

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO
Fakulta veterinární hygieny a ekologie

Citlivost spor mikrosporidie *Nosema ceranae* k dezinfekčním činidlům

Bakalářská práce

Autor práce

Yuliia Shulha

Vedoucí práce

Papežíková Ivana, MVDr. Ph. D.

Brno 2017

PROHLÁŠENÍ STUDENTA

Prohlašuji, že jsem předkládanou bakalářskou / ~~diplomovou~~ / ~~rigorózní~~ / ~~disertační~~* práci vypracoval/a zcela samostatně pod vedením vedoucího práce a veškeré podkladové materiály, z nichž jsem vycházel/a, uvádím v Seznamu literatury.

V Brně dne.....

.....Podpis studenta:

** nehodící se škrtněte*

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí práce Ivaně Papežíkové, MVDr. Ph. D., za její cenné rady, čas, ochotu a připomínky, díky kterým jsem zdárně dokončila mou bakalářskou práci.

Obsah

1. Úvod.....	5
2. Cíl práce	5
3. Literární přehled.....	6
3.2 Mikrosporidie rodu <i>Nosema</i>	8
3.3 Historie výskytu <i>Nosema ceranae</i> u včely medonosné.....	8
3.4 Morfologie spor <i>N. apis</i> a <i>N. ceranae</i>	8
3.5 Životní cyklus <i>N. apis</i> a <i>N. ceranae</i>	9
3.6 Klinické příznaky a patologické změny u včely medonosné	10
3.7 Diagnostika	11
3.8 Terapie	12
3.9 Zootechnická opatření při nosematóze, prevence	12
3.10 Odolnost spor <i>N. apis</i> a <i>N. ceranae</i> v prostředí	13
3.11 Organické kyseliny ve včelařství	14
3.12 Fluorescenční mikroskopie, fluorescenční barviva.....	15
4. Materiál a metodika.....	17
4.1 Izolace spor	17
4.2 Druhové určení spor, barvení fluorescenčními barvivy, kontrola životnosti spor	17
4.3 Citlivost spor na pH	17
4.4 Citlivost spor na vysokou teplotu.....	18
4.5 Citlivost spor k organickým kyselinám.....	18
4.6 Vyhodnocení životnosti spor	18
4.7 Statistické zpracování dat.....	19
5. Výsledky a diskuze	20
5.1 Barvení spor <i>N. ceranae</i> fluorescenčními barvivy	20
5.2 Citlivost spor <i>N. ceranae</i> k vyschnutí	22
5.3 Citlivost spor <i>N. ceranae</i> ke kyselině mravenčí.....	23
5.4 Citlivost spor <i>N. ceranae</i> ke kyselině octové.....	25
5.5 Citlivost spor <i>N. ceranae</i> ke kyselině šťavelové.....	26
5.6 Citlivost spor k pH	27
5.7 Ošetření teplem	29
6. Závěr	31
7. Literatura.....	32
8. Abstrakt.....	38

9. Abstract	39
10. Přílohy	40

1. Úvod

Včely žijí na Zemi miliony let. Včela medonosná původně vznikla v Africe a až potom se rozšířila do Evropy. Dnes je zásluhou člověka rozšířena téměř po celém světě s výjimkou polárních oblastí a rozsáhlých pouští. Dříve byly včely chovány pouze pro zisk medu, vosk, propolis nebo pyl. Společně s rozvojem zemědělství rostl význam včely medonosné jako přírodního opylovatele rostlin, který hraje důležitou roli v ekosystému. (Hrobařová, 2010)

Pokud jsou ohroženi hmyzí opylovatelé, může být ohrožen i náš systém potravinové soběstačnosti. Ve včelařství ve celá řada problémů světových měřítek, které je potřeba začít postupně řešit, dokudto situace umožňuje. V případě ignorace těchto skutečností se takové problémy mohou stát neřešitelnými s významnými důsledky pro budoucí generace. Většinu z těchto problémů způsobují parazité a patogeny (Tichomirov, 2016).

Jednou z nejrozšířenějších chorob včely medonosné je nosematóza. Toto onemocnění zažívacího traktu dospělých včel je způsobeno parazitickými houbami - hmyzomorkami. Má dva původce - *Nosema apis* (hmyzomorka včelí) a *Nosema ceranae* (zatím bez českého názvu). Oba původci jsou obligátní parazité, kteří mimo tělo hostitele přežívají jen v podobě odolných spor.

Zkušenosti včelaři ukázali v praxi, že správnou péčí lze významně snížit materiální ztráty, způsobené nosematózou. Vedle správného ošetřování včelstev má velký význam i důkladná dezinfekce včelařského vybavení.

2. Cíl práce

Cílem této práce bylo otestovat citlivost spor mikrosporidie *Nosema ceranae* k dezinfekčním zásahům – k organickým kyselinám a k tepelnému ošetření. Dalším cílem bylo otestovat citlivost spor k pH prostředí.

3. Literární přehled

3.1 Včela medonosná

Včela medonosná je jeden z nejznámějších zástupců společenského hmyzu. Hraje velkou úlohu při rozmnožování rostlin. Umožňuje reprodukci i za bezvětrí a je schopna přenášet pyl na velké vzdálenosti (Kuzmichev, 2008).

Zařazení včely medonosné do zoologického systému:

- říše – živočichové (Animalia)
- kmen - členovci (Arthropoda)
- podkmen - vzdušnicovci (Tracheata)
- třída - hmyz (Insecta)
- podtřída - křídlatí (Pterygota)
- řád - blanokřídlí (Hymenoptera)
- podřád - štíhloпасí (Apocrita)
- nadčeleď - včely (Apoidea)
- čeleď - včelovití (Apidae)
- rod - včela (*Apis*)
- druh - včela medonosná (*Apis mellifera*)

Kromě včely medonosné existují i další druhy včel. Včela zlatá (*Apis dorsata*) je největší ze všech druhů rodu *Apis*. Žije v tropických oblastech. Má výrazně žluté zbarvení. Včela květná (*Apis florea*) je nejmenší. Žije na indickém subkontinentu. Má tmavé zbarvení. Včela východní (*Apis cerana*) nejvíce podobná včele medonosné. Žije v jihovýchodní Asii (Švamberk, 2003).

Tělo včely se skládá ze tří částí – hlavy, hrudi a zadečku. Článkování je zřetelné pouze u zadečku. Tělo je na povrchu kryto pevnou kutikulou, jejímž základem je dusíkatý polysacharid chitin. Kutikula je vnější kostrou - zevnitř jsou na ni upevněny svaly i orgánové soustavy. Aby byla pohyblivá, jsou jednotlivé články spojeny pružnou chitinovou blankou. Na hlavě jsou uloženy smyslové orgány a ústní ústrojí. Končetiny a křídla vyrůstají z hrudi. Trávicí a rozmnožovací orgány se nacházejí v zadečku včely.

K přijímání, přenášení a zpracování potravy slouží včele trávicí ústrojí. Je tvořeno třemi základními částmi. Přední část zahrnuje hltan, jícen a medný váček. Žaludek je druhá část trávicího ústrojí a poslední část tvoří konečník a výkalový vak (Veselý, 2003).

Včela medonosná patří k hmyzu, který žije v početných společenstvích. Za účelem přežití v tvrdých přírodních podmínkách se včela medonosná sdružuje ve společenstvu čítajícím řádově až desítky tisíc jedinců. Společenský život včel vždycky sloužil jako vzor píce, spolupráce a efektivnosti. Včelstvo je fungující organismus, ve kterém existují včelí kasty – matky, dělnice a trubci. Dělnice vykonávají většinu práce v úle a zajišťují složitou organizaci života včelstva. Hlavní úloha matky spočívá v kladení vajíček a produkci mateřího feromonu, který zajišťuje soudržnost včelstva. Hlavní úlohou trubců je oplodnit mladé matky a zajistit tak pokračování života včelstva. (Kuzmichev, 2008) Vývoj dělnice od vajíčka po dospělého trvá 21 dnů, vývoj matky 16 dnů a vývoj trubce 24 dnů. Včelí matka žije 3 až 5 let. Dělnice, které se líhnou na jaře, žijí jen asi 6 týdnů, a ty, které se líhnou po letním slunovratu, až 9 měsíců. Včelí matka klade na vrcholu kladení až 1500 vajíček denně (Veselý a kol., 1985).

Včely létavky sbírají venku v terénu pyl, nektar a medovici, pryskyřice pro tvorbu propolisu nebo vodu. V medném váčku shromažďují nasátý nektar. Včelí dělnice má hmotnost přibližně 100 mg, v medném váčku je schopna unést okolo 40 mg nektaru nebo medovice. Po návratu do úlu předají létavky přinesený nektar nebo medovici mladuškám (mladým včelám, vykonávajícím práci v úle). Mladušky přidávají výměšky hltanových žláz s obsahem invertázy, která štěpí sacharózu na jednoduché cukry. Odpařováním zahušťují na jazyčku vodnatý med a surovinu předávají celému řetězci dalších mladušek.

Nasbíraný pyl včela sbírá z chloupků na povrchu těla pročišťováním a přilepuje ho do košíčků na zadním páru nohou. V těchto košíčcích přinášejí včely i pryskyřice pro tvorbu propolisu. Propolis včely používají k zatmelení netěsností v úle.

V plodovém hnízdě udržují včely stálou teplotu 34-35°C. Teplotu včely zvyšují svalovým třesením. Chlazení zajišťují vířením křídel.

3.2 Mikrosporidie rodu *Nosema*

3.2.1 *Nosema apis* a *Nosema ceranae*

Do dnešní doby byly popsány dva druhy mikrosporidií, způsobující nosematózu včely medonosné: *Nosema apis* (první popsal Zander v roce 1909) a *Nosema ceranae* (Fries a kol., 1996). *Nosema ceranae* je původním parazitem asijské včely východní (*Apis cerana*) a *Nosema apis* je původní parazit evropské včely medonosné (*Apis mellifera*) (Fries a kol., 1996).

Původní druh *Nosema apis* nalézáme u včely medonosné čím dál méně, nový druh *Nosema ceranae* naopak stále častěji. Oba uvedené druhy jsou si velmi podobné stavbou spor a celkovou biologii.

3.3 Historie výskytu *Nosema ceranae* u včely medonosné

Až do roku 2004 byla *N. ceranae* známá a popsána pouze u včely východní (*Apis cerana*), u které byla objevena v Číně v roce 1996 (Fries a kol., 1996). V roce 2004 byla *N. ceranae* poprvé nalezena u včelstev včely medonosné na Taiwanu (Huang a kol., 2007).

V jižní Evropě byly v polovině první dekády 21. století pozorovány velké ztáty včelstev. V roce 2005 byla mikrosporidie *N. ceranae* poprvé nalezena u včelstev včely medonosné v Evropě (konkrétně ve Španělsku) (Higes a kol., 2006).

