



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

**Baktericidní efekt vybraných rostlinných silic na  
patogena včelího plodu Paenibacillus larvae**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Studijní program: LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

**Autor:** Robert Thomas

**Vedoucí práce:** Ing. Petr Mráz, Ph.D.

České Budějovice 2024

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Baktericidní efekt vybraných rostlinných silic na patogena včelího plodu *Paenibacillus larvae*“ jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 23. 4. 2024

.....

Robert Thomas

### **Poděkování**

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce panu Ing. Petru Mrázovi, Ph.D. za jeho aktivní a trpělivý přístup a také za jeho cenné připomínky k mé bakalářské práci. Také bych rád poděkoval Fakultě zemědělské a technologické za poskytnutí jejich laboratoře při provádění laboratorní práce.

# Baktericidní efekt vybraných rostlinných silic na patogena včelího plodu *Paenibacillus larvae*

## Abstrakt

Mor včelího plodu je vážné onemocnění včelích larev, které je zakázáno léčit a způsobuje velké škody, které v mnohých případech končí i likvidací celých včelstev. Zatím nebyl objeven žádný lék, kterým by bylo možné nakažená včelstva vyléčit. Byly prováděny experimenty s použitím antibiotik proti moru včelímu plodu, ale výsledkem bylo pouze dočasné potlačení klinických příznaků tohoto onemocnění. Na spory antibiotika nepůsobili a po odeznění účinku antibiotik propuká mor znovu. Správně zvolená prevence má hlavní roli v eliminaci tohoto onemocnění. Tato práce se zabývá antimikrobiálním účinkem rostlinných silic na původce onemocnění moru včelího plodu *P. larvae*. Testovaný kmen CCM 4488 patogena *P. larvae* byl pořízen z České sbírky mikroorganismů (Brno).

Cílem práce bylo stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) vybraných rostlinných silic na bakterii *P. larvae*. Stanovení MIC se provádělo na mikrotitračních destičkách a stanovení MBC na Petriho miskách. Celkem bylo testováno šest různých koncentrací vybraných rostlinných silic. Jedná se o koncentrace 2048 µg/ml, 1024 µg/ml, 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml a 64 µg/ml.

Nejsilnější antimikrobiální účinek měla ze všech měřených silic Copaiba, která vykazovala MIC a MBC již při koncentraci 64 µg/ml. Nejvíce použitých silic z měření vykazovalo MIC a MBC při koncentraci 2048 µg/ml. Tyto silice byly zároveň v rámci měření antimikrobiálního účinku nejslabší. Výsledky mohou posloužit jako data pro další výzkum, který by se mohl zabývat například vývojem přípravků pro prevenci vypuknutí onemocnění.

**Klíčová slova:** rostlinné silice; *Paenibacillus larvae*; antimikrobiální účinek; bakterie; mor včelího plodu; MIC; MBC

# **Bactericidal effect of selected plant essential oils on the bee brood pathogen *Paenibacillus larvae***

## **Abstract**

Plague of bee brood is a serious disease of bee larvae that is forbidden to treat and causes great damage, which in many cases ends with the elimination of entire bee colonies. No drug has yet been discovered that can cure infected bee colonies. Experiments were carried out using antibiotics against plague of bee brood, but the result was only a temporary suppression of the clinical symptoms of this disease. Antibiotics did not work on the spores, and after the antibiotic wears off, it breaks out again. Correctly chosen prevention plays a major role in eliminating this disease. This thesis deals with the antimicrobial effect of plant essential oils on the origin of *P. larvae* pest disease. The tested strain CCM 4488 of the pathogen *P. larvae* was obtained from the Czech Collection of Microorganisms (Brno).

The aim of the work was to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of selected plant essential oils against the bacterium *P. larvae*. MIC determination was performed on microtitre plates and MBC determination on Petri dishes. In total, six different sets of selected plant strengths were tested. These are concentrations of 2048 µg/ml, 1024 µg/ml, 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml and 64 µg/ml.

Of all the measured essential oils, Copaiba had the most antimicrobial effect, which was rather MIC and MBC at a concentration of 64 µg/ml. The most used essential oils from the measurement by measuring MIC and MBC at a concentration of 2048 µg/ml. At the same time, these essential oils were the weakest in measuring the antimicrobial effect. The results will serve as data for further research, which could deal with, for example, the development of preparations to prevent disease outbreaks.

**Key words:** plant essential oils; *Paenibacillus larvae*; antimicrobial effect; bacteria; american foulbrood; MIC; MBC

## Obsah

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>1 LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>10</b>
1.1 Včela medonosná .....	10
1.2 Typy onemocnění včelího plodu.....	11
1.2.1 Varroáza.....	11
1.2.2 Nosemóza.....	12
1.2.2.1 Nosemosa apis.....	12
1.2.2.2 Nosemosa cerenae .....	12
1.3 Mor včelího plodu.....	13
1.3.1 Současný stav onemocnění moru včelího moru .....	13
1.3.2 Původce nákazy .....	13
1.3.3 Průběh infekce u onemocnění moru včelího plodu .....	14
1.3.4 Jak zvýšit odolnost včelstev proti moru včelího plodu.....	14
1.3.4.1 Kvalitní potrava.....	14
1.3.4.2 Nemoci .....	15
1.3.4.3 Další stresové vlivy .....	15
1.3.5 Symptomy onemocnění moru včelího plodu .....	15
1.3.6 Epidemiologie moru včelího plodu.....	17
1.3.7 Laboratorní diagnostika moru včelího plodu.....	17
1.3.7.1 Laboratorní vyšetření z měli .....	18
1.3.7.2 Kultivační testování.....	18
1.3.7.3 PCR testování .....	18
1.3.7.4 Vyhodnocování spektrofotometrem.....	18
1.3.7.5 Sekvenování nové generace .....	19
1.3.8 Obrana proti včelímu moru.....	19
1.3.8.1 Výběr kvalitního stanoviště.....	19
1.3.8.2 likvidace nakažených včelstev .....	20
1.3.8.3 Vlastní obranné chování včelstva.....	20
1.3.8.4 Studie prevence moru včelího plodu .....	20
1.4 Zaměnitelná onemocnění s morem včelího plodu .....	22

1.4.1	Hniloba plodu .....	22
1.4.2	Zvápenatění plodu.....	22
1.4.3	Virozy .....	23
1.4.4	Jiné potíže .....	23
1.5	Přenos včelích virů.....	23
1.5.1	Přenos horizontálně přímí.....	23
1.5.2	Přenos vertikální .....	23
1.6	Dezinfekce .....	23
1.6.1	Chemická dezinfekce.....	24
1.6.2	Fyzikální dezinfekce.....	25
1.6.3	Použití dezinfekce k ochraně úlů a rámků .....	26
1.7	Rezistence původce onemocnění moru včelího plodu vůči antibiotikům .....	26
1.8	Rostlinné silice.....	26
1.8.1	Vlastnosti rostlinných silic.....	26
1.8.2	Výskyt silic .....	27
1.8.3	Struktura silic.....	27
1.8.4	Získávání silic .....	27
1.8.4.1	Lisování za studena .....	28
1.8.4.2	Extrakce rozpouštědlem .....	28
1.8.4.3	Destilace .....	29
1.8.4.4	Extrakce superkritickými plyny .....	29
1.8.4.5	Výhody superkritické extrakce tekutin (SFE).....	29
1.8.4.6	Porovnání SFE s konvenčními metodami .....	30
1.8.5	Působení silic na mikrobiální populace .....	31
1.8.6	Měření účinnosti silic proti mikroorganismům .....	31
1.8.7	Stanovení minimální inhibiční koncentrace .....	32
1.8.8	Stanovení minimální baktericidní koncentrace.....	32
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY.....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>METODIKA.....</b>	<b>34</b>
3.1	Příprava silic .....	34

3.2	Příprava media .....	36
3.3	Příprava inokula .....	36
3.4	Příprava sterilního prostředí.....	36
3.5	Přístrojové vybavení .....	37
3.6	Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) .....	37
3.7	Stanovení minimální baktericidní koncentrace (MBC) .....	39
3.8	Zásady práce při provádění experimentu.....	40
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>41</b>
4.1	Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) .....	41
4.2	Stanovení minimální baktericidní koncentrace (MBC) .....	43
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>63</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>64</b>



## Úvod

Mor včelího plodu (MVP) (American foulbrood) je do dnešní doby stále aktuální téma, jak mezi včelaři, tak v oblasti výzkumu. Lidé ještě neznají způsob, pomocí kterého by se včelstvo nakažené morem včelího plodu dalo vyléčit. Bakterie *P. larvae* je známá pro svou nebezpečnost zejména pro včelaře. Když se onemocnění vznikne, již nelze vyléčit. Díky tomu je povinnost každého včelaře neprodleně ohlásit veterinární instituci informaci o podezření týkající se onemocnění včelího moru. Veterinární instituce má za úkol toto podezření potvrdit nebo vyvrátit. Při potvrzení nákazy je podle české legislativy stanovena likvidace celých včelstev. Likvidace se provádí vysířením a spálením včelstva (Malena, 2007). Léčba moru včelího plodu není v České republice povolena. Nedodržení tohoto nařízení je trestné (vyhláška č. 299/2003 Sb.). Rostlinné silice mohou pomoci v prevenci proti tomuto onemocnění včel. Některé rostlinné silice mohou mít antimikrobiální účinky a z toho důvodu by mohli být využity k eliminaci včelích onemocnění. Již ve starověku byl mor včelího plodu známý. Přírodovědec Schirach ze Saska, popsal tuto chorobu, jako onemocnění s charakteristickým hnilobným zápachem nakaženého včelstva (Genersch, 2008). Původcem onemocnění MVP je grampozitivní, sporulující bakterie, která nese název *P. larvae*. Tato bakterie je velmi odolná vůči chemickým a fyzikálním vlivům. Dokáže také produkovat významné množství proteáz, přičemž některé z nich jsou toxické i pro larvální stadia včel. Mor včelího plodu zabijí infikované larvy, ale dále je také potenciálně nebezpečný pro celé nakažené včelstvo. Bakterie se šíří díky velmi odolným endosporám, které jsou vysoce odolné i v podmínkách nad 100 °C a slouží jako infekční forma této bakterie. Spory obsahují vícevrstevný obal, který je chrání před vnějšími vlivy. *P. larvae* je dlouhá 2,5 – 8,5 µm a široká 0,5 – 0,8 µm. Pohybuje se pomocí dlouhých bičíků, které se vyskytují po celém jejím těle. Vyskytuje se samostatně nebo tvoří řetízky (Veselý a kol., 2003). Šíření moru včelího plodu je ulehčeno prodejem oddělků, matek a především medu. *P. larvae* napadá pouze na larvy včel. Největší pravděpodobnost k nakažení mají larvy mladší 36–48 hodin. Včela, která je starší než 53 hodin se už nenakazí (Spivak a Reuter., 2001).

Předmětem zkoumání je reakce bakterie *P. larvae* na různé druhy rostlinných silic, které mají obecně silný antimikrobiální účinek. Bakterie *P. larvae*, která vyrostla na speciálním živném mediu je následně pipetována do mikrotitračních destiček, kde je mísená s různými typy rostlinných silic. Na základě výsledků ze spektrofotometru jsou

vybrány čtyři vhodné koncentrační řady na pomezí růstu a inhibice bakterií, ze kterých se stanoví minimální baktericidní koncentrace na Petriho miskách.

## 1 Literární přehled

### 1.1 Včela medonosná

Včela medonosná (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) je jedna z nejsocializovanějších druhů z čeledi včelovitých a je výborně přizpůsobena k opylování ke většině hmyzosprašných rostlin. Druhy onemocnění, kterými se může včela nakazit mohou být bakteriální, virové nebo houbové. Včela medonosná je především tvor společenský, s čímž je spojeno například pečování o potomstvo, obrana, rychlé informování o zdroji potravy apod. Matka je hlavním článkem včelího společenství, jelikož jako jediná klade vajíčka, a tím pádem je pro přežití včelstva nepostradatelná. Dělnice vajíčka nekladou z důvodu nedostatečného vyvinutí pohlavních orgánů. V počátku života dělnic jejich práce spočívá v přípravě buněk k následnému zaklazení. Po nějaké době začnou dělnice krmit larvy a shánět pro ně potravu. Po vyvinutí voskových žláz se dělnice začnou starat o stavbu včelího hnízda. Následně se dělnice requalifikují od stavění hnízda k hlídání vchodu do hnízda. V předposledním stadiu začnou dělnice opouštět hnízdo a začínají přinášet potravu a vodu do hnízda. V posledním stadiu dělnice sbírají a dopravují propolis do hnízda (Genersch, 2008). Trubci v hnízdě nežijí celý život a jsou z něj na konci léta vytlačováni. Trubci se páří s včelí matkou, přičemž včelí matka se rozmnožuje pouze jednou za život a s několika trubci. Život v takovém včelím společenství má řadu výhod, ale také se s tím pojí problémy související s lehkým přenosem různých onemocnění. Konkrétně to je konstantní vlhkost a teplota, která v těchto společenství podporuje přenos onemocnění (Švamberský, 2000). Člověku byla včela medonosná od počátku jejího chovu dobrým pomocníkem a patří k jednomu z nejznámějších zástupců společenského hmyzu. Včela medonosná žije v dlouhotrvajících koloniích, které se dělí na jednotlivé kasty, přičemž zde žijou dělnice, dále pak trubci a jedna matka (Macek et al., 2010). První zdomácnění včely medonosné proběhlo v Egyptě více než před 5000 lety. Důvodem domestikace byla výroba medu a vosku (Tautz, 2009). Včely si pro svá hnízda vybírají hlavně dutiny stromů nebo lidské stavby. Včely staví hnízda z voskových plástů, které jsou složeny z plodových buněk a medových zásobníků. Plodové buňky zastávají prostor, kam se kladou vajíčka. Medové zásobníky zastávají funkci úložného prostoru pro potravu (Genersch, 2008).

Kasty vznikají z několika důvodů. Jedním z nich je haploidní určení pohlaví a úrovní kvality potravy. Dalším důvodem jsou feromony, které produkuje včelí matka. Přerušení působení feromonů je způsobeno ztrátou matky. Ztráta funkce tohoto feromonu, kterému se říká „mateří látka“ má na včelstvo špatný vliv, jelikož funkce tohoto feromonu spočívá v působení proti vývoji vaječníků a dělnic. Dále omezují dělnicím budovat tzv. matečníky. Matečníky jsou specifické plodové buňky, v nichž se vyvinou nové matky. Přenos feromonu je také závislý na množství jedinců ve hníždě. S abnormálním zvýšením počtu jedinců ve hníždě se může přenos feromonu porušit, což má za následek to, že dělnice začnou stavět matečníky na okraji plodové plástve. Do plodových plástev jsou poté kladeny oplodněná vajíčka. Larvy jsou krmeny mateří kašičkou. Larvám dělnic se dostává potrava chudší na živiny na rozdíl od larev matek, které dostávají kvalitnější potravu. Stará včelí matka z hnízda odlétá s částí včelstva ještě před vylíhnutím nových matek. Poté přichází na řadu rojení. Rojení je chápáno, jako rozmnožování včelstev a další šíření druhu. Původně se včela medonosná rozšířila v Evropě, přední Asii a Africe. Do Ameriky a Austrálie se dostala až následným vlivem kolonizace v 17. století. Dnes je včela medonosná rozšířena v podstatě po celé obyvatelné části planety. Vysoká pohyblivost a způsob páření včely medonosné má za následek, že mezi jednotlivými plemeny nenajdeme výrazné rozdíly. Dochází ke křížení a tvorbě řady mezitypů. Exteriérové znaky, co se nejvíce používají k rozdělení jednotlivých plemen jsou hlavně velikost těla, délka sosáku, typ ochlupení a žilnatina křídel. Obecně lze říci, že jižní plemena jsou v průměru větší než plemena severní (Genersch, 2008).

## **1.2 Typy onemocnění včelího plodu**

Mezi známé onemocnění včelstev patří varroáza, virové nákazy, mor včelího plodu, nose móza. (Titěra, 2009).

