovodíková

H₃PO₄ – Kyselina fosforečná

HPLC – high performance liquid chromatography (vysoko účinná kapalinová chromatografie)

LB – Lysogeny broth (Lysogenylový bujón)

DNA – desoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleová kyselina)

ITS – internal transcribed spacer (Interní transkribovaný spacer)

CTAB-PVP – hexadecyltrimethylammonium bromide-polyvinyl pyrrolidone

UV – Ultrafialové záření

CTAB – hexadecyltrimethylammonium bromide

TE pufru – Tris/EDTA pufr

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

MO – mikroorganismus

PCR – polymerase chain reaction (Polymerázová řetězová reakce)