3.4 Morfologie spor *N. apis* a *N. ceranae*

Zralé spory *Nosema apis* mají oválný až vejčitý tvar. Jejich velikost je 4 x 7 µm. Obal spory je hladký, někdy mírně zvlněný, jeho tloušťka je 0,2 - 0,3 µm. Uvnitř spory je sporoplazma (dvojjaderný zárodek), dále polaroplast, tvořený několika vrstvami membránových lamel, duté svinuté pólové vlákno o délce přibližně 400 mikrometrů, a zadní vakuola o délce až 400 µm.

Spory *N. ceranae* mají podobnou vnitřní strukturu jako spory *N. apis*, ale jsou poněkud menší a užší (Fries a kol., 1996). Největší spory *N. ceranae* jsou přibližně stejně velké jako nejmenší spory *N. apis*. V průměru jsou však spory *N. ceranae* asi o 1 μm menší (Fries a kol., 2006). Jsou velké přibližně $4,4 \times 2,2 \mu\text{m}$ (Smith, 2012). Počet závitů pólového vlákna uvnitř spory je 18-21 (Chen a kol., 2009).

3. 5 Životní cyklus *N. apis* a *N. ceranae*

Nosema apis je typický jednobuněčný parazit, který potřebuje pro vývoj velmi specifické podmínky životního prostředí.. Mimo tělo včely je *Nosema apis* schopna přežít pouze ve formě spor.

K nákaze včel dochází pozřením infekčních spor. *Nosema* spp. infikuje epitelální buňky žaludku dospělých dělnic, matek i trubců. Na počátku infekce parazit proniká do buněk zadní části žaludku. Tady jsou buňky nejméně ochráněny peritrofickou membránou, která je zde jen slabě vyvinuta. Následuje napadení buněk dalších úseků žaludku.

Nákaza včel sporami *Nosema apis* je nejúčinnější při teplotách od 10 do 37 °C. Optimalní teplota pro vývoj parazita je kolem 30- 35 °C, pokud teplota stoupne nebo klesne pod tuto hranici, vývoj se značně omezí. (Kubišová a Hálsbachová, 1998) Malone a kol. (2001) uvádí, že spory *Nosema apis* jsou zabity při dlouhodobém vystavení teplotám převyšujícím 35 °C.

K napadení epitelálních buněk žaludku dochází za 10 - 30 minut po pozření spor. Nejdříve při působení trávicích šťáv polaroplast a zadní vakuola nabobtná, a začne tláčit na vnitřní stěnu spory a na její obsah. Tímto vytlačí pólové vlákno takovou silou, že je schopno proniknout skrze plazmatickou membránu hostitelské buňky. Sporoplasma vstupuje přes dutinu pólového vlákna dovnitř buňky. Paraziti proniknuvší do cytoplazmy buňky (zřídka do jádra) jsou pokryti jednovrstvou membránou, zvětšují se a stávají se tak meronty (schizonty). Poté prodělávají několik rozmnožovacích cyklů. V důsledku jaderného štěpení vzniká vícejaderné plasmodium, které se dělením cytoplazmy rozdělí na dvoujaderné buňky. Tento proces (merogonie) se opakuje dvakrát. Meronty první a druhé generace se liší ve velikosti a intenzitě zbarvení jader a cytoplazmy. Po dokončení merogonie vznikají sporoblasty, z nichž se formují nové

spory. Za 36 hodin po nákaze se objeví spora s tenkou endosporou a krátkým pólovým vláknem, skrz které proniká sporoplazma do cytoplazmy infikované buňky a do sousedních buněk epitelu. Spory postupně zcela zaplní vnitřek epiteliálních buněk, čímž buňky ztrácejí svoji funkci, odumírají a odpadají od stěny žaludku. Po rozpadu buňky se spory dostávají do lumina žaludku a spolu s výkaly odcházejí z těla včely. Celý vývojový cyklus parazita trvá 48 až 72 hodin. V žaludku postižené včely se při plně rozvinuté infekci nacházejí řádově stovky milionů spor, přičemž v zadní části střeva se může nacházet až 500 milionů spor.

Životní cyklus *N. ceranae* je podobný jako u *N. apis*. Rozdíl je především v tom, že *N. ceranae* vytvoří v těle nemocné včely více infekčních spor (Huang a Solter 2013).

Někteří autoři popisují, že *N. ceranae* napadá i ostatní tkáně (Chen a kol., 2009). Kromě primární infekce ve středním střevě byla molekulárními metodami prokázána přítomnost *N. ceranae* ve tkáních hltanového slinných žláz, Malpighiho tubulech a v tělním tuku (Chen a kol., 2009, Gisder a kol., 2010, Jabaji, 2012).

3.6 Klinické příznaky a patologické změny u včely medonosné

V prvním období onemocnění se postižené včely živí velkým množstvím pylu. Roste i spotřeba medu nebo cukru. Ve druhém období onemocnění se spotřeba krmiva snižuje na normální. Je prokázáno, že zvýšený obsah bílkovin ve stravě v době nemoci způsobuje přeplňování výkalového vaku a mimovolní defekaci včel v úlu a snižuje délku jejich života. Nemocné včely začnou brzo vykonávat práci neobvyklou pro jejich věk – mladé včely se předčasně stávají létavkami. V aktivním období se nacházejí na okraji hnízda a hromadí se u česna a v horní části úlu. V zimě a na jaře jsou nemocné včely soustředěny v místě s nejvyšší teplotou. Při zimování nakažené včely vydávají nepřetržitý hluk, prchají z úlu a hynou. Čelní stěna úlu, stejně tak i pláсты jsou na mnoha místech pokryty výkaly. Včely jsou malátné a málo reagují na vnější podněty.

Onemocnění vede ke špatnému rozvoji včelstva a ke ztrátám na výnosech včelích produktů. Letová aktivita postižených včelstev se sníží o 30 %, výnos medu a produktivita opylení se sníží o 25 %. Včelstvo se špatně rozvíjí, plodová plocha se sníží 4-8 krát, z vajíček, nakladených matkou zahyne 10-20 % (ve srovnání s 1% normou)

ještě před vylihnutím larev. Matky, odchované v napadených včelstvech bývají nemocí také postiženy. Pomalu se pohybují a často padají na dno úlu; jsou špatně přijímány do nových včelstev. Byly zaznamenány výměny nemocných matek, přidaných do včelstev. Výměna se uskutečňuje vyskytuje za 2-6 týdnů po přidání, a nezávisí na fázi onemocnění; mladé infikované matky žijí v průměru 25,3 dní (Laskotova a kol., 1980).

Střední délka života nemocných včel je téměř poloviční než u zdravých. Včely mají větší pravděpodobnost, že zahynou v úlu během zimy. Na jaře a počátkem léta včely hynou v terénu. Intenzivní oslabení včelstev na jaře často vede ke snížení teploty v hnízdě a snížení rezistence u larev (Grobov a kol., 1987).

Existují dvě formy onemocnění nose móza, kterou způsobuje *Nosema apis*: typická a skrytá (latentní). První z nich je pozorována poměrně zřídka, obvykle v oblastech s mírným a chladným podnebím. Při typickém projevu nosematózy, přechází nemoc v létě do latentní formy. Latentní forma je zaznamenávána poměrně často ve všech oblastech světa, ale zvláště v subtropických a tropických oblastech. Nosematóza se často vyskytuje ve spojení s dalšími onemocněními a přispívá k rozvoji infekce virem chronické paralýzy u včel. Pokud jsou v krmivech pro včely přítomny bakteriální patogeny (*Hafnia alvei*, *Bacillus. alvei*, *Bacillus. mesentericus viscosus*, *Pseudomonas apisepticum*), usnadňuje *Nosema* infekci těmito patogeny. Dospělé včely, napadené mikrosporidiiemi, mají také sníženou odolnost vůči určitým houbám (*Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Torulopsis dattila*, *T. stelata*) (Grobov a kol., 1987).

Existují rozdíly v sezónní dynamice onemocnění, způsobeného *N. apis* a *N. ceranae*. Zatímco infekce, způsobená *N. apis*, má typický sezónní průběh a často dochází k samouzdravování včelstev během léta, *N. ceranae* je ve včelstvu přítomna po celý rok. Nejvyšší výskyt zaznamenáváme během letních měsíců.. Infekce *N. ceranae* má často bezsymptomatický průběh. Na rozdíl od infekce *N. apis* nebývá nemoc provázená průjmem. Nakažené včely hynou většinou mimo úl. Průběh onemocnění bývá mnohem rychlejší než u nákazy *Nosema apis* (Šilhán, 2017).

3.7 Diagnostika

Nosematóza se diagnostikuje na základě klinických příznaků (špatný rozvoj včelstva, výkaly v úle). Nosematóza by měla být odlišena od neinfekčního průjmu včel (chybí patogen) nebo chemické toxicity (kdy se v trávicím traktu nalézají toxická látka).

Laboratorně se provádí mikroskopie vodné suspenze zhomogenizovaného trávicího traktu nemocné nebo uhynulé včely (objevují se oválné spory nosemy). Včely nakažené nosematózou mají žaludek šedo-bílé barvy, zvětšeného objemu. Pomocí PCR můžeme detekovat mikrosporidiální infekce ve všech fázích životního cyklu patogena (Weiss a Vossbrinck, 1999).

3.8 Terapie

Nejúčinnější prostředek pro léčbu mikrosporidiových infekcí u včel jsou léčiva na bázi fumagillinu. V některých zemích se při léčbě a prevenci nosematózy používá například přípravek Fumagillin-B ve formě těsta nebo sirupu.

V České republice a v celé Evropské unii je používání fumagilinu a dalších antibiotik u včel zakázáno kvůli riziku kontaminace včelích produktů. (Papežíková a kol., 2015).

3.9 Zootechnická opatření při nosematóze, prevence

Jelikož se výnos ze včelnice dosahuje díky zdravým včelstvům, uskutečňují se různá profylaktická opatření. V některých zemích při vyskytu nosematózy zavádějí karanténní opatření, v jiných zemích se kvůli této chorobě nastavují určité limity. Aby se zamezilo šíření původce nesmí být včelsta napadená nosematózou přemísťována jinam. Stejně tak se nesmějí používat chovná včelstva, která nebyla předem testována na přítomnost patogenů. Samozřejmě všechny úly, plásty a další zařízení musí být dezinfikovány. Nedoporučuje se používání rojů neznámého původu. Při koupi nových včel se doporučuje umístit je do čistých úlů na dezinfikované rámky. Úly s nově založenými oddělkami se pečlivě utěplují a rozmísťují se cca 30 metrů od hlavní včelnice.