### **1.2.1 Varroáza**

Toto onemocnění způsobuje parazitický roztoč *Varroa destructor*, který napadá včelí plod a saje hemolymfu včel, čímž včelstvo výrazně oslabuje. Roztoč *Varroa destructor* je velkou hrozbou pro včelařství již řadu let a řadí se mezi nejobávanější včelí parazity. Tento parazit se zvládl rozšířit během krátké doby téměř po celém světě, přičemž dnes už by bylo těžké najít včelstvo bez infekce tímto patogenem všude po

světě mimo Austrálii. Bez pravidelného ošetřování včelstev by došlo kvůli tomuto parazitu ke zhroucení včelstev už během dvou až tří let (Rosenkranz et al., 2010).

### **1.2.2 Nosemóza**

Tuto chorobu včel způsobují dva druhy mikrosporidií, *Nosema apis* a *Nosema ceranae* (Duquesne et al., 2021).

#### **1.2.2.1 Nosemosa apis**

Včely se nakazí, když pojidají spory při čištění výkalů, které jsou od jiných infikovaných včel (Fries, 1988). Dalším zdrojem nákazy mohou být také infikované potraviny a voda. (Fries, 1997).

Utracením staršího plástu a ošetřením fumagilinem včelaři běžně kontrolují onemocnění (Fries, 1997). Včelí ošetřovatelky, které krmí svou královnu, mají při infekci sníženou činnost hypofaryngeálních žláz (Wang a Moeller, 1969, 1971). Pokud se nakazí královny, jsou často nahrazovány. Nakažení matek *N. apis* má značný dopad pro praktické včelaření (Farrar, 1947; Furgala, 1962).

*N. apis* byl prvně identifikován u západní včely medonosné (*Apis mellifera*), před více než 100 lety (Zander, 1909).

#### **1.2.2.2 Nosemosa ceranae**

*Nosema ceranae* napadá asijskou včelu medonosnou asijskou (*Apis cerana*) a evropskou včelu medonosnou (*Apis mellifera*). Mikrosporidní parazité mají intracelulární parazitický způsob života a jsou to vysoce specializované parazitické houby. Rozptylují se mezi hostiteli podobně jako spory. Jejich orgány jsou uzpůsobeny k buněčné invazi. Jejich infikování hostitele spočívá v mechanické injekci polárního vlákna, které vyčnívá z klíčící spory. Vlákno pronikne do cytoplazmy hostitelské buňky. V hostitelské buňce probíhá replikace parazita a poté produkce spor (Fries et al., 1996; Higes et al., 2006).

*N. ceranae* byla objeven ve vzorcích Čínské akademie zemědělských věd (Fries et al., 1996). Přesto, že se vědělo o tom, že *N. ceranae* je infekční pro *A. mellifera* (Fries, 1997), přirozená infekce *N. ceranae* u *A. mellifera* nebyla do té doby zaznamenána, až do doby, kdy Higes et al. (2006) přišli na to, že 10 z 11 vzorků z roku 2005 ze španělských včelínů obsahují mikrosporidii *N. ceranae*.

Některé španělské studie říkají, že *N. ceranae* je virulentní parazit na úrovni kolonie, a že infekce nakonec vedou ke kolapsu kolonie v případě, že infekce nejsou kontrolovány (Higes et al., 2008; Martín-Hernández et al., 2007). Převážné množství publikací o ztrátách kolonií spojených s infekcemi *N. ceranae* jsou však korelace a nejsou důkazem o příčině vzniku. Higes et al. (2008) popisují na základě korelačních dat různé fáze, kterými infikované kolonie procházejí, až nakonec infekci podlehnou.

### 1.3 Mor včelího plodu

Mor včelího plodu je onemocnění, které je po celém světě známé, jako nejnebezpečnější bakteriální choroba plodu včelího plodu, která je vedena pod ohlašovací povinností dle zákona č. 166/1999 Sb. (Löffelman, 2013).

#### 1.3.1 Současný stav onemocnění moru včelího moru

Mor včelího plodu se vyskytuje pouze v určitých oblastech, avšak tam, kde v minulosti došlo k ohniskům moru, jsou jeho zárodky dodnes přítomné (Bzdil, 2010). Sporám moru se dobře daří v dřevěných materiálech. Staré a vyřazené úly mohou být stále infikované, protože jak stárnou a začínají se rozkládat, mor se může opět objevit na povrchu. Včely k tomu mohou přispět tím, že staré dřevo v úlech rozkoušou, což je podobné tomu, co dělají v dutých stromech, čímž se často dostanou do přímého kontaktu s nákazou (Bzdil, 2010).

#### 1.3.2 Původce nákazy

*Taxonomické řazení P. larvae (Sedláček, 2007):*

Doména	<i>Bacteria</i>
Kmen	<i>Firmicutes</i>
Třída	<i>Bacilli</i>
Řád	<i>Bacillales</i>
Čeleď	<i>Paenibacillaceae</i>
Rod	<i>Paenibacillus</i>

Bakterie *P. larvae* má tyčinkovitý tvar a je dlouhá 2,5 – 8,5  $\mu\text{m}$  a široká 0,5 – 0,8  $\mu\text{m}$  (Madara, 2009). Je vědecky prokázáno, že původce onemocnění moru včelího plodu *P. larvae* je schopna se reprodukovat jen uvnitř napadené včelí larvy (Hrobařová, 2010).

U bakteriálních spor tohoto patogena je známo, že vykazují vysokou odolnost vůči vysokým teplotám. Tyto spory dokáží přežít teploty i nad 100 °C (Madara, 2009). Spory obsahují několikvrstevný obal, který je chrání před vnějšími vlivy a pomáhá jim přežít v nehostinných podmínkách i řadu let. *P. larvae* dokáže produkovat proteázy, a to ve velkém obsahu. Proteázy mají za úkol štěpit bílkoviny a patří mezi enzymy. Původce onemocnění moru včelího plodu *P. larvae* vytváří proteázy, které mají toxický účinek proti včelím larvám, které napadá (Veselý a kol., 2003).

### ***1.3.3 Průběh infekce u onemocnění moru včelího plodu***

Spory se dostávají do larvy skrze potravu během krmení. Larva se nakazí v případě, že je vystavena potravě kontaminované spory během prvních 36 hodin po vylíhnutí vajíčka (Ebeling et al., 2016). Spory začnou být v larvě aktivní při zakuklení po tom, co se přestane larva krmit. Spory poté prochází stěnou žaludku a následně se rozšíří do celého těla. Poté infikovaná larva hyne (Bzdil, 2010).

### ***1.3.4 Jak zvýšit odolnost včelstev proti moru včelího plodu***

Jeden bacil moru propuknutí nemoci nezpůsobí, protože je zneškodněn imunitním systémem včel. Imunitní systém selhává v případě, že je bacilů velké množství, přičemž není znám jejich přesný počet, který imunitu včel překoná (Titěra, 2018).

#### ***1.3.4.1 Kvalitní potrava***

Med a pyl je pro včely klíčovou potravou, bez které by byl jejich zdravotní stav ohrožen, zejména kvůli oslabené imunitě. Květový med, který se dává včelám do úlu na zimu v kombinaci s cukrem, jako zdroj potravy obsahuje více různých typů cukrů a minerálů oproti medovicovému medu. Med by nikdy neměl být cukrem zcela nahrazen, protože obsahuje důležité látky, které v cukru chybí (Titěra, 2018).

Pyl obsahuje bílkoviny významné pro imunitu. Pyl je pro včely nenahraditelný. V menších úlech jsou pylové zásoby problematické, jelikož jsou často předčasně snědены z důvodu toho, že včelstvo musí uvolnit buňky pro jiné záměry, a proto je velikost úlu důležitá. Pyl i med, jestliže jde o jediný druh rostliny, může být v takovém případě i špatná potrava pro včely, protože v přírodě takovou potravu včely běžně nepřijímají (Titěra, 2018).

#### **1.3.4.2 Nemoci**

Mezi hlavní nemoci, která snižuje odolnost včel je varroáza, kterou je potřeba tlumit. Roztoč *Varroa* je přenašečem virů, které včelstvo oslabují (Titěra, 2018).

Dalším vážným onemocněním je nosemoza. Toto onemocnění vytváří mikrosporidie hmyzomorka. Nosemozu podporují nízké teploty. Silná včelstva mají oproti tomuto onemocnění výhodu. Abychom dosáhli silného včelstva, je nutné ho oštrovat tak, aby se nerojilo. Včelstva jsou geneticky odlišná vzhledem v náchylnosti k nemocem, ale taková odolná včelstva zatím nebyla vyšlechtěna (Titěra, 2018).

#### **1.3.4.3 Další stresové vlivy**

Kočování je jedním ze stresových faktorů, které odolnost včelstva oslabuje. Kočování s rozumnou vzdáleností je prospěšné, protože se tím zvýší rozmanitost potravy pro včelstvo, ale pokud je kočování časté a na velké vzdálenosti, má na včelstvo negativní důsledky. Včelstvo bývá zmatené a dělá mu problém se orientovat v prostoru (Titěra, 2018).

Odborníci tvrdí, že pokud není matka ve včelstvu, tak to má na včelstvo také negativní vliv, protože matka produkuje feromony. Naopak nadměrný počet feromonů je pro včelstvo také špatný (Titěra, 2018).

Včelstva se v přírodě vyskytují obecně více jednotlivě než společně. Nečistoty ze životního prostředí také přispívají ke stresu včelstva. Nečistoty se obvykle vyskytují v sadech, proto by zde včelstva měla být umístována jen na opylování, nikoli celoročně (Titěra, 2018).

#### **1.3.5 Symptomy onemocnění moru včelího plodu**

Napadení morem včelího plodu je patrné většinou při uzavření plodu. Buňky s touto nákazou mají tmavé zbarvení a je u nich sledována perforace. U larev s touto nákazou, je patrná absence původního perleťového lesku, který se u zdravých larev vyskytuje zcela běžně. Namísto perleťového lesku jsou nakažené larvy typicky šedožlutě zbarvené. Napadený plod páchne klijem a je mezerovitý (Veselý a kol., 2003).

Pokud je mezerovitost plodu vyšší než pět procent, včelař by měl zkontrolovat stav včelstva a prověřit možné komplikace a hledat další příznaky. Při prohlížení stavu

včelstva je dobré používat lupu než se spoléhat na pouhé oko. Mezerovitost nemusí být nutně příznakem nákazy morem včelího plodu, může to znamenat, že matka vajíčka nakladla špatně, kdy příčinnou je obvykle pokročilé stáří matky. Pokud se objeví špatně kladoucí matka, řešením je její výměna. Po výměně matky mezerovitost plodu obvykle mizí, ale nemusí to být vždy podmínkou (Veselý a kol., 2003).

Příznakem přítomnosti moru včelího plodu ve včelstvu jsou rozložené larvy v buňkách a klišovitá hmota, která se detekuje zápalkovým testem. Zápalkový test spočívá v tažení sirky z potenciálně nakažené buňky a pokud se za sirkou začne táhnout vlákno o délce několika centimetrů, je buňka nakažená. Nicméně tento příznak je považován v určitých fázích moru za nepřesný a tím pádem není příliš využíván v praxi. (Veselý a kol., 2003).

Rozpad plodu nastává v odkrytých i zakrytých buňkách. Rozpad plodu se také vyskytuje u některých jiných onemocnění včel. V rámci stejného povrchu plástu lze spatřit vajíčka, larvy v různých stádiích a zakryté buňky obsahující mrtvé nebo zdravé kukly. Čistící včely zpravidla sami odstraňují většinu nemocných larev. Infikované larvy mají v důsledku množení patogenů ve střevním traktu vyšší potřebu potravy. Včely, které se starají o larvy, jsou schopny identifikovat a vyhodit z hnízda larvy s nadměrnou potravní poptávkou. Tímto způsobem dokáže silný včelí úl eliminovat nemocné larvy a udržovat tak mor pod kontrolou. Některé infikované larvy však mohou obdržet dostatek potravy k tomu, aby mohli přežít, což má za následek to, že se prodlužuje doba trvání onemocnění. Tyto larvy přecházejí do stádia kukly a následně se vyvíjejí do dospělého jedince. Tyto kukly a dospělci jsou zakrnělé a mají menší hmotnost ve srovnání se zdravými jedinci. Kromě toho vylučují patogeny prostřednictvím výkalů. Proto se onemocnění nejčastěji opakuje v následujících letech u ošetřených úlů, protože původce onemocnění je stále přítomen v úlu. Za účelem laboratorního testování jsou vybrány plásty s nemocným plodem o rozměrech 10 x 10 cm. Nejvhodnějším řešením je odeslat plásty s čerstvě zemřelými larvami na testy. Přítomnost patogenu se provádí vyšetřením zbarvených mikroskopických preparátů z mrtvých larev, dále pak izolací patogenu na živných mediích a také molekulární diagnostika (Titěra, 2018).

Včely odstraňují nemocné larvy, které jsou nakažené houbou *Ascosphaera*, viry nebo roztočem *Varroa*. V současné době se díky biochemicko-genetickému výzkumu



potvrdilo, že původce onemocnění moru včelího plodu je značně různorodý (Titěra, 2018).

### **1.3.6 Epidemiologie moru včelího plodu**

Epidemiologické studie jsou založeny na subtypizaci izolovaných kmenů. Metoda, která je zvolena pro subtypizaci konkrétního patogenního druhu musí splňovat několik kritérií. První kritérium je, že všechny kmény druhu musí být typovatelné zvolenou metodou. Druhé kritérium je, že metoda musí mít vysokou diferenciací schopnost. Třetí kritérium je, že metoda musí poskytovat reprodukovatelné výsledky v rámci laboratoře (vnitrolaboratorní reprodukovatelnost) i mezi laboratořemi (mezilaboratorní reprodukovatelnost) (Genersch, 2010).

Typizační metody, které jsou založené na fenotypu obsahují nedostatky, především při použitelnosti na všechny členy druhu. Tyto nedostatky byly důvodem zavedení typizačních metod založené na mikrobiálním genotypu nebo konkrétní sekvenci DNA, které snižují problémy ohledně reprodukovatelnosti a typovatelnosti. Používané metody pro molekulární typizaci jsou například, polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (RFLP), náhodně amplifikované polymorfní DNA testy (RAPD), polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP) založený na selektivní amplifikaci podskupiny fragmentů DNA generovaných štěpením restrikčních enzymů (Genersch, 2010).

V průběhu let bylo pro subtypizaci izolátů *P. larvae* použito již více metod. Několik studií se zabývalo použitím rep-PCR pro podtypování *P. larvae*, které bylo úspěšné. Byly vytvořeny tři hlavní sady repetitivních prvků, které jsou používány pro bakteriální subtypování. Jedná se o repetitivní extragenní palindromické prvky (REP), dále pak enterobakteriální repetitivní intergenové konsenzuální sekvence (ERIC). (Genersch, 2010).

### **1.3.7 Laboratorní diagnostika moru včelího plodu**

Pokud se objeví první klinické příznaky moru včelího plodu, použije se laboratorní vyšetření. Klinické příznaky by měl alespoň do jisté míry rozeznat přímo chovatel včel, ale hlavní rozhodnutí vydá veterinární instituce, která použije laboratorní vyšetření. (Titěra, 2018).

#### **1.3.7.1 Laboratorní vyšetření z měli**

K vyšetření ochranných pásem pomáhá tzv. předklinická diagnostika, která je založena na vyšetření z měli ze dna úlů na detekci *P. larvae*. Včelstvo, které se nakazí morem včelího plodu je známé tím, že se u něj začnou objevovat spory *P. larvae* ve voskových kouskách na dně úlů. Mimo to se spory objevují také například v medu nebo cukerných zásobách, kde mohou být posléze detekovány, nicméně zde se jich vyskytuje početně méně. Z toho důvodu je vyšetření v měli mnohem více průkaznější (Titěra et al., 2018).

#### **1.3.7.2 Kultivační testování**

Kultivace probíhá tak, že se nejprve vzorek naočkuje na živnou půdu, kde se nechá týden při konstantní teplotě. Poté se stanoví nárůst patogena *P. larvae*. Minimální množství je 100 spor v jednom gramu vzorku (Titěra et al., 2018).