Je známo, že mladé včely jsou odolnější vůči infekci, než ty starší. Proto klíčovým bodem při předcházení chorobě je obnovení populace přidáním mladých matek. Matky před přidáváním pečlivě zkontrolujeme, doprovodné včely se eliminují. Včely je dobré chovat v utěplených úlech, které jsou umístěny na stojanech, na stanovištích, která jsou dobře osvětlena sluncem a chráněna před větrem. Slabým včelstvům se v úle zužuje prostor pomocí přepážky, nebo se spojují dohromady. V pozdním podzimním, zimním a předjarním období se včely nesmějí rušit. Po jarním proletu za příznivého počasí se včelstvo přesazuje do čistých dezinfikovaných úlů. Starší plásty, nevhodné pro další využití (3 roky a víc) se zlikvidují, plásty s fermentovaným nebo zkrystalizovaným

medem se také odstraňují, stejně jako prázdné plásty se stopami včelích výkalů. Z dřevěných částí úlu se odstraňují skvrny a prach. Po mechanickém očištění dřevěných rámků se plásty vhodné pro další použití dezinfikují (Grobov a kol., 1987).

Důležité je také správné krmení včel. Do krmiva se přidávají komplexní minerály a vitaminy. Na jaře je potřeba, aby včely konzumovaly plnohodnotný pyl. Někdy se přidávají bílkovinná krmiva (droždí, práškový cukr a med v poměru 4:6:6 smíchané dohladka, nebo cukerný sirup napůl s 10-20% čerstvým mlékem (Miller, Popov a kol., 1982). Je velmi důležité, aby byl včelstvům v průběhu celého období rozvoje zajištěn přísun bílkovin. Pro stimulaci kladení vajíček má vysoký účinek pravidelné podávání malých dávek (200-250 g) čistého medu ze starých zásob. Včely se nesmějí krmit medem od včelstev, postižených nosematózou. Před zazimováním mají být včelstva zásobena sacharidovými krmivy v množství 18-30 kg v závislosti na klimatických podmínkách země. Nahrazování medu cukrem musí být provedeno včas; cukerný sirup by měl být důkladně zpracován a umístěn v buňkách ještě před vytvořením tzv. včelího chumáče. Staré matky (tříleté a starší) se vyměňují za nové. Slabá včelstva se ze včelnice vyřazují. Aby se zabránilo šíření nosematózy na včelnici, měly by být úly natřeny barvami, dobře diferencovanými včelami (bílá, žlutá nebo modrá) a umístěny na vzdálenosti 3-4 m od sebe. Na včelnici je třeba zabránit loupeži. Udržují se pouze silná včelstva. Nelze přemísťovat plásty se včelím plodem nebo krmivem ze slabých včelstev do silných (Grobov a kol., 1987).

Musí se hlídat čistota okolních lokalit a všechny odpadky se musí spálit. Úly se vybavují individuálními napáječkami nebo se na dobře osvětlených prostorách umístí skupinové napáječky s tekoucí vodou, zároveň by včely měly mít přístup k mírně osolené vodě. V boji proti nemoci má velký význam také včasná identifikace nemocných včelstev. Do veterinární laboratoře se zasílají vzorky včel od včelstev, podezřelých na onemocnění. V případě nepřítomnosti podezřelých se zasílají vzorky od cca 10 % od včelstev, přítomných na včelnici. Hlavní metodou prevence nosematózy je systematická každoroční dezinfekce plástů (Grobov a kol., 1987).

3.10 Odolnost spor *N. apis* a *N. ceranae* v prostředí

Spory jsou velmi odolné. Ve výkalech přežijí více než 2 roky, v medu více než 1 rok. K jejich odolnosti přispívá chitin, přítomný v jejich obalu, který dokazuje blízkost

hmyzomerek s houbami. Spory mohou být zabity zmrazením pokud je vystavíme nízké teplotě dlouhou dobu. *Nosema ceranae* je oproti *N. apis* více citlivá na nižší teploty, spory *N. ceranae* mohou být zabity například umístěním kontaminovaných plástů na delší dobu do mrazničky (Chen a kol., 2009).

Spory je možno zničit desinfekčním prostředkem Savo, který se dává dle návodu. Savo účinkuje také proti vegetativním formám plísní, kvasinkám, řasám. Fungicidní a desinfekční účinnost se dostaví okamžitě po aplikaci. Usnadňuje likvidaci původců chorob i na obtížně přístupných místech, pokud je aplikován mechanickým rozprašovačem (Veselý, 2003, Ritter, 2006).

Jedno z hlavních preventivních opatření proti nemocem jako je nosematóza by měla být konstrukce úlu, která umožňuje snadnou dezinfekci (Kamler a kol., 2011).

K dezinfekci plástů ve včelstvu se používá kyselina mravenčí, nejčastěji v podobě přípravku Formidol. Plásty bez včel se dezinfikují také parami kyseliny octové nebo formaldehydem. Úly se dezinfikují pomocí 5% louhu sodného nebo draselného. (Veselý a kol., 2003, Ritter, , 2006). Roztoky louhu je nutné použít čerstvé a co nejteplejší.

3.11 Organické kyseliny ve včelařství

Organické kyseliny se ve včelařství používají především k boji proti ektoparazitickým roztočům *Varroa destructor*. Nejčastěji se používá kyselina šťavelová a kyselina mravenčí. Každá organická kyselina má své výhody i nevýhody. Při ošetření se musí postupovat přesně podle předepsaných pravidel a dodržovat správné dávkování (Friedrich Pohl, 2012).

3.11.1 Kyselina mravenčí

Kyselina mravenčí je za pokojové teploty kapalná látka; aplikuje se odparem. Odpařovací systémy kyseliny mravenčí se v poslední době stávají velmi používaným a perspektivním ošetřením proti varroóze včel a působí i jako doplňkové opatření proti nosematóze. Kyselina mravenčí je jediná organická kyselina, která účinkuje i na roztoče v plodu. Ale má spoustu nevýhod: krátkodobě zastavuje plodování, snadno poškodí vajíčka, nejmladší larvy a vylíhlé včely. Kyselina mravenčí se nesmí používat během

krmení tekutým krmivem nebo v období vlhka. Za vysokých venkovních teplot může dojít k předávkování, především u včelstev v malých úlech.

Krátkodobé ošetřování se provádí pomocí odparných desek nebo dlouhodobým odpařovačem, který ale je ve včelstvu jen několik dní místo několika týdnů. U produkčních včelstev se často používají dlouhodobé odpařovače (Klíma, 2010).

3.11.2 Kyselina šťavelová

Kyselina šťavelová se včelám aplikuje sublimací, postřikem nebo pokapem. Kyselina šťavelová má vysokou účinnost proti roztočům ve včelstvu bez plodu, dobře působí i na roztoče v roji a smetenci. Ale nemá žádný účinek na roztoče v zavíčkovaném plodu. Používá se především v zimě, když jsou včelstva bez plodu (Pohl, 2012).

3.11.3 Kyselina octová

Kyselina octová se ve včelařství používá v boji se zavíječem voskovým. Je účinná i proti sporám *Nosema apis* (Higes a kol., 2008). Používá se k dezinfekci včelařského vybavení a úlů, v nichž nejsou přítomny včely. Je agresivní vůči kovům.

3.12 Fluorescenční mikroskopie, fluorescenční barviva

Fluorescenční mikroskopie využívá schopnosti fluorescenčních barviv absorbovat světlo a vyzařovat světlo o vyšší vlnové délce. Umožňuje zobrazit určité látky a struktury, obsažené v buňkách často v minimálním množství. Principem je vazba fluorochromu na určitou buněčnou složku, která pak např. v modrém excitačním světle září světlem žlutým. Excitační světlo musí být odstraněno bariérovým filtrem, aby nevadilo při pozorování. Bariérový filtr zachytí modré excitační světlo a do okuláru propustí jen žluté světlo vyzařované vzorkem. Výsledkem je tedy obraz žlutě zářících struktur v temném poli. K vytvoření obrazu se použije pouze nezbytně nutná část fluorescenčního světla. Obraz se může pozorovat nebo se zachytí na mikrofotografii. Důležitá je správná volba vlnové délky a vhodných optických filtrů. Fluorescenční mikroskop má čtyři základní součásti : zdroj světla, excitační filtr, fluorescenční preparát, bariérový filtr.

Fluorofory se dělí na vnitřní (fluoreskující látky, přirozeně přítomné v pozorovaném vzorku) a vnější (materiál sám o sobě nefluoreskuje, fluorescence vzniká až při použití fluorescenční sondy nebo značky).

Mezi nejčastěji používaná barviva patří zejména DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), akridinová oranž a propidium jodid.

DAPI je barvivo, které se po průchodu buněčnou membránou pevně váže na oblasti v DNA, bohaté na A - T a po ozáření UV světlem dochází k excitaci a následně emisi fluorescence. Pokud se použije ve vysoké koncentraci, proniká do živých i mrtvých buněk. Do živých buněk však proniká méně ochotně.

Propidium jodid prochází přes poškozenou plazmatickou membránu mrtvých buněk, do živých buněk neprochází. Molekuly propidium jodidu se zabudovávají do molekuly DNA; po vazbě na DNA silně zvyšují svoji fluorescenci. Barvení propidium jodidem je jedna z nejpoužívanějších metod k určování životnosti buněk. Používá se i ke stanovování množství DNA v buňce a rozlišování jednotlivých stadií buněčného cyklu (Bartůňková, Paulík a kol., 2011).

4. Materiál a metodika

4.1 Izolace spor

První etapa byla příprava vzorku. Spory *Nosema ceranae* byly získány z přirozeně infikovaných včel. Zadečky 80 včel byly zhomogenizovány v 10 ml vody. Pak byl homogenát zfiltrován přes dvojitou vrstvu gázy. Poté byla provedena gradientová centrifugace na médiu Percoll do mikrozkušavek byl napipetován 100% Percoll a postupně převrstven 75%, 50% a 25% Percollem, ředěným v destilované vodě. Na hladinu byl opatrně napipetován homogenát. Byla provedena centrifugace (10000 g, 10 minut při teplotě 25° C). Supernatant byl odstraněn, získaný pelet byl rozsuspendován ve fosfátovém pufru (PBS) a celý proces byl opakován ještě jednou. Pomocí gradientové centrifugace na Percollu byla získána suspenze spor o vysoké čistotě. Spory byly rozsuspendovány v PBS a uskladněny v chladničce.

4.2 Druhové určení spor, barvení fluorescenčními barvivy, kontrola životnosti spor

Získané spory byly srovnány se standardy z archivu Ústavu ekologie, chorob zvířet, ryb a včel VFU a mikroskopicky identifikovány jako *Nosema ceranae*. Spory byly napipetovány na podložní sklíčka a obarveny fluorescenčními barvivy.

Byly použity fluorochromy DAPI a propidium iodide (PI). Živé spory, obarvené DAPI, fluoreskují modře; mrtvé spory fluoreskují intenzivně modro-bíle. Propidium iodidem se zviditelní jen mrtvé spory (fluoreskují červeně), do živých buněk propidium iodide neprochází. Oba fluorofory byly použity v koncentraci 0,1 mg/ml.

4.3 Citlivost spor na pH

Pro stanovení citlivosti spor k pH byla suspenze spor rozpipetována do mikrozkušavek a do jednotlivých mikrozkušavek bylo přidáno 1 ml fosfátového pufru o pH 3-12. Po hodině byly spory zcentrifugovány a supernatant odstraněn. Spory byly promyty v PBS o pH 7,1 zcentrifugovány, rozsuspendovány ve 30 µl PBS, obarveny fluorescenčními barvivy a pomocí fluorescenční mikroskopie byla vyhodnocena jejich životnost.

4.4 Citlivost spor na vysokou teplotu

Spory byly tepelně ošetřeny ve vodní lázni při 100° C po dobu 15 minut a 30 minut. Poté byly spory zcentrifugovány, rozsuspendovány ve 30 µl PBS, obarveny fluorescenčními barvivy a analyzovány pod fluorescenčním mikroskopem.

4.5 Citlivost spor k organickým kyselinám

Suspenze spor byla napipetována na skleněné Petriho misky. Po zaschnutí suspenze byly misky se sporami umístěny do prázdných nástavků. V každém nástavku byla umístěna papírová vata, na kterou bylo napipetováno 20 ml 99% kyseliny octové, anebo 20 ml 85% kyseliny mravenčí. Nástavky byly utěsněny a spory byly ponechány uvnitř po dobu 4 dnů. Experiment probíhal při laboratorní teplotě.

Další misky se sporami byly ošetřeny kyselinou šťavelovou, aplikovanou sublimací. Misky se zaschlými sporami byly umístěny do úlového prostoru, který se skládal z úlového dna, prázdného nástavku a víka. Přes česno byla dovnitř vsunuta sublimační pánvička, na které byl nasypán 1g krystalické kyseliny šťavelové. Česno bylo utěsněno a pánvička byla na 2,5 minuty připojena na 12V autobaterii. Pak byla pánvička odpojena od baterie a ponechána v úle další dvě minuty. Misky se sporami byly ponechány uvnitř po dobu 4 dnů. Experiment probíhal při laboratorní teplotě.

Připojením na autobaterii se pánvička zahřeje a dojde k sublimaci kyseliny šťavelové. Při laboratorní teplotě páry kyseliny šťavelové rychle přejdou zpátky do pevné fáze a všechny povrchy v úle i misky se sporami se pokryjí jemnými krystalky.

Po ukončení expozice byly misky se sporami vyndány z nástavků. Z misek, ošetřených kyselinou šťavelovou, byly opatrně ořeny krystalky (z celého povrchu, kromě místa, na kterém byly napipetovány spory). Spory byly z misek opláchnuty 1 ml PBS a zcentrifugovány. Supernatant byl odstraněn, spory byly rozsuspendovány ve 30 µl PBS, obarveny fluorescenčními barvivy a analyzovány pod fluorescenčním mikroskopem.

4.6 Vyhodnocení životnosti spor

U barvení DAPI byly v zorném poli spočítány modře fluoreskující spory (živé) a spory, fluoreskující intenzivně modro – bíle (mrtvé).

U barvení propidium jodidem bylo totéž zorné pole vyfotografováno dvakrát – jednou pod fluorescenčním filtrem a jednou pod bílým světlem. Byly spočítány všechny spory,

přítomné v zorném poli (snímek pod bílým světlem) a poté všechny červeně fluoreskující (mrtvé) spory (snímek pod filtrem). Bylo spočítáno % mrtvých spor ve vzorku. V každém vzorku bylo vyhodnoceno minimálně 200 spor.

4.7 Statistické zpracování dat

Statistické zpracování dat bylo provedeno v programu Microsoft *Excel*. Data v grafech představují průměr $\pm$ SEM. Byl použit f test k vyhodnocení rovnosti nebo nerovnosti rozptylů. Statistická významnost byla vyhodnocena pomocí Studentova t testu.

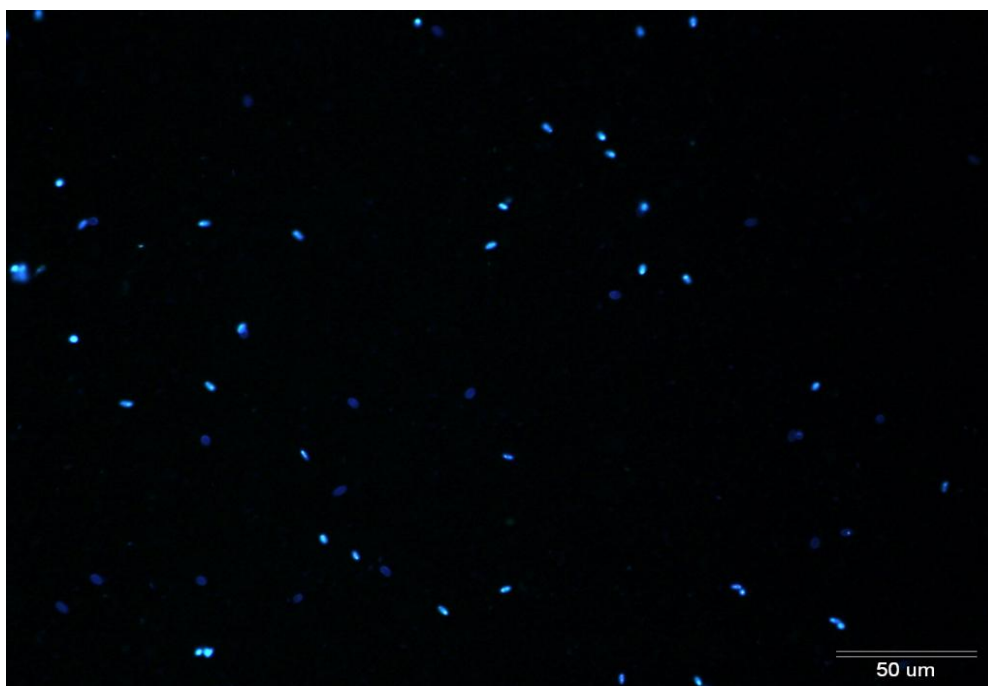
5. Výsledky a diskuze

Nosematóza je v současné době jedním z nejrozšířenějších onemocnění dospělých včel. Kamler (2011) uvádí, že v posledních letech ustupuje druh *Nosema apis* a jeho místo zaujímá *Nosema ceranae*. Podobný vývoj je pozorován po celém světě. *N. ceranae* se vyskytuje celoročně, infekce je obtížněji rozeznatelná a má rychlejší vývoj.

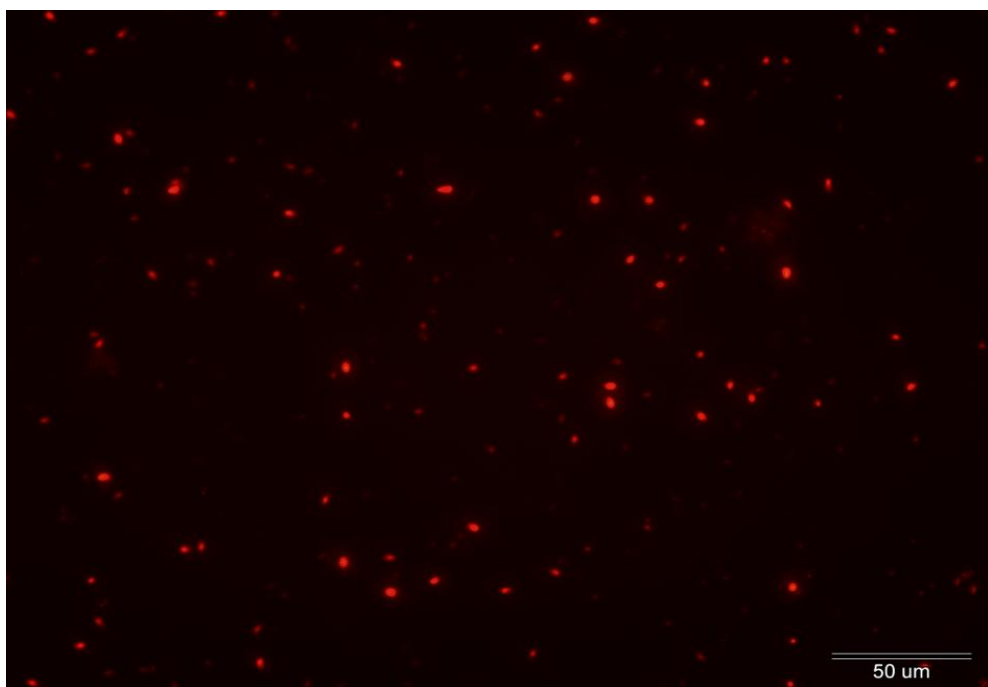
Oba původci nosematózy jsou citliví na antibiotikum fumagilin. Žádný přípravek na bázi fumagilinu však není v ČR registrován pro léčbu včel, neboť přísné normy EU zakazují u včel užívání jakýchkoliv antibiotik (Hrabák, 2007). Včelaři tedy mohou bojovat s nosematózou jen pomocí zootechnických opatření a dezinfekce. Pro jiné druhy mikrosporidií se používají různé dezinfekční metody, které zahrnují UV záření (Huffman et al., 2002), zahřátí na bod varu (Green a kol., 2000) nebo použití chemické dezinfekce, příkladem je ethanol a hydroxid sodný (Santillana-Hayat a kol., 2002). Pro likvidaci spor *N. apis* se doporučuje tepelná dezinfekce anebo dezinfekce parami ledové kyseliny octové (Cantwell, Shimanuki, 1970; De Ruiter, Van Der Steen, 1989). Citlivost spor *N. ceranae* k dezinfekčním postupům zatím nebyla testována s výjimkou citlivosti k vysokým a nízkým teplotám (Fenoy a kol., 2009).