#### **1.3.7.3 PCR testování**

K moderním a často používaným laboratorním vyšetřením patří molekulárně genetické metody. Vzorky se posílají na vyšetření moru včelího plodu v prodyšných obalech, které nasávají vlhkost. Spolehlivost této metody je obdobná s kultivační metodou. V praxi se potvrzují pozitivní vzorky s více než 100 buňkami obsažené v jednom gramu materiálu (Titěra et al., 2018).

#### **1.3.7.4 Vyhodnocování spektrofotometrem**

Analýza spektrofotometrem, která je při vyhodnocování vzorků v této práci využívána, porovnává intenzitu zdrojem vysílaného záření s intenzitou záření, které dopadá na detektor. Určité množství energie světelného záření je rozpuštěnými látkami a roztokem absorbováno. Množství absorbovaného záření je pak přímo úměrné koncentraci látky ve studovaném roztoku. Spektrofotometr byl v této práci využíván ke stanovení minimální inhibiční koncentrace, přičemž byl měřen zákal, vytvořený patogenem *P. larvae* (Titěra et al., 2018).

### **1.3.7.5 Sekvenování nové generace**

Pomocí této moderní metody lze zjistit přítomnost bakterie *P. larvae*, ale zároveň i jiných bakterií. U moderního sekvenování lze využít toho, že pokud se neprokáže přítomnost *P. larvae*, mohou se detekovat i jiné bakterie, a to i symbiotické, jejichž schopnosti spočívají v zneškodňování moru včelího plodu (Titěra et al., 2018).

### **1.3.8 Obrana proti včelímu moru**

Choroby se včelí kolonii šíří odlišným způsobem, než je tomu u jiných zvířat. Odlišně vypadá i průběh a boj proti včelím chorobám. Pokud se ve včelstvu nakazí malý počet jedinců, je malé riziko, že mor pronikne do celého včelstva (Čavojský, 1981). Nízké počty včel proto způsobují potíže v diagnostice, jelikož se neví, zda jsou ostatní včely taky nakažené (Titěra, 2007).

#### **1.3.8.1 Výběr kvalitního stanoviště**

Velice dobrým materiálem ke stavbě úlu je dřevo. Dřevo se používá z důvodů odolnosti proti vnějším vlivům. To znamená, že vydrží dlouhou dobu. Na výstavbu úlů ze dřeva se nejvíce používá borovice vejmutovka, protože toto dřevo je podle včelařů lehké a dobře voní (Bentzien, 2008). Hmotnost úlu je rozhodujícím předpokladem pro chov silného včelstva. Na hmotnost je odkázán způsob ošetřování, které poskytuje včelař (Kamler et al., 1998).

Úly by měli být vyrobeny z materiálu, který umožňuje snadnou dezinfekci a musí být v souladu s hygienickými předpisy. Tento materiál by měl také být vhodný pro umístění do životního prostředí, to znamená, aby ho minimálně zatěžoval. Nevhodný materiál je například polystyren nebo sololit (Bentzien, 2008). Funkce stěn je udržovat v úlu stálé mikroklima a vytvářet dobrou tepelnou izolaci. Taky musí být odolné proti pronikání cizorodých a nebezpečných látek. Obvykle se v úlech používá zasíťované dno, kvůli tomu, aby měli včely dostatek kontaktu s vnějším prostředím a probíhala správná cirkulace vzduchu mezi úlem a vnějším prostředím (Pernica, 1991). Lokace úlu je pro včely jedním z hlavních pilířů kvalitního a zdravého života. Úl je správné umístit mimo lidská stavení, kde by byl chráněn proti silnému větru nebo dešti. Dále se nesmí opomíjet správný a bezpečný nákup včelstva, medu, plástů, vosku a pylu. Tyto produkty by měli být pořízeny z míst, kde je dobře známá situace ohledně nálezů včelími

chorobami. Důležité je také nekrmit včely medem o jehož stavu příliš mnoho nevíme, anebo když je jeho původ neznámý (Čavojský, 1981).

Všechny tyto opatření jsou důležité a mohou nám pomoci výrazně snížit riziko nákazy morem včelího plodu. Nicméně dodržení všech opatření a doporučení nebude nikdy zárukou toho, že se ve včelstvu toto onemocnění nemůže objevit (Čavojský, 1981).

#### **1.3.8.2      *likvidace nakažených včelstev***

Ničení včelstev a úlů se provádí v případě, když je včelstvo již nakažené. Likvidace je založena na spálení všeho, co je součástí ohniska nákazy. K spočítání náhrady se používá úřední zápis o provedené likvidaci (Titěra, 2007).

Při zaevidování počtu úlů, který před likvidací původně byl, je považováno za výhodu. Může se tak totiž předejít věcem, jako je například ukrytí části úlů před jejich likvidací. Nutným stanoviskem je domluva, která se týká utracení a spálení včelstev najednou. Důležité je spálit i náhradní díly, jako jsou víka, rojáčky, nástavky a dna. Pokud dojde k opomenutí něčeho potenciálně nakaženého, může to vést k dalšímu rozšíření moru (Titěra, 2007).

#### **1.3.8.3      *Vlastní obranné chování včelstva***

Pyl, který včely sbírají, obsahuje mikroorganismy, které působí proti patogenu *P. larvae*. Množství pylu v potravě včelích larev výrazně podporuje snížení infekce larev. Nejméně pylu je poskytován trubcům a nejvíce pylu dostávají larvy včelích matek (Rinderer et al., 1975).

Správná hygiena má pozitivní vliv na odolnost včelstva. Správnou hygienou se myslí především rychlé zjišťování a odstraňování infikovaného plodu. Studie ukázali, že větší šanci k nákaze bakterií *P. larvae* mají včelí larvy, které mají nižší hmotnost nebo míru růstu (Piccirillo a De Jong., 2002).

#### **1.3.8.4      *Studie prevence moru včelího plodu***

Mor včelího plodu je onemocnění, na které není dosud žádný lék. Antibiotika mají schopnost potlačit klinické projevy nemoci. Antibiotika jsou v Evropské unii zakázána, protože podle Evropské unie antibiotika postupně způsobují nežádoucí rezistenci u

lidských bakteriálních patogenů. V České republice je zákonem nařízená likvidace ohněm všeho, co je nakažené a co lze spálit (Sláma, 2010).

V souvislosti s nebezpečím této choroby se v České republice se zavedla přísná veterinární opatření. Infikované včelařské materiály, na kterých je detekována koncentrace spor mezi  $10^2/g$  až  $10^3/g$  jsou jen sledovány, jelikož infekci může způsobovat například jen infekční tlak z okolí. Takto nízkým koncentracím se říká subklinické stadium, a klinické příznaky se zde mohou, ale i nemusí projevit. V takové situaci, kdy jsou pravděpodobné obě možnosti je potřeba vždy zavést preventivní opatření, aby se nákaza dále nešířila (Přidal, 2008).

V posledních letech jsou zkoumány výtažky z určitých druhů rostlin a esenciální oleje, které vykazují antimikrobiální účinky, jako je například silice *Thymus vulgaris* (Flesar et al., 2010). Šlechtění kmenů včel je další téma, o které se vědci v současnosti zajímají. Vědci se snaží šlechtit především včelstva kvůli jejich hygienickému chování (Palmer a Oldroyd, 2003).

Probiotické bakterie v žaludku včel jsou předmětem výzkumu již řadu let. O těchto bakteriích je známo, že oslabují *P. larvae*. Tyto bakterie je v současnosti možno použít na posílení včelstev (Přidal, 2009).

Infikované včelstvo, které nevykazuje klinické příznaky se prostřednictvím metody vyrojení uzdraví. V tomto roji se sníží velké množství spor a nové larvy nejsou nakaženy. V roji ze včelstva v klinickém stadiu byl sledován nejdříve pokles infekce, nicméně po nějaké době se u něj objevila choroba znovu. To znamená, že pokud se rojí včelstvo, které je jen infikované bez klinických příznaků, může to vést k odstranění onemocnění moru včelího plodu (Fries et al., 2006).

Vědci Hansen a Brødsgaard (2003) ve svém výzkumu pozorovali vysoký pokles množství spor, která byla léčena touto metodou vyrojení (Lindström, 2006).

Podle Pernal et al. (2008), kteří provedli na této metodě ekonomický výzkum uvedli, že z finanční stránky věci je tato metoda výhodnější oproti pálení včelstev, která jsou nakažena a jejich následné nahrazování včelstvy novými. Mor včelího plodu je v dnešní době poměrně známé onemocnění. Problémem je, že vědecké poznatky jsou o něm jen částečně zavedeny do praxe. Likvidace všech stanovišť s pozitivním výskytem spor moru včelího plodu v měli, a to i v nízké koncentraci, bez objevení klinických příznaků, se tak vystavujeme riziku vyhubení velkému množství včel chovaných v České republice. Z toho důvodu je potřeba, projednávat všechny možné okolnosti,

kteřé praxe přináší a dojít tak k řešení, které povede k vytvoření podmínek bránící vyvolání nákazy (Přidal, 2008).

#### **1.4 Zaměnitelná onemocnění s morem včelího plodu**

##### **1.4.1 Hniloba plodu**

Bakterie *Paenibacillus alvei*, která vytváří spory jsou spolu s bakterií *Melissococcus plutonius*, která spory nevytváří původci hniloby včelího plodu. To znamená, že klinická diagnostika v terénu je aktuálně nespolehlivá. Hniloba včelího plodu není považována za vysoce rizikové onemocnění, ale v některých případech se již vyskytly některé její kmeny, které byly vysoce infekční (Titěra 2018).

Hniloba včelího plodu je případ, který se posílá hlavně do laboratoř. V laboratořích je bakterie *Melissococcus plutonius* vždy identifikována pomocí kombinací různých diagnostických metod. Onemocnění hniloba včelího plodu se přenáší jen mezi včelami, to znamená, že není přenosná na ostatní zvířata a člověka (Titěra 2018).

Mimořádně infekční verze hniloby plodu se vyskytla v Peci pod Sněžkou v letech 2015-2017, kde byla nalezena ohniska tohoto onemocnění (Státní veterinární správa, 2015).

##### **1.4.2 Zvápenatění plodu**

Zvápenatění plodu je onemocnění plodu včely medonosné. Toto onemocnění vyvolává houba *Ascospheara Apis*. Houba vytváří spory, které se dostávají do trávicího traktu včel a zde začínají klíčit. Poté začínají růst vláknovitě a začínají se dále rozrůstat. V mrtvých larvách a kuklách se začne vytvářet křídovitá struktura, kvůli myceliu, které proniká do včely. Díky tomuto procesu začnou vznikat takzvané křídové mumie. Jejich infekčnost je vysoká. Křídové mumie vytváří spory, které opět infikují včelí kolonie prostřednictvím potravy. Tato potrava je ukládána do hnízda. Nemocní jedinci jsou z hnízda v zásadě odstraňováni, čímž je riziko infekce snižováno. Infikované larvy jsou rozpoznány většinou podle toho, že začnou vyžadovat více potravy. Na základě toho dospělá včela vyhodnotí, že něco není v pořádku a larvy z hnízda vyhodí. Může se stát, že nakažená larva přežije napříč menším příjmem potravy, které by vyžadovala a nakazí tak další jedince (Williams, 2000; Hornitzky, 2001).

### **1.4.3 Virozy**

Hlavním příznakem je tvorba takzvaných pytlíčků. U tohoto onemocnění je typické, že larva má tvrdou pokožku a uvnitř dochází k rozložení tkáně na tekutý stav. Z buňky lze larvu, která je infikovaná virem, vytáhnout v kompletním tvaru na rozdíl od bakteriální infekce, kde je larva rozpadlá (Titěra, 2018).

### **1.4.4 Jiné potíže**

Zeslábnutí včelstva můžou způsobit také například silná varroáza, hlad, nevyhovující matka nebo její ztráta, polní chemické postřiky nebo otrava. Při napadení varroázou se v buňkách mohou vyskytovat i dospělí roztoči *Varroa* spolu s jejich vývojovými stádii. Oslabené včelstvo se poté již nedokáže starat o plod, který v důsledku toho umírá (Titěra, 2018).

## **1.5 Přenos včelích virů**

Způsob přenosu včelích virů může být horizontálně přímí. Dále se také můžeme setkat s přenosem vertikálním (Chen et al., 2006).

### **1.5.1 Přenos horizontálně přímí**

Tento způsob přenosu se řadí mezi nejrozšířenější. Funguje na principu přímého kontaktu mezi zdravými a nakaženými včelami. Může se uskutečnit například přenosem z infikované potravy, stolice nebo orální cestou při krmení (Chen et al., 2006).

### **1.5.2 Přenos vertikální**

Při vertikálním přenosu jsou viry přenášeny vertikálně z matky na potomstvo prostřednictvím vajíčka během jeho vývoje přes buňky folikulu nebo po dokončení vývoje vajíčka. Při vertikálním přenosu mohou být viry přenášeny buď na povrchu vajíčka nebo uvnitř vajíčka (Yue et al., 2007)

## **1.6 Dezinfekce**

Choroboplodné zárodky se ničí pomocí postupu, kterému se obecně říká dezinfekce. Na zničení všech přítomných patogenů se používá proces nazývaný sterilizace. Sterilizace je vcelku nákladná a náročná dezinfekční metoda. Sporulující

bakterie moru včelího plodu *P. larvae* je značně odolná, to znamená, že její dezinfekce je poměrně složitá a musí se postupovat podle předepsaných postupů (Titěra, 2007).

Dezinfekce se rozděluje na fyzikální a chemickou nebo na profylaktickou a ohniskovou. Ohnisková dezinfekce se používá v místech, kde se nachází přímý zdroj infekce nebo se tato místa alespoň nachází v její blízkosti a zaměřuje se na specifické místo, ve kterém se vyskytuje infekční materiál. Ohnisková dezinfekce si klade za cíl snížit počet patogenů v daném ohnisku, čímž se omezí další rozšiřování infekce. Profylaktická dezinfekce je využívána jako preventivní opatření, kvůli minimalizaci možné infekce. Tento typ dezinfekce je používán k prevenci proti rozšiřování patogenů. Dále je také využíván k zabezpečení hygienických podmínek v prostředí. Tyto dva typy dezinfekce mají společnou funkci, která se týká snížení množství patogenů. Profylaktická dezinfekce je určena pro preventivní účely z důvodu snížení hrozby infekce v širším prostředí. Ohnisková dezinfekce se používá na konkrétní místa, kde je vysoká hustota patogenů (Kareš, 2005).

V praxi to vypadá tak, že pokud se nákaza objeví, je důležité chránit včelstvo před šířením infekce pomocí ohniskové dezinfekce (Rejnič, 1990). Je známo několik způsobů, jakým způsobem provést dezinfekci ploch a včelařských pomůcek. Jedna z možností je otření hadrem nebo tamponem, které jsou namočené do dezinfekčního roztoku, přičemž se dodržuje stanovená doba účinkování nebo se čeká až do zaschnutí. Zatím se považuje za nejlepší postup ponoření do roztoku o dané koncentraci po předem stanovenou dobu (Drašar, 1978). Před provedením dezinfekce určeného předmětu, je potřeba zjistit potřebné informace o infekčních činitelech. Poté musíme zjistit informace o materiálech, na kterých bude dezinfekce prováděna a je potřeba k nim opatřit specifické dezinfekční přípravky. Dále se pokračuje manuálním čištěním. Po dokončení manuálního čištění zůstává poslední krok. Poslední krok je vlastní dezinfekce, což znamená výběr vhodných dezinfekčních přípravků a druhů dezinfekce (Kursa et al., 1998).

### **1.6.1 Chemická dezinfekce**

Dezinfekční prostředky představují různorodou skupinu chemických látek, které vytvářejí nepříznivé podmínky pro přežití mikroorganismů. Mikrobicidy (baktericidy, fungicidy, virucidy, sporocidy) hubí mikroorganismy nebo jejich spory, zatímco mikrobistatika (bakteriostatika, fungistatika) pouze zastavují růst mikroorganismů.