5.1 Barvení spor *N. ceranae* fluorescenčními barvivy

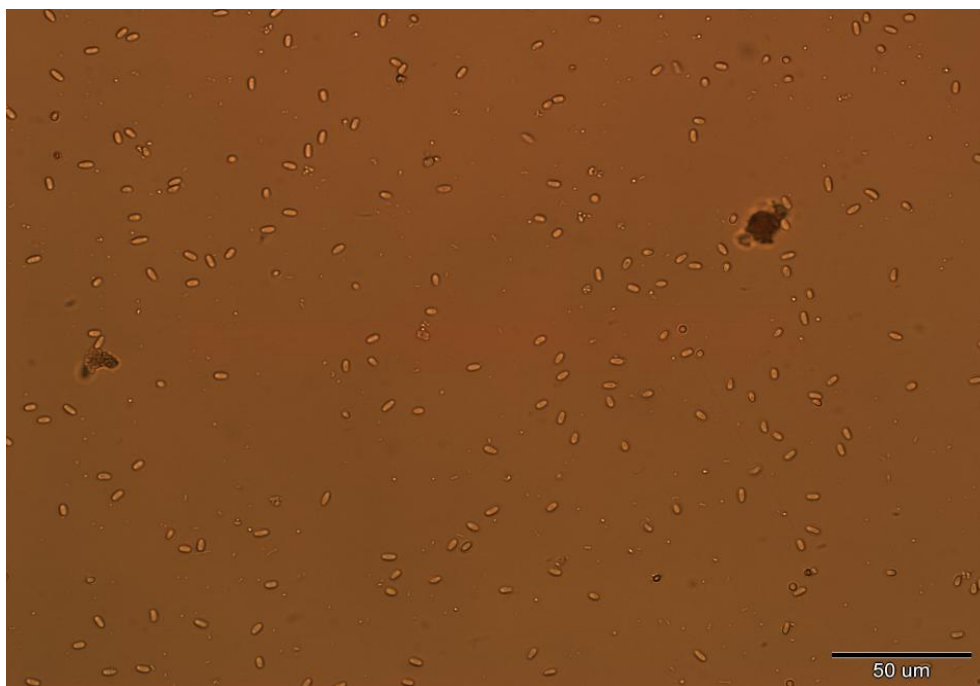
Aby bylo možné vyhodnotit účinnost dezinfekčních činidel na spory *Nosema* spp., je třeba mít k dispozici metody k rozlišení živých a mrtvých spor. Fluorescenční barviva jsou považována za nejcitlivější, nejpresnější a časově nejefektivnější způsob pro zhodnocení životaschopnosti buněk. (Schupp and Erlandsen, 1987; Green et al., 2000) V našem experimentu byla k barvení spor použita fluorescenční barviva DAPI a propidium iodide. McGowan (2012) uvádí, že tato barviva jsou k barvení spor mikrosporidií nejvhodnější. Kromě těchto barviv lze k rozlišování živých a mrtvých buněk použít například kombinaci propidium iodide a Sytox green (Green a kol., 2000). Fenoy a kol. (2009) úspěšně použili pro rozlišení živých a mrtvých spor nosemy kombinaci Sytox green a DAPI.



Obrázek 1. Spory *Nosema ceranae* obarvené fluorescenčním barvivem DAPI. Zvětšení 400x. Živé spory fluoreskují modře, mrtvé intenzivně modro – bíle.

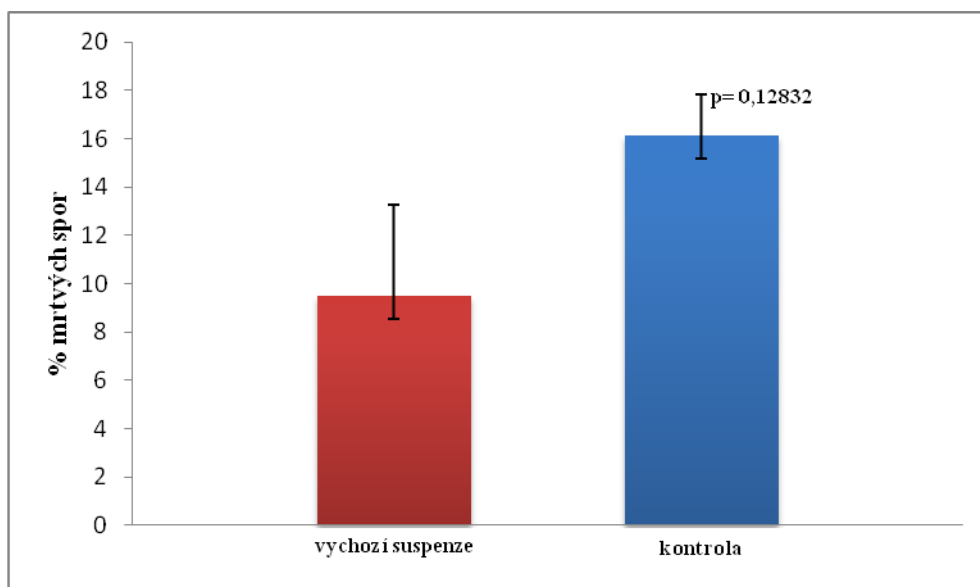


Obrázek 2. Spory *Nosema ceranae* obarvené fluorescenčním barvivem propidium iodide. Zvětšení 400x. Mrtvé spory fluoreskují červeně, živé se nezobrazí.



Obrázek 3. Totéž zorné pole jako na obrázku 2, vyfotografované pod bílým světlem. Zvětšení 400x.

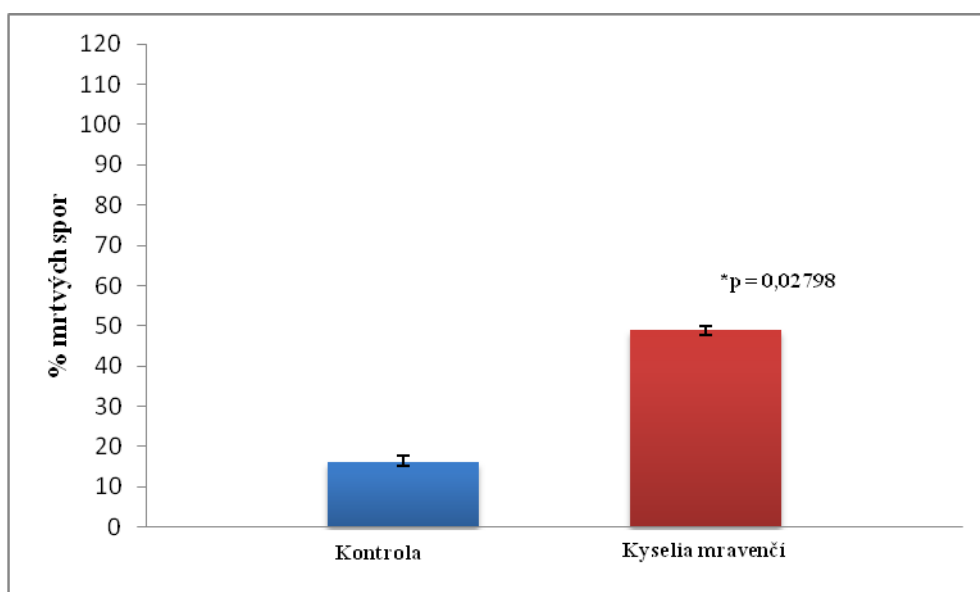
5.2 Citlivost spor *N. ceranae* k vyschnutí



Graf 1. Procento mrtvých spor ve výchozí suspenzi a ve vzorku spor po 4 dny zaschlých na miskách, které byly v experimentu použity jako kontrola. Data představují průměr ± SEM.

Graf 1 ukazuje, že mezi výchozí suspenzí (sporami, vyizolovanými pomocí gradientové centrifugace) a sporami, po čtyři dny zaschlými na miskách, není statisticky významný rozdíl. To souhlasí s výsledky Fenoy a kol. (2009), kteří testovali odolnost spor *N. ceranae* k vyschnutí a uvádějí, že po třech týdnech nebyl mezi životností kontrolních a vyschlých spor statisticky významný rozdíl.

5.3 Citlivost spor *N. ceranae* ke kyselině mravenčí



Graf 2. Procento mrtvých spor po čtyřdenní expozici parám kyseliny mravenčí. Data představují průměr $\pm$ SEM.

Z Grafu 2 můžeme vidět, že kyselina mravenčí byla účinná proti sporům *N. ceranae*. Čtyřdenní expozice parám kyseliny mravenčí v našem experimentu významně zvýšila procento mrtvých spor ve vzorku.

Citlivostí spor *N. ceranae* k parám kyseliny mravenčí se zabývala Papežíková a kol. (2016). V její práci byl testován vliv dlouhodobé expozice 65% kyselině mravenčí a krátkodobé expozice 85% kyselině mravenčí. Na rozdíl od naší práce zde byla kyselina mravenčí aplikována do úlů se včelami. Do úlů byly umístěny krátkodobé odpařovače kyseliny mravenčí (Formidol 40) nebo dlouhodobé odpařovače kyseliny mravenčí (Nassenheider). Efekt kyseliny byl závislý spíše na její koncentraci, než na délce expozice. Po čtyřdenní expozici 85% kyselině mravenčí bylo devitalizováno 25 % spor,

zatímco třítydenní expozice 65% kyselině mravenčí neměla významný efekt. V našem případě bylo usmrceno 48,8% spor za čtyři dni.

Přípravky pro včely na bázi kyseliny mravenčí jsou určeny především ke tlumení varroázy. V ČR se používá přípravek Formidol 40. Jedná se o odparné desky s kyselinou mravenčí, které se vkládají do úlu. Do podmetu úlu se v první fázi umístí deska v regulačním obalu. Kyselina mravenčí se odpařuje z pěti otvorů až do odpaření poloviny obsahu. Pak se z desky odstraní regulační obal. Doba ošetření u tohoto systému je 2 dny s regulačním obalem a další 2 dny bez obalu. Celkem tedy ošetření trvá 4 dny, takže se jedná o krátkodobý odpařovací systém. Přípravek se používá jen, když v úle není konzumní med. Výrobce uvádí účinnost tohoto přípravku proti sporám *Nosema* spp., bez specifikace druhu (web ÚSKVBL)

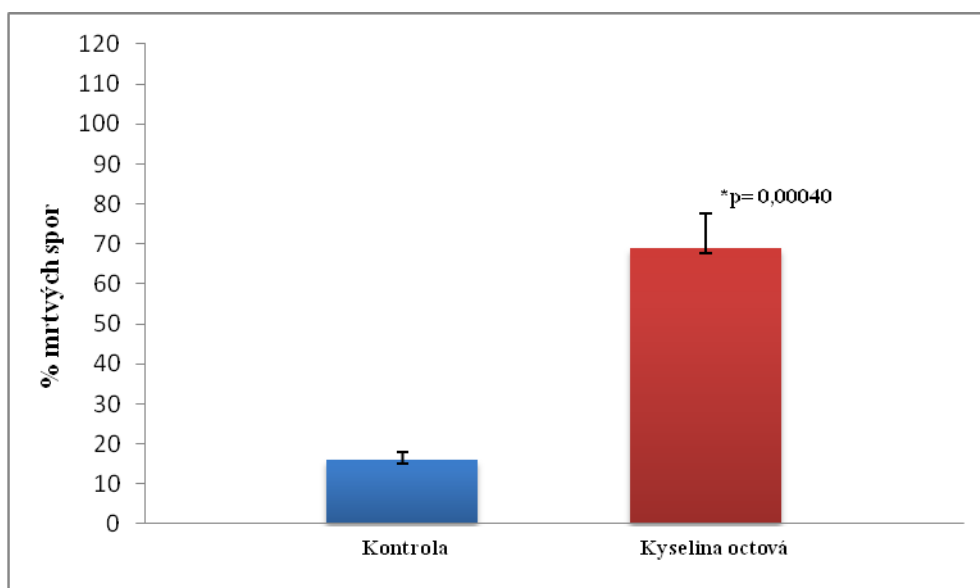
V Německu se využívá odpařovač Nassenheider. Je vyroben z potravinářského polypropylenu s dobrou odolností vůči kyselině. Je určen pro aplikaci 65 % kyseliny mravenčí. Celková doporučená dávka kyseliny je 360 ml. Tato dávka se při průměrných letních teplotách odpaří přibližně za 10-14 dnů. Při chladnějších teplotách trvá odpařování déle. Z USA k nám byl v minulých letech dovezen odpařovač MiteGone™ založený na kapilárním efektu porézní hmoty. Doba odparu kyseliny se pohybuje v rozmezí 10 - 14 dnů, při letním použití při teplotách kolem 25 °C, při vyšších teplotách může být délka odparu kratší.

Profesionální včelaři v Evropě úspěšně používají kyselinu mravenčí proti larvám zavíječe voskového, které napadají uskladněné souše (prázdné včelí dílo bez zásob). Její účinek proti zavíječi je srovnatelný s účinkem kyseliny octové (Charrière a Imdorf 1999). Je i součástí různých preparátů proti nosematóze. Jedním z preparátů, určených k tlumení nosematózy je „Nozestat“. Je to veterinární preparát, určený k léčbě a prevenci nosematózy, zaregistrován je v Bulharsku. Obsahuje jód, jodid draselný, kyselinu mravenčí a stabilizátory. Další složkou jsou aromatizující látky, usnadňující přijetí léčiva včelami. Podává se perorálně v cukerném sirupu (1:1) anebo v medocukrovém těstě. Uvádí se účinnost 89% až 94% proti *Nosema apis* a do 74% proti *Nosema ceranae*. (K. Gurgulova, 2006). Vlivem kyseliny mravenčí na nosematózu se zabývali Underwood a Currie, kteří uvádějí, že kyselina mravenčí aplikovaná odparem tlumí rozvoj choroby (Underwood a Currie 2009). Testovali však vliv této látky na

rozvoj choroby u infikovaných včelstev, ne na životnost spor. Navíc šlo o včelstva se smíšenou infekcí *N. apis* i *N. ceranae*.

5.4 Citlivost spor *N. ceranae* ke kyselině octové

Kyselina octová se ve včelařství používá k dezinfekci plástů a úlů bez včel. Také se používá k likvidaci larev zavíječe voskového, podobně jako kyselina mravenčí (Grobov a kol., 1987). OIE manuál (2013) popisuje dezinfekci ledovou (99,8%) kyselinou octovou jako účinný postup k usmrcení spor *N. apis*. Pro *N. ceranae* zatím kyselina octová nebyla testována. Plásty se umístí do skříně nebo je přímo v nástavcích vystavíme do uzavřeného komínu. Nahoře na rámcích je miska s kyselinou octovou. Necháme stát 14 dní při teplotě vzduchu 15 °C. Na každý 1 m³ prostoru (skříně) se doporučuje použít 2 l kyseliny octové. Je třeba počítat s tím, že v kyselém prostředí bude docházet ke korozi kovových částí. (Veselý, V. a kol. 2003, Ritter, W., , 2006). V našem experimentu čtyřdenní expozice kyselině octové v dávce 20 ml/nástavek významně zvýšila procento mrtvých spor (Graf 3).



Graf 3. Procento mrtvých spor *N. ceranae* po čtyřdenním ošetření kyselinou octovou. Data představují průměr ± SEM.

Z Grafu 3 je vidět, že mezi kontrolou a kyselinou octovou je statisticky významný rozdíl. Kyselina octová usmrtila 68,8% spor, byla tedy účinnější než ostatní organické kyseliny, použité v pokusu (Graf 2, Graf 4).

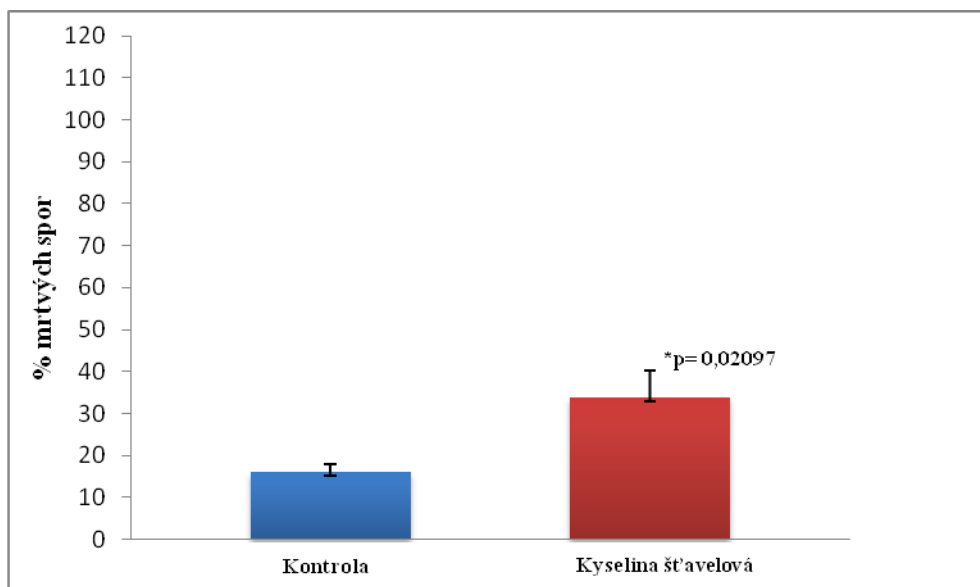
5.5 Citlivost spor *N. ceranae* ke kyselině šťavelové

Kyselina šťavelová se ve včelařství používá ke tlumení varroázy včel. V ČR dosud není kyselina šťavelová registrována jako léčivo pro včely. Řada včelařů však s kyselinou šťavelovou experimentovala v rámci klinické studie Mendelovy společnosti pro včelařský výzkum (Klíma, 2012).

Ve srovnání se syntetickými akaricidy (tau-fluvalinát, amitraz, acrinathrin) nezanechává kyselina šťavelová dlouhodobá rezidua ve včelích produktech (Johnson a kol., 2010).

Není vhodné použít tuto kyselinu v plodovém období, má v této době proti roztočům nízkou účinnost a navíc poškozuje plod. (Hatjina a Haristos, 2005). Pokud je ošetření provedeno v bezplodém období např. v listopadu, účinnost proti varroáze dosahuje až 97 % (Gregorc a Planinc, 2002).

Při použití proti varroáze se kyselina šťavelová aplikuje postřikem včel na plástech, pokapem (poléváním včel v uličkách) anebo sublimací. Po aplikaci sublimací zůstávají krystalky dlouhodobě v úle a je možné předpokládat, že budou mít kromě účinků na roztoče i dezinfekční účinek na plásty. Použití kyseliny šťavelové proti nosematóze testoval Nanetti a kol. (2015). Bylo zjištěno, že kyselina šťavelová významně tlumí rozvoj choroby u napadených včelstev. V jejich práci však nebyl testován vliv kyseliny šťavelové na životnost spor; byl sledován vliv kyseliny šťavelové na intenzitu a prevalenci infekce.

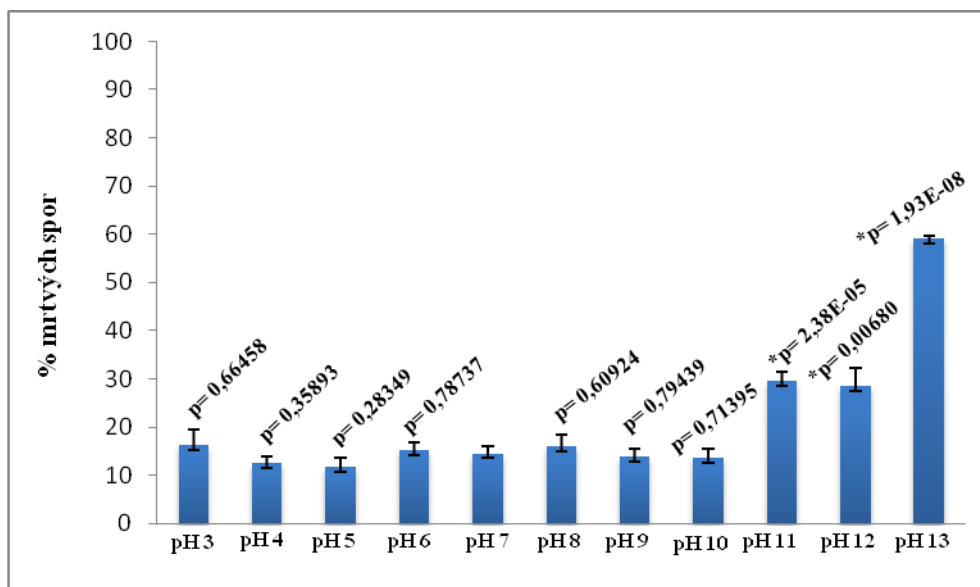


Graf 4. Procento mrtvých spor *N. ceranae* čtyři dny po ošetření kyselinou šťavelovou, aplikovanou sublimací. Data představují průměr $\pm$ SEM.

Schopnost kyseliny šťavelové usmrcovat spory *N. ceranae* testovala Papežíková a kol. (2016) která zjistila, že kyselina šťavelová, aplikovaná sublimací po třídní expozici usmrtila 27 % spor. Účinnost tedy byla poměrně nízká. Podobné výsledky byly získány i v našem experimentu. Za čtyři dny zvýšila kyselina šťavelová počet mrtvých spor ve vzorku na 33,9% (Graf 4). Při porovnání s dalšími kyselinami, použitými v našem experimentu tedy nebyla příliš efektivní. Kyselina šťavelová je však určena především k tlumení varroázy, schopnost devitalizovat spory *N. ceranae* je tedy příznivým účinkem navíc. Kyselina šťavelová se aplikuje v období, kdy včely zimují, stažené v chumáči. Lze tedy předpokládat, že krystalky zůstanou v úle, dokud se neoteplí a včely nezačnou vyletovat ven z úlu a spory budou kontaktu s kyselinou vystaveny dlouhodobě.

5.6 Citlivost spor k pH

Všechny testované látky jsou organické kyseliny. Proto byla testována i citlivost spor k alkalickému pH.