Účinné látky dezinfekčních prostředků obvykle ovlivňují metabolismus mikroorganismů (Buchrieser a Miorini, 2009). Chemické reakce, na kterých je nejčastěji založeno působení dezinfekčních prostředků, jsou: oxidace (přípravky chloru, chloraminů, isokyanurátů, přípravky jódu, peroxid vodíku a jiné peroxidové sloučeniny), hydrolýza: (kyseliny, louh sodný, horká voda). Chemické metody dezinfekce v mnoha ohledech převažují nad metodami fyzikálními. Při dezinfekci je nutné provést předdezinfekci, což je mechanická očista a sanitární mytí a následně samotná dezinfekce. Někdy lze obě fáze provádět pomocí detergentů a dezinfekčních prostředků. Účinky dezinfekce závisí také na způsobu aplikace dezinfekčního prostředku na místa, kde je potřeba ničit mikroorganismy. Dezinfekci povrchů a předmětů lze provést ponořením do dezinfekčního prostředku, setřením hadříkem namočeným v dezinfekčním prostředku, postřikem, uvolněním plynu, odpařením dezinfekčního prostředku. Při provádění dezinfekce musí mít zhotovitel k dispozici ochranný oblek, čepici, rukavice, boty, brýle a respirátor, příruční lékárnu s vhodnými protijedy. Dezinfekční roztok by měl být připraven těsně před použitím, protože jeho účinnost klesá (Vukićević a Hrgović, 1988; Asaj, 2000).

### ***1.6.2 Fyzikální dezinfekce***

Fyzikální metody dezinfekce jsou založeny především na využití suchého nebo mokrého tepla a aplikaci záření. Spalování je nejstarší a velmi dobrá metoda fyzikální dezinfekce. To zabíjí velmi odolné bakterie (jako je původce onemocnění moru včelího plodu). Spálení je postup, který zahrnuje vystavení kontaminovaných předmětů plamenům, aby se zničily patogeny, které se na nich nacházejí. Tímto způsobem lze kovové předměty i některé dřevěné předměty dezinfikovat. Účinek dezinfekce horkou vodou za normálního atmosférického tlaku po dobu 30 minut se zvýší přidáním 1-2% krystalické sody ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Úspěšnou metodou dezinfekce je také dezinfekce horkovodní párou vytvářenou pevnými nebo mobilními vyvíječi páry. Vodní pára může mít na rozdíl od vody teplotu vyšší než 100 °C. Aby byla dezinfekce účinná, musí být vodní pára pod určitým tlakem a při minimální teplotě 110 °C po dobu 40-45 minut. Pro dezinfekci se používá také proudící suchý horký vzduch při teplotě od 110 °C do 150 °C v pecích a sušičkách po dobu 30 minut (Bojanić Rašović, 2021). Ultrafialové záření o vlnové délce 253 - 280 nm působí baktericidně. Maximální účinnosti je dosaženo s paprsky o vlnové délce 265 nm. Zdrojem UV záření jsou kromě slunce

různé zářivky. Ultrafialové záření nemůže proniknout dovnitř ošetřovaných předmětů - záření působí pouze na ozařovaný povrch. Sporulující bakterie jsou odolné vůči ultrafialovému záření (Belojević, 2013; Titěra, 2009).

### **1.6.3 Použití dezinfekce k ochraně úlů a rámků**

Dezinfekci úlu provádíme vždy před osídlením včelami. Dezinfekce úlu probíhá vždy jednou za tři roky, pokud není podezření na onemocnění moru včelího plodu ve včelstvu. Při dezinfikování musíme používat ochranné pomůcky, jako jsou například ochranné brýle, gumové rukavice a gumová obuv. V případě, že se mor včelího plodu ve včelstvu nevyskytne, tak dezinfikujeme úly pokaždé po přeložení včelstva. Než začneme s dezinfekcí, je potřeba dobře očistit dno, stěny, strop úlu a zbytky poté neprodleně spálit. Po tomto čištění začneme úly dezinfikovat pomocí ohně (Beránek et al., 1956).

Spojením fyzikální a chemické dezinfekce vzniká nejúčinnější a nejvíce používaná metoda dezinfikování úlů. Nejprve je v rámci fyzikální dezinfekce úl ošlehán plamenem. Poté v rámci chemické dezinfekce přichází na řadu použití louhu. Nakonec se tento postup ještě jednou celý opakuje (Beránek et al., 1956).

### **1.7 Rezistence původce onemocnění moru včelího plodu vůči antibiotikům**

Tylosin je druh antibiotik, který se používá v USA na potlačení onemocnění moru včelího plodu. Lék Tylosin dobře eliminuje symptomy této nemoci. Nicméně podle poznatků vědců z 21. století je patrné, že tento lék je nedostatečný, protože bakterie *P. larvae* se proti antibiotikům dokáže bránit. V EU se antibiotika proti včelímu plodu nepoužívají, kvůli zákazu používání antibiotik v živočišném průmyslu a také z možné intoxikace včelích produktů antibiotiky. Podle odborníků je nejdůležitější, aby se včelaři soustředili hlavně na správnou izolaci včel před infekcí pomocí rozdílných metod (Svoboda a kol., 1968).

### **1.8 Rostlinné silice**

#### **1.8.1 Vlastnosti rostlinných silic**

Rostlinné silice jsou jen malý zlomek složení rostlin, ale jsou základem charakteristických vlastností, pro které se aromatické rostliny používají ve farmaceutickém, potravinářském a vonném průmyslu. Dnes je známo, že tyto silice mají

komplexní složení, které tvoří mnoho složek jako jsou uhlovodíky a kyslíkaté sloučeniny (Hubík et al., 1989).

### **1.8.2 Výskyt silic**

V současnosti se ještě úplně neví, k čemu přesně silice rostlinám slouží, existuje pouze několik teorií. Jedna z teorií tvrdí, že slouží jako lákadlo pro opylující hmyz a jako usměrňovač transpirace. Dále mají silice v rostlině funkci fytoncidů. Fytoncidy jsou látky, které mají anti choroboplodné účinky. Množství silic je v jednotlivých rostlinách různorodé a během vývoje rostliny se může klesat nebo stoupat. (Bergkvist, 2007).

Silice se vytváří v protoplazmě a mohou se ukládat do různých částí rostliny, přičemž každá rostlina pro ně má vytvořený specifický úložný prostor. Například čeled' *Lamiaceae* má silice obsažené ve svých speciálních povrchových žlázkách (Bergkvist, 2007).

Silice se tvoří v protoplazmě. Odtud mohou prostupovat do pletiv nebo se ukládají v květech či žlaznatých trichomech listů. Rostlinné silice jsou předmětem různých výzkumů a stále se o nich vědci dozívají nové informace (Bergkvist, 2007).

### **1.8.3 Struktura silic**

Silice obsahují vysoký počet různých chemických sloučenin, z kterých bylo dosud určeno více než 500 různých látek (Bergkvist, 2007).

Silice se skládají skoro ze všech organických sloučenin. Vyskytují se zde sloučeniny uhlovodíků, alkoholů, aldehydů, ketonů, éterů, kyselin, esterů a dalších obdobných chemických látek (Bergkvist, 2007).

V minulosti byla u silice zaznamenána změna její původní vůně. Jako příklad se uvádí citrusové, které během času mohou získat terpentýnový zápach. Citrusové silice obsahují vysoký obsah terpenů, a proto se mění nejrychleji, nejspíše kvůli tomu, že u nich dochází k snadné oxidaci nenasycených terpenických uhlovodíků, které jsou schopné vést až k řetězovým reakcím v dalších složkách silice (Bergkvist, 2007).

### **1.8.4 Získávání silic**

Silice můžeme získat z rostlinných surovin více způsoby. Je důležité, aby bylo zachováno přirozené množství složek během extrakce silic z rostlin, kteroukoli

používanou metodu. Existují různé metody separace rostlinných silic od rostlinných materiálů. Složení silice se může mírně lišit na základě použití různých extračních metod (Anitescu et al., 1997; Cassel et al., 2009).

Konvenční extrakční technologie mají několik nevýhod, přičemž jsou energeticky náročné. Kvůli vysokým energetickým nákladům a snížení emisí přimělo lidi vytvářet jiné metody, které jsou nákladově udržitelné, efektivní a dokáží vytvářet produkty se stejnými nebo lepšími vlastnostmi (Stratakos a Koidis, 2016).

#### **1.8.4.1 Lisování za studena**

Lisování za studena je starší konvenční metoda extrakce, která se používá hlavně k výrobě citrusových silic. Tato metoda je založena na rozbíjení žlázek v kutikule nebo slupce, čímž se uvolní potřebné silice. Tento proces vede ke vzniku vodnaté emulze, která se poté odstředí, aby došlo k separaci silice (Bousbia et al., 2009).

Do začátku dvacátého století se průmyslová výroba citrusových olejů, které se lisovali za studena, prováděla manuálně. Dnes je manuální práce nahrazena systémy pro průmyslovou výrobu peelingových olejů. Patří sem stroje „sfumatric“, extraktory bergamotového oleje a extraktory hnědého oleje (Arnoudou, 1991; Dugo a Di Giacomo, 2002). Jelikož nejsou aldehydy obsažené v citrusových plodech tepelně stabilní, je tím pádem extrakce rostlinných silic praktikována mechanickými metodami (Stratakos a Koidis, 2016).

#### **1.8.4.2 Extrakce rozpouštědlem**

Tento druh extrakce je využíván pro tepelně labilní rostlinné silice, které jsou obsaženy například v květech. Prvním krokem je rozpuštění rostlin v lázni. Rozpuštěný materiál je poté filtrován a destilován. Jako rozpouštědlo se zde používá například alkohol nebo ethanol. Při extrakci se používají nižší teploty oproti destilaci, což snižuje problémy, týkající se chemických změn. Extrakce rozpouštědlem je také levná a vcelku rychlá, a protože rychlost difuze je závislá na teplotě, může se zvýšit rychlost procesu aplikací horkých rozpouštědel (Stratakos a Koidis, 2016).

Výsledný esenciální olej při použití této metody obsahuje malé zbytky rozpouštědla. Z toho důvodu není možné tuto silici použít pro potravinářské účely. Výjimkou je, když se použije alkohol, jako rozpouštědlo. V takovém případě je použití

vzniklé silice povoleno v potravinářském průmyslu. Parfémový průmysl se vyznačuje používáním tohoto typu extrakce (Stratakos a Koidis, 2016).

#### **1.8.4.3 Destilace**

Nejvíce se používá destilace vodní parou. Doba destilace trvá nejvýše deset hodin. Celkové množství vzniklé silice destilačním procesem závisí na délce doby destilace, tlaku a teplotě (Naves, 1974).

Nevýhodou destilace je, že se vlivem procesu hydrolyzují estery na alkoholy, což se negativně projeví u silic, které mají ve své struktuře vysoký počet takových esterů (Stratakos a Koidis, 2016).

#### **1.8.4.4 Extrakce superkritickými plyny**

Tato metoda patří do kategorie alternativních metod, která vznikla v důsledku nespokojenosti s konvenčními metodami, a její zkratka je SFE. Při zavedení byla tato metoda poté ještě dlouhou dobu důmyslně studována. Superkritickou fluidní extrakci lze provádět celkem ve třech režimech. Je to dávkový, semidávkový a kontinuální režim (Stratakos a Koidis, 2016).

Obecně dojde k vložení pevného materiálu do nádoby, do které se přidává nadkritická tekutina při specifické průtokové rychlosti až do té doby, než je dosaženo vhodných extrakčních podmínek (Stratakos a Koidis, 2016).

#### **1.8.4.5 Výhody superkritické extrakce tekutin (SFE)**

SFE má několik vlastností, které z něj činí účinnou alternativní techniku extrakce esenciálních olejů ve srovnání s konvenčními metodami extrakce rozpouštědlem (Otterbach a Wenclawiak, 1999; Lang a Wai, 2001).

Solvatační síla (tj. interakce solutu s rozpouštědlem) použité tekutiny může být řízena změnou tlaku a teploty, což vede k velmi vysoké selektivitě. Důležité je vyhnout se vysokému tlaku, jelikož to může poškodit extrakci špatných sloučenin s vysokou molekulovou hmotností (Stratakos a Koidis, 2016).

Superkritické tekutiny mají možnost kvůli své nižší viskozitě a vyšší difuzivitě vstupovat do porézních pevných materiálů účinněji v porovnání s kapalnými rozpouštědly. To vede k rychlejšímu přenosu hmoty a rychlé extrakci ve srovnání s metodami extrakce rozpouštědlem (Stratakos a Koidis, 2016).

Další výhodou je, že tato metoda je šetrnější k životnímu prostředí, jelikož se při ní používají netoxické plyny. Používá se zde například CO<sub>2</sub> nebo v určitých případech se používá výrazně menší množství organického rozpouštědla. Velkou výhodou je také možnost škálování podle potřeby. To znamená buď analytické nebo velké průmyslové výroby (Stratakos a Koidis, 2016).

#### **1.8.4.6 Porovnání SFE s konvenčními metodami**

Plyn CO<sub>2</sub> (oxid uhličitý) se při SFE často používá, protože má nízkou kritickou teplotu, je levný, netoxický, nezapáchá a snadno se odstraní bez zanechání zbytků. Navíc má dobré rozpouštědlové vlastnosti pro nepolární a některé polární molekuly. Změnou podmínek procesu (např. teploty a tlaku CO<sub>2</sub>) během extrakce lze selektivně extrahovat olej požadovaného složení (Modey et al., 1996; Khajeh et al., 2005).

Eikani et al., (1999) srovnávali extrakci esenciálního oleje kmínu získaného z *Cuminum cyminum* superkritickým CO<sub>2</sub> s olejem získaným konvenční parní destilací. Ukázali, že fyzikálně-chemické vlastnosti olejů extrahovaných superkritickým CO<sub>2</sub> a parní destilací byly odlišné. Srovnání parní destilace, extrakce rozpouštědlem, SFE a kapalného CO<sub>2</sub> použitého k získání těkavého oleje ze santalového dřeva západní Austrálie ukázalo, že SFE poskytuje nejvyšší výtěžky extraktů a celkových těkavých látek (Piggott et al., 1997). Studie Pourmortazaviho a Hajimirsadeghiho (2007) také ukázala, že různými extrakčními metodami lze získat různá extrakční složení. Studovali SFE těkavého oleje z listů *Juniperus communis* pomocí CO<sub>2</sub> za různých podmínek tlaku, teploty, obsahu modifikátoru a dynamické doby extrakce. Porovnání SFE s parní destilací odhalilo, že v extraktech SFE bylo přítomno celkem 22 sloučenin, zatímco v destilovaném oleji bylo identifikováno a kvantifikováno pouze 11 složek.

Podle Khajeh et al. (2005) SFE nabízí několik výhod oproti parní destilaci. SFE má za následek kratší dobu extrakce (25 minut oproti 4 h u parní destilace) a nižší náklady na energii a vyšší selektivitu. Možnost manipulace se složením oleje změnou parametrů extrakce (tlak, teplota, objem modifikátoru a dynamická doba extrakce) je v SFE dosažitelná. Ačkoli se ukázalo, že složení olejů získaných SFE a parní destilací se kvalitativně nelišilo, lišilo se kvantitativně.

### **1.8.5 Působení silic na mikrobiální populace**

Studie potvrdili, že některé silice mají antibakteriální efekt. Bohužel se výsledky obtížně porovnávají. To je způsobeno rozdílnými metodami a typy testovaných mikroorganismů. Proces, jakým silice mikroorganismy ovlivňují zatím ještě není zcela znám. Nejspíše se na tom podílí více aspektů. Jeden z aspektů mohou být například terpenoidy, což jsou lipofilní látky, které negativním způsobem ovlivňují respirační cyklus mikroorganismů (Bergkvist, 2007)

### **1.8.6 Měření účinnosti silic proti mikroorganismům**

Metody, které se aktuálně běžně používají na testování antibakteriálního efektu na silice, byly původně vytvořeny za účelem pro testování antibiotik. Princip těchto metod spočívá v použití zkoumané látky rovnou na mikroorganismus v agarové nebo kapalně živné půdě. Různé typy metod determinují rozdílný systém experimentů. Tyto typy metod se dále rozdělují do kategorií. Konkrétně mluvíme o agarových testech difuzní citlivosti a dilučních metodách. Jelikož je velký počet rozdílů, co se týče citlivosti mikroorganismů na různé druhy silic, vyvolává to obtížné stanovení optimální koncentrace silic pro dezinfekci. S tímto problémem se taky pojí již uvedená skutečnost, že silice ze stejného druhu rostliny mohou mít odlišný efekt kvůli růstovým a klimatickým podmínkám v daném místě, kde byla rostlina odebrána, a dále také na uchovávání silice a typu její destilace (Kalemba, 2003; Nedorostova et al., 2009).