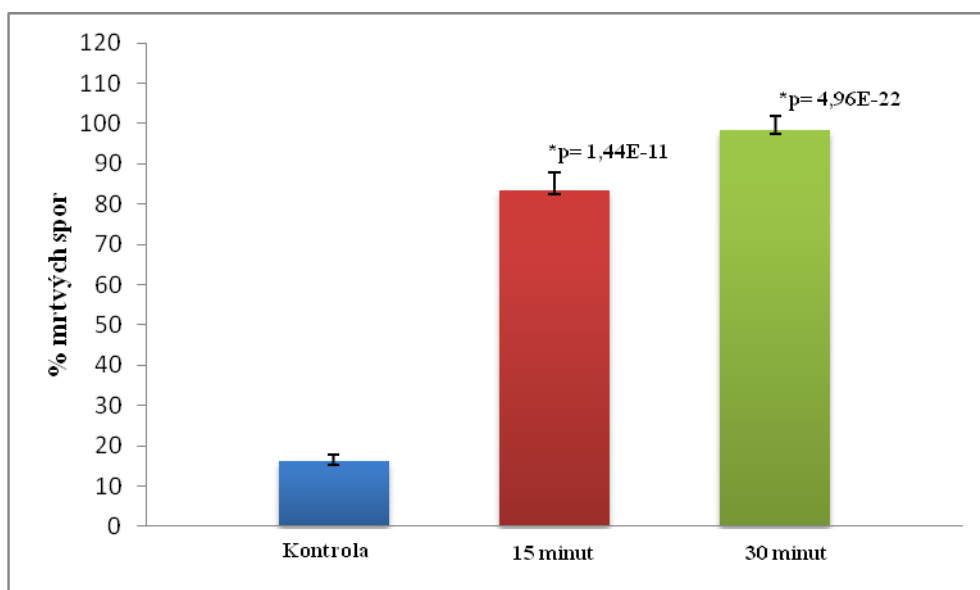
Graf 5. Spory *Nosema ceranae* po hodinové inkubaci ve fosfátovém pufru o různém pH. Data představují průměr $\pm$ SEM.

Graf 5 ukazuje, že spory *N. ceranae* jsou citlivější k vysokému pH než k nízkému. U vzorků, které byly inkubovány v alkalickém prostředí (pH 11 – 13) se významně zvýšilo procento mrtvých spor oproti kontrole (pH 7), u ostatních vzorků nebyla zjištěna statistická významnost oproti kontrole. K dezinfekci zařízení, kontaminovaného spory *N. ceranae* by tedy bylo možné použít i alkalické dezinfekční prostředky.

Pazderka G. 2007 praktikoval profylaktickou dezinfekci ve včelařství alkalickým chlornanem sodným. Alkalický roztok chlornanu sodného je doporučován v ohniscích moru včelího plodu k dezinfekci zařízení, které se nebude pálit. Používá se roztok Sava (chlornan sodný) a louhu (hydroxid sodný nebo draselný) v poměru 0,5 kg louhu na 1 litr Sava. Vzniklý roztok je vhodný na dezinfekci rámků a dalšího vybavení. Je nutné provádět dezinfekci v odvětrávaném prostoru, protože z roztoku se uvolňuje chlor. K dezinfekci je možné použít i samotný vodný roztok louhu bez Sava. Roztoky o vyšších teplotách působí razantněji.

Ve všech případech nutné mít celokaučkové rukavice, mít zahalené celé tělo a obličej si nejlépe chránit průhledným štítem nebo alespoň brýlemi. Při přímém zásahu je třeba zasažené části těla okamžitě opláchnout vodou (Pazderka, 2007).

5.7 Ošetření teplem



Graf 6. Účinnost ošetření teplem na spory *N. ceranae*. Data představují průměr $\pm$ SEM.

V našem experimentu se ukázalo, že ošetření teplem bylo ze všech testovaných postupů nejvíce účinné. Po 15 minutách bylo usmrceno 83,5 % spor, po 30 minutách už téměř všechny (98,3 %).

Fenoy a kol.. (2009) pozorovali životaschopnost spor *N. ceranae* při teplotě 60 ° C až - 20 ° C (celkový rozsah 80° C). K rozlišení živých a mrtvých spor použili fluorescenční barviva DAPI a Sytox Green (Fenoy a kol., 2009).

Podle jejich studie byla po 6 hodinách při 60°C průměrná životnost spor *N. ceranae* 92,1%. Naopak spory *N. apis* kompletně zahubí 15 minutové zahřátí na 60°C (Cantwell a kol., 1970). Citlivost spor *N. ceranae* testovala ve své práci také McGowan (2012). Spory byly vystaveny teplotě 80 °C na 5, 15, 30 a 60 minut. Významný účinek (96,8% mortalita spor) byl pozorován až po 60 minutách (McGowan, 2012).

Fenoy a kol. testovali i citlivost spor obou druhů ke zmrazení. Zjistili, že spory *N. ceranae* jsou sice tolerantnější k vyšším teplotám, ale více citlivé na nízkou teplotu. Vyšší citlivost *N. ceranae* k nízkým teplotám uvádí ve svém souborném článku i Oliver

(2009). To je důležitý faktor pro opakované použití a ukládání starých plástů (Fries, 2010).

Dezinfekce teplem se ve včelařství používá často. Teplem je možné dezinfikovat úly i plásty. Plásty stačí naskládat ve svislé poloze do termostatu, kde se jeden den udržuje teplota 50 °C. Tento dezinfekční postup se používal u plástů kontaminovaných sporami *N. apis* (OIE manuál, 2013). Proti sporám *N. ceranae* je však neúčinný (Fenoy a kol., 2009). U plástů tedy nelze při napadení *N. ceranae* použít tepelnou dezinfekci – k devitalizaci spor je třeba použít vyšší teplotu, při které by plásty roztavily (včelí vosk má teplotu tání 62 - 65°C (Drašar, 1978). Nástavky se dezinfikují ponořením do parafínu, tak, aby došlo k prohřátí dřeva na teplotu 150 °C až 180 °C po dobu 3-5 minut. Tento postup účinkuje i na spory moru včelího plodu (Dobbelaere a kol., 2001)

6. Závěr

Všechny otestované látky byly schopny usmrčovovat spory mikrosporidie *Nosema ceranae*. Ani jedna z testovaných látek však neusmrtila všechny spory, přítomné ve vzorcích. K usmrcení většiny spor došlo jen při tepelném ošetření (30 minut při 100°C). Nejlepší účinky byly pozorovány u kyseliny octové. Kyselina mravenčí měla slabší devitalizační efekt než kyselina octová. Nejméně účinná byla kyselina šťavelová. Kyselina mravenčí a šťavelová se však ve včelařství používá především ke tlumení varroázy. Schopnost usmrčovovat spory *Nosema ceranae* je tedy u těchto látek doplňkovým příznivým účinkem.

7. Literatura

BARTUŇKOVÁ, J., PAULÍK, M., 2011. Vyšetřovací metody v imunologii. 2., Vyd. 2. upr. a dopl. vyd. Grada Publishing. ISBN 978-80-247-3533-7.

COPLEY, T. R., JABAJI, S. H., 2012. Honeybee glands as possible infection reservoirs of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in naturally infected forager bees // J.Appl. Microbiol. V. 112. P. 15-24.

DOBBELAERE, W., DE GRAAF, D.C., W., REYBROECK, W., DESMEDT, J.E. 2001. Disinfection of wooden structures contaminated with *Paenibacillus* larvae subsp. Larvae spores. Journal of Applied Microbiology, 91, s. 212-216.

DRAŠAR, J., A KOL., 1978, Včelařství, Vyd.Státní zemědělské vydavatelství, Praha, , ISBN: 07-079-78 - O4/53, s. 312.

FENOY, S. C., RUEDA, M., HIGES, M., MARTÍN-HEMÁNDEZ, R., and DEL AGUILA, C. 2009. High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. Applied and Environmental Microbiology. 75: 6886-6889.

FRIES, I., MARTÍN, R., MEANA, A., GARCÍA-PALENCIA P., HIGES M. 2006. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees, J. Apic. Res. 45, 230–233.

FRIES, I., FENG, F., DA SILVA, A., SLEMENDA, S. B., PIENIAZEK, J. 1996. *Nosema ceranae*.sp.(Microspora,Nosematidae). Morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). Eur. J. Protistol. 32:356-365.

GISDER S., HEDTKE, K., MOCKEL N., FRIELITZ M. C., LINDE A., GENERCH E., 2010. Five-year cohort study of *Nosema spp* in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? // Appl. Environ.Microbiol. V. 76. P. 3032-3038.

GREEN, L. C., LEBLANC, P. J, and DIDIER, E. S. 2000. Discrimination between viable and dead *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidian) spores by dual staining with Sytox Green and Calcofluor White M2R. Journal of Clinical Microbiology. 38: 3811-3814.

GREGOS, A., PLANINS, I, 2001, Acaricidal effect of oxalic acid in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. Apidologie 32: 333-340.

GROBOV, O. F., SMIRNOV, A. M., POPOV, E.T., 1987. Spravochnik: Bolezni i vrediteli medonosnyh pchel. Vyd. Agropromizdat.

GURGULOVA, K., 2006. Jak nozestatem zastavit rozvoj nosematozy na jaře. Dostupné z: http://primavet.com/sites/default/files/Zdrava_pchela_9.pdf

HATJINA, F., TSOKTOURIDIE, G., BOUGA, M., CHARIETOE, L., EVANGELOU, V., AVTZIE, D., MEEUS, I., BRUNAIN, M., SMAGGHE, G., DE GRAAF, D. C., 2011. Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study, 108, s.131–134.

HIGES M., MARTÍN-HERNANDEZ R., BOTIAS C., BAILON E.G., GONZALES-PORTO A., BARRIOS L., DEL NOZAL M.J., PALENCIA P.G. and MEANA, A., 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Environment. Microbiol., 10, 2659–2669.

HIGES, M., MARTIN, R., MEANA, A., 2006. *Nosema ceranae* a new microsporidian parasite in honey bees in Europe. J. Invert. Pathol. 92:93-95.

HRABÁK J., 2007. *Nosema apis*, původce nose mózy, je nyní houbou. Včelařství, časopis ČSV, roč. 60, čís. 4, s. 100. ISSN 0042-2924.

HUANG, W. F., JIANG, J. H., CHEN, Y. W., WANG, C. H., 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. Apidologie 38: 30–37.

- HUANG, W.F., SOLTER, F. L. 2013. *Nosema apis* a *Nosema ceranae*: Srovnávací studie u hostitele včely medonosné, Odborné včelařské překlady, Praha, Český svaz včelařů, 2013 s. 24 – 26.
- HUFFMAN,, D. E., GENNACCARO, A., ROSE, J. B., and DUSSERT, B.W. 2002. Low- and medium-pressure UV inactivation of microsporidia *Encephalitozoon intestinalis*. Water Research. 36: 3161–3164.
- CHEN, Y. P., EVANS, J. D., MURPHY, C. A., GUTELL, R., ZUKER, M., GUNDERSEN-RINDAL, D. E., PETTIS, J. .S. 2009. Morphological, molecular and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*, J. Euk. Microb. 56, 142–147.
- CHEN, Y. P., EVANS, J. D., MURPHY, C., GUTELL, R., ZUKER, M., 2009. Morphological, molecular and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae* a microsporidian parasite isolated from the European honey bee *Apis mellifera*// J. Euk. Microbiol. 2009. V. 56. P. 142-147.
- DOBBELAERE, W., DE GRAAF, D.C., REYBROECK, W., DESMEDT, E., PEETERS, J.E., and JACOBS, F.J. Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. Journal of Invertebrate Pathology, 108, 131–134. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.07.003> .
- JOHNSON,, R.M., ELLIS, M.D., MULLIN, C. A., FRAZIER, M., 2010. Pesticides and honey bee toxicity. Apidologie 41: 312–331.
- KAMLER a kol., 2011. Rozšíření, patogeneze a návrh opatření v chovech včel ohrožených mikrosporidií *Nosema ceranae*. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/142451/Zaver_zprava_Nosema_2011_final.pdf
- KLÍMA, Z., 2010. Odpařovače kyseliny mravenčí při tlumení varroózy včel. Moderní včelař 2. Dostupné z: <http://docplayer.cz/29195504-Odparovace-kyseliny-mravenci-pri-tlumeni-varroozy-vcel-napsal-uzivatel-mvdr-zdenek-klima-sobota-15-kveten-31.html>

KUBIŠOVÁ, S., HÁLSBACHOVÁ, H., 1998. Včelařství, Brno, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, s. 86.

LASKOTOVA J., PEROUTKA M., VESELÝ, V., 1980. Nosema disease of honey bee queens (*Apis mellifica* L.). *Apidologie*, 11(2):153-161.

MALONE, L. A., GATEHOUSE, H. S., TREGIDGA, E. L. 2001. Effects of time, temperature and honey on *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae) a parasite of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *J. Invert. Pathol.* 77:258-268.

MCGOWAN, J., 2012. Viability Assessment and cryopreservation of the honey bee (*Apis mellifera*) parasite, *Nosema ceranae*. Thesis presented at the University of Guelph, Ontario, Canada. Dostupné na: <https://dspace.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/3801/Janine%20McGowan%20Thesis%20Defense%20Copy%20July%202012.pdf?sequence=3>. Accessed on 15 July 2013

NANETTI, A., RODRIGUEZ GARCÍA, C., meana, A., MARTÍN-HEMÁNDEZ, R., HIGES, M., 2015. Effect of oxalic acid on *Nosema ceranae* infection. *Research in Veterinary Science* 102, 167–172.

OIE Terrestrial Manual, 2013, Nosemosis of honey bee. Dostupné na: [file:///C:/Users/user/Downloads/2.02.04_NOSEMOSIS%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/user/Downloads/2.02.04_NOSEMOSIS%20(3).pdf)

PAPEŽÍKOVÁ, I., ONDRÁČKOVÁ, P., KOVÁČOVÁ, V., PETEROVÁ, H., ZACHOVÁ, A., 2016. Citlivost spor mikrosporidie *Nosema ceranae* k dezinfekčním činidlům. *Sborník konference IGA VFU*, s. 129 – 132.

PAPEŽÍKOVÁ, I., PALÍKOVÁ, M., NAVRÁTIL, S., PECKOVÁ, L., 2015. Nosematóza – přetrvávající a podceňovaný problém u včel. *Veterinářství* 2015;65:446-448.

PAZDERKA, G., 2007. Možná nebezpečí při dezinfekci ve včelařství a opatření proti nim. *Včelařské noviny*. Dostupné z <http://www.vcelarskenoviny.cz/index.php/joomla-page/12-pracovni-postupy/256-mozna-nebezpeci-pri-dezinfekci-ve-vcelarstvi-a-opatreni-proti-nim>

POHL, F., 2012. Úspěšné včelaření: Péče o včelstva a vytváření oddělků. Vyd. Víkend s.r.o. ISBN 987-80-7433-049-0.

SANTILLANA-HAZAT, M., SARFATI, C., FOUMIER, S., CHAU, F., PORCHER, R., MOLINA, J. M., and DEROUIN, F., 2002. Effects of chemical and physical agents on viability and infectivity of *Encephalitozoon intestinalis* determined by cell culture and flow cytometry. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 46: 2049-2051.

SCHUPP, D. G., and ERLANDSEN, S. L. 1987. A new method to determine *Giardia* cyst viability: correlation of fluorescein diacetate and propidium iodide staining with animal infectivity. Applied and Environmental Microbiology. 53: 704-707.

SMITH, M. L. 2012. The honey bee parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via food exchange? PLoS One. 7:e43319.

ŠVAMBERK, V., 2003. Záhadné včely: tajemný svět včel II. Vyd. 2. upr. a dopl. vyd. Líbeznice: Víkend. ISBN 80-7222-285-6.

ŠILHÁN, 2017. Hmyzomorka včelí – *N.apis* x *N.ceranae*. Dostupné z: <http://www.vcelaristruharov.cz/hmyzomorka-vceli-nosema-apis-ceranae/>

TICHOMIROV, V., 2016. Pchelovodstvo dliz nachinauchich. Vyd. AST, ISBN: 978-5-17-095643-2.

UNDERWOOD, R. M., CURRIE, R. W., 2009. Indoor winter fumigation with formic acid for control of *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) and nosema disease, *Nosema* sp. Journal of Economic Entomology. Oct;102(5):1729-36.

Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv [online]. [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: <http://www.uskvbl.cz/cs/registrace-a-schvalovani/registrace-vlp/seznam-vlp/aktualne-registrovane-vlp/detail-pipravku-vlp?Id=0910f7c7800bfad9>

RITTER, W., 2006, Die Biene. Dostupné z: <http://www.vcelarstvisedlacek.cz>

VESELÝ, V., 2003. Včelařství. Vyd. 2., upr. a dopl. Praha: Brázda. ISBN 80-209-0320-8.

WEISS, L. M., VOSSBRINEK, C. R. 1999. Molecular biology, molecular phylogeny and molecular diagnostic approaches to the microsporidia, p. 129-171. In: Witner M. and Weiss L. M.(eds.), The microsporidia and microsporidiosis. ASM Press. p. 553.

8. Abstrakt

Citlivost spor mikrosporidie *Nosema ceranae* k dezinfekčním činidlům

Shulha, Y

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

Abstrakt

Cílem této práce bylo otestovat citlivost spor mikrosporidie *Nosema ceranae* k dezinfekčním zásahům.

Spory *N. ceranae* byly vyizolovány z přirozeně infikovaných včel pomocí gradientové centrifugace a ošetřeny organickými kyselinami (mravenčí, šťavelová, octová). U dalších vzorků bylo provedeno tepelné ošetření a byla otestována citlivost k pH. Po ukončení expozice byly spory obarveny fluorescenčními barvivy a pomocí fluorescenční mikroskopie byla vyhodnocena jejich životnost.

Všechny otestované látky byly schopny usmrcovat spory mikrosporidie *Nosema ceranae*. Ani jedna z testovaných látek však neusmrtila všechny spory, přítomné ve vzorcích. K usmrcení většiny spor (98,3 %) došlo jen při tepelném ošetření (30 minut při 100°C). Nejlepší účinky byly pozorovány u kyseliny octové. Kyselina mravenčí měla menší efekt než kyselina octová; jako nejméně účinná se ukázala kyselina šťavelová. Bylo zjištěno, že spory jsou citlivé i na alkalické pH, bylo by tedy možné použít k dezinfekci i alkalická dezinfekční činidla.

Klíčová slova: mikrosporidie, spory, *Nosema ceranae*, *Nosema apis*.

9. Abstract

Sensitivity of microsporidia *Nosema ceranae* spores to disinfectants

Shulha, Y

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences

Fakulty of Veterinary Hygiene and Ecology

Abstract

The aim of this bachelor thesis was to test the sensitivity of microsporidia *Nosema ceranae* spores to disinfection interventions.

N. ceranae spores were isolated from naturally infected bees by gradient centrifugation and treated with organic acids (formic acid, oxalic acid, acetic acid). Other samples were subjected to heat treatment, and were tested for pH sensitivity. After the exposure, the spores were stained with fluorescent dyes and, their viability was evaluated with the use of fluorescence microscopy.

All tested compounds were able to kill spores of microsporidia *Nosema ceranae*. None of the tested substances killed all of the spores present in the samples. The highest mortality (98.3%) was observed after heat treatment (30 minutes at 100°C). Among organic acids, the best effects were observed using acetic acid. Formic acid was less effective than acetic acid; the least effective proved to be oxalic acid. It was found, that *N. ceranae* spores are sensitive to alkaline pH. Therefore it would be possible to disinfect beekeeping equipment with the use of alkaline disinfectants.

Key words: microsporidia, spores, *Nosema ceranae*, *Nosema apis*.

10. Přílohy

Seznam obrázků

Obrázek 1: Spory *Nosema ceranae* obarvené fluorescenčním barvivem DAPI

Obrázek 2: Spory *Nosema ceranae* obarvené fluorescenčním barvivem propidium iodide

Obrázek 3: Spory *Nosema ceranae* vyfotografované pod bílým světlem

Seznam grafů

Graf 1: Procento mrtvých spor ve vzorku spor, rozsuspendovaných v PBS a ve vzorku spor po 4 dny zaschlých na miskách

Graf 2: Procento mrtvých spor po čtyřdenní expozici parám kyseliny mravenčí

Graf 3: Procento mrtvých spor *N. ceranae* po čtyřdenním ošetření kyselinou octovou

Graf 4: Procento mrtvých spor *N. ceranae* čtyři dny po ošetření kyselinou šťávelovou, aplikovanou sublimací

Graf 5: Spory *Nosema ceranae* po hodinové inkubaci ve fosfátovém pufru o různém pH

Graf 6: Účinnost ošetření teplem na spory *N. ceranae*

PROHLÁŠENÍ AUTORA

Jsem si vědom, že

- odevzdáním závěrečné práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby,
- moje závěrečná práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitní databázi a bude veřejně přístupná k nahlédnutí,
- na moji závěrečnou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jméno a příjmení autora, titul:

.....

Název práce:

.....

V Brně dne

Podpis autora:

1) zákon č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, ustanovení § 47b Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a záznamu o průběhu a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

2) zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, ustanovení § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní vnitřní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

3) zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, ustanovení § 60:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez závažného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

POTVRZENÍ AUTORA

Svým podpisem potvrzuji, že písemná verze odevzdané bakalářské / ~~diplomové~~ / ~~rigorózní~~ / ~~dizertační~~* práce je shodná s elektronickou verzí práce, která je pod stejnojmenným názvem v pdf formě uložena v Informačním systému VFU Brno (STAG), příp. na předaném nosiči (CD, DVD).

Jméno a příjmení autora, titul:	
Název práce v češtině:	
Název práce v angličtině:	

V Brně dne Podpis autora:

*nehodící se škrtně