Z tohoto důvodu se používají různé typy rozpouštědel, které zajišťují, že se silice rozpustí v tekutinách pro stanovení antimikrobiálního účinku. K nejpoužívanějším patří například rozpouštědla DMSO, PEG nebo také ethanol. Zároveň mohou tyto rozpouštědla zpomalovat růst mikroorganismů, a to stěžuje testování silic (Kalemba, 2003; Nedorostova et al., 2009).

Dalším způsobem stanovení působení silic, který se používá, se specifikuje na působení v plynné fázi. Tato metoda se vyznačuje tím, že testovaný organismus je vystavován výparům silice, který se z ní pravidelně uvolňuje, ale přímo se do živné půdy nekládá. Později se ukázalo, že vystavování výparům silic vůči mikroorganismům přináší výraznější účinky silic, hlavně u hub, což bylo následně i dokázáno pomocí experimentů. Tento jev je vysvětlován více způsoby. První je, že citlivost hub je celkově o něco vyšší vůči silicím v porovnání s bakteriemi. Faktem je,

že houby rostou především na povrchu a díky tomu mají větší kontakt s uvolňovanými párami. Na bakterie mají největší vliv silice ze substrátu (Bergkvist, 2007).

### **1.8.7 Stanovení minimální inhibiční koncentrace**

Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) je kvantitativní diluční metoda. MIC v překladu znamená nejnižší koncentrace antibiotika (ATB), která ještě dokáže inhibovat růst bakterie, který je pozorovatelný. Tato metoda je přesnější než difuzní metody. Je udávána v  $\mu\text{g/ml}$  nebo  $\text{mg/l}$  (Vlas et al., 2021).

Metoda nachází uplatnění například při vyšetření citlivosti kmenů z hemokultur, u mikrobů, kteří pomalu rostou a dalších nebezpečných materiálů, které bývají sterilní. Také ji můžeme využít u diskových testů, kde byla objevena polyrezistence. Polyrezistence znamená, že kmeny jsou necitlivé na více skupin ATB. (Vlas et al., 2021).

Pozitivním aspektem na této metodě je, že díky ní můžeme zkoumat jeden kmen pro více antibiotik. Horší na této metodě je, že kvantitativní metoda je celkem obtížná a může u ní dojít k bakteriální kontaminaci. To znamená, že při této metodě je potřeba pracovat pouze s jednou čistou kulturou mikroba bez příměsí dalších patogenů a je potřeba při stanovení různých typů rezistence dodržovat přesnost (Vlas et al., 2021).

### **1.8.8 Stanovení minimální baktericidní koncentrace**

Minimální baktericidní koncentrace (MBC) je nejmenší koncentrace antibakteriálního činidla potřebná k usmrcení mikroorganismu. Při minimální baktericidní koncentraci je zničeno nejméně 99,9 % bakterií ve zkoumaném vzorku. Obecně je antimikrobiální látka určena za baktericidní, jestliže MBC není čtyřnásobně větší než minimální inhibiční koncentrace. Minimální baktericidní koncentrace je během antibakteriálního testování k minimální inhibiční koncentraci doplňkem. Používání těchto metod dohromady, se provádí proto, že i když určitý MIC ukazuje dobrý inhibiční výsledek, při naočkování bakterií na agar se může stále ukázat proliferace bakterií. To je způsobeno tím, že antibakteriální činidlo v této dané koncentraci nečinilo úplnou smrt stanovovaných bakterií (Moulton et al., 2017).

MBC se nejčastěji měří v  $\mu\text{g/ml}$ . Tato metoda je známá tím, že umožňuje antimikrobiálnímu činidlu, aby bylo v kontaktu s testovaným mikroorganismem po dobu až 48 hodin. Díky tomu je výsledkem testu nejnižší koncentrace potřebná ke



zničení stanovovaného zkoumaného mikroorganismu spolu se všemi dalšími faktory, které přispívají k baktericidnímu účinku (Moulton et al., 2017).

Také je možné určit, zda si mikroorganismus vytvořil vlastní rezistenci proti testovanému léčivu. Určí se to tím způsobem, že se zjistí, zda je MBC testovaného léčiva proti testovanému mikroorganismu větší než násobek třiceti dvou MIC (Moulton et al., 2017).

## 2 Cíle práce a hypotézy

Hlavním cílem práce je výběr vhodných rostlinných silic s baktericidním účinkem a stanovení jejich minimální inhibiční a baktericidní koncentrace. Na základě zkoumání reakce rostlinných silic na *P. larvae* zjistíme, na jaké látky je tento patogen citlivý. Tento poznatek je důležitý zejména k získání dalších postupů v boji proti tomuto patogenu.

Hypotézy práce:

- Vybrané silice mají baktericidní vliv na *P. larvae*.
- Některé silice mají minimální inhibiční i baktericidní koncentraci  $\leq 64 \mu\text{g/ml}$ .

Zkoumané silice jsou použity vždy v šesti různých koncentracích. K oddělení koncentrací jsou využívány mikrotitrační destičky o celkovém počtu 96 jamek. Densita narostlého patogenu je měřena na spektrofotometru.

Výběr silic vychází z rešerše dostupné literatury. Vybrané silice jsou při stanovení minimální inhibiční koncentrace testovány mikrodiluční metodou na mikrotitračních destičkách. Vyhodnocení bakteriálního růstu probíhá na spektrofotometru. Minimální baktericidní koncentrace je testována na agarových plotnách.

## 3 Metodika

### 3.1 Příprava silic

Vzorky silic byly byly pořízeny od firmy 1. Aromaterapeutická KH a.s. Samotný odběr silic nebyl potřeba, protože používané rostlinné silice byly již předem pro výzkum připraveny. Samotný výběr vzorků byl zvolen na základě informací z dostupné literatury. Skladovány byly v tmavých skleněných nádobkách při teplotě 4 °C. Vzhledem k silné koncentraci se silice uchovávaly pouze v kapalném skupenství, aby déle vydržely. Soubor použitých rostlinných silic je uveden v tabulce (viz tab. 1).

Tabulka 1: Seznam použitých rostlinných silic

<b>Silice</b>	<b>latinský název</b>	<b>čeleď</b>
Copaiba	<i>Copaifera officinalis</i>	Bobovité ( <i>Fabaceae</i> )
Česnek	<i>Allium sativum</i>	Amarylkovité ( <i>Amaryllidaceae</i> )
Dobromysl	<i>Origanum Vulgare</i>	Hluchavkovité ( <i>Lamiaceae</i> )
Fenykl	<i>Foeniculum vulgare</i>	Míříkovité ( <i>Apiaceae</i> )
Heřmánek modrý	<i>Chamomilla recutita</i>	Hvězdnicovité ( <i>Asteraceae</i> )
Heřmánek římský	<i>Chamaemelum nobile</i>	Hvězdnicovité ( <i>Asteraceae</i> )
Heřmánek žlutý	<i>Ormenis multicaulis</i>	Hvězdnicovité ( <i>Asteraceae</i> )
Hřebíček	<i>Syzygium aromaticum</i>	Myrtovité ( <i>Myrtaceae</i> )
Kardamom	<i>Elettaria cardamomum</i>	Zázvorníkovité ( <i>Zingiberaceae</i> )
Koriandr setý	<i>Coriandrum sativum</i>	Míříkovité ( <i>Apiaceae</i> )
Kurkuma	<i>Curcuma longa</i>	Zázvorníkovité ( <i>Zingiberaceae</i> )
Levandule	<i>Lavandula</i>	Hluchavkovité ( <i>Lamiaceae</i> )
Litsea	<i>Litsea cubeba</i>	Vavřínovité ( <i>Lauraceae</i> )
Manuka	<i>Leptospermum scoparium</i>	Myrtovité ( <i>Myrtaceae</i> )
Máta kadeřavá	<i>Mentha crispa</i>	Hluchavkovité ( <i>Lamiaceae</i> )
Máta peprná	<i>Mentha piperita</i>	Hluchavkovité ( <i>Lamiaceae</i> )
Mateřídouška	<i>Thymus serpyllum</i>	Hluchavkovité ( <i>Lamiaceae</i> )
Mrkev setá	<i>Daucus carota</i>	Míříkovité ( <i>Apiaceae</i> )
Mrkev (nepál)	<i>Nepal carota</i>	Míříkovité ( <i>Apiaceae</i> )
Muškatový květ	<i>Myristica fragrans</i>	Muškatovníkovité ( <i>Myristicaceae</i> )
Muškatový ořech	<i>Myristica fragrans</i>	Muškatovníkovité ( <i>Myristicaceae</i> )
Pelargonie	<i>Pelargonium</i>	Kakostovité ( <i>Geraniaceae</i> )
Pelyněk	<i>Artemisia</i>	Hvězdnicovité ( <i>Asteraceae</i> )
Pepř	<i>Piper</i>	Pepřovníkovité ( <i>Piperaceae</i> )
Ravensára	<i>Cinnamomum camphora</i>	Vavřínovité ( <i>Lauraceae</i> )
Rozmarýn	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Hluchavkovité ( <i>Lamiaceae</i> )
Skořice	<i>Cinnamomum</i>	Vavřínovité ( <i>Lauraceae</i> )
Šalvěj	<i>Salvia officinalis</i>	Hluchavkovité ( <i>Lamiaceae</i> )
Tymián	<i>Garden Thyme</i>	Hluchavkovité ( <i>Lamiaceae</i> )
Vavřín	<i>Laurus</i>	Vavřínovité ( <i>Lauraceae</i> )
Zázvor	<i>Zingiber officinale</i>	Zázvorníkovité ( <i>Zingiberaceae</i> )

Zdroj: vlastní

### 3.2 Příprava media

Medium pro růst bakterie *P. larvae* muselo být připraveno tak, aby obsahovalo dostatečné množství všech potřebných živin pro její růst. Po nanesení čisté sbírky kultury *P. larvae* CCM 4488, získané přímo od České sbírky mikroorganismů z Brna došlo ke kultivaci nejméně po dobu dvou dnů nebo do nárůstu viditelných kolonií *P. larvae*. Medium se vařilo, jak pro stanovení minimální inhibiční koncentrace, tak pro stanovení minimální baktericidní koncentrace. Pro tyto dvě stanovení se vařila dvě mírně odlišná živná media. Rozdíl mezi těmito dvěma medii byl v jejich konzistenci. Pro stanovení minimální baktericidní koncentrace na plotnách se použilo tuhé medium. Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace v mikrotitračních destičkách se použilo medium tekuté. 1 l tuhého media se připravovalo z 10 g Mueller-Hintonova bujONU, 1 g pyruvátu sodného, 20 g K. agaru, 15 g kvasnicového extraktu, 3 g  $K_2HPO_4$  a 2 g glukosy. 1 l tekutého media se připravovalo ze stejných látek jako tuhé medium kromě K. agaru, který zde byl vynechán a celkově bylo použito menší množství surovin, přičemž z glukosy se vytvořil 10% roztok. Takto připravené medium se pak nechalo vařit v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

### 3.3 Příprava inokula

Testovaný kmen CCM 4488 (Czech collection of microorganisms) patogena *P. larvae* byl pořízen z České sbírky mikroorganismů (gr). Bakteriální kmen byl nejdříve naočkován na MYPGP agar a kultivován 48 hodin při 37 °C. Narostlá bakteriální kolonie byla poté nabrána pomocí sterilní kličky a následně byla rozpuštěna ve sterilní destilované vodě o výsledné denzitě 0,5 McF ( $1-2 \times 10^8$  CFU/ml). Bakteriální suspenze se poté ředila 1:200 (50ul:10ml). Výsledná denzita bakterií byla přibližně  $5 \times 10^5$  CFU/ml.

### 3.4 Příprava sterilního prostředí

Úspěšně provedený experiment, zabývající se působením rostlinných silic na bakterii *P. larvae* je ovlivněn řadou faktorů. Jeden z těchto faktorů je správná dezinfekce pracovního prostředí. Před každou prací v laboratoři bylo nutné pečlivě vydezinfikovat všechny používané předměty, před tím, než byly vloženy do flowboxu. To znamená dezinfekce pipet, obaly na špičky pipet, nádoby na media, emulgátor a fyziologický roztok. Dále pak nádobu, která sloužila jako odpad pro použité špičky a

obal na očkovací kličky. Špičky pipet byly sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 23 minut při tlaku 101,3 kPa. Všechny tyto sterilní materiály byly vloženy do předem vydezinfikovaného flowboxu. Po vložení do flowboxu už se tyto materiály nesměli z flowboxu vyjmout, kvůli možné kontaminaci z okolního prostředí. Flowbox se dezinfikoval klasicky použitím papírového ubrousku, který byl předem namočený do dezinfekce.

Důležitá také byla správná dezinfekce rukou. Správným postupem bylo umytí rukou mýdlem, osušit a následně použít dezinfekci na ruce. Nejméně rizikovým postupem bylo použít rukavice které se následně vydezinfikovali. Ve flowboxu nebylo vhodné pracovat s hodinkami nebo náramky, které nejsou sterilní. Dále bylo taky důležité pracovat s vyhrnutými rukávy tak, aby nezasahovali do Flowboxu.

### **3.5 *Přístrojové vybavení***

Flowbox

Vortex mixer

Laboratorní termostat

Ultrazvukový sonikátor

Spektrofotometr

Termostat

Autokláv

Analytické váhy

### **3.6 *Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC)***

Pro tento screening byla vybrána metoda v mikrotitračních destičkách se specifickým médiem (MYPGP agar) pro kultivaci původce onemocnění moru včelího plodu. V experimentu se použili klasické 96 jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem a víkem. Ve 2 ml eppendorfově zkumavce se smíchalo jako emulgátor 10 µl DMSO, 8 µl rostlinné silice a 982 µl tekutého MYPGP media. Při tomto procesu vznikla ve zkumavce přibližná koncentrace 8192 µg/ml. K homogenizaci vzorku se použil ultrazvukový sonikátor po dobu 10 minut. Do všech jamek mikrotitrační destičky se pipetovalo 100 µl tekutého namíchaného MYPGP media. Poté se 100 µl namíchaného media se silicemi pipetovalo do první řady mikrotitrační destičky. Každá silice byla testována při třech opakováních, to znamená ve třech sloupcích mikrotitrační destičky. Pomocí multikanálové pipety se první řada promíchala, čímž se získala

koncentrace 4096  $\mu\text{g/ml}$ . Následně bylo 100  $\mu\text{l}$  roztoku přesunuto z první jamky do druhé jamky. Na základě toho se dosáhlo poloviční koncentrace z první jamky do jamky druhé. Na tomto principu byla koncentrace ředěna až do šesté jamky, přičemž v šesté jamce koncentrace silice klesla na 128  $\mu\text{g/ml}$ . Poslední a předposlední jamka byla využita, jako pozitivní a negativní kontrola. Na závěr bylo do každé jamky aplikováno 100  $\mu\text{l}$  suspenze bakterie, čímž se zředila poloviční koncentrace ve všech jamkách (2048-64  $\mu\text{g/ml}$ ) s rozdílem poslední řady, kam byla umístěna negativní kontrola. Celá destička se poté nejprve změřila na spektrofotometru na vlnové délce 405 nm. Poté se destička dala inkubovat na 48 hodin při 37 °C. Po 48 hodinách se destička podruhé změřila na spektrofotometru a následně se spočítala procentuální inhibice bakterie na základě rozdílů denzity (růst bakterie způsobuje zákal) a stanovila se hodnota minimální inhibiční koncentrace (viz tab. 2).

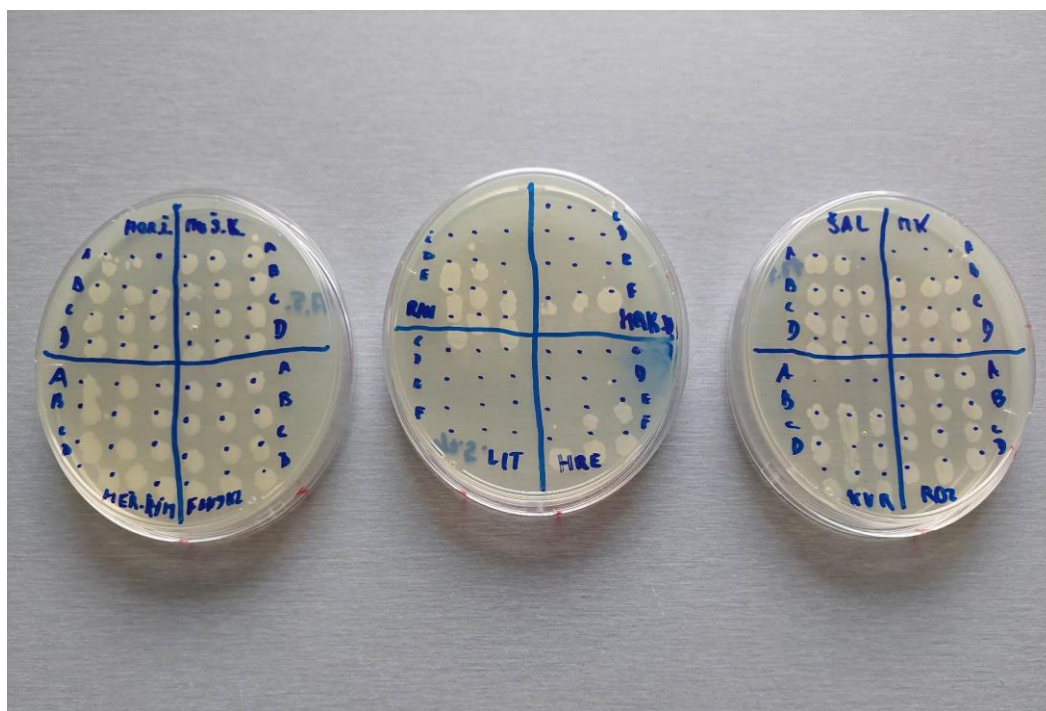
Tabulka 2: Příklad vyhodnocení MIC na mikrotitrační destičce

		Tymián			Kurkuma			Česnek			Ravensára		
( $\mu\text{g/ml}$ )		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2048	A	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice
1024	B	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice
512	C	inhibice	inhibice	inhibice	nárůst	nárůst	nárůst	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice
256	D	inhibice	inhibice	inhibice	nárůst	nárůst	nárůst	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice	inhibice
128	E	inhibice	inhibice	inhibice	nárůst	nárůst	nárůst	inhibice	inhibice	inhibice	nárůst	nárůst	nárůst
64	F	nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	inhibice	inhibice	inhibice	nárůst	nárůst	nárůst
K+	G	nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	nárůst
K-	H	bez růstu	bez růstu	bez růstu	bez růstu	bez růstu	bez růstu	bez růstu	bez růstu	bez růstu	bez růstu	bez růstu	bez růstu

zdroj: vlastní

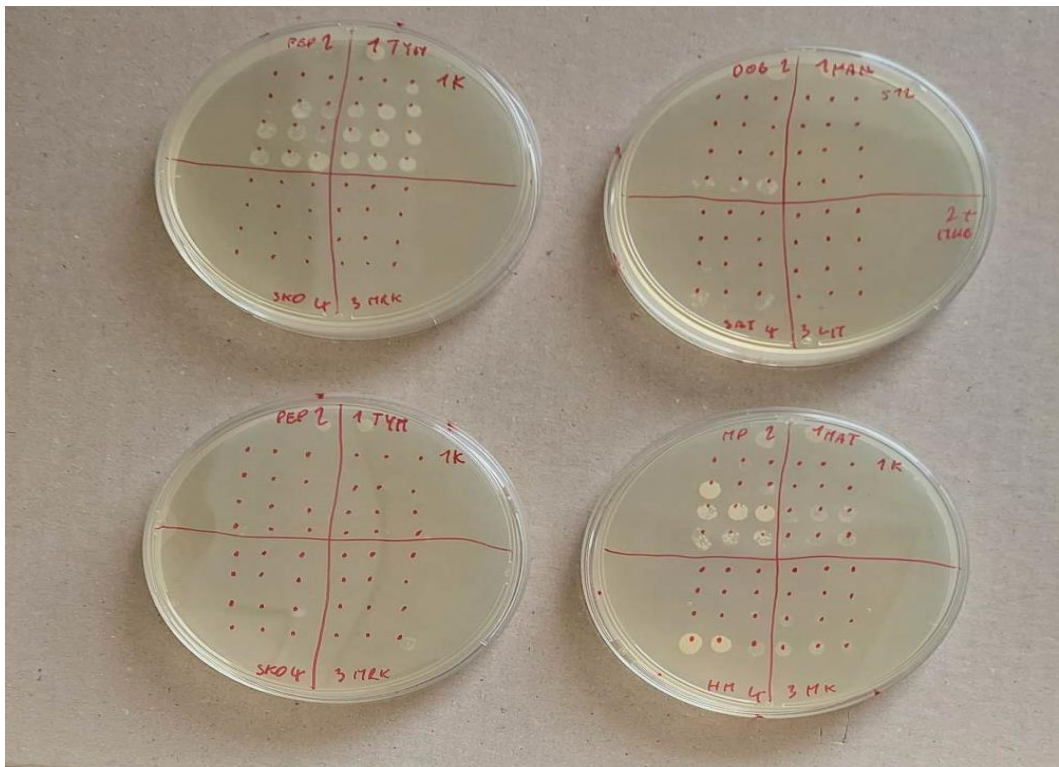
### 3.7 Stanovení minimální baktericidní koncentrace (MBC)

Pro tento test byly vybrány klasické plastové sterilní Petriho misky o průměru 90 milimetrů (viz obr. 1 a 2). Do Petriho misek bylo použito specifické tuhé medium pro kultivaci původce onemocnění moru včelího plodu. Toto medium se jmenuje MYPGP. Ke stanovení MBC byly použity 48 hodin staré kultury z výše uvedených MIC testů na mikrotitračních destičkách. Plotna se pro stanovení MBC rozdělila obrazně fixou na čtyři čtvrtkruhy. Daný čtvrtkruh obsahoval dohromady čtyři řady, které reprezentovali inokulum, jehož nejdůležitější složkou byla silice s bakterií *P. larvae*, přičemž druh zkoumané silice byl vždy v rámci jednoho čtvrtkruhu stejný. Inokulum bylo aplikováno na Petriho misku pomocí sterilní kličky o objemu 1  $\mu$ l. Každá řada se vždy skládala ze tří opakování. Tyto čtyři řady se lišili koncentrací použité silice. Koncentrace bakterie byla ve vzorku vždy stejná. Bylo na výběr 6 různých koncentrací zkoumaných silic. Konkrétně koncentrace 64  $\mu$ g/ml, 128  $\mu$ g/ml, 256  $\mu$ g/ml, 512  $\mu$ g/ml, 1024  $\mu$ g/ml a 2048  $\mu$ g/ml. Na základě výsledků ze spektrofotometru došlo k výběru čtyř vhodných řad dané silice na pomezí růstu a inhibice bakterie. Po 48 hodinách inkubace ve 37 °C došlo ke kontrole růstu/absence růstu bakterií a stanovení MBC.



Obrázek 1: nárůst bakterie *P. larvae* při testu minimální baktericidní koncentrace, zdroj: vlastní





Obrázek 2: Nárůst bakterie *P. larvae* při testu minimální baktericidní koncentrace, zdroj: vlastní

### 3.8 Zásady práce při provádění experimentu

Při tomto laboratorním úkolu bylo potřeba pracovat pečlivě a přesně. Každý chybný krok mohl značně ovlivnit celý výsledek. Důležité bylo přesné pipetování roztoků, především pak pipetování multikanálovou pipetou, což vyžadovalo menší praxi a pracovat podle návodu. Dále pak bylo potřeba dodržovat přesné množství používaných látek, čemuž předcházela správný výpočet potřebného množství, především při vaření media. Zároveň se musel dodržovat přesný čas mezi jednotlivými kroky. Například při přípravě inokula bylo potřeba inokulum s bakterií připravit tak, aby po smíchání s fyziologickým roztokem jeho denzita splňovala hodnotu  $0,5 \text{ McF}$  ( $1-2 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$ ) a hned po tom pipetovat do mikrotitrační destičky.

Důležité bylo také dodržovat dobu potřebnou při stanovení minimální inhibiční a baktericidní koncentrace. Doba těchto dvou stanovení po přípravě bakterie k růstu činila vždy 48 hodin. Za 48 hodin měla bakterie, která k tomu měla podmínky vždy vyrůst. Pokud se tak nestalo, důsledkem byl účinný baktericidní efekt použité silice.



## 4 Výsledky

### 4.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC)

Celkem byla určena MIC a MBC u 31 různých silic (viz tab. 3). Z výsledků vyplývá, že mezi zkoumané rostlinné silice s hodnotou MIC 64  $\mu\text{g/ml}$  jsou Copaiba, Česnek, Litsea, Mrkev (Nepál), Pepř a Skořice. O něco slabší silice byly Dobromysl, Hřebíček, Manuka, Mateřídouška, Mrkev setá a Tymián, jejichž hodnota MIC tedy byla 128  $\mu\text{g/ml}$ . Dále následovali opět o něco slabší silice, jako Heřmánek modrý a Ravensára, jejichž hodnota MIC se rovnala 256  $\mu\text{g/ml}$ . Máta peprná vykazovala inhibiční účinek při hodnotě zředění 512  $\mu\text{g/ml}$ . Při této hodnotě byla silice ve vzorku zředěna trojnásobně, přičemž při dalším zředění by už nedokázala inhibovat růst *P. larvae*. Silice, které inhibovali růst bakterií nejvýše při hodnotě zředění 1024  $\mu\text{g/ml}$  jsou Heřmánek žlutý, Koriandr, Kurkuma, Máta kadeřavá a Zázvor. Tyto silice už jsou poměrně slabé a při hubení *P. larvae* nejsou příliš účinné. Poslední nejpočetnější skupinou z experimentu MIC jsou v tabulce uvedeny silice s hodnotou zředění 2048  $\mu\text{g/ml}$ . Jedná se o silice Fenykl, Heřmánek římský, Kardamom, Levandule, Muškátový květ, Muškátový ořech, Pelargonie, Pelyněk, Rozmarýn, Šalvěj a Vavřín. Tyto silice jsou z experimentu nejslabší, co se týče antimikrobiálního účinku na *P. larvae*. Řada s pozitivní a negativní kontrolou měla vyjít vždy stejně, a to tak, že pokud v pozitivní nebo negativní kontrole vyšla kontaminace, bylo namístež zkontrolovat čistotu použitého media.

Tabulka 3: Výsledky minimální inhibiční koncentrace

<b>Silice</b>	<b>Minimální inhibiční koncentrace</b>
Copaiba	64 µg/ml
Česnek	64 µg/ml
Litsea	64 µg/ml
Mrkev (Nepál)	64 µg/ml
Pepř	64 µg/ml
Skořice	64 µg/ml
Manuka	128 µg/ml
Tymián	128 µg/ml
Dobromysl	128 µg/ml
Hřebíček	128 µg/ml
Mrkev setá	128 µg/ml
Mateřídouška	128 µg/ml
Ravensára	256 µg/ml
Heřmánek modrý	256 µg/ml
Máta peprná	512 µg/ml
Zázvor	1024 µg/ml
Máta kadeřavá	1024 µg/ml
Kurkuma	1024 µg/ml
Koriandr	1024 µg/ml
Heřmánek žlutý	1024 µg/ml
Pelargonie	2048 µg/ml
Muškatový ořech	2048 µg/ml
Muškatový květ	2048 µg/ml
Rozmarýn	2048 µg/ml
Pelyněk	2048 µg/ml
Šalvěj	2048 µg/ml
Levandule	2048 µg/ml
Kardamom	2048 µg/ml
Heřmánek římský	2048 µg/ml
Fenykl	2048 µg/ml
Vavřín	2048 µg/ml

*zdroj: vlastní*

## 4.2 Stanovení minimální baktericidní koncentrace (MBC)

Stanovení minimální baktericidní koncentrace bylo prováděno po nárstu bakterie v mikrotitračních destičkách (viz tab. 4). Bakteriální roztok se silicí byl z každé jamky odebrán očkovací kličkou na živné medium na Petriho miskách o průměru 90 milimetrů. Odebíraly se vždy čtyři řady směsi silice s bakterií na pomezí přechodu mezi inhibicí a růstem bakterie. Z experimentu stanovení minimální baktericidní koncentrace a minimální inhibiční koncentrace vyplývá, že nejsilnější silicí z experimentu je Copaiba, která usmrtila bakterii při hodnotě zředění 64  $\mu\text{g/ml}$ .

Dále následovali silice jako Dobromysl, Pepř, Litsea, Manuka, Skořice, Mrkev (Nepál) a Tymián. Tyto silice dokázaly usmrtit bakterie do koncentrace 128  $\mu\text{g/ml}$ . Bakterie by přežila jejich antimikrobiální účinek, pokud by tyto silice měly koncentraci 64  $\mu\text{g/ml}$  a méně.

O něco slabší byly silice Česnek, Heřmánek modrý, Hřebíček a Mrkev setá. Toto jsou středně silné silice v rámci experimentu. Tyto rostlinné silice dokázaly usmrtit bakterii *P. larvae* až do koncentrace 256  $\mu\text{g/ml}$ . Bakterie při použití těchto silic dokázala přežít, pokud měli tyto silice hodnotu zředění 128  $\mu\text{g/ml}$  a méně. Dále byly změřeny silice Ravensára a Mateřídouška. U těchto silic byla změřena hodnota MBC 512  $\mu\text{g/ml}$ . Tato dvojice silic tedy zvládla usmrtit bakterii maximálně při hodnotě zředění 512  $\mu\text{g/ml}$  a výš. Od hodnoty zředění 256  $\mu\text{g/ml}$  a méně tyto dvě silice nedokázaly bakterii usmrtit.

Nyní se dostáváme k předposlední nejslabší skupině silic, co se týče stanovení minimální baktericidní koncentrace. Do této skupiny patří silice Zázvor a Máta peprná. U těchto rostlinných silic nebyl patrný žádný nárůst bakterie *P. larvae* až do hodnoty zředění silice 1024  $\mu\text{g/ml}$ . Bakterie již dokázala přežít účinky těchto silic o koncentraci 512  $\mu\text{g/ml}$  a nižší. Zcela nejslabší skupina silic z měření MBC dokázala usmrtit bakterie při hodnotě zředění 2048  $\mu\text{g/ml}$ . Pokud měli tyto silice hodnotu zředění 1024  $\mu\text{g/ml}$  a méně, bakterie jejich působení dokázala přežít. Do této skupiny patří Fenykl, Heřmánek římský, Heřmánek žlutý, Kardamom, Koriandr, Kurkuma, Levandule, Máta kadeřavá, Muškátový květ, Muškátový ořech, Pelargonie, Pelyněk, Rozmarýn, Šalvěj a Vavřín. Tato nejslabší skupina silic byla nejpočetnější v rámci testování MBC.

Tabulka 4: Výsledky minimální baktericidní koncentrace

<b>Silice</b>	<b>Minimální baktericidní koncentrace</b>
Copaiba	64 µg/ml
Dobromysl	128 µg/ml
Litsea	128 µg/ml
Manuka	128 µg/ml
Mrkev (Nepál)	128 µg/ml
Pepř	128 µg/ml
Skořice	128 µg/ml
Tymián	128 µg/ml
Heřmánek modrý	256 µg/ml
Česnek	256 µg/ml
Hřebíček	256 µg/ml
Mrkev setá	256 µg/ml
Mateřídouška	512 µg/ml
Ravensára	512 µg/ml
Máta peprná	1024 µg/ml
Zázvor	1024 µg/ml
Vavřín	2048 µg/ml
Šalvěj	2048 µg/ml
Rozmarýn	2048 µg/ml
Pelyněk	2048 µg/ml
Pelargonie	2048 µg/ml
Muškatový ořech	2048 µg/ml
Muškatový květ	2048 µg/ml
Máta kadeřavá	2048 µg/ml
Levandule	2048 µg/ml
Kurkuma	2048 µg/ml
Koriandr	2048 µg/ml
Kardamom	2048 µg/ml
Heřmánek žlutý	2048 µg/ml
Heřmánek římský	2048 µg/ml
Fenykl	2048 µg/ml

*zdroj: vlastní*

## 5 Diskuze

Antimikrobiální efekt použitých rostlinných silic byl různorodý. Z mého pozorování měly silné silice většinou vysokou hustotu a výraznou silnou vůni. Pokud se podíváme na antimikrobiální efekt použitých silic, tak zjistíme, že silice, které vykazovaly silný antimikrobiální efekt byl malý počet. Příčinou malého počtu silic se silným antimikrobiálním efektem v experimentu mohl být náhodný výběr těchto rostlinných silic nebo také fakt, že v přírodě se vyskytuje obecně méně rostlinných silic s vysokým antimikrobiálním účinkem. Výhoda vysokého antimikrobiálního účinku silice spočívá v tom, že stačí použít pouze malé množství dané silice k usmrcení kolonie *P. Larvae*. Nevýhodou vysokého antimikrobiálního účinku silice může být špatný vliv na samotné larvy v úlu, to znamená poškození larev (Fuselli et al., 2005).

Na průkaz antimikrobiálního účinku silic byla použita metoda pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC). Stanovení MIC probíhalo na mikrotitračních destičkách. Zde bylo testováno pokaždé šest koncentrací čtyř odlišných silic. Pro MBC byly vybrány pouze čtyři koncentrace dané silice z testu MIC, přičemž první koncentrace vybrané silice byla na pomezí inhibice a růstu.

Práce s mikrotitračními destičkami a agarovými plotnami, kam byla umístována bakterie s rostlinou silicí byla náročná z důvodu snadné kontaminace. Muselo se vždy postupovat za přísných hygienických podmínek, jinak hrozila kontaminace.

Kontaminace vzorku byla zjišťována dvěma způsoby. První možností bylo nechat prosvítit mikrotitrační destičku slunečním světlem a zaměřovat se na nárůst cizorodých bakterií. Bakterie *P. larvae* měla vždy bílou barvu. Druhou možností bylo pomocí spektrofotometru. Pokud kontaminace v určitém vzorku přesáhla z výsledků 700 jednotek absorbance naměřených na spektrofotometru, byla tak prokázána přítomnost jinou bakterií, než je *P. larvae*. Další možnosti bylo přenesení inokula na agarovou plotnu, jako při stanovení MBC a sledování růstu. Byla tak zajištěna přesnější identifikace a snížila se tím chybovost špatného určení kontaminovaného vzorku.

Výběr vhodných silic k použití na výrobu preventivního přípravku na mor včelího plodu záleží například na velikosti úlu, hustotě zamoření, typu včelstva a tak podobně. Aktuálně se úly nakažené morem včelího plodu musí pálit. Použití silic v úlovém prostředí by mohlo být tím pádem předmětem dalšího výzkumu.

Tohidpour et al. (2010) uvádí, že tymiánová silice, je bohatá na thymol a dle Juven et al. (1994) byly hlášeny antagonistické účinky thymolu proti *Listeria monocytogenes* a *Bacillus subtilis*. Má práce zkoumala působení Tymianu proti *P. Larvae*, kde tymián dosahoval hodnot MBC a MIC 128 µg/ml. Dále pak Ben Jabeur et al. (2017) ve své studii uvádějí, že silice Tyminán vykazuje antifungální aktivitu neboli schopnost potlačovat růst a šíření houby. Toto zjištění se pravděpodobně využije pro navržení alternativního biofungicidu (prostředky sloužící k potlačení růstu a šíření hub), který minimalizuje riziko vzniku multirezistence patogenů.

Silice Skořice dosahovala při měření proti *P. larvae* u testu MIC 64 µg/ml a u MBC 128 µg/ml. Gende et al. (2008) tvrdí, že Skořice vykazuje *in vitro* antibakteriální aktivitu, která je způsobena přítomností eugenolu i proti *Staphylococcus aureus*. Skořice se řadí do čeledi *Lauraceae* a rodu *Cinnamomum*. Tento rod zahrnuje asi 250 druhů. Skořice patří také k tradičním bylinným lékům, které jsou široce distribuovány v Číně, Indii a Austrálii (Wang a Yang, 2009). Pro své antimikrobiální, antioxidační a antikarcinogenní aktivity je Skořice využívána v potravinářství, koření, kosmetice a lékařství (Li et al., 2013).

Testovaná silice Hřebíček v našem měření vykazovala o něco nižší antimikrobiální účinky, než tomu bylo například u silice Pepř, nicméně stále ji můžeme řadit do poměrně účinných silic. Hodnota MIC u Hřebíčku byla 128 µg/ml a hodnota MBC 256 µg/ml. Eugenol je hlavní sloučeninou hřebíčkové silice (*Syzygium aromaticum*) a má kromě antimikrobiálních účinků také antioxidační, protizánětlivé, anestetické, protirakovinné a relaxační účinky. Mimo to také napomáhá ochraně kostí, posiluje pokožku a vykazuje insekticidní účinky (Kaur a Kaushal, 2019). Selles et al. (2020) ve své studii testovali silici hřebíček (*Syzygium aromaticum*) proti různým bakteriím, jako jsou *Serratia sp.*, *Salmonella sp.*, *Kluyvera sp.*, *Klebsiella sp.* a *E. coli*. MIC naměřili u bakterie *Serratii sp.* a *Salmonelli sp.* 2,72 mg/ml. U *Kluyvera sp.*, *Klebsiella sp.* a *E. coli*. naměřili hodnotu MIC 1,36 mg/ml. Hodnoty, které naměřili u MBC byly několikanásobně vyšší. U *Serratii sp.* naměřili hodnotu MBC 10,9 mg/ml. U *Salmonelli sp.* a *Kluyveri sp.* naměřili hodnotu MBC 5,45 mg/ml. U *Klebsielli sp.* jim vyšla hodnota MBC opět 10,9 mg/ml stejně jako u *Serratii sp.* Hodnota MBC u *E. coli* jim vyšla 5,45 mg/ml.

Heřmánek římský byl v testu MIC a MBC naopak vyhodnocen jako silice s velice slabou antimikrobiální aktivitou. Hodnota MBC a MIC Heřmánku římského vyšla

2048 µg/ml. Bail et al. (2009) studovali účinky silice Heřmánku římského proti různým kmenům grampozitivních bakterií, jako jsou například *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis* a gramnegativních bakterií jako jsou například *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*, a také proti kvasinkám *Candida albicans* za použití modifikované metody ředění agaru a agarové difúze. Výsledkem testů bylo, že Heřmánek vykazoval vysokou antimikrobiální aktivitu proti všem kmenům testovaných mikrobů.

Silice Heřmánek modrý vykazovala u testů MIC a MBC hodnotu 256 µg/ml. Hlavní složkou Heřmánku je Chamazulen a Bisabolol, které zajišťují antimikrobiální účinky Heřmánku (Gosztola et al., 2010). Další testovanou silicí byla Litsea. Ansari et al. (2016) zařadili silici Litsea do kategorie vysoce účinných silic s hodnotou MBC 186 µg/ml a u MIC 85 µg/ml proti *P. larvae*. Při mém měření vyšla hodnota MBC u Litsey 128 µg/ml a hodnota MIC 64 µg/ml. Hodnoty měření MBC a MIC u Ansari et al. (2016) vyšly u Litsey v porovnání s mým měřením podobně. Důvodem tohoto malého rozdílu může být rozdílné složení silice Litsey nebo mírně odlišná metodika provedení experimentu. U silice Česnek vyšla vysoká antimikrobiální aktivita hlavně u testu MIC, kde hodnota Česneku vyšla 64 µg/ml. Hodnota MBC Česneku vyšla 256 µg/ml. Hlavní účinnou složkou Česneku je nejčinnější disulfid s výrazným antibakteriálním účinkem. Kromě toho, že se používá k inhibici *P. larvae*, nachází využití inhibice i u bakterií patřících do skupiny *E. coli*, *tyfus Bacillus*, *epiphytes*, *Vibrio cholerae* a další viry.

Silice Manuka měla mnou naměřené hodnoty MIC a MBC 128 µg/ml, což vykazuje její silnou antimikrobiální účinnost proti bakterii *P. larvae*. Podle Chen et al. (2016) má Manuka vysokou inhibici i proti bakteriím, jako jsou například *S. aureus*, *S. mutans*, *S. sobrinus* nebo *E. coli*. Dále tvrdí, že dokáže inhibovat, jak gramnegativní, tak grampozitivní bakterie, přičemž antibakteriální účinky této silice zůstaly silné i po dlouhých dobách inkubace bakterie.

Další vysoce účinné silice z měření můžou být zmíněny silice Copaiba, Pepř a Mrkev. Hodnota Pepře při testu MBC vyšla při měření 128 µg/ml, což je nepatrně menší hodnota, než kterou naměřili Ansari et al. (2016), kterým při měření silice Pepře vyšlo  $162 \pm 18,2$  µg/ml. Důvodem rozdílu může být mírně odlišná metodika experimentu, která byla během testování použita. Při měření MIC u Pepře vyšla hodnota 64 µg/ml. V porovnání s testem MIC Pepře u Ansari et al. (2016), kterým vyšlo  $78 \pm 8,2$  µg/ml je námi naměřená hodnota nižší. Další silice s vysokou účinností z této

skupiny je silice Mrkev setá. Zdrojem esenciálního oleje z mrkvových semen jsou především semena divoké mrkve (*Daucus carota L. ssp. carota, Apiaceae*), které se běžně vyskytují v Evropě. Vůně této esenciální silice je jemně sladká a jsou v ní přítomny zemité a bylinné náznaky. V tradiční medicíně se vlastnosti této silice využívaly k léčbě zažívacích potíží (Sieniawska et al., 2016). Při našem měření dosáhla silice Mrkev setá hodnoty MIC 128 µg/ml a MBC 256 µg/ml. V porovnání s testováním silice Mrkve u Ansari et al. (2016), kterým u Mrkve vyšla hodnota MIC  $482.0 \pm 36.5$  a hodnota MBC  $612.6 \pm 52.0$  jsou námi naměřené hodnoty znatelně nižší. Důvodem může být mírně odlišná metodika experimentu a odlišné složení testované silice Mrkve. Copaiba při měření dosáhla hodnoty MIC a MBC 64 µg/ml. Antimikrobiální aktivita Copaiby byla popsána i proti jiným orálním mikroorganismům, jako jsou *S. pyogenes* a *S. salivarius*. Olej Copaiba se skládá z několika různých látek, jako jsou například kyselina kopalová, kanabinoidy a  $\beta$ -karyofylen. Tyto látky mohou mít různé interakce s bakterií, což potlačuje vývoj rezistentních kmenů *S. mutans* (Pieri et al., 2012). Co se týče účinků Copaiby na jiné bakterie, tak například Packer a Luz (2007) ve své studii uvádí, že silice Copaiba nevykazuje inhibiční účinek proti bakteriálním kmenům, jako je *Staphylococcus aureus* nebo *Pseudomonas aeruginosa*.



## 6 Závěr

Tato práce se zaměřovala na zkoumání působení rostlinných silic na bakterii *P. larvae*. Práce splnila své cíle, které byly zadány na začátku experimentu. Byly vybrány vhodné rostlinné silice, u kterých se dalo vždy změřit, při jaké koncentraci začnou působit svým antimikrobiálním účinkem na bakterii *P. larvae*, a kdy už ne. Bylo určeno šest koncentrací zředěných silic, jako rámec, a všechny vybrané silice se do tohoto rámce vešly. Konkrétně se jednalo o koncentrace, které jsou uvedeny v tabulce čili hodnoty 2048 µg/ml, 1024 µg/ml, 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml a 64 µg/ml. Tyto rámcové koncentrace určovaly, kolikrát je daná silice zředěna a zda daná silice s touto koncentrací ještě zvládne bakterii ve vzorku zničit nebo jen inhibovat její růst. U vybraných silic se poté vždy stanovila minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC). Výsledky byly poté zahrnuty do tabulky a seřazeny podle antimikrobiálního účinku vybraných silic.

V literární části jsou stručně popsány informace o včele medonosné. Dále se práce podrobněji věnuje onemocnění moru včelího plodu. V literární části jsou popsána i jiná včelí onemocnění, která jsou způsobena bakteriemi, parazity nebo houbami. Dále jsou popsány různé možnosti dezinfekce a v poslední řadě jsou zde popsány vlastnosti, výskyt, struktura, získávání a působení rostlinných silic na mikroorganismy.

Z měření vyšla jako nejúčinnější silice Copaiba, která dosahovala hodnot 64 µg/ml u testu minimální inhibiční koncentrace (MIC) i u minimální baktericidní koncentrace (MBC). To znamená, že tato silice dokázala zničit bakterii *P. larvae* při koncentraci 64 µg/ml. Dosáhnout v obou testech MIC a MBC hodnoty 64 µg/ml se žádné jiné silici kromě Copaiiby v experimentu nepodařilo. Silice, které dosahovaly u testu MIC hodnot 64 µg/ml a zároveň u testu MBC hodnoty 128 µg/ml jsou Mrkev (Nepál), Pepř, Litsea a Skořice. Naopak z experimentu vyšly jako nejslabší silice Fenykl, Heřmánek římský, Kardamom, Levandule, Muškátový květ, Muškátový ořech, Pelargonie, Pelyněk, Rozmarýn, Šalvěj a Vavřín. U těchto silic vyšla hodnota MIC a MBC 2048 µg/ml.

Velký důraz byl při provádění experimentu kladen na přesnost pipetování a dodržování přísných hygienických podmínek, aby se tak předešlo kontaminaci vzorků, což by negativně ovlivnilo výsledky. Dezinfekce byla nedílnou součástí pro úspěšné provedení experimentu. Dezinfikovalo se prakticky vše, s čím se pracovalo ve

flowboxu. Výsledky z měření MIC byly vyhodnocovány na mikrotitračních destičkách pomocí spektrofotometru a výsledky MBC byly vyhodnocovány na Petriho miskách.

Co se týče hypotéz, tak první hypotéza se zabývá tím, zda mají vybrané silice v experimentu vliv na bakterii *P. larvae*. To bylo potvrzeno při testu MIC a MBC, jelikož z výsledků těchto testů je patrné, že i ty nejslabší vybrané silice dokázaly úspěšně inhibovat růst bakterie *P. larvae*

Druhá hypotéza se ptala na to, zda bude mít některá z vybraných rostlinných silic minimální inhibiční koncentraci  $\leq 64 \mu\text{g/ml}$ . Tato hypotéza byla také potvrzena, protože u silice Copaiby vyšla hodnota MIC a MBC  $64 \mu\text{g/ml}$ .

## 7 Seznam použitých zdrojů

1. Anitescu, G., Doneanu, C., & Radulescu, V. I. (1997). Isolation of coriander oil: comparison between steam distillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Flavour and fragrance journal*, 12(3), 173-176.
2. Ansari, M. J., Al-Ghamdi, A., Usmani, S., Al-Waili, N., Nuru, A., Sharma, D., ... & Omer, M. (2016). In vitro evaluation of the effects of some plant essential oils on *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1), 49-55.
3. Asaj, A. (2000). *Dezinfekcija*, Medicinska naklada, 1-170.
4. Arnodou, J. F. (1991). The taste of nature; industrial methods of natural products extraction. In a conference organized by the Royal Society of Chemistry in Canterbury (pp. 16-19).
5. Bail, S., Buchbauer, G., Jirovetz, L., Denkova, Z., Slavchev, A., Stoyanova, A., ... & Geissler, M. (2009). Antimicrobial activities of roman chamomile oil from France and its main compounds. *Journal of Essential Oil Research*, 21(3), 283-286.
6. Belojević, G. (2013). Higijena, *Univerzitet Crne Gore*, 1-279.
7. Ben Jabeur, M., Somai-Jemmali, L., & Hamada, W. (2017). Thyme essential oil as an alternative mechanism: biofungicide-causing sensitivity of *Mycosphaerella graminicola*. *Journal of applied microbiology*, 122(4), 932-939.
8. Bentzien, C. (2008). *Ekologický chov včel*. Víkend.
9. Bergkvist, T. P. (2007). *Antimicrobial activity of four volatile essential oils*. Master Thesis in Pharmacy, Göteborgs Universite.

10. Beránek, V., Geisler, V., Lisý, E., Rošický, M., Savvin, J., Svoboda, J., Tocháček, E., Vitek, V. (1956). *Včelařská encyklopedie*, Státní zemědělské nakladatelství.
11. Bojanić Rašović, M. (2021). Značaj i metode dezinfekcije u stočarstvu (1nd ed), *Pčelarstvo*, 238, 22-25.
12. Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2009). A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of food Engineering*, 90(3), 409-413.
13. Hansen, H., & Brødsgaard, C. J. (2003). Tolerance mechanisms against American foulbrood in honeybee larvae and colonies. *Apiacta*, 38, 114-124.
14. Buchrieser, V., Miorini, T. (2009). Osnovi čišćenja i dezinfekcije, Osnovna skripta za reprocessiranje medic. instrumenata i pribora. *SUSID (Srpsko udruženje sterilizacije i dezinfekcije)*, 1-19.
15. Bzdil, J. (2010). Nové metody v diagnostice moru včelího plodu. [disertační práce]. 121 s.
16. Cassel, E., Vargas, R. M. F., Martinez, N., Lorenzo, D., & Dellacassa, E. (2009). Steam distillation modeling for essential oil extraction process. *Industrial crops and products*, 29(1), 171-176.
17. Chen, Y., Evans, J., Feldlaufer, M. (2006). Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92 (3). 152-159.
18. Chen, C. C., Yan, S. H., Yen, M. Y., Wu, P. F., Liao, W. T., Huang, T. S., ... & Wang, H. M. D. (2016). Investigations of kanuka and manuka essential oils for in vitro treatment of disease and cellular inflammation caused by infectious microorganisms. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49(1), 104-111.

19. Čavojský, V. (1981). *Včelárstvo*. Příroda.
20. Drašar, J. (1978). *Včelářství* (1nd ed.). státní zemědělské nakladatelství.
21. Dugo, G., & Di Giacomo, A. (Eds.). (2002). *Citrus: the genus citrus*. CRC Press.
22. Duquesne, V., Gastaldi, C., Del Cont, A., Cougoule, N., Bober, A., Brunain, M., Franco, S. (2021). An international inter-laboratory study on *Nosema* spp. spore detection and quantification through microscopic examination of crushed honey bee abdomens. *Journal of Microbiological Methods*, 184, 106183.
23. Ebeling, J., Knispel, H., Hertlein, G., Fünfhaus, A., Genersch, E. (2016). Biology of *Paenibacillus* larvae, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(17), 7387-7395.
24. Eikani, M. H., Goodarznia, I., & Mirza, M. (1999). Supercritical carbon dioxide extraction of cumin seeds (*Cuminum cyminum* L.). *Flavour and Fragrance Journal*, 14(1), 29-31.
25. Farrar, C.L. (1947). *Nosema* losses in package bees as related to queen supersedure and honey yields, *J. Econ. Entomol*, 40, 333–338.
26. Flesar, J., Havlík, J., Klouček, P., Rada, V., Titěra, D., Bednar, Stropnický, M., Kokoska, L. (2010). In vitro growth-inhibitory effect of plantderived extracts and compounds against *Paenibacillus* larvae and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Veterinary Microbiology*, 145, 129-133.
27. Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S. B., Pieniazek, J. (1996). *Nosema ceranae* n. 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.

28. Fries, I. (1988) Comb replacement and nosema disease (*Nosema apis* Z.) in honey bee colonies, *Apidologie*, 19, 343–354.
29. Fries, I. (1997) Protozoa, 3rd ed., in: Morse R.A., Flottum K. (Eds.), Honey bee pests, predators, and diseases.
30. Fries, I., Lindström, A., Korpela, S. (2006). Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*). *Veterinary Microbiology*, 114 (3–4), 269-274.
31. Fuselli, S. R., Gende, L. B., de la Rosa, S. G., Eguaras, M. J., & Fritz, R. (2005). Inhibition of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* by the essential oils of two wild plants and their emulsifying agents. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 3(2), 220-224.
32. Furgala, B. (1962). The effect of the intensity of *Nosema* inoculum on queen supersedure in the honey bee. *Apis mellifera* Linnaeus. *J. Insect Pathol*, 4, 429-432.
33. Genersch, E. (2008). *Paenibacillus larvae* and American foulbrood—long since known and still surprising. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 3, 429-434.
34. Genersch, E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S10-S19.
35. Gende, L. B., Floris, I., Fritz, R., & Eguaras, M. J. (2008). Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentina. *Bulletin of insectology*, 61(1), 1.
36. Gosztola, B., Sárosi, S., & Németh, E. (2010). Variability of the essential oil content and composition of chamomile (*Matricaria recutita* L.) affected by weather conditions. *Natural product communications*, 5(3).

37. Hansen, H., & Brødsgaard, C. J. (2003). Control of American foulbrood by the shaking method. *Apiacta*, 38, 140-145.
38. Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailón, E., & Higes, M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and environmental microbiology*, 73(20), 6331-6338.
39. Higes, M., Matin, R., Meana, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bees in Europe. *Journal Invert. Pathol*, 92, 93-95.
40. Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E. G., González-Porto, A. V., Barrios, L., ... & Meana, A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental microbiology*, 10(10), 2659-2669.
41. Hornitzky, M. (2001). Literature review of chalkbrood. *A report for the RIRDC*, 1(150), 1-20.
42. Hrobařová, B. (2010). Nemoci dospělých včel. *Včelařství*, 63, 196-197.
43. Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J., Šícha, J. (1989). *Obecná farmakognosie. II. Sekundární látky*. Státní pedagogické nakladatelství.
44. Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of applied bacteriology*, 76(6), 626-631.
45. Kalembe, D., Kunicka, A. (2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-829.
46. Kamler, F., Oliva, Z., Ptáček, V. (1998). *Nástavkové včelaření*. Výstavnictví Ministerstva zemědělství a výživy ČR.

47. Kaur, K., & Kaushal, S. (2019). Phytochemistry and pharmacological aspects of *Syzygium aromaticum*: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(1), 398-406.
48. Kareš, I. (2005). Výskyt multirezistentních kmenů a dekontaminace zdravotnických prostředků. Sestra-mimořádná příloha.
49. Kursa, J., Jílek, F., Vítovec, J., Rajmon, R. (1998). Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat. *JU ZF a ČZU agronomická fakulta*, 200 s.
50. Khajeh, M., Yamini, Y., Bahramifar, N., Sefidkon, F., & Pirmoradei, M. R. (2005). Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food chemistry*, 91(4), 639-644.
51. Lang, Q., & Wai, C. M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta*, 53(4), 771-782.
52. Li, Y. Q., Kong, D. X., & Wu, H. (2013). Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC–MS and FTIR spectroscopy. *Industrial Crops and Products*, 41, 269-278.
53. Lindström, A. (2006). Distribution and Transmission of American Foulbrood in Honey Bees. [Doctoral dissertation] Swedish University of Agricultural Sciences].
54. Löffelmann, J. (2013). Snadná detekce moru a hniloby včelího plodu. *Včelařství*, 116-117.
55. Macek, J., Straka J., Bogusch P., Dvořák L., Bezděčka P. & Tyrner P. (2010). Blanokřídlí České republiky I. – žahadloví. *Academia*. 524 s.



56. Madara, V. (2009). Mor včelího plodu se dá úspěšně potlačit. *Včelařství*, 270-273.
57. Malena, M. (2007). Metodický návod SVS ČR číslo (Ře/585/2007). *Státní veterinární správa České republiky*, 2.
58. Moulton, H., Chow, G., Morcos, P. (2017). *Morpholino Oligomers*. Humana Press.
59. Modey, W. K., Mulholland, D. A., & Raynor, M. W. (1996). Analytical supercritical fluid extraction of natural products. *Phytochemical Analysis*, 7(1), 1-15.
60. Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., & Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food control*, 20(2), 157-160.
61. Naves, Y. R. (1974). Technologie et chimie des parfums naturels; essences concretes, resinoides, huiles et pommades aux fleurs.
62. Packer, J. F., Luz, M. (2007). Evaluation and research method for natural products inhibitory activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 102-107.
63. Palmer, K. A., Oldroyd, B. P. (2003). Evidence for intra-colonial genetic variance in resistance to American foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*): further support for the parasite/pathogen hypothesis for the evolution of polyandry. *Naturwissenschaften*, 90, 265–268.
64. Otterbach, A., & Wenclawiak, B. W. (1999). Ultrasonic/S Soxhlet/supercritical fluid extraction kinetics of pyrethrins from flowers and allethrin from paper strips. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 365, 472-474.

65. Pernal, S. F., Albright, R. L., Melathopoulos, A. P. (2008). Evaluation of the Shaking Technique for the Economic Management of American Foulbrood Disease of Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economical Entomology*, 101 (4), 1095-1104.
66. Pernica, J. (1991). *Úspěšný chov včel*. Brázda (Zemědělské nakladatelství).
67. Pieri, F. A., Mussi, M. C. M., Fiorini, J. E., Moreira, M. A. S., & Schneedorf, J. M. (2012). Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. *Brazilian Dental Journal*, 23, 36-38.
68. Piggott, M. J., Ghisalberti, E. L., & Trengove, R. D. (1997). Western Australian sandalwood oil: extraction by different techniques and variations of the major components in different sections of a single tree. *Flavour and Fragrance Journal*, 12(1), 43-46.
69. Piccirillo, G. A., De Jong, D. (2002). Old brood combs are more infested by the mite *Varroa Jacobsoni* than new brood combs. *Apiacta*. 1.
70. Pourmortazavi, S. M., & Hajimirsadeghi, S. S. (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of chromatography A*, 1163(1-2), 2-24.
71. Přidal, A. (2008). Mor včelího plodu – diagnostika. *Moderní včelař*, 3, 5–6.
72. Přidal, A. (2009). Mor včelího plodu a syrovátka. *Moderní včelař*, 6, 184–185.
73. Rejnič, J. (1990). *Včelářstvo* (2nd ed.). Příroda.
74. Rinderer, T. E., Rothenbuhler, W. C., Gochnauer, T. A. (1975). The influence of pollen on the susceptibility of honey bee larvae to *Bacillus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 13, 81–86.

75. Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of invertebrate pathology*, 103, 96-119.
76. Selles, S. M. A., Kouidri, M., Belhamiti, B. T., & Ait Amrane, A. (2020). Chemical composition, in-vitro antibacterial and antioxidant activities of *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(4), 2352-2358.
77. Sedláček, I. (2007). *Taxonomie prokaryot*. Masarykova univerzita.
78. Sieniawska, E., Świątek, Ł., Rajtar, B., Koziół, E., Polz-Dacewicz, M., & Skalicka-Woźniak, K. (2016). Carrot seed essential oil—Source of carotol and cytotoxicity study. *Industrial Crops and Products*, 92, 109-115.
79. Sláma, J. (2010). Minimum znalostí pro začátečníky. *Včelařství*, 12, 414 s.
80. Spivak, M., & Reuter, G. S. (2001). Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie*, 32(6), 555-565.
81. Svoboda, J., Haragsimová, L., Hanko, J., Haragsim. O. (1968). *Nemoci a škůdci v čely-medonosné*. SZN – Státní zemědělské nakladatelství.
82. Státní veterinární správa ČR. (2015). Ohniska hniloby včelího plodu mezi rokem 2015-2017 na území ČR.
83. Stratakos, A. C., & Koidis, A. (2016). Methods for extracting essential oils. In *Essential oils in food preservation, flavor and safety* (pp. 31-38). Academic Press.
84. Švamberg, V. (2000). *Štajemný svět včel*. Víkend.

85. Tautz, J. (2009). Fenomenální včely Biologie včelstva jako superorganismu. Brázda.
86. Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A., & Nazemi, J. (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Phytomedicine*, 17(2), 142-145.
87. Titěra, D. (2007). *Mor včelího plodu – Pohroma a obnova*. Ministerstvo zemědělství ČR.
88. Titěra, D. (2009). *Mor včelího plodu*. Výzkumný ústav včelařský.
89. Titěra, D. (2009). *Dezinfekce ve včelařství*. Výzkumný ústav včelařský, s.r.o., 1-36.
90. Titěra, D., Kamler, M., Erban, T., Hubert, J. (2018). *Mor včelího plodu – Dianostika, prevence a tlumení*. Výzkumný ústav včelařský.
91. Veselý, V., Bacílek, J., Čemrák, K., Drobníková, V., Haragsim, O., Kamler, F., Krieg, P., Kubišová, S., Peroutka, M., Ptáček, V., Škrobal, D. (2003). *Včelařství* (2nd ed.). Brázda (zemědělské nakladatelství).
92. Vlas, T., Cibulka, R. (2021). Sborník prezentací – studentská konference 2020. Západočeská univerzita v Plzni, 7 s.
93. Vukićević, Z., Hrgović, N. (1988). Dezinfekcija u veterinarskoj medicini Savez veterinara i veterinarskih tehničara Jugoslaije, 1-240.

94. Wang, R., & Yang, B. (2009). Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 289-292.
95. Wang, D.-I., Moeller, F.E. (1969). Ultrastructural changes in the hypopharyngeal glands of worker honey bees infected by *Nosema apis*. *J. Invertebr. Pathol*, 17, 308-320.
96. Wang, D.-I., Moeller, F.E. (1971). Ultrastructural changes in the hypopharyngeal glands of worker honey bees infected by *Nosema apis*. *J. Invertebr. Pathol*, 17, 308-320.
97. Williams, D. L. (2000). A veterinary approach to the European honey bee (*Apis mellifera*). *The Veterinary Journal*, 160(1), 61-73.
98. Yue, C., Schröder, M., Gisder, S., Genersch, E. (2007). Vertical-transmission routes for Deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *J. Gen. Virol*, 88, 2329-2336.
99. Zander, E. (1909). Tierische parasiten als krankheitserreger bei der biene. *Münchener Bienenzeitung*, 31, 196-204.

## 8 Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam použitých rostlinných silic .....	35
Tabulka 2: Příklad vyhodnocení MIC na mikrotitrační destičce .....	38
Tabulka 3: Výsledky minimální inhibiční koncentrace .....	42
Tabulka 4: Výsledky minimální baktericidní koncentrace .....	44

## **9 Seznam obrázků**

Obrázek 1: nárůst bakterie *P. larvae* při testu minimální baktericidní koncentrace ..... 39

Obrázek 2: Nárůst bakterie *P. larvae* při testu minimální baktericidní koncentrace ..... 40

## 10 Seznam použitých zkratek

CCM	Czech collection of microorganisms
DMSO	dimethylsulfoxid
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MBC	minimální baktericidní koncentrace
McF	McFarland
PCR	polymerázová řetězová reakce
repPCR	polymerázová řetězová reakce s repetitivními prvky
PEG	polyethylenglykol
EU	Evropská unie
MVP	mor včelího plodu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	uhličitan sodný
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	hydrogenfosforečnan draselný
CFU	jednotka tvořící kolonie
RAPD	amplifikované polymorfní DNA testy
RFLP	polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů
AFLP	polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů
REP	repetitivní extragenní palindromické prvky
ERIC	enterobakteriální repetitivní intergenové konsenzuální sekvence
SFE	superkritické extrakce tekutin
ATB	antibiotika
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý