

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Antimikrobiální účinky extraktů řasy *Chlorella sorokiniana* vůči bakterii *Paenibacillus larvae*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Tereza Vránová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
Rok:	2017

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 12. 5. 2017

V první řadě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas, zájem a ochotu kdykoliv se vším poradit při zpracování teoretické a experimentální části bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Mgr. Silvii Dostálkové za cenné rady, pomoc a dohled při provádění experimentů. A v poslední řadě bych chtěla také poděkovat celé Katedře biochemie za vstřícný a přátelský přístup během mého studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Vránová
Název práce	Antibakteriální účinky extraktů z řasy <i>Chlorella sorokiniana</i> vůči bakterii <i>Paenibacillus larvae</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017

Abstrakt

Včely zaujímají v hospodářství velmi důležitou roli. Nejen že jsou zdrojem celé řady produktů využívaných v potravinářství nebo mající terapeutické účinky (včelí vosk, propolis, mateří kašička, med, pyl), ale také jsou velmi důležitými opylovateli hospodářských plodin. K jedněm z nejzávažnějších onemocnění včely medonosné (*Apis mellifera*) patří mor včelího plodu způsobený bakterií *Paenibacillus larvae*, která napadá mladé včelí larvy. Jedním ze způsobů, jak toto onemocnění potlačit, je použití antibiotik. V Evropské unii je však kvůli možné kontaminaci včelích produktů léčení antibiotiky zakázáno, proto je třeba najít alternativní řešení. V teoretické části práce jsou popsány principy humorální imunity se zaměřením na včely, nejčastější bakteriální patogeny způsobující závažná včelí onemocnění a také metody studia antimikrobiálních látek. V praktické části byla optimalizována metoda difuzních testů, aplikace vodných a acetonových extraktů řasy *Chlorella sorokiniana* a byla otestována antimikrobiální aktivita těchto extraktů proti *Paenibacillus larvae*. Vodné extrakty řasy byly aplikovány na povrch naočkovaného média, zatímco acetonové extrakty byly testovány na miskách se zalitou bakteriální kulturou. Dále byla stanovena minimální inhibiční koncentrace vodných extraktů proti bakterii *P. larvae* za použití resazurinu. Nejúčinnější byl vodný extrakt autotrofní řasy, jehož hodnoty minimální inhibiční koncentrace byly v porovnání s vodným extraktem autotrofní degradované řasy a heterotrofní řasy nejnižší. Pro zařazení kmenů *P. larvae* do klasifikačního systému ERIC I-IV se používá metoda PCR, pro spolehlivé zařazení používaných sbírkových kmenů bude potřeba metodu PCR dále optimalizovat.

Klíčová slova	včela medonosná, antimikrobiální aktivita, <i>Chlorella sorokiniana</i> , vodný a acetonový extrakt, <i>Paenibacillus larvae</i>
Počet stran	69
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Tereza Vránová
Title	Antimicrobial properties of extracts from <i>Chlorella sorokiniana</i> against bacterium <i>Paenibacillus larvae</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Jiří Danihlák, Ph.D.
The year of presentation	2017

Abstract

Bees play a very important role in economy. They are not only a source of a whole range of products used in the food industry or products with therapeutic effects (beeswax, propolis, royal jelly, honey, pollen), but they are also very important for their pollination activity. American foulbrood is one of the most serious diseases of honey bees (*Apis mellifera*), it is caused by the bacterium *Paenibacillus larvae*, which attacks young larvae. Using antibiotics is one way how to control this disease. However, in the European Union, the usage of antibiotics is prohibited due to contamination of bee products, thus alternative solutions are needed. Humoral immunity with particular interest on honey bees is described in the theoretical part of the thesis. A specific focus is also aimed on the most common bacterial pathogens and methods for studying of antimicrobial agents. The diffusion assay and the application of aqueous and acetone extracts of *Chlorella sorokiniana* were optimized in the practical part of the thesis. The antimicrobial activity of these extracts were tested against the *Paenibacillus larvae*. The aqueous extracts were applied on the surface of the inoculated medium, while the acetone extracts were tested on plate with embedded bacterial culture. The minimum inhibitory concentrations of the aqueous extracts were determined against the bacteria *P. larvae* using resazurin method. The most active was the aqueous extract of autotrophic algae whose values of minimum inhibitory concentration were the lowest compared to the aqueous extract of autotrophic degraded algae and heterotrophic algae. A PCR method was performed for determination of *P. larvae* strains into the

ERIC I-IV classification system. Further optimization of the PCR method is needed for reliable inclusion of the collected strains.

Keywords	honeybee, antimicrobial activity, <i>Chlorella sorokiniana</i> , aqueous and acetone extract, <i>Paenibacillus larvae</i>
Number of pages	69
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Imunita jednotlivých včel a mikrobiální patogeny.....	2
2.1.1 Fyzikální bariéry	2
2.1.2 Buněčná imunita.....	2
2.2 Humorální složka imunitního systému.....	4
2.2.1 Antimikrobiální peptidy	4
2.2.2 Aglutininy (lektiny).....	5
2.2.3 Fenoloxidasová kaskáda	5
2.2.4 Lysozym.....	7
2.3 Bakteriální patogeny včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>)	8
2.3.1 <i>Paenibacillus larvae</i>	8
2.3.2.1 Klasifikace <i>Paenibacillus larvae</i>	9
2.3.2 <i>Melissococcus plutonius</i>	10
2.4 Výživa včel se zaměřením na její význam na rozvoj AFB nebo EFB.....	12
2.4.1 Účinky včelích produktů na AFB nebo EFB	12
2.4.1.1 Propolis	13
2.4.1.2 Med	13
2.4.1.3 Mateří kašička	14
2.5 Metody studia antimikrobiálních látek	15
2.5.1 Difuzní metody.....	15
2.5.1.1 Disková difuzní metoda	15
2.5.1.2 Metoda využívající koncentračního gradientu (E-test).....	16
2.5.2 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) – bioautografická.....	16
2.5.2.1 Agarová difuze	17
2.5.2.2 Přímá bioautografie.....	17
2.5.2.3 Vrchní agar.....	17
2.5.2 Diluční metody.....	18
2.5.2.1 Diluční metoda v tekutém médiu	18
2.5.2.2 Agarová diluční metoda	19
2.5.3 Time-kill test	19
2.5.4 ATP bioluminiscenční test	19
2.6 Řasa <i>Chlorella spp.</i>	21
2.6.1 Kultivace řasy <i>Chlorella spp.</i>	24
2.6.2 Využití řasy <i>Chlorella spp.</i>	25
2.6.2.1 Využití řasy <i>Chlorella spp.</i> ve včelařství.....	26

2.7 Potravinové doplňky pro zvýšení odolnosti včel k nálezám	28
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1 Materiál	29
3.1.1 Chemikálie	29
3.1.2 Biologický materiál	30
3.1.3 Přístroje a vybavení	30
3.1.4 Příprava extraktů z řasy <i>Chlorella sorokiniana</i>	31
3.1.5 Použité roztoky a média	31
3.2 Metody	32
3.2.1 Příprava bakteriální suspenze	32
3.2.2 Očkování média bakteriálním kmenem přímo	32
3.2.3 Očkování média bakteriálním kmenem metodou zalité kultury	32
3.2.4 Testování pomocí difuzních testů	32
3.2.4.1 Aplikace extraktů řasy přímo na inokulované médium	32
3.2.4.2 Aplikace extraktů řasy na zalitou kulturu	33
3.2.4.3 Aplikace extraktů řasy do uměle vytvořených jamek v médiu	33
3.2.4.4 Aplikace extraktů řasy na papírové disky	33
3.2.5 Stanovení minimální inhibiční koncentrace	33
3.2.6 Izolace DNA z <i>Paenibacillus larvae</i>	34
3.2.7 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA	34
3.2.8 PCR pro rozlišení genotypů <i>P. larvae</i> v systému primerů ERIC	34
3.2.8.1 Příprava PCR směsi	34
3.2.8.2 Podmínky PCR reakce	35
3.2.9 PCR pro typizaci bakterie <i>Paenibacillus larvae</i>	35
3.2.9.1 Příprava PCR směsi	35
3.2.9.2 Podmínky PCR reakce	36
3.2.10 Detekce PCR produktů metodou gelové agarosové elektroforézy	36
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1 Difuzní testy	38
4.1.1 Difuzní testy vodných extraktů řasy	39
4.1.2 Difuzní testy acetonových extraktů řasy	43
4.2 Stanovení MIC vodných extraktů řasy pro bakteriální kmeny <i>P. larvae</i>	45
4.3 Klasifikace <i>P. larvae</i> podle genotypů ERIC I-IV	49
4.3.1 Typizace bakteriálních kmenů <i>P. larvae</i>	49
4.3.2 Klasifikace bakteriálních kmenů <i>P. larvae</i> do systému ERIC I-IV	50
5 ZÁVĚR	52
6 LITERATURA	53

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	58
---------------------------------	----

CÍLE PRÁCE

Součástí teoretické části bude vypracování literární rešerše zabývající se problematikou:

- imunitní systému včel se zaměřením na obranné mechanismy proti bakteriálním nákazám
- metody a testování antimikrobiálních látek
- možnosti praktického využití řasy *Chlorella sorokiniana*

V praktické části budou provedeny experimenty se zaměřením na:

- optimalizace metod pro stanovení antimikrobiální aktivity extraktů z řasy vůči různým sbírkovým kmenům *Paenibacillus larvae*
- optimalizace metody PCR pro zařazení sbírkových kmenů *P. larvae* do mezinárodního klasifikačního rámce genotypů ERIC I-IV

1 ÚVOD

V dnešní době hraje včelařství v zemědělství velmi důležitou roli. Včely nám poskytují nejen produkty využívané v potravinářství (med, pyl), ale také produkty, které mají terapeutické účinky (včelí vosk, propolis, mateří kašička, včelí jed). Mimo to se včely podílejí také na opylování hospodářských plodin, čímž zvyšují množství a kvalitu úrody. Včelařství se tak stalo nepostradatelným a v případě, že je včelstvo nakaženou nějakou nemocí, musí být ihned zakročeno, aby nedošlo k rozšíření. Mezi velmi nebezpečné bakteriální onemocnění včely medonosné (*Apis mellifera*) patří mor včelího plodu způsobené bakterií *Paenibacillus larvae*. Tato bakterie napadá mladé včelí larvy a způsobuje jejich smrt. Jediným ze způsobů, jak toto onemocnění potlačit, je aplikace antibiotik. Avšak postupem času se zvyšuje odolnost bakterií i proti tomuto jedinému léku, proto ani použití antibiotik nezaručí vyléčení celého nakaženého včelstva. Navíc používání antibiotik proti včelím nákazám je v České republice a ostatních zemích Evropské unie zakázáno, kvůli možné kontaminaci včelích produktů. Z tohoto důvodu je potřeba najít alternativní způsob, jak včelstva před takto nebezpečnými nemocemi ochránit.

Jeden z alternativních způsobů, jak zvýšit odolnost včel proti nemoci mor včelího plodu, je používání extraktu řasy *Chlorella sorokiniana* jako potravinový doplněk. Tato řasa vykazuje antimikrobiální účinky proti *P. larvae* a právě této problematice je věnována moje bakalářská práce. Konkrétně jsou testovány inhibiční účinky vodných a acetonových extraktů řasy.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Imunita jednotlivých včel a mikrobiální patogeny

Hlavním úkolem je chránit organismus před vnějšími nepříznivými podmínkami prostředí nebo před napadením škodlivých organismů vyskytujících se v přírodě. Dostane-li se tento patogen do organismu zdravého jedince, může způsobit různá onemocnění nebo dokonce i smrt. Mezi hlavní funkce imunitního systému patří obranyschopnost (rozpoznání vnějších škodlivin), autotolerance (rozpoznání vlastní tkáně) a imunitní dohled (rozpoznání vlastních starých, poškozených nebo zmutovaných buněk) (Hořejší a Bartůňková, 2005).

Existují dva typy imunitního systému – nespecifický a specifický. U bezobratlých živočichů se vyskytuje nespecifický imunitní systém nazývaný také jako neadaptivní či vrozený. Buňky a molekuly zajišťující tuto imunitu, jsou v organismu stále přítomny, proto se tyto organismy vyznačují velmi rychlou imunitní odpovědí. Na rozdíl od obratlovců majících převážně specifický (adaptivní) imunitní systém, se u bezobratlých nevyskytuje imunologická paměť (Hořejší a Bartůňková, 2005). U včel je imunitní systém jednotlivých včel tvořen třemi složkami – fyzikální bariérou, buněčnou imunitou a humorální imunitou.

2.1.1 Fyzikální bariéry

Mezi fyzikální bariéry u hmyzu řadíme kutikulu, stěnu tracheí nebo stěnu střeva, jejich hlavní funkcí je zabránit průniku patogenu do intracelulárního prostředí organismu (Hořejší a Bartůňková, 2005). Pronikne-li patogen skrz tuto bariéru, dojde k rychlé aktivaci dalších dvou složek imunitního systému – buněčné a humorální imunity.

2.1.2 Buněčná imunita

Buněčná imunita se řadí mezi nespecifickou imunitu, která je zprostředkována pomocí imunitních buněk schopných bránit se proti patogenům. Tuto funkci zajišťují buňky hemolymfy – hemocyty. Mechanismy, jakými se buňky mohou chránit, jsou různé. Patří mezi ně fagocytóza (pohlcení patogenu buňkou), nodulace (vychytávání patogenu agregací hemocytů), enkapsulace (obalení větších patogenů imunitní buňkou), koagulace (srážení hemolymfy) nebo tvorba cytotoxických látek (Turner, 1994).

Ostrou hranici mezi buněčnou a humorální imunitou nelze přesně stanovit, protože obě tyto části imunitního systému spolu úzce souvisí. Velmi důležitou rolí některých hemocytů je syntéza molekul, které se účastní humorální imunity (Lavine a Strand, 2002)

2.2 Humorální složka imunitního systému

Do humorální (látkové) imunity řadíme látky vyskytující se v organismu, které mají imunitní funkci. Můžeme je charakterizovat podle rozdílných vlastností, mechanismu působení nebo také podle různého zastoupení u jednotlivých druhů. Mezi humorální složky řadíme antimikrobiální peptidy, aglutininy (lektiny), fenoloxidasovou kaskádu a lysozym (Turner, 1994).

Látky zodpovědné za imunitní odpověď organismu jsou syntetizovány buňkami imunitního systému (hemocyty) nebo také v tukovém tělese (tkáň, která funkčně odpovídá savčím játrům). Obsah těchto látek často závisí na pohlaví a fázi vývoje (Turner, 1994, Laughton *et al.*, 2011)

2.2.1 Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy (AmP) jsou geneticky kódované polypeptidy dlouhé 30 – 60 aminokyselin. Vyznačují se svojí tepelnou stabilitou, kladným nábojem a s tím souvisí i izoelektrický bod peptidů v bazické oblasti. Antimikrobiální peptidy jsou ribozomálně syntetizované v buňkách tukového tělesa nebo v hemocytech, odkud jsou poté vylučovány do hemolymfy. AmP se vyskytují prakticky ve všech živých organismech, jak u prokaryot, tak i u eukaryot včetně člověka (Li *et al.*, 2012, Yi *et al.*, 2014).

V dnešní době je podle databáze antimikrobiálních peptidů (APD, Antimicrobial Peptide Database) známo 277 AmP vyskytujících se u hmyzu a jsou klasifikovány do čtyř skupin: cecropiny, hmyzí defensiny, peptidy bohaté na prolin a peptidy bohaté na glycin (Li *et al.*, 2012).

a) Cecropiny

Cecropin patří historicky mezi první antimikrobiální peptid izolovaný z hmyzí hemolymfy. V peptidovém řetězci o délce 35-39 aminokyselin jsou obsaženy všechny aminokyseliny kromě cysteinu (Li *et al.*, 2012). Řadí se mezi lineární peptidy tvořící dva α -helixy, kde N-terminální část je silně bazická a C-terminální část hydrofobní (Neubauerová *et al.*, 2009)

b) Hmyzí defensiny

Defensiny se řadí do skupiny cyklických kationických peptidů bohatých na cystein (Li *et al.*, 2012). Celý peptidový řetězec je sestaven z 36 – 51 aminokyselin tvořený z šesti reziduí cysteinu, mezi kterými jsou vytvořeny 3 disulfidové můstky (Bulet *et al.*, 1999). Tyto 3 disulfidové můstky stabilizují

celou strukturu tvořenou N-koncovou smyčkou, jedním α -helixem a párem anti-paralelně β -skládanými listy (Otvos, 2000).

c) Peptidy bohaté na prolin

Tyto peptidy patří také do skupiny kationických, nikoliv však cyklických ale lineárních. Vyznačují se vysokým obsahem prolinu ve svých řetězcích a to alespoň 25 % (Li *et al.*, 2012). Kromě prolinu zde můžeme nalézt i bazické aminokyseliny (arginin, lysin) tvořící dublety a triplety s prolinem v sekvenci Pro-Arg-Pro nebo Pro-Lys-Pro. Dle délky řetězce je dělíme na krátké, kam můžeme zařadit např. apidaecin, drosocin nebo metalnikowin a dlouhé, kam patří např. abaecin (Bulet *et al.*, 1999). Apidaecin a abaecin byly izolovány z včely medonosné (*Apis mellifera*), drosocin a metchnikowin z rodu *Drosophila* (Vilmos a Kurucz, 1998).

d) Peptidy bohaté na glycin

Peptidy bohaté na glycin jsou takové peptidy, které mají ve své primární struktuře zvýšený obsah glycinu (tzv. G doména) alespoň na 14 – 22 % (Hultmark, 1993, Li *et al.*, 2012). Mezi významné zástupce obsahující jednu nebo více těchto G domén patří attaciny nebo diptericyny (Vilmos a Kurucz, 1998).

2.2.2 Aglutininy (lektiny)

Hlavní funkcí aglutininů je aglutinovat neboli shlukovat cizorodé částice nebo buňky (bakterie, prvoci), z čehož je odvozen i jejich název. Aglutinace započne, dojde-li k navázání aglutininů na určité uhlíkaté struktury nacházející se na povrchu těchto cizorodých buněk (Gupta, 2001). Schopnost aglutinace mají zejména lektiny.

Lektiny patří do velké skupiny proteinů s vysokou afinitou ke glykosylované části na povrchu bakteriální membrány, na kterou se vážou. Takto navázané lektiny jsou pak schopny aglutinovat cizorodé částice, které mohou být snáze fagocytovány nebo enkapsulovány (Boman a Hultmark, 1987). Ke správnému fungování jsou pro lektiny nezbytné vápenaté ionty Ca^{2+} , které fungují jako vazebná místa pro sacharidy nebo jako stabilizátory molekul lektinu (Turner, 1994).

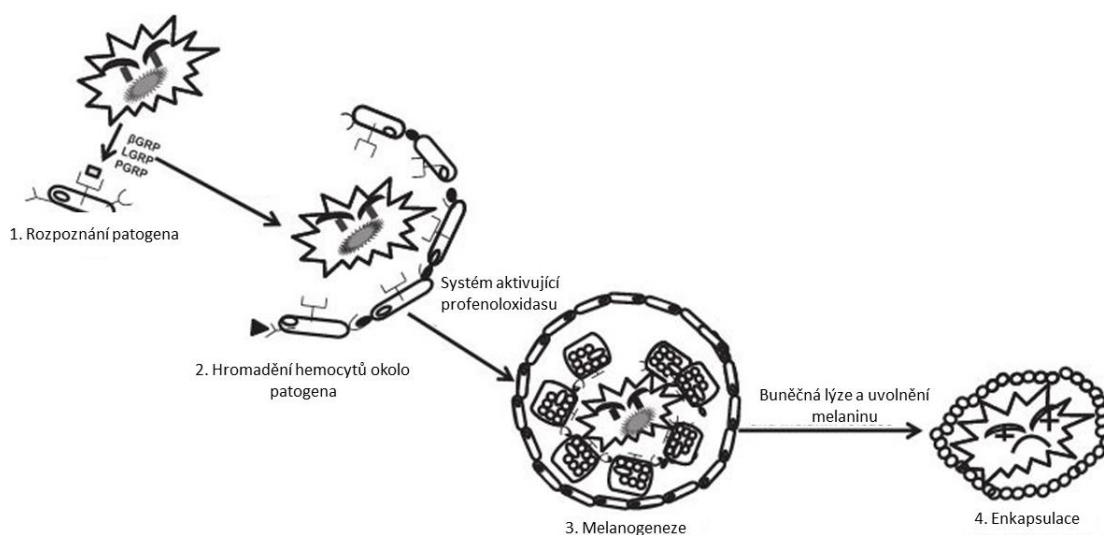
2.2.3 Fenoloxidasová kaskáda

Fenoloxidasová kaskáda je soubor enzymatických procesů, který se účastní imunitní reakce u bezobratlých živočichů. Konečným produktem této kaskády je enzym

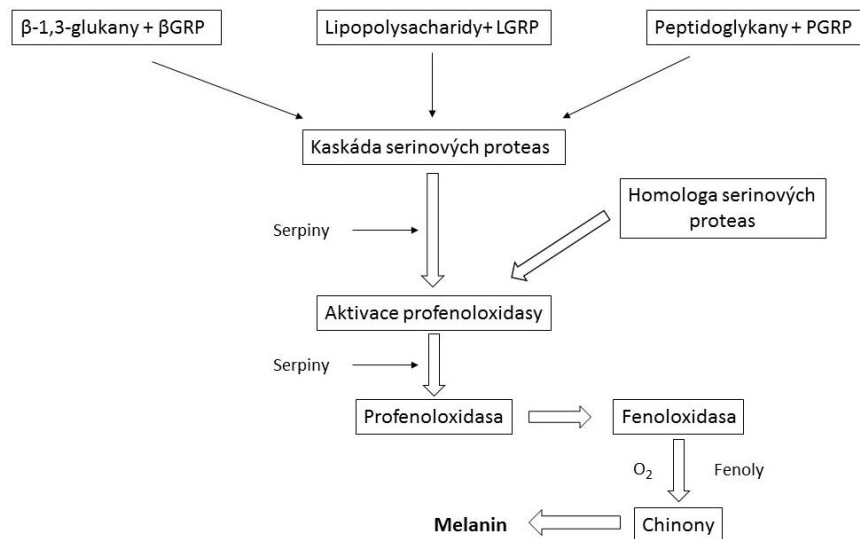
fenoloxidasa (PO, EC 1.14.18.1), který katalyzuje oxidaci fenolů na chinony. Chinony poté neenzymově polymerují na melanin (Soderhall a Cerenius, 1998). Melanin, uplatňující se v procesu melanizace (Obr. 1), je tmavý pigment, který se hromadí kolem patogenu při jeho průniku do organismu a vytváří noduly nebo kapsule (Boman a Hultmark, 1987, Soderhall a Cerenius, 1998)

Melanin má i ochrannou funkci, kdy dochází k jeho hromadění na poškozeném místě a vytváří tak mechanickou bariéru, která zabrání vstupu patogenu a jeho množení (Boman a Hultmark, 1987).

PO se v hemolymfě vyskytuje v neaktivní formě zymogenu profenoloxidasy (proPO), která se nejprve musí aktivovat. Aktivační systém (Obr. 2) je spuštěn navázáním mikrobiálních složek (β -1,3-glukany, peptidoglykany a lipopolysacharidy) na cytoplazmatickou membránu buněk hostitele, na které se navážou rozpoznávací proteiny (β GRP, LGRP, PGRP) a dochází tak ke spuštění kaskády serinových proteas. Na konci této kaskády dojde k aktivaci profenoloxidasových aktivujících enzymů, které proteolytickým štěpením převedou zymogen proPO na aktivní formu PO. Mechanismus aktivace proPO je regulován inhibitory serinových proteas zvané serpiny (Soderhall a Cerenius, 1998, González-Santoyo a Córdoba-Aguilar, 2012, Zhang *et al.*, 2016).



Obr. 1: Proces melanizace ve čtyřech krocích: 1 – rozpoznání patogena pomocí specifických molekul (např. lipopolysacharidy), 2 – hromadění hemocytů kolem patogena, 3 – tvorba melaninu v hemocytech, 4 – uvolnění melaninu a enkapsulace patogena (převzato a upraveno dle González-Santoyo a Córdoba-Aguilar, 2012).



Obr. 2: Schéma aktivačního systému profenoloxidasy u hmyzu. Systém je spuštěn po navázání rozpoznávacích proteinů (βGRP, LGRP, PGRP) na β-1,3-glukany, lipopolysacharidy nebo peptidoglykany nacházející se na povrchu patogena (převzato a upraveno dle González-Santoyo a Córdoba-Aguilar, 2012).

2.2.4 Lysozym

Lysozym (EC 3.2.1.17) je antibakteriální enzym způsobující lýzu grampozitivních (G+) bakterií, které se vyznačují silnou vrstvou peptidoglykanu. Hydrolyticky působí na vazbu β-1,4-glykosidu mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetylglukosaminem v peptidoglykanu (mureinu) nacházející se v bakteriální buněčné stěně a také na vazbu mezi dvěma homopolymery N-acetylglukosaminu v chitinu vyskytující se v buněčné stěně hub (Van Herreweghe a Michiels, 2012).

V závislosti na rozdílné sekvenci aminokyselin a enzymatických vlastnostech, můžeme lysozomy rozdělit na několik typů. V živočišné říši jsou známy celkem 3 typy: c-typ (chicken – kuřecí), g-typ (goose – husí) a i-typ (invertebrate – bezobratlý). Zatímco u obratlovců se vyskytují pouze první dva typy, u bezobratlých jsou známy všechny tři. Jak už napovídá název, tak nejtypičtější a také jedinečný pro bezobratlé živočichy je i-typ (Van Herreweghe a Michiels, 2012). Včelí lysozomy jsou poměrně malé molekuly (cca 15 kDa) a Glinski a Jarosz (1993) uvádějí, že v hemolymfě dospělých včel a v jejich larvách se vyskytují v koncentraci 5-25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Dojde-li k napadení organismu patogenem, může se tato koncentrace u larev zvýšit až na 1300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u dospělých včel na 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

2.3 Bakteriální patogeny včely medonosné (*Apis mellifera*)

Včely nejsou důležité jen díky produkci medu, ale patří také mezi významné opylovatele zemědělských a zahradnických plodin. Chov včelstev má proto velký dopad na celosvětové zemědělství. Dospělé včely nebo jejich plod můžou být napadeny celou škálou patogenních organismů (bakterie, viry, prvoci, houby). K hospodářsky nejvýznamnějším chorobám včel patří bakteriální onemocnění postihující plod. Je to mor včelího plodu (American foulbrood, AFB) způsobený bakterií *Paenibacillus larvae* a hniloba včelího plodu (European foulbrood, EBF), kterou způsobuje bakterie *Melissococcus plutonius* (Forsgren, 2010).

2.3.1 *Paenibacillus larvae*

Bakterie *P. larvae* se řadí mezi G+ bakterie mírně zakřiveného tyčinkovitého tvaru a dlouhé 2,5 – 5 µm, které mají tendenci tvořit řetězce. Jsou to sporulující bakterie tvořící velmi odolné spory (proti teplu i chemikáliím) oválného tvaru dvakrát tak dlouhého než širokého (Shimanuki, 2000).

Spory jsou vysoce infekční pouze pro larvální stádia včel, a to zejména u larev starých 12-36 hodin, která jsou nejnáchylnější (Bamrick a Rothenbuhler, 1961). Do těla včelí larvy se dostanou prostřednictvím potravy, osidlují střevo, kde se masivně množí, aniž by porušovaly integritu tkáně střevního epitelu. Během tohoto stádia žijí bakterie v symbióze s larvou jako komenzály, tj. živí se potravou přijatou larvou. Takto namnožené bakterie pak pronikají přes střevní epitel do tělní dutiny a způsobují proteolytický rozklad celé larvy a její následnou smrt (Genersch, 2010). Z uhynulých larev se vlivem přítomnosti bakterie tvoří nahnědlá, mazlavá, polotekutá hmota (Obr. 3), kterou se dospělé včely snaží z úlu vyklidit. Odvíčkovávají tmavě zbarvená víčka plástů (Obr. 4), čímž dojde k uvolnění řádově miliónů spor a dochází tak k nakažení dalších včelích larev (Genersch, 2008).

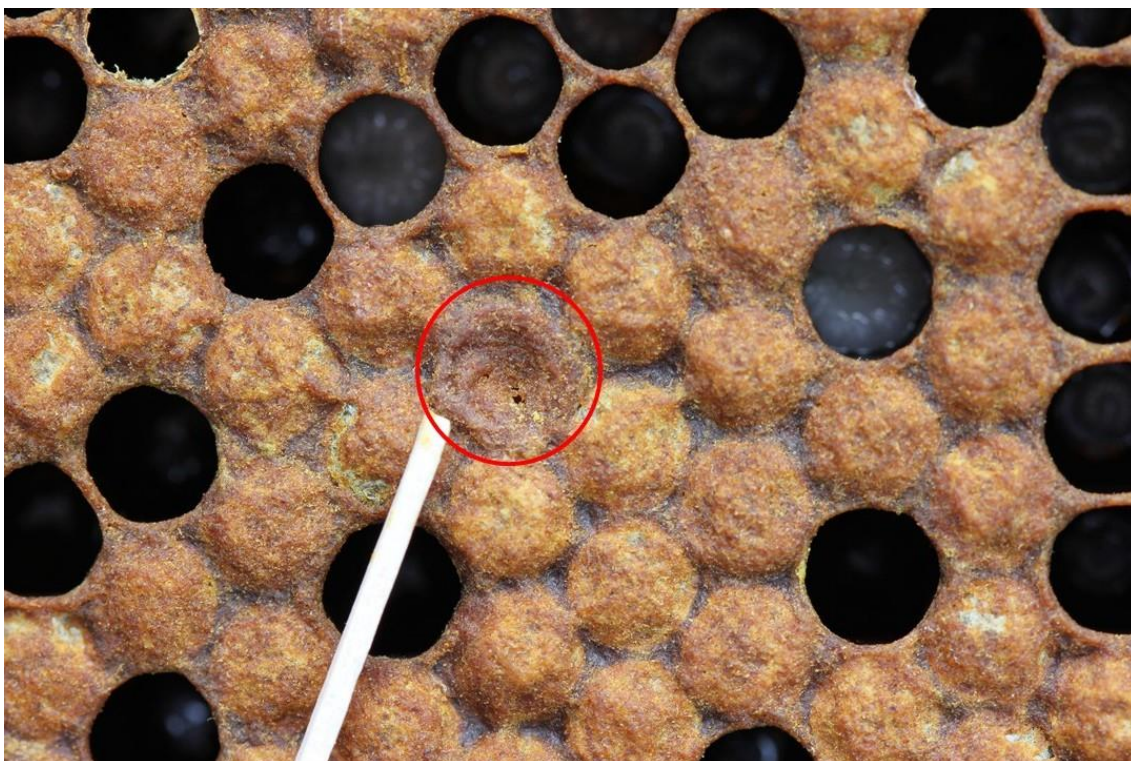
K nakažení bakterií *P. larvae* může dojít například při loupení, kdy „včely zlodějky“ pronikají do infikovaných včelstev, „vylupují“ je a do svých vlastních úlů přináší nakažené medné zásoby. Opačným případem jsou „včely toulavé“, které „uplácejí“ včely zodpovědné za hlídání úlu svými medovými zásobami, které mohou nakazit jejich kolonii. Kromě těchto tzv. přirozených cest přenosu bakterie mezi včelstvy jsou možné přenosy způsobené samotným včelařem. Ten může vyměňovat med nebo plásty mezi různými včelstvy, které mohou být spory *P. larvae* už kontaminované (Genersch, 2008).



Obr. 3: Mazlavá, polotekutá hmota vzniklá z infikované larvy bakterií *P. larvae* (použito se svolením autora Mgr. J. Danihlíka, Ph.D.)

2.3.2.1 Klasifikace *Paenibacillus larvae*

Analýzou metody polymerázové řetězové reakce (PCR), založené na rozdílech repetitivních elementech ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus), můžeme *P. larvae* rozdělit do čtyř skupin podle genotypu, které jsou pojmenované ERIC I, ERIC II, ERIC III a ERIC IV (Genersch *et al.*, 2006). Tyto genotypy se od sebe liší různými fenotypovými vlastnostmi, především virulencí – schopností vyvolat infekci a morfologií bakteriálních kolonií. Kolonie genotypů ERIC II a ERIC III se vyznačují svým typickým oranžovým zbarvením, čímž se liší od zbylých dvou genotypů, které jsou spíše bílé až šedé. Rozdíly můžeme pozorovat také pod elektronovým mikroskopem, kde spory u ERIC I mají hladký povrch, ERIC II mají povrch hrbolatý a svým vzhledem připomínají strukturu mozku a u ERIC III a IV jsou vidět různě velké vyvýšeniny (Genersch *et al.*, 2005, Ashiralieva a Genersch, 2006). Nejdelší dobu virulence má genotyp ERIC I, který dokáže usmrtit všechny napadené larvy během 12 dnů, zatímco zbylé tři genotypy už do týdne (Genersch *et al.*, 2006).



Obr. 4: Tmavé víčko plodu po nakažení bakterií *P. larvae* znázorněné červeným kroužkem (použito se svolením autora Mgr. J. Danihlíka, Ph.D.)

Údajů o rozšíření genotypů ERIC bakterie *P. larvae* v různých zemích je poměrně málo. Nejčastější genotyp způsobující AFB po celém světě je ERIC I, který je považován za „klasický“ genotyp *P. larvae*. V Evropě byl izolován v Německu, ve Švédsku (Genersch, 2010), ve Finsku (Pentikainen *et al.*, 2009) a Rakousku (Loncaric *et al.*, 2009). Genotyp ERIC II se vyskytuje zejména v Evropě, ale byl nalezen i v Asii nebo Arábii (Schafer *et al.*, 2014), zatímco genotypy ERIC III a ERIC IV byly izolovány velmi zřídka, proto nemají moc velký význam (Bassi *et al.*, 2015).

2.3.2 *Melissococcus plutonius*

M. plutonius je G⁺ kulovitá bakterie blízká k rodu *Enterococcus*, která netvoří spory. Vegetativní forma se vyskytuje volně, v párech nebo v řetězcích různé délky.

Hniloba včelího plodu, kterou tato bakterie způsobuje, postihuje především otevřený (nezavíčkovaný) plod. Bakterie se dostávají s potravou do žaludku, kde dochází k jejich množení a soutěžení o živiny z potravy mezi infikovanou larvou a patogenem, což vede ke hladovění a následné smrti larev (zhruba ve stáří 4 dnů) (Forsgren, 2010). Uhynulou

larvu poznáme díky změně zbarvení z perlově bílé barvy na světle žlutou, často doprovázené ztrátou segmentace. U pokročilejšího stádia nemoci se může barva měnit na hnědou nebo až na šedočernou barvu. Dalším důkazem je neobvyklá poloha larvy v plodové buňce. Místo klasické polohy je larva překroucená nebo natažená podél stěny (Obr. 5).

Některé organismy, které nezpůsobují hnilobu včelího plodu, mohou ovlivnit zápach či konzistenci mrtvého plodu. Mezi tyto sekundární patogeny patří *Paenibacillus alvei*, *Enterococcus faecalis*, *Achromobacter euridice* a *Brevibacillus laterosporus* (Forsgren *et al.*, 2013).



Obr. 5: Včelí larva napadená bakterií *M. plutonius* označená červeným kroužkem (použito se svolením autorky E. Forsgren)

2.4 Výživa včel se zaměřením na její význam na rozvoj AFB nebo EFB

Mezi základní komponenty výživy včel řadíme sacharidy, bílkoviny, tuky, minerální látky, vitamíny a vodu, které jsou důležité pro jejich růst, vývoj a rozmnožování. Hlavním zdrojem sacharidů je nektar a med, zbylé nepostradatelné látky, důležité zejména pro správný vývoj a růst mladých včel a larev, jsou pak získávány ve formě pylu. Sacharidy tvoří velkou část včelí potravy. Jsou využívány zejména jako zdroj energie svalové aktivity, dále slouží k zajištění teploty v úlu nezbytné k životu nebo na produkci vosku (Standifer *et al.*, 1978).

Hlavním zdrojem bílkovin a tuků je pyl, jehož složení závisí na jeho původu. Obsah proteinů se pohybuje v rozmezí 7-30 %. Pyl, v jakém jej včely ukládají v buňkách, obsahuje 20-22 % proteinů. Některé proteiny obsažené v pylu, důležité hlavně pro vývoj larev a mladých včel, jsou na různé AMK deficientní. Tyto aminokyseliny mohou být pro včely esenciální, samy si je nedokáží syntetizovat, a proto by včely měly mít přísun pylu s velkým a různorodým množstvím aminokyselin, které uspokojí jejich nutriční hodnoty. Lipidy jsou pravděpodobně využívány larvami a mladými dospělými včelami jako zdroj energie a pro syntézu rezervního tuku a glykogenu. V pylu se vyskytuje také velké množství vitamínů, především vitamínů skupiny B, ale v malém množství i vitamíny skupiny A, C a D (Standifer *et al.*, 1978, Lampeitl, 1995).

Pyl, jakožto bílkovinná potrava, je využíván dvojitým způsobem. Starší larvy dělnic a trubců jej konzumují přímo jako směs medu, pylu a mateří kašičky. Naopak mladé larvy dělnic a trubců dostávají čistou mateří kašičku v prvních čtyřech dnech a larvy matek dostávají čistou mateří kašičku až do zavíčkování. Tento způsob se označuje jako nepřímá konzumace pylu (Lampeitl, 1995).

Voda slouží především jako rozpouštědlo pro hustý nektar a med, pro udržování optimální vlhkosti v úlu a pro chlazení vzduchu uvnitř úlu za horkých dnů (Standifer *et al.*, 1978).

2.4.1 Účinky včelích produktů na AFB nebo EFB

Mor včelího plodu (AFB) postihující včelí larvy je vysoce infekční a destruktivní onemocnění, které je často smrtelné pro celé včelstvo. Snižuje produkci medu na minimum a naopak zvyšuje náklady pro včelaře, kteří se musí o napadená včelstva postarat (Bastos *et al.*, 2008). V některých zemích (např. USA) k boji proti AFB používají antibiotika (tetracyklin) či chemoterapeutikum sulfathiazol. Tyto látky však nezneškodní

infekční endospory, dokáží potlačit pouze klinické příznaky. Bylo také prokázáno, že požívání antibiotik vede k bakteriální rezistenci nebo ke kontaminaci včelích produktů (Eguaras *et al.*, 2005). V Evropské unii je použití těchto látek zakázáno, neboť včely se řadí k hospodářským zvířatům, jejichž produkty nesmí obsahovat stopy jakýchkoliv léků. Postižená včelstva musí být utracena a spálena včetně úlu a dalšího včelařského vybavení. Proto je v poslední době věnována značná pozornost vývoji alternativních léčebných metod založených na uplatňování přírodních antimikrobiálních látek, jako jsou éterické oleje nebo propolis (Isidorov *et al.*, 2017).

2.4.1.1 Propolis

Původ propolisu je v rostlinných pryskyřicích, které jsou shromažďovány včelami. Propolis je celosvětově známý pro svoje antimikrobiální vlastnosti (Bastos *et al.*, 2008). Antimikrobiální aktivita těchto přírodních antibiotik je dána přítomností fenolických látek: flavonoidové aglykony (necukerná složka glykosidů vázaná na cukernou složku glykosidovou vazbou), fenolické a hydroxyskořicové kyseliny (Kujumgiev *et al.*, 1999). Mezi nejdůležitější rostlinné prekurzory propolisu z boreálního (nejsevernější část mírného pásma) a mírného pásma Evropy je pryskyřice z topolu černého (*Populus nigra*), břízy pýřité (*Betula pubescens*) a topolu osika (*Populus tremula*) (Isidorov *et al.*, 2014). I když včely ze stejného včelstva sbírají pryskyřice z více než těchto tří dřevin, můžeme evropskou pryskyřici rozdělit do tří typů na základě specifického chemického složení: topolový, břízový a osikový typ. Různé chemické složení pravděpodobně odráží i rozdílnou antimikrobiální aktivitu různých propolisů na *P. larvae* (Isidorov *et al.*, 2017). Vyšší antimikrobiální aktivita byla prokázána u topolového a břízového typu, které mají zvýšený obsah flavonoidů (Popova *et al.*, 2007, Mihai *et al.*, 2012, Bilikova *et al.*, 2013).

2.4.1.2 Med

Med můžeme definovat jako sladkou hmotu, kterou včely tvoří z nektaru nebo medovice získaných z rostlin. Ve svém těle je obohacují o další látky a vzniklý produkt je poté uskladňován v plástech (Lampeitl, 1995). Cílem tohoto uskladňování a zrání je přeměna tekuté a mikrobiálně nestálé přírodní šťávy na hutné a mikrobiálně stálé zimní zásoby – med. Včelí med patří k nejznámějším a nejdůležitějším včelím produktům. Mezi základní složky chemického složení medu patří: voda, cukry, kyseliny, bílkoviny, aminokyseliny, tuky, minerální a aromatické látky (Veselý *et al.*, 2003).

Antimikrobiální vlastnosti medu jsou známy už tisíce let (Zumla a Lulat, 1989). Za antimikrobiální aktivitu je zodpovědný peroxid vodíku, vysoká osmolarita, kyselost, aromatické kyseliny a fenolické sloučeniny (Molan, 1992a, Molan, 1992b). Vysoká osmolarita medu je dána kvůli vysoké koncentraci cukrů (až 85 %) jako jsou fruktosa, sacharosa, glukosa, maltosa a další (Lee *et al.*, 2008).

V rámci svého výzkumu Lee *et al.* (2009) z medu izolovali bakteriální druh, který vykazoval vysokou antimikrobiální aktivitu proti G⁺ i G⁻ typům bakterií, následně byl identifikován jako *Paenibacillus polymyxa*. Tato bakterie produkuje látky účinné proti druhu *Paenibacillus larvae*, původci moru včelího plodu (Lee *et al.*, 2009).

2.4.1.3 Mateří kašička

Dospělé včely krmí rostoucí larvy různou potravou v závislosti na pohlaví, stáří a v závislosti na tom, do jaké kasty larva spadá (matka, trubci, dělnice). Mateří kašičkou, která je sekretována hltanovými a mandibulárními žlázami dělnic, jsou krmeny pouze larvy matek. Obsahuje kromě 10-hydroxy-2-decenové kyseliny, která má antimikrobiální účinek, také proteinové složky s antimikrobiální aktivitou. Mezi tyto proteiny se řadí defensin (neboli royalisin), ale i řada dalších proteinů, a celá tato skupina proteinů se označuje jako MJRPs (major royal jelly proteins). V mateří kašičce se vyskytuje asi 80 % těchto proteinů (Vezeteu *et al.*, 2016). Rozlišujeme celkem 9 genů (MJRP1 – 9) vyskytující se v genomu včely medonosné (Buttstedt *et al.*, 2013). Tyto proteiny, zejména MJRP1 a MJRP2, vykazují inhibiční účinky proti *M. plutonius*, bakterii způsobující hnilobu včelího plodu (EFB) a také na sekundární patogeny této nemoci (*E. faecalis*, *B. pumilus*, *P. alvei* and *B. laterosporus*) (Vezeteu *et al.*, 2016).

2.5 Metody studia antimikrobiálních látek

Mezi globální problémy patří i mimo jiné zvyšující se bakteriální rezistence vůči některým antibiotikům, což má za následek i zvyšující se počet neúčinných léčebných metod. Z tohoto důvodu je proto velmi důležité objevování nových látek s antibiotickými účinky. Mezi hlavní zdroje antimikrobiálních látek patří mikrobiální a rostlinné produkty, které mohou poskytovat širokou škálu komplexních a strukturně odlišných sloučenin. Pro vyhodnocení nebo sledování antimikrobiální aktivity se využívají zejména difuzní testy (kvalitativní stanovení) a diluční (kvantitativní stanovení) metody, které slouží pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Dále pak mezi méně používané metody patří např. bioluminiscenční metody nebo průtoková cytometrie (Balouiri *et al.*, 2016).

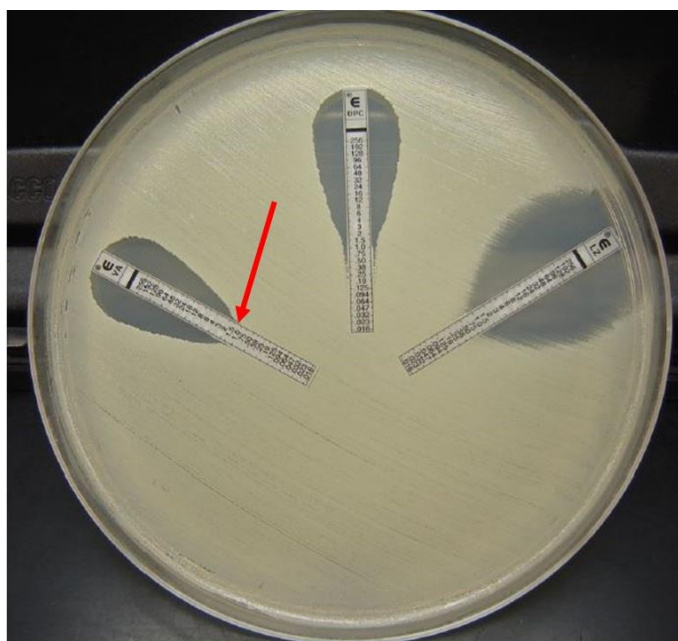
2.5.1 Difuzní metody

2.5.1.1 Disková difuzní metoda

Tato metoda byla popsána v roce 1940 (Heatley, 1944) a patří mezi oficiální metody používané v mnoha mikrobiologických laboratořích pro rutinní testování mikrobiální citlivosti. Je založena na inokulaci daného mikroorganismu na povrch kultivačního média na Petriho miskách, na jehož povrch jsou umístěny papírové disky o průměru 6 mm obsahující testovanou inhibiční látku (Balouiri *et al.*, 2016). Po inkubaci za vhodných podmínek dochází k uvolnění antimikrobiální látky, která v případě pozitivního výsledku vytvoří okolo disku zónu (inhibiční zónu) v důsledku inhibice bakteriálního růstu. Je-li testovaná bakterie vůči antimikrobiální látce rezistentní, inhibiční zóna se nevytvoří (Votava *et al.*, 2010). Podle velikosti průměru inhibičních zón získáme kvalitativní vyhodnocení, které pak porovnáme s kritérii dle CLS (Clinical and Laboratory Standards) a určíme, zda je bakterie citlivá, středně citlivá nebo rezistentní (Jorgensen a Ferraro, 2009). Z pouhého inhibičního účinku však nepoznáme, jestli došlo k usmrcení bakterií nebo ne, a proto nemůžeme určit, zda má antimikrobiální látka baktericidní (usmrcení bakterií) nebo bakteriostatické účinky (zpomalení růstu bakterií). Také touto metodou nedokážeme zjistit minimální inhibiční koncentraci (MIC). Dá se vypočítat pouze přibližné MIC a jen pro některé mikroorganismy a antibiotika. Velké výhody má však v jednoduchosti provedení, nízké finanční nákladnosti a možnosti otestovat ohromné množství mikroorganismů a antimikrobiálních látek (Balouiri *et al.*, 2016).

2.5.1.2 Metoda využívající koncentračního gradientu (E-test)

Metoda využívá kombinaci principů difuzní i diluční (ředící) metody a slouží k určení MIC. Je založena na vytvoření koncentračního gradientu testované antimikrobiální látky v kultivačním médiu (Balouiri *et al.*, 2016). Tenké plastové proužky (E-testové proužky), obsahující gradient antimikrobiální látky, jsou umístěny na inokulovanou plochu agarového média. Tato látka následně proniká do média, inhibuje růst daného mikroorganismu a vytváří kontinuální koncentrační gradient testované antimikrobiální látky podél proužku. Po inkubaci se vytvoří elipsoidní inhibiční zóna. Hodnotu MIC odečteme v místě, kde se prolíná okraj proužku s hranicí růstu bakterie (Obr. 6). Metoda je nejvhodnější pro zjišťování MIC jedné nebo dvou antimikrobiálních látek nebo vyžaduje-li organismus náročnější podmínky (např. obohacené médium, speciální kultivační podmínky). Její výhodou je snadná proveditelnost, avšak cena jednoho E-testového proužku se pohybuje okolo 2 – 3 USD, proto při testování více látek může tato metoda vyjít poměrně draho (Jorgensen a Ferraro, 2009).



Obr. 6: Testování antimikrobiálních látek vancomycin (VA), daptomycin (DM) a linezolid (LZ) se *Staphylococcus aureus* metodou koncentračního gradientu na Mueller-Hinton agaru (převzato od Jorgensen a Ferraro, 2009). Červená šipka znázorňuje místo, kde se odečítá hodnota MIC.

2.5.2 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) – bioautografická

Začátky spojení mikrobiologického testu s chromatografií se vážou k roku 1946, kdy Goodbal a Levi zkombinovali papírovou chromatografií (PC) s kontaktní bioautografií

ke stanovení různých antibiotik. O 15 let později byla zavedena ve stejné oblasti chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Metody byly popsány jako jednoduché, reprodukovatelné a vysoce citlivé. Bioautografická TLC metoda je kombinací klasické TLC metody a obou biologických a chemických metod detekce. Řadí se sem agarová difuze, přímá bioautografie a test s vrchním agarem (Choma a Grzelak, 2011, Balouiri *et al.*, 2016). První přezkoumání uplatnění bioautografie v papírové a tenkovrstevné chromatografii bylo v roce 1973 od Betina (1973). Autor nezdůraznil pouze výhody metody, jako jsou např. rychlost a všestrannost, ale také zdůraznil obtíže kvantitativní interpretace získaných výsledků.

2.5.2.1 Agarová difuze

Tato metoda, patří mezi nejméně využívané. Je založena na principu difuze antimikrobiální látky z chromatogramu (PC nebo TLC) na agarovou plotnu předem naočkovanou testovaným mikroorganismem. Po proběhnutí difuze (několik minut až hodin) se chromatogram odstraní a miska s agarem se dá kultivovat. V místech, kde byla antimikrobiální látka v kontaktu s agarovou plotnou, se objeví inhibiční zóny (Balouiri *et al.*, 2016).

2.5.2.2 Přímá bioautografie

Podle Balouri *et al.* (2016) patří přímá bioautografická metoda mezi nejpoužívanější metody ze všech tří uvedených. Vyvinutá TLC vrstva je buď ponořena do mikrobiální suspenze nebo je bakteriální suspenzí nastříkána. Poté se za vlhkých podmínek inkubuje 48 hod při 25 °C. Pro vizualizaci mikrobiálního růstu se používají tetrazoliové soli (např. fialový p-jodonitrotetrazolium), které se působením dehydrogenas v živých buňkách změň na odpovídající intenzivně zbarvený formazan. Tyto soli se nastříkají na bioautogram, který se dá znovu inkubovat na 24 hod při 25 °C nebo po dobu 3 – 4 hodin při 37 °C. Do používaného Mueller Hinton agaru je doporučeno přidávat dostatečné množství kapaliny kvůli dobré přilnavosti TLC vrstvy a k udržování vlhkého prostředí pro bakteriální růst. Tato metoda je vhodná pro všechny známé houby nebo bakterie (Balouiri *et al.*, 2016).

2.5.2.3 Vrchní agar

Metoda vrchního agaru je založena na principu obou předchozích metod. TLC vrstva se zalije rozehřátým tekutým médiem. Aby se testovaná látka v médiu dobře rozptýlila, mohou být TLC vrstvy několik hodin před inkubací vystaveny nízkým teplotám. Po inkubaci za vhodných podmínek v závislosti na testovacích mikroorganismech se

provede barvení tetrazoliovým barvivem. Stejně jako přímá bioautografická metoda tak i tato metoda může být použita pro většinu mikroorganismů. Poskytuje dobře viditelné růstové inhibiční zóny a není citlivá na znečištění. Můžeme konstatovat, že TLC-bioautografická metoda je jednoduchá, efektivní a levná technika pro separaci složité směsi, která zároveň dokáže lokalizovat aktivní složky na TLC vrstvě. Kvůli těmto výhodám může být prováděna v sofistikovaných i malých laboratořích, které mají minimální vybavení. Může také sloužit pro detekci antimikrobiálních látek v životním prostředí a v potravinách k hledání nových antimikrobiálních léků (Balouiri *et al.*, 2016).

2.5.2 Diluční metody

Diluční neboli ředící metody jsou jedny z nejvhodnějších metod ke stanovování MIC, neboť podle nich můžeme určovat koncentraci testované antimikrobiální látky v pevném médiu (agaru) i v tekutém médiu (bujón). MIC hodnota je nejnižší hodnota koncentrace testované antimikrobiální látky, při které můžeme už pozorovat inhibiční růst testovaného mikroorganismu. Udává se v jednotkách $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ nebo $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Balouiri *et al.*, 2016).

2.5.2.1 Diluční metoda v tekutém médiu

Tato mikro a makro ředící metoda tekutého média patří mezi nejzákladnější antimikrobiální metody sloužící pro stanovování MIC. Postup zahrnuje dvojnásobné ředění antimikrobiální látky (např. 1, 2, 4, 8, 16 a $32 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), které se připravuje buď ve zkumavkách s minimálním objemem 2 ml (makroředění) nebo po menších objemech za použití 96-jamkové mikrodestičky (mikroředění). Do naředěných objemů antimikrobiální látky se poté inokuluje bakteriální suspenze sledovaných bakterií a provede se inkubace za vhodných podmínek v závislosti na testované bakterii (Balouiri *et al.*, 2016). Po kultivaci se zjišťuje stupeň zakalení média – vizuální způsob. Je-li médium zakalené, k inhibici bakteriálního růstu nedošlo a naopak je-li čiré, došlo k inhibici bakteriálního růstu. Mezi další způsoby hodnocení výsledků lze použít turbidimetrické stanovení, měření optické denzity nebo přímé stanovení počtu buněk pomocí počítačích komůrek (Votava *et al.*, 2010)

MIC je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která zcela inhibuje růst organismu ve zkumavkách nebo při mikroředění pozorovatelné pouhým okem. Na rozdíl od mikroředící metody má makroředící řadu nevýhod. Je zdlouhavá, pro každý test se musí ručně připravit antimikrobiální roztok, při kterém hrozí i velké riziko možných chyb a

vyžaduje celkem velké množství činidel a dostatečný prostor. Miniaturizace této techniky (použití mikrodestiček) získala mnohem větší uplatnění.

Velikost mikroorganismů, růst média, inkubační doba a příprava bakteriální suspenze hraje důležitou roli v určování hodnoty MIC, proto byla tato metoda standardizována pouze pro aerobní bakterie, kvasinky a vláknité houby (Balouiri *et al.*, 2016).

2.5.2.2 Agarová diluční metoda

U ředící agarové metody se různé koncentrace antimikrobiální látky přidávají do rozehrátého tekutého média, které se poté nechá ztuhnout. Následně se agarová plotna naočkuje bakteriální suspenzí. Tato metoda se často doporučuje pro určení MIC u obtížně kultivovaných bakterií, jako jsou anaerobní nebo bakterie rodu *Helicobacter* (Balouiri *et al.*, 2016).

2.5.3 Time-kill test

Time-kill test (sledování fungicidního účinku v čase) je nejvhodnější metoda pro stanovení baktericidního a fungicidního účinku. Ukazuje závislost antimikrobiálního efektu na čase nebo koncentraci. Provádí se v tekutém kultivačním médiu pomocí tří zkumavek obsahující bakteriální suspenzi o 5×10^5 KTJ.ml⁻¹ (KTJ = kolonii tvořící jednotka). První a druhá zkumavka obsahují obvykle testovaný extrakt o finální koncentraci $0,25 \times \text{MIC}$ a $1 \times \text{MIC}$ a třetí je použita jako kontrola růstu. Inkubace se provádí v různých časových intervalech (0, 4, 6, 8, 10, 12 a 24 hod). Poté se vypočítá procento mrtvých buněk v porovnání se zkumavkou, která sloužila jako kontrola, stanovením počtu živých buněk v každé zkumavce metodou počítání na agarové plotně (Balouiri *et al.*, 2016).

2.5.4 ATP bioluminiscenční test

Test je založen na měření adenosintrifosfátu (ATP) nacházejícího se ve všech živých organismech, kde slouží jako forma chemické energie. Množství ATP se proto využívá pro odhad antimikrobiální populace ve vzorku. Bioluminiscenční mechanismus je vícestupňový proces, který vyžaduje zejména přítomnost substrátu luciferinu, kyslíku (O₂), hořečnatého kationtu (Mg²⁺) a ATP. D-luciferin je v přítomnosti ATP, Mg²⁺ a luciferasy převeden na enzymově vázaný luciferyl-adenylát, který je následně oxidován na oxyluciferin a dochází k uvolnění světla (Chollet a Ribault, 2012). Množství emitovaného světla se měří pomocí luminometru a je vyjádřeno jako relativní světelná

jednotka (RLU), která může být vyjádřena v jednotkách RLU/mol ATP (Balouiri *et al.*, 2016).

Bioluminiscenční stanovení se obecně používá k monitorování čistoty vzduchu a kvality výrobků hlavně v potravinářském průmyslu a v menší míře také ve farmaceutickém průmyslu. Používá se taky jako test cytotoxicity, při hodnocení vlivu biofilmů *in situ* nebo k antimikrobiálnímu a antimykobakteriálnímu testování. Dostupnost citlivých luminometrů a mnoha komerčních ATP-bioluminiscenčních sad umožnila vývoj různých protokolů a aplikací v průmyslové mikrobiologii. V současné době je ATP-bioluminiscence běžnou technologií používanou ke sledování kontaminace v potravinách, nápojích či v kosmetice. Hlavní výhodou je rychlost, která poskytuje kvantitativní výsledky. Bylo prokázáno, že tato technika může poskytnout výsledky během 3-5 dnů, kdežto konvekční ředící technika vyžaduje 3-4 týdny inkubace (Balouiri *et al.*, 2016, Chollet a Ribault, 2012).

2.6 Řasa *Chlorella spp.*

Mikroskopické řasy patří mezi mikroskopické fotosyntetické organismy, které se vyskytují ve sladkovodních i mořských vodách. Jsou to primitivní rostliny, tj. nemají kořeny, stonky, listy a také nemají sterilní pokrytí kolem reprodukčních buněk. Jejich primárním fotosyntetickým pigmentem je chlorofyl. Jedná se o různorodou skupinu prokaryontních a eukaryontních mikroorganismů s jednobuněčnou nebo jednoduchou vícebuněčnou strukturou, která jim umožňuje přežít v extrémních podmínkách a dlouhodobě prosperovat. Při fotosyntéze dokážou díky své jednoduché struktuře rychle a mnohem efektivněji využít energii ze slunečního záření k produkci olejů a sacharidů než jiné rostliny. Eukaryotické řasy můžeme na základě jejich pigmentace a biologické struktury rozdělit do několika různých tříd. Nejdůležitější rozdělení je na zelené řasy (Chlorophyta), červené řasy (Rhodophyta) a rozsivky (Bacillariophyta). Dle rozdílných látek, které řasy potřebují pro svůj růst, je dělíme na autotrofní a heterotrofní. Autotrofní řasy potřebují pro svůj růst pouze světlo a anorganické sloučeniny (CO₂, dusičnanové a fosfátové soli), zatímco heterotrofní řasy jsou nefotosyntetické a vyžadují proto pro svůj růst externí zdroj organických látek (např. vytvořené jinými organismy). Existují také řasy, které jsou schopné jak fotosyntézy, tak příjmu externí organické látky. Tyto řasy jsou označovány jako mixotrofní (Brennan a Owende, 2010, Baicha *et al.*, 2016).

Rod *Chlorella* patří mezi nejznámější skupinu mikroskopických řas. Jedná se o velmi rozsáhlou a všudypřítomnou (též ubikvitní) skupinu zejména jednobuněčných, sladkovodních řas (existují i mořské či symbiotické), patřící do kmene Chlorophyta – zelené řasy. Podle současných informací patří do tzv. pravého rodu *Chlorella* pět druhů: *Ch. vulgaris*, *Ch. lobophora*, *Ch. sorokiniana*, *Ch. heliozoae*, a *Ch. variabilis* (Huss *et al.*, 1999, Proschold *et al.*, 2010.) Nedávné fylogenetické studie prokázaly, že morfologické znaky rodu *Chlorella* jsou sdíleny i dalšími liniemi v rámci třídy Chlorophyceae a Trebouxiophyceae (Neustupa *et al.*, 2009). Ve třídě Trebouxiophyceae patří zástupci rodu *Chlorella* do čeledě Chlorellaceae, která se rozděluje na dvě sesterské skupiny: *Parachlorella* a *Ch. sensu stricto* (Krienitz *et al.*, 2004). Toto rozdělení je založeno na analýzách ultrastruktury, především pak na syntéze buněčné stěny autospor u druhů obou skupin (Yamamoto *et al.*, 2005) a je tedy v dnešní vědecké sféře akceptováno (Obr. 7).

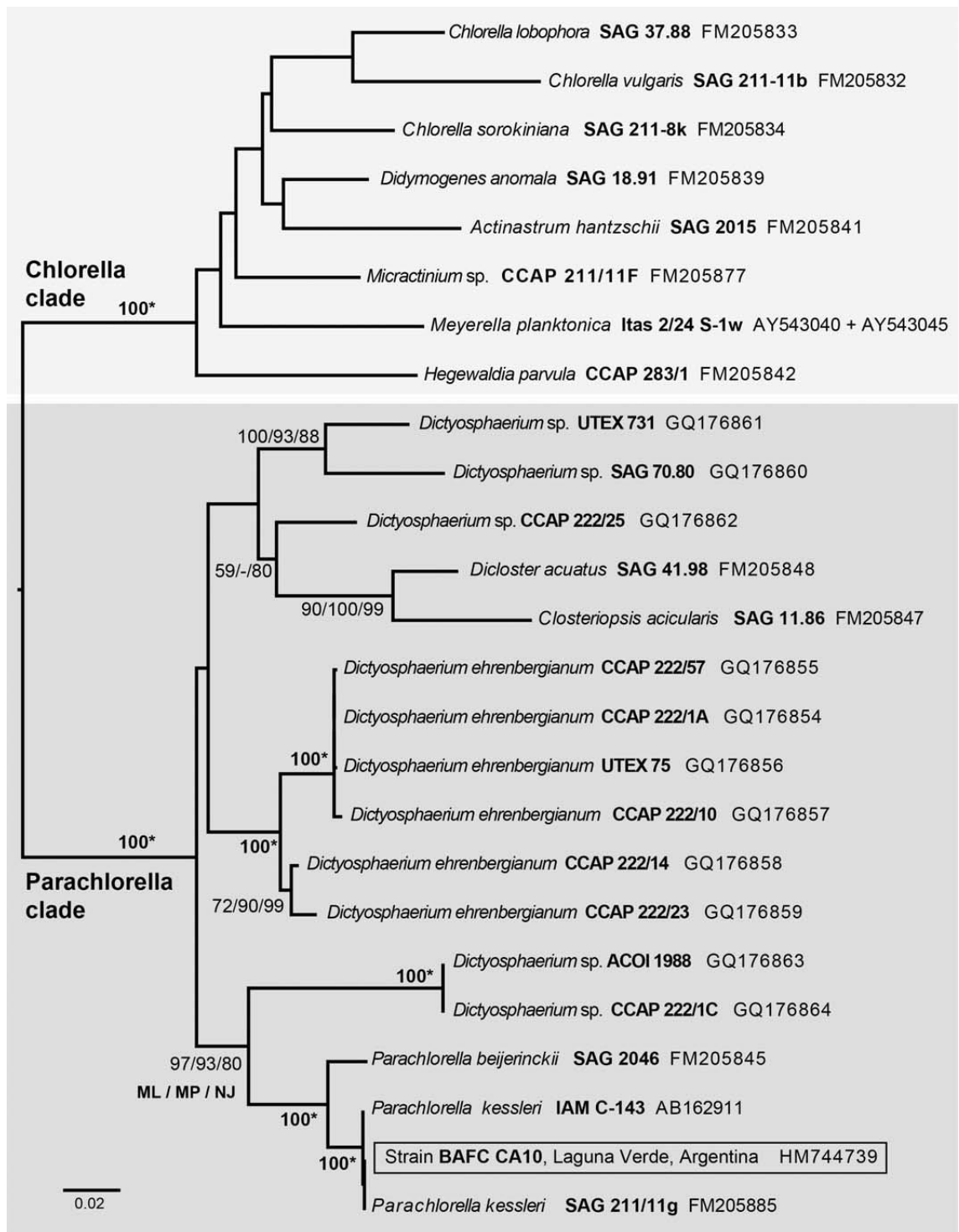
Druhy rodu *Chlorella* jsou ve většině odborné literatury popsány ve vegetativním stavu jako kokální, kulovité, sférické až elipsoidní řasy o rozměrech 5-10 μm (Obr. 8).

Tvarové a velikostní odlišnosti jsou způsobeny vnějšími i vnitřními faktory, mezi které patří stáří, živiny, environmentální nebo kultivační podmínky. Převážně žijí soliterně nebo tvoří kolonie (maximálně do 64 buněk) většinou bez slizového obalu. Během buněčného cyklu nevytvářejí bičíky (Bock *et al.*, 2011). V její cytoplazmě se nacházejí pouze dva páry centriol, které jsou pravděpodobně pozůstatkem bičíkatých předků. V důsledku absence bičíku je *Chlorella* nepohyblivá. Každá buňka obsahuje jeden chloroplast. Ten bývá rozdělen na dva přibližně stejné laloky a obsahuje základní fotosyntetická barviva, jako jsou chlorofyl a a b doplněné luteinem, β -karotenem, neoxantinem a violaxantinem.

Buněčná stěna tvoří přibližně 13,6 % hmotnosti a její složení je následující (Atkinson *et al.*, 1972):

- proteiny – 27%
- lipidy – 9,2%
- α -celulóza – 15,4%
- hemicelulóza – 31%
- glukosamin – 3,3%
- popelovina obsahující Fe a Ca – 5,2%

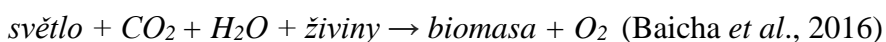
Výsledná tloušťka buněčné stěny se odvíjí od rychlosti růstu, čím je větší, tím více jsou buněčné stěny tenčí. Buněčnou stěnu lze pozorovat pomocí elektronového mikroskopu jako dvě vrstvy složené z mikrofibril uložených ve dvou směrech, které spolu s ostatními složkami tvoří kontinuální matrix (Northcote *et al.*, 1958). Každá buňka obsahuje jedno kulovité jádro a jeden pyrenoid, který ale nemusí být vždy přítomen (Bock *et al.*, 2011). Pokud je, bývá uložen centrálně a v jeho okolí se nachází homogenní matrix z granulárních škrobových zrn. V jeho bezprostřední blízkosti se nachází jedna mitochondrie a mikrotělísko obsahující enzymy a další důležité látky. Mitochondrie prochází skrze chloroplast a v těchto místech se vytváří trojrozměrná retikulární síť, která je běžná u jednobuněčných organismů z říše Plantae (Atkinson *et al.*, 1972).



Obr. 7: Nejpravděpodobnější fylogenetický strom rodu *Chlorella*. Za každým názvem druhu je název příslušného kmene a přístupové číslo do databáze GenBank. Čísla jednotlivých uzlů představují bootstrap hodnoty (stupeň podpory jednotlivých větví vzhledem k vstupním datům) pro metody maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP) a neighbor joining (NJ). 100* znamená 100% podpoření všemi třemi metodami (převzato od Juárez *et al.*, 2011)

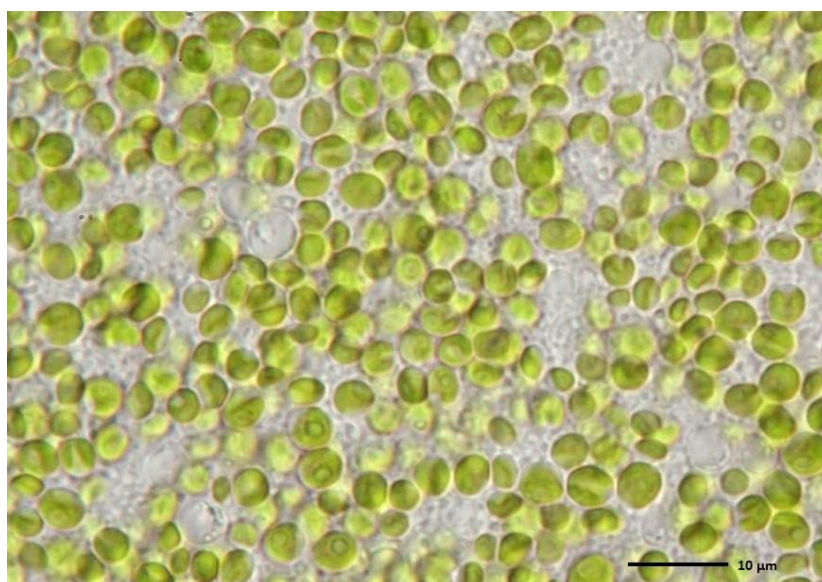
2.6.1 Kultivace řasy *Chlorella spp.*

K jejich rychlému růstu dochází za adekvátních podmínek. Během fotosyntézy produkují biomasu, jak znázorňuje uvedená rovnice:



Kultivace řasy vyžaduje použití vhodného média bohatého na živiny a soli, které jim umožňují rychlý růst. Rychlost růstu je ovlivněna také řadou fyzikálně-chemickými a biologickými faktory (světlo, teplota, pH, koncentrace živin). Nejdůležitější z nich je světlo a množství uhlíku v médiu. Dalším faktorem je teplota, se zvyšující se teplotou roste produkce biomasy. Chisti (2008) uvádí, že optimální teplota pro růst je v rozmezí 20-30 °C. Vysoké koncentrace CO₂ rovněž zvyšují tvorbu biomasy, avšak záleží na typu řasy (Singh a Singh, 2014). Kultivace také vyžaduje provzdušňovací systémy, které zabezpečují přísun CO₂ nutného pro fotosyntézu a stabilizaci pH. Rovnoměrné rozložení je zajištěno mírným promícháváním. Na základě svého metabolismu se řasy rozdělují do čtyř skupin (Baicha et al., 2016):

- fotoautotrofní
- heterotrofní
- mixotrofní
- fotoheterotrofní



Obr. 8: Fotografie buněčné kultury řasy druhu *Chlorella sorokiniana* (převzato z <http://botany.natur.cuni.cz/algo/database/node/104>).

Fotoautotrofní kultivace je nejrozšířenější kultivační systém, neboť téměř všechny řasy mohou používat anorganický uhlík a světlo k získání chemické energie prostřednictvím světla. V heterotrofním metabolismu nedochází k fotosyntéze, organický uhlík je přímo přeměňován na jiné organické sloučeniny potřebné pro růst a je tak zdrojem uhlíku i energie současně. Hlavní výhodou tohoto metabolismu je, že řasy dokážou rychle růst a produkovat biomasu i za nepřítomnosti světla. Mixotrofní metabolismus, který může být fototrofní, heterotrofní nebo obojí, využívá k produkci biomasy prostřednictvím fotosyntézy jako zdroj uhlíku CO₂ a organické sloučeniny (Baicha *et al.*, 2016). Kultivace v mixotrofních podmínkách vykazuje nejrychlejší růst řasy a také vyšší produkci biomasy v porovnání s fototrofními nebo heterotrofními kulturami (Yu *et al.*, 2009). Fotoheterotrofní metabolismus je kombinací heterotrofie a fototrofie. Mikroorganismy mající tento metabolismus využívají světlo jako zdroj energie a organické látky jako zdroj uhlíku (Baicha *et al.*, 2016)

Kultivační systémy pro řasy se rozdělují na otevřené nebo uzavřené. Volba vhodného kultivačního systému je rozhodující pro pěstování a závisí na konkrétním druhu. Dále se zohledňují náklady na celý proces, zdroje CO₂ a živin. Většina kmenů se pěstuje v uzavřených fotobioreaktorech. Otevřené systémy, jako jsou velkoplošné sladkovodní nádrže, jsou vhodné jen pro některé kmeny (Baicha *et al.*, 2016).

2.6.2 Využití řasy *Chlorella* spp.

Řasa *Chlorella* je díky svému vysokému obsahu bílkovin (cca 60 %) využívána jako potravinový doplněk. Poskytuje všechny esenciálních aminokyseliny, ale také řadu vitamínů (C, A, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, kyselina listová, B₁₂, K) a minerálních látek (fosfor, zinek, vápník, železo, hořčík). Aminokyseliny podporují srdeční činnost, nárůst svalové hmoty a také mohou být výchozími látkami pro tvorbu hormonů (Merchant and Cynthia, 2001, Rathouský, 2008, Tang a Suter, 2011). Vitamíny jsou zase nezbytné pro správné fungování organismu. Výborný antioxidantem je vitamin A, který dokáže přeměňovat volné radikály do méně reaktivní podoby (Bulková, 2011). Kombinace velkého množství vitamínu B₁₂, kyseliny listové a železa, může přispět ke zlepšení anémie a hypertenzních poruch (Tang a Suter, 2011). Nakano *et al.* (2010) ve své studii zkoumali preventivní účinky doplňků z řasy na tyto poruchy u těhotných žen a prokázali, že přípravky z řasy *Chlorella* snižují riziko vzniku anémie či hypertenze.

Nejčastěji vyskytující se polysacharidy v buněčné stěně řas jsou sulfátové estery označované jako sulfátové polysacharidy, které vykazují antivirové, antioxidační a protinádorové účinky a také jsou široce používány jako potravinářská aditiva (Vaz *et al.*, 2016).

Kromě aminokyselin, peptidů, proteinů, vitamínů, sacharidů a nukleových kyselin obsahuje *Chlorella* ve vodě rozpustný komplex známý jako Chlorella growth factor (CGF), složen převážně z aminokyselin, bílkovin a nukleových kyselin, pocházející pravděpodobně z buněčných jader řas. CFG může zvýšením počtu a aktivitou makrofágů posílit imunitní systém (Merchant and Cynthia 2001, Tang a Suter, 2011). Dále má také CGF schopnost regenerace tkáně nebo prebiotické účinky. Zvyšuje rychlost růstu střevní mikroflóry, podporuje růst laktobacilů, zlepšuje vstřebávání živin a také má schopnost vylučovat toxiny z těla konzumenta (Rathouský, 2008).

Chlorella obsahuje ze všech dosud známých rostlin největší množství chlorofylu, který se podílí nejen na fotosyntéze, ale má také velmi příznivé vlivy na organismus. Bylo prokázáno, že vykazuje antimikrobiální účinky proti několika patogenům v potravinách (*Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*) (Tang a Suter, 2011, Guedes *et al.*, 2011) Antibakteriální aktivita je pravděpodobně způsobena vysokou produkcí mastných kyselin s dlouhým řetězcem, které byly přítomny u extraktů s nejlepšími antimikrobiálními účinky (Guedes *et al.*, 2011). Další významnou látkou obsažená v řase je chlorellin. Nazývá se přírodním antibiotikem, dokáže zastavit nebo úplně potlačit vzniklé infekce a na rozdíl od syntetických antibiotik nepoškozuje střevní mikroflóru (Rathouský, 2008).

2.6.2.1 Využití řasy *Chlorella spp.* ve včelařství

Chlorella se hodí jako potravinový doplněk, neboť má pozitivní výsledek na růst a zvýšení produktivity včelstev (Eremia *et al.*, 2013). Protože některé druhy řas mohou být vysoce jedovaté pro savce a ptáky, bylo studováno, zda mají toxiny z řas insekticidní účinek na včely. Mnoho alkaloidů mající toxický účinek může být i insekticidní. Tato řasa však toxicitu vůči včelám nevykazovala. Vystavení včel jejich vlivu nevedlo k jejich poškození (Barker, 1977). Kromě těchto studií se v současné době provádí výzkum inhibičních účinků *Chlorelly* na některá onemocnění včelstev, jako je např. mor včelího plodu (AFB). V mnoha zemích se AFB léčí pomocí antibiotických látek, jako je širokospektrální antibiotikum oxytetracyklin. V Evropské unii je však používání

antibiotik zákonem zakázáno a klinicky nemocná včelstva se likvidují spálením. Tato situace volá po alternativních cestách podpory ozdravení a prevence chorob u chovaných včelstev, které jsou v souladu se zákony Evropské unie a také vyhovují současným trendům zeleného konzumerismu.

Vyšší rostliny jsou považovány za důležité zdroje bioaktivních molekul, z nichž některé vykazují antimikrobiální účinek. Na základě toho byly zkoumány biologické účinky celé řady různých přírodních produktů jako jsou např. allicin, thymol, citral, geraniol, mastné kyseliny a esenciální oleje. V řadě studií bylo prokázáno, že tyto látky vykazují růstově inhibiční účinek proti několika včelím chorobám včetně AFB (Flesar *et al.*, 2010). Řasy obsahují celou řadu látek využitelných v tomto směru a v poslední době je jim věnována značná pozornost. Sulfatované polysacharidy získané z řas byly testovány ke kontrole růstu mikrosporidie *Nosema ceranae*, parazita ohrožujícího dospělé jedince včely medonosné, aby se snížily škodlivé účinky na hostitele a tím se snížily ztráty včelstev. Studie u některých látek z této skupiny skutečně prokázaly pokles v přítomnosti parazita, což se projevilo poklesem mortality včel. Tyto slibné výsledky jen potvrzují současný trend použití řas při kontrole onemocnění včelstev (Roussel *et al.*, 2015).

2.7 Potravinové doplňky pro zvýšení odolnosti včel k nálezám

Mezi velké obavy včelařů patří období, kdy je nedostatečné množství pylu a v důsledku toho včely velmi rychle spotřebovávají své vlastní pylové zásoby. Není-li k dispozici pyl, může se snížit produkce včelích plodů nebo dokonce i úplně zastavit. Aby bylo zachováno silné včelstvo důležité pro opylování a výrobu medu, používají se různé doplňky stravy a pylové náhražky. Tyto alternativní doplňky stravy podporují také zdravý rozvoj včelstev a tím i jejich výkonost (Morais, 2013).

Ve své studii Flesar *et al.* (2010) testovali celkem 26 různých přírodních chemických látek a 19 čistých extraktů (např. z blahovičnicku, vavřínu či rozmarýnu) proti *P. larvae*, bakterii způsobující AFB. Ze všech testovaných přírodních látek byl největší inhibiční účinek pozorován u sanguinarinu, který měl MIC 4 mg.ml⁻¹, dále pak u thymoquinonu, kapsaicinu, trans-2-hexanalů nebo kyseliny nordihydroguajaretové. U extraktů byla pozorována nejmenší MIC z výtažků chmelu otáčivého (*Humulus lupulus*) nebo z myrty obecné (*Myrtus communis*). Díky nízké toxicitě vůči včelám a značnému inhibičnímu účinku proti *P. larvae* by mohly být tyto přírodní látky použity jako alternativa k potlačení AFB (Flesar *et al.*, 2010). Některé publikace dokonce ukazují, že určité kmeny *P. larvae* jsou odolné vůči oxytetracyklinu a jejich hodnoty MIC mohou dosahovat až 32 mg.ml⁻¹, což je daleko vyšší hodnota než testovaného sanguinarinu (Miyagi *et al.*, 2000).

Gastrointestinální trakt včel je velmi složitý systém, který obsahuje poměrně pestré spektrum mikrobů. Studie prokázaly, že bakteriální probiotika mohou vyvolat imunitní odpověď (Evans a Lopez, 2004), a přispět tak k udržení zdravých včelstev. V důsledku toho vzrostl vědecký zájem o tyto bakterie trávicí soustavy a možnosti jejich využití jako alternativa k tlumení nález ve včelařství. Yoshiyama a Kimura (2009) se ve svém výzkumu zabývali právě těmito bakteriemi a jejich inhibičními účinky na *P. larvae* a zjistili, že střevní bakterie z včely východní japonského plemene *Apis cerana japonica*, způsobují inhibiční růst *P. larvae*. V dalších studiích Wu *et al.* (2014) zjistili, že tyto bakterie mají také inhibiční účinek proti *M. plutonius*. Střevní bakterie této včely vykazovaly antagonistický účinek proti *M. plutonius* z včely medonosné, a proto by mohly být použity jako biologický prostředek ke kontrole EFB (Wu *et al.*, 2014).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Aceton (Lach-Ner, ČR)

Agar (Carl Roth, Německo)

DNA standard 2-Log-Ladder (0,1 – 10,0 kb) (BioLabs, USA)

GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA)

Glukosa (Sigma-Aldrich, USA)

GoTaq polymerase Green Master Mix (Promega, USA)

Hydrogenfosforečnan draselný (Penta, ČR)

Chlorid sodný (Carl Roth, Německo)

InstaGene Matrix (BioRad, USA)

Isopropanol 70% (Lach-Ner, ČR)

Kvasničný extrakt (Carl Roth, Německo)

Kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina nalidixová (Sigma-Aldrich, Itálie)

Kyselina octová (Lach-Ner, ČR)

Mueller Hinton broth (Carl Roth, Německo)

PCR voda (Sigma-Aldrich, USA)

Primery (Sigma-Aldrich, USA)

Pyruvát sodný (Sigma-Adrich, Japonsko)

Resazurin sodná sůl (Sigma-Aldrich, USA)

SeaKem LE Agarosa (Lonza, USA)

Tetracyklin-hydrochlorid (Fluka, Čína)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.2 Biologický materiál

Bakteriální kmeny použité pro testování byly získány ze sbírky referenčních kmenů České sbírky mikroorganismů Masarykovy Univerzity v Brně (Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University Brno, Czech Republic).

Testované bakteriální kmeny:

- *Paenibacillus larvae* CCM 38
- *Paenibacillus larvae* CCM 39
- *Paenibacillus larvae* CCM 4483
- *Paenibacillus larvae* CCM 4484
- *Paenibacillus larvae* CCM 4485
- *Paenibacillus larvae* CCM 4486
- *Paenibacillus larvae* CCM 4487
- *Paenibacillus larvae* CCM 4488
- *Paenibacillus larvae* CCM 5680

K rozlišení genotypu ERIC I-IV byly použity referenční kmeny *Paenibacillus larvae* ERIC I a *Paenibacillus larvae* ERIC II poskytnuty od Evy Forsgren ze Švédska.

3.1.3 Přístroje a vybavení

Analytické váhy (Denver Instrument, Německo)

Autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Densitometr DEN-1 (Biosan, Lotyšsko)

Digitální fotoaparát (SONY, Japonsko)

Digitální předvážky (Radwag®, ČR)

Elektroforetický systém MBE-150 (Major Science, USA)

Elektromagnetická míchačka Intelli Stirrer (BioSan, Lotyšsko)

Flowbox Bioban (Steril, Itálie)

Gel Doc EZ Imager systém (Bio-Rad, USA)

Chlazená centrifuga 5418 R (Eppendorf, Německo)

Inkubátor Q-CELL (Verkon, ČR)

Minicentrifuga MCF 2360 (Vitrum, Česká republika)

Multifunkční reader Synergy H1 (BioTek, USA)

PCR T100 termocykler (Bio-Rad, USA)

Spektrofotometr Lightwave II (Biochrom, VB)

Termostat CH-100 (BioSan, Lotyšsko)

Třepačka PSU-10i (BioSan, Lotyšsko)

Ultrazvuková lázeň K5 (Kraintek, ČR)

Vortex V-1 (BioSan, Lotyšsko)

3.1.4 Příprava extraktů z řasy *Chlorella sorokiniana*

Vodné a acetonové extrakty byly poskytnuty ve formě sušiny Ing. Petrou Urajovou, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu Akademie věd v Třeboni. Vodné extrakty byly z řasy autotrofní (CA), heterotrofní (CHM) a autotrofní degradované (CAD). Autotrofní řasa byla pěstována venku na světle, heterotrofní řasa byla pěstována v tanku ve tmě a jako médium byla použita glukosa. Autotrofní degradovaná řasa se pěstovala stejně jako řasa autotrofní, lišila se pouze v jediném rozdílu, a to že po sklizni byla ponechána na světle. Acetonové extrakty pak nesou označení 593 a 871. Tyto extrakty ve formě sušiny byly poté rozpuštěny ve sterilní vodě příp. acetonu na koncentraci 10 mg.ml⁻¹.

3.1.5 Použité roztoky a média

- Fyziologický roztok: 0,9% NaCl s 1% glukosou
- Resazurin: 0,01% (w/v) vodný roztok
- Resazurin: 0,03% (w/v) vodný roztok
- TAE (Tris-acetát-EDTA) pufr (500 ml): 121 g Tris; 28,55 ml ledové kyseliny octové; 50 ml 0,5M EDTA
- MYPGP agar: 10 g.l⁻¹ Mueller Hinton broth, 15 g.l⁻¹ kvasničný extrakt, 3 g.l⁻¹ K₂HPO₄, 1g.l⁻¹ pyruvát sodný, 20 g.l⁻¹ agar (pevné médium)
- MYPGP agar: 10 g.l⁻¹ Mueller Hinton broth, 15 g.l⁻¹ kvasničný extrakt, 3 g.l⁻¹ K₂HPO₄, 1g.l⁻¹ pyruvát sodný (tekuté médium)

Do každého připravovaného média určeného k difuzním testům bylo po autoklávování přidáno 8 ml 10% glukosy a 8 ml kyseliny nalidixové na celkový objem 400 ml. Do každého

tekutého média určeného ke stanovování MIC bylo po autoklávování přidáno 8 ml 10% glukosy na celkový objem 400 ml.

TAE pufr byl před použitím 50x zředěn.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava bakteriální suspenze

Ze zmraženého bakteriálního kmene *P. larvae* byla připravena bakteriální suspenze rozsuspendováním ve fyziologickém roztoku na výslednou hustotu 0,5 jednotky McFarlanda (Votava *et al.*, 2010). Suspenze byla rozetřena pomocí vatové tyčinky ve třech různých směrech (cca pod úhlem 60°) na MYPGP agar v Petriho miskách a ty byly poté inkubovány 2 – 3 dny při 37 °C.

3.2.2 Očkování média bakteriálním kmenem přímo

Po uplynutí doby inkubace byla z narostlých kolonií připravena bakteriální suspenze rozsuspendováním ve sterilní vodě na výslednou hustotu 0,5 McFarlanda a naočkována pomocí vatové tyčinky na MYPGP agar v hranatých Petriho miskách (120 x 120 mm) ve třech různých směrech. Po zaschnutí bakteriální suspenze byla miska s médiem připravena k testování extraktů řasy.

3.2.3 Očkování média bakteriálním kmenem metodou zalité kultury

Po uplynutí doby inkubace byla z narostlé kolonie připravena bakteriální suspenze rozsuspendováním ve sterilní vodě o hustotě 0,5 McFarlanda. Suspenze (2 ml) byla přidávána do tekutého média (50 ml), které poté bylo nalito do hranaté Petriho misky (120 x 120 mm).

3.2.4 Testování pomocí difuzních testů

Testování bylo prováděno několika způsoby. Extrakty byly aplikovány přímo na misku, na papírové disky, do uměle vytvořených jamek či na zalitou bakteriální kulturu. Koncentrace vodných a acetonových extraktů byla 10 mg.ml⁻¹. Po nanesení extraktů z řasy byly misky inkubovány dnem vzhůru 48 h při 37 °C. Po ukončení inkubace byly změřeny průměry inhibičních zón.

3.2.4.1 Aplikace extraktů řasy přímo na inokulované médium

Na vyznačená místa bylo na povrch naočkovaného pevného média aplikováno 10 µl extraktu řasy. Testování bylo zprvu prováděno pro každý kmen a extrakt jednou. Nakonec

bylo zvoleno testování v triplikátech a pro každý kmen dvakrát. Po zaschnutí byly misky vloženy do inkubátoru.

3.2.4.2 Aplikace extraktů řasy na zalitou kulturu

Po zaschnutí média obsahující bakteriální suspenzi bylo na vyznačená místa na povrchu média aplikováno 10 μ l extraktu řasy. Testování bylo zprvu prováděno pro každý kmen a extrakt jednou. Nakonec bylo zvoleno testování v triplikátech a pro každý kmen dvakrát. Po zaschnutí byly misky vloženy do inkubátoru.

3.2.4.3 Aplikace extraktů řasy do uměle vytvořených jamek v médiu

Do pevného média byly vykrojeny jamky (průměr 3 mm). Poté bylo médium naočkováno testovaným bakteriálním kmenem. Po zaschnutí bylo do jamek napipetováno 10 μ l extraktu.

3.2.4.4 Aplikace extraktů řasy na papírové disky

Kultivační médium bylo naočkováno testovaným bakteriálním kmenem. Po zaschnutí byly na vyznačená místa položeny papírové disky, na které bylo aplikováno 10 μ l extraktu.

3.2.3 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Byla připravena bakteriální suspenze rozsuspendováním ve sterilní vodě, která byla poté přidávána do tekutého MYPGP média až do hodnoty absorbance 0,1 (OD_{600}). Z MYPGP média s bakteriální kulturou byl odebrán 1 ml, který byl centrifugován (10 min, $8800 \times g$). Po odstranění supernatantu byl k peletu přidán 1 ml 70% isopropanolu, čímž došlo k usmrcení bakteriálních buněk. Byla provedena inkubace při pokojové teplotě po dobu 60 min za občasného promíchávání.

Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace byla použita 96-jamková mikrotitrační destička. Do každé jamky bylo napipetováno 50 μ l bakteriální suspenze v MYPGP médiu a 50 μ l vodného extraktu řasy. Byla vytvořena koncentrační řada extraktů s koncentracemi 5 $mg \cdot ml^{-1}$ – 0,039 $mg \cdot ml^{-1}$. K ředění bylo použito tekuté kultivační médium – MYPGP. Následně bylo pro detekci živých a mrtvých buněk do každé jamky přidáno 10 μ l modrého barviva resazurin o koncentraci 0,3 $mg \cdot ml^{-1}$. V přítomnosti živé buňky je modrý resazurin redukován přenosem elektronů v dýchacím řetězci na růžový produkt – resofurin. V kultivačním médiu bez přítomnosti bakterií je velmi stabilní, ale v přítomnosti bakterií dochází k rychlé redukci působením např. NADPH dehydrogenasy. (Mariscal *et al.*, 2009). Kontrolní vzorky byly připraveny z bakteriální

suspenze usmrcených buněk (100 µl), bakteriální suspenze živých buněk (100 µl), tekutého MYPGP média (100 µl), 50 µl bakteriální suspenze s přidavkem 50 µl antibiotika tetracyklinu (TTC, 200 µmol.l⁻¹) a 50 µl bakteriální suspenze usmrcených buněk s 50 µl extraktu. Testování bylo pro každý vodný extrakt a kontrolní vzorek aplikováno v triplicátech. Takto připravená mikrotitrační destička byla za stálého třepání inkubována ve tmě při 37 °C po dobu 12 h. Po kultivaci byla odečítána MIC podle zabarvení bakteriální suspenze.

3.2.4 Izolace DNA z *Paenibacillus larvae*

Odebrané bakteriální kolonie byly rozsuspendovány v 1 ml sterilní vody. Suspenze byla centrifugována (1 min, 10000 × g) a k peletu bylo poté přidáno 200 µl lyzačního pufu InstaGene Matrix. Proběhla inkubace při 56 °C po dobu 30 minut. Po inkubaci byl vzorek 10 s promíchán na vortexu a znovu inkubován, tentokrát při 100 °C a 8 min. Po inkubaci byl vzorek opět promíchán na vortexu a poté centrifugován (3 min, 10000 × g). Nakonec byl odebrán supernatant, který obsahoval vyizolovanou DNA.

3.2.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA bylo prováděno na multifunkčním readeru Synergy H1. Na specifickou destičku Take3 byly nanášeny vzorky DNA (2 µl) v duplikátech. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda (2 µl) nanesená také v duplikátu. Byla změřena absorbance vzorku (poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) a vypočtena koncentrace DNA.

3.2.6 PCR pro rozlišení genotypů *P. larvae* v systému primerů ERIC

Pro zařazení sbírkových kmenů *P. larvae* metodou PCR byly použity primery ERIC1R a ERIC2 (Genersch *et al.*, 2006). Sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce 1.

3.2.6.1 Příprava PCR směsi

Z jednotlivých složek (Tab. 2) byla do mikrozkušavek připravena reakční směs na PCR. Objemy daných složek byly přizpůsobeny množství vzorků (včetně pozitivní a negativní kontroly). Objem přidávané PCR vody se měnil dle množství objemu DNA tak, aby celkový objem byl 12,5 µl. Koncentrace DNA přidávaná do reakční směsi byla přibližně 100 ng.µl⁻¹. Připravená reakční směs byla poté spolu s DNA pipetována do stripů, tak aby celkový objem byl 12,5 µl (např. 1 µl DNA + 11,5 µl reakční směsi PCR). Jako negativní kontrola byla použita PCR voda, která byla přidávána místo DNA. Pozitivní kontrolou byla vyizolovaná DNA z referenčních kmenů *P. larvae* ERIC I a ERIC II.

Tab. 1: Sekvence primerů používané při PCR reakci pro rozlišení genotypů ERIC

Primer	Sekvence primeru (5'-3')
ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG

Tab. 2: Složení reakční směsi pro PCR k rozlišení ERIC

Složka	Objem (μl) na jednu reakci
PCR voda	4,25
Primer ERIC1R (10 mmol.l ⁻¹)	0,50
Primer ERIC2 (10 mmol.l ⁻¹)	0,50
GoTaq polymerasa premix	6,25
DNA (100 ng.μl ⁻¹)	1,00

3.2.6.2 Podmínky PCR reakce

Vzorky obsahující všechny složky PCR směsi byly promíchány a krátce centrifugovány. Poté byly vzorky umístěny do přístroje a byl nastaven program na rozlišení ERIC (Tab. 3). Kroky 2 – 4 byly opakovány 34x (Genersch *et al.*, 2006). Po skončení PCR reakce je přístroj nastaven na teplotu 4 °C.

3.2.7 PCR pro typizaci bakterie *Paenibacillus larvae*

K určení, jedná-li se o bakterii *P. larvae*, byly použity primery AFB Fw a AFB Rew (de Graaf *et al.*, 2013), jejichž sekvence jsou uvedeny v Tabulce 4.

3.2.7.1 Příprava PCR směsi

Z jednotlivých složek (Tab. 5) byla do mikrozkrumavek připravena reakční směs na PCR. Objemy daných složek byly přizpůsobeny množství vzorků. Objem přidávané PCR vody se měnil dle množství objemu DNA tak, aby celkový objem byl 12,5 μl. Připravená reakční směs byla poté spolu s DNA pipetována do stripů, tak aby celkový objem byl 12,5 μl (např. 1 μl DNA + 11,5 μl reakční směsi PCR).

Tab. 3: Program PCR reakce pro rozlišení genotypů ERIC

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)
Počátek denaturace	95	2:00
Denaturace	94	1:00
Připojení primerů	53	1:00
Syntéza DNA	72	2:30
Poslední cyklus	72	5:00
Chlazení	4	∞

Tab. 4: Sekvence primerů použitých k určení *P. larvae*

Primer	Sekvence primeru (5'-3')
AFB Fw	CTTGTGTTTCTTTCGGGAGACGCCA
AFB Rew	TCTTAGAGTGCCACCTCTGCG

Tab. 5: Složení reakční směsi pro PCR k určení *P. larvae*

Složka	Objem (μl) na jednu reakci
PCR voda	4,25
Primer AFB Fw (10 mmol.l ⁻¹)	0,50
Primer AFB Rew (10 mmol.l ⁻¹)	0,50
GoTaq polymerasa premix	6,25
DNA (100 ng.μl ⁻¹)	1,00

3.2.7.2 Podmínky PCR reakce

Vzorky obsahující všechny složky PCR směsi byly promíchány a krátce centrifugovány. Poté byly vzorky umístěny do přístroje a byl nastaven program na určení *P. larvae* (Tab. 6). Kroky 2 – 4 byly opakovány 35x (de Graaf *et al.*, 2013). Po skončení PCR reakce je přístroj nastaven na teplotu 4 °C.

3.2.8 Detekce PCR produktů metodou gelové agarosové elektroforézy

Byl připraven 0,8% (w/v) agarosový gel (0,8 g agarosy, 100 ml 1× TAE pufu). Suspenze byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě a po zchladnutí byla nalita do elektroforetické vaničky. K vizualizaci DNA bylo použito barvivo GelRed. Poté byl vložen hřebínek a gel byl nechán ztuhnout. Po ztuhnutí byl hřebínek vyndán a vanička s gelem byla vložena do elektroforetického systému s 1× TAE pufrem. Do jamek byly nanášeny vzorky DNA získané z PCR (6 μl) a marker (4 μl), sloužící jako standard velikosti

produktů (0,1 – 10,0 kb). Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 80 V, 1 hod. Po ukončení byl gel pomocí Gel Doc EZ Imager systému vyfocen a vyhodnocen.

Tab. 6: Program PCR reakce pro určení *P. larvae*

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)
Počátek denaturace	95	2:00
Denaturace	93	1:00
Připojení primerů	55	0:30
Syntéza DNA	72	1:00
Poslední cyklus	72	5:00
Chlazení	4	∞

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

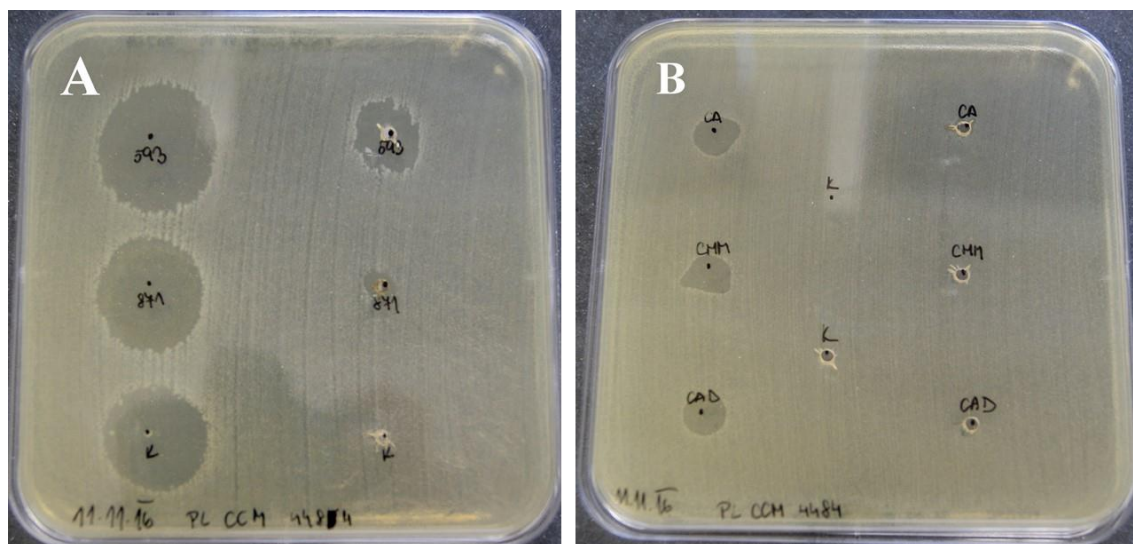
4.1 Difuzní testy

Aplikace vodných a acetonových extraktů řasy na plotnu MYPGP média inokulované bakteriálním kmenem *P. larvae* metodou papírových disků se pro testování antimikrobiálních účinků jevila jako nevhodná. Testování jsem provedla jak na plotně naočkované přímo (viz kapitola 3.2.4.1), tak i na plotně naočkované metodou zalité kultury (viz kapitola 3.2.4.2). Inhibiční zóny se při aplikaci na papírové disky u vodných extraktů (CA = autotrofní řasa, CAD = autotrofní degradovaná řasa, CHM = heterotrofní řasa) netvořily vůbec a u acetonových extraktů se vytvořila inhibiční zóna pouze u jednoho ze dvou testovaných extraktů – 593. Acetonový extrakt 871 nevykazoval žádné antimikrobiální účinky. Shabudeen *et al.* (2016) použili k určení antimikrobiální aktivity řasy *Chlorella vulgaris* taky difuzní disky a měli pozitivní výsledek, inhibiční zóny se vytvořily. Možným důvodem, proč se při mém experimentu inhibiční zóny netvořily je ten, že já aplikovala na disk 10 μl a Shabudeen *et al.* (2016) 150 μl extraktu. Ibrahim *et al.* (2015) aplikovali 50 μl extraktu (vodný a ethanolový) řasy *Chlorella vulgaris* do uměle vytvořených jamek (průměr 6 mm) a po inkubaci s inokulovanou G+ bakterií pozorovali inhibiční zóny. V mém případě po aplikaci extraktů řasy *Chlorella sorokiniana* do uměle vytvořených jamek (viz 3.2.4.3) nedocházelo k tvorbě inhibičních zón nebo se u některých bakteriálních kmenů tvořily jen zóny s malými, nepatrnými průměry. Koncentraci extraktů jsem měla nižší (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), než které použili Ibrahim *et al.* (2015) (100 – 500 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a taky jsem do jamky nanášela menší množství (10 μl). Daleko lepší výsledky vykazovala metoda, kdy jsem extrakty řasy aplikovala přímo na povrch inokulovaného média (Obr. 7). U této metody jsem pozorovala tvorbu inhibičních zón jak u vodných extraktů, tak i u acetonových extraktů řasy. Avšak při aplikaci acetonových extraktů přímo na misku s médiem inokulovaného bakteriální kulturou, se tvořila inhibiční zóna i u použité kontroly – aceton. Aceton je polární organické rozpouštědlo, které už samo o sobě vykazuje antimikrobiální účinky, patrně tak došlo k usmrcení bakterií a vytvoření inhibiční zóny. Pro další testování jsem z tohoto důvodu zvolila aplikaci acetonových extraktů na médium se zalitou bakteriální kulturou, kde byla bakteriální kultura rozprostřena v celém médiu, nikoliv pouze na povrchu. Pro vodné extrakty řasy jsem jako kontrolu použila sterilní vodu, která nevykazovala žádné antimikrobiální účinky (Obr. 9), proto jsem při dalším testování používala právě tuto

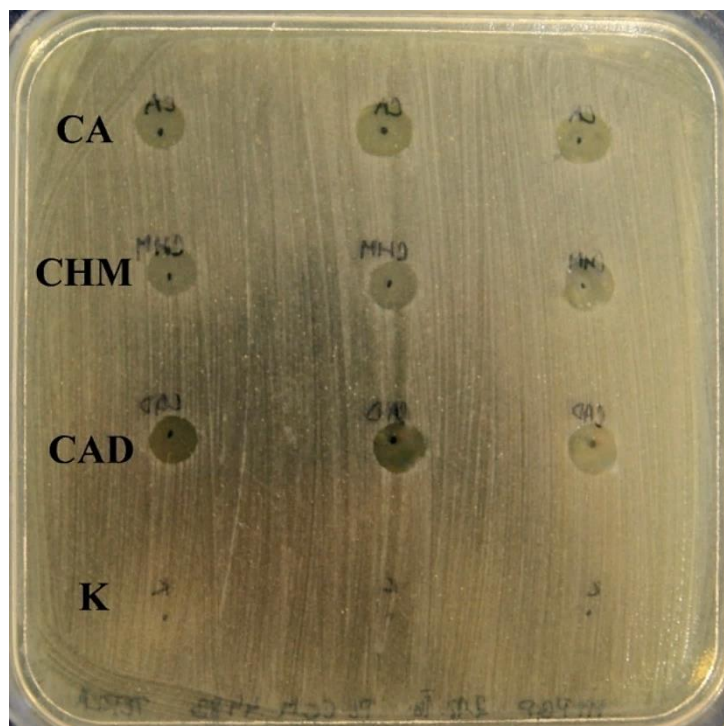
metodu aplikace extraktů. Aplikaci vodných a acetonových extraktů řasy jsem prováděla v triplikátech a pro každý bakteriální kmen *P. larvae* v duplikátu.

4.1.2 Difuzní testy vodných extraktů řasy

Vodné extrakty řasy jsem aplikovala v triplikátech přímo na MYPGP médium inokulované bakteriálním kmenem na povrchu. Na vyznačené místo jsem nanášela 10 μl extraktu o koncentraci 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Všechny tři typy vodných extraktů vykazovaly inhibiční účinky proti testovaným bakteriálním kmenům *P. larvae* (Obr. 10). Nejsilnější antimikrobiální účinky měl vodný extrakt CA, který tvořil téměř u všech bakteriálních kmenů inhibiční zóny o velikosti 10 mm. Výjimkou byly pouze kmeny CCM 4488 a CCM 5680, jejichž inhibiční zóny dosahovaly velikosti 7 – 8 mm. Naopak nejcitlivější bakteriální kmeny byly CCM 38 a CCM 39, které tvořily zóny nejčastěji o velikosti 10 mm a kmen CCM 39 dokonce i 11 mm. Vodný extrakt autotrofní degradované řasy (CAD) vykazoval o něco menší inhibiční účinky než extrakt autotrofní řasy (CA). Vznikající inhibiční zóny nejčastěji dosahovaly průměrů 8 mm. U většiny bakteriálních kmenů byly velikosti inhibičních zón v triplikátech rozdílné, avšak po zprůměrování dosahovaly všechny velikosti 8 mm. Výjimkou byly jen kmeny CCM 38 a CCM 4484, jejichž zóny měly při každém testování 8 mm. Nejmenší antimikrobiální účinnost



Obr. 9: Porovnání aplikace acetonových (A) a vodných (B) extraktů řasy přímo na misku (levý sloupec na obrázku A i B) a do uměle vytvořených jamek (pravý sloupec obrázku na A i B). Koncentrace vodných i acetonových extraktů byla 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a byly aplikovány po 10 μl (0,1 mg na spotu).



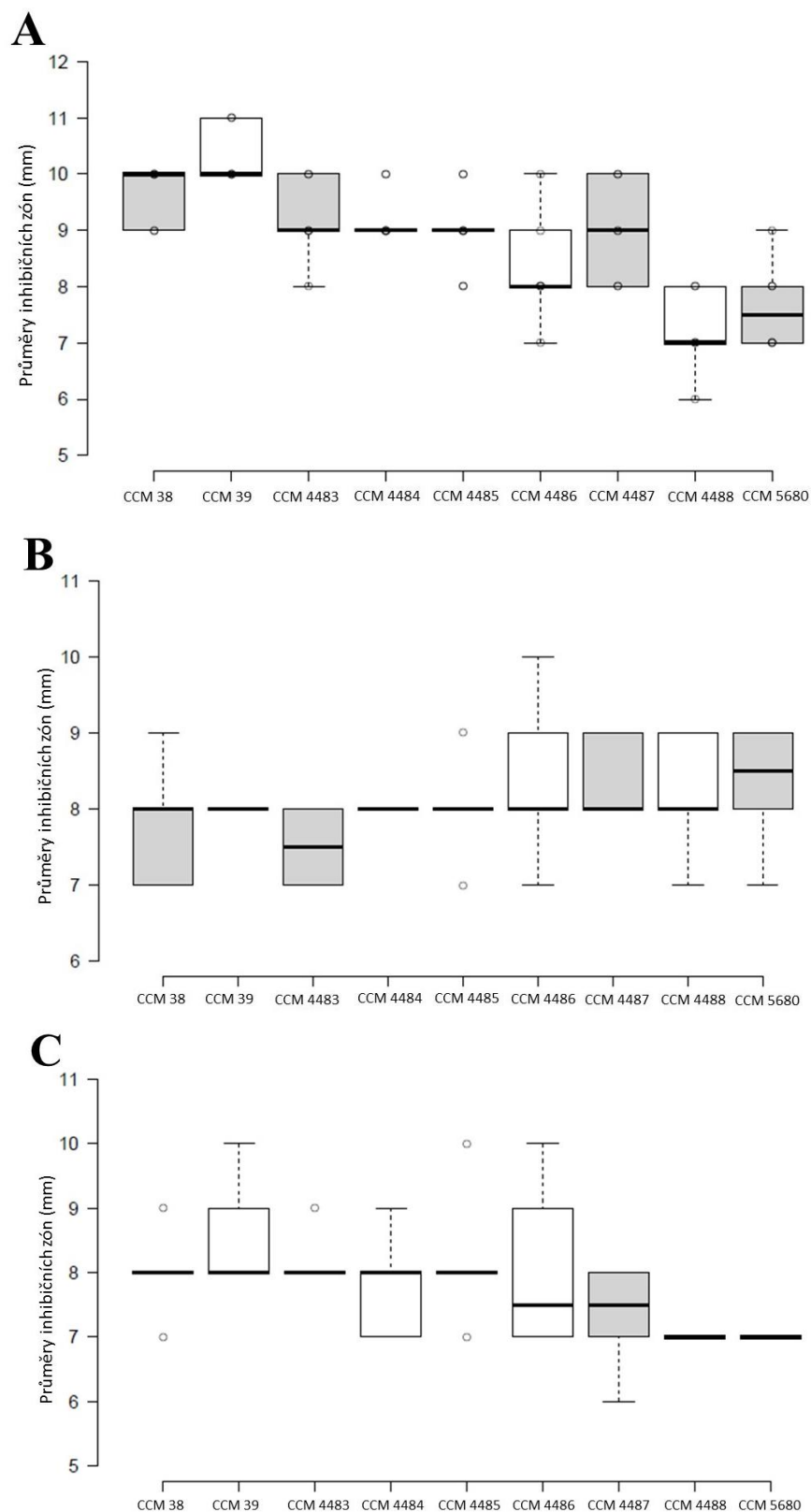
Obr. 10: Inhibiční zóny vodných extraktů aplikované na médium inokulované bakteriálním kmenem *P. larvae* CCM 4483. Extrakty byly nanášeny po 10 μ l, což odpovídá množství 0,1 mg ($10 \text{ mg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). V prvním řádku je extrakt autotrofní řasy, ve druhém řádku je extrakt heterotrofní řasy, ve třetím řádku je extrakt autotrofní degradované řasy. V posledním řádku je sterilní voda jako kontrola.

vykazoval vodný extrakt CHM, který sice vytvořil u třech kmenů (CCM 39, CCM 4485, CCM 4486) inhibiční zónu o velikosti 10 mm, avšak u většiny testovaných kmenů se průměry inhibičních zón pohybovaly okolo 7 – 8 mm. U kmenů CCM 4488 a CCM 5680 narostly inhibiční zóny pouze o velikosti 7 mm..

Proti G+ bakteriím (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* a *Enterococcus faecalis*), mezi které patří i *P. larvae*, vykazuje antimikrobiální aktivitu i řasa *Chlorella vulgaris*, kterou se ve svých studiích zabývaly Ibrahim *et al.* (2015). Inhibiční zóny se tvořily ale pouze o velikosti 6 mm a to i při aplikaci koncentrace extraktu 100 – 500 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, tedy větší než byla aplikována koncentrace extraktu řasy *Chlorella sorokiniana*.

Na grafech (Obr. 11) můžeme vidět, že testované bakteriální kmeny byly vůči vodným extraktům různě citlivé. Průměry inhibičních zón extraktů z autotrofní řasy (CA) se pohybovaly v rozmezí 6 – 11 mm (one-way ANOVA df = 8, p = 0). U vodného extraktu autotrofní degradované řasy (CAD) nebyly průměry inhibičních zón tak rozdílné.

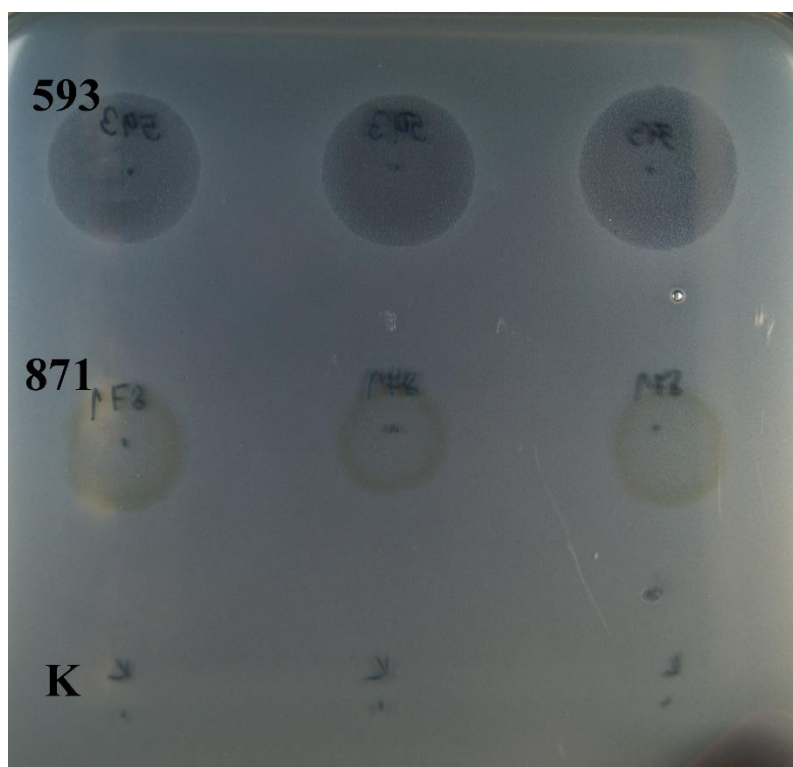
Nejmenší zóny měly v průměru 7 mm a největší 10 mm. Velikost zón se však mezi sebou statisticky nelišila (one-way ANOVA $df = 8$, $p = 0,4$). Inhibiční zóny u vodného extraktu heterotrofní řasy (CHM) se pohybovaly také v rozmezí 7 – 10 mm, kmeny byly k tomuto extraktu různě citlivé (one-way ANOVA $df = 8$, $p = 0,0001$). U vodných extraktů CA a CHM byla hodnota p menší než 0,05, platí tedy alternativní hypotéza (H_1), která odpovídá různé citlivosti testovaných bakteriálních kmenů. U vodného extraktu CAD byla hodnota p větší než 0,05, platí zde proto nulová hypotéza (H_0), která říká, že velikosti inhibičních zón pro všechny bakteriální kmeny byly podobné.



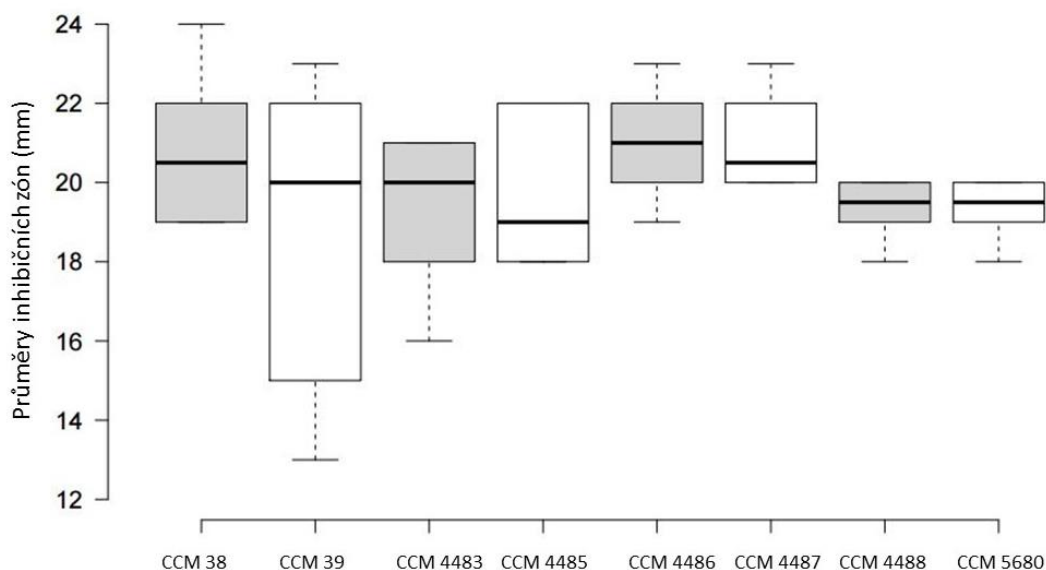
Obr. 11: Velikosti inhibičních zón u vodných extraktů řasy testované na všech sbírkových bakteriálních kmenech *P. larvae*. A – průměry inhibičních zón pro vodný extrakt autotrofní řasy. B – průměry inhibičních zón pro vodný extrakt autotrofní degradované řasy. C – průměry inhibičních zón pro vodný extrakt heterotrofní řasy (n = 6 pro každý kmen).

4.1.3 Difuzní testy acetonových extraktů řasy

Acetonové extrakty 593 a 871 jsem aplikovala po 10 μl (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) na povrch inokulovaného média metodou zalité kultury (viz kapitola 3.2.3), což odpovídalo množství 0,1 mg. Na rozdíl od vodných extraktů, kde se tvořily inhibiční zóny u všech tří extraktů, tak u acetonových extraktů vykazoval antimikrobiální účinek pouze extrakt 593. Acetonový extrakt 871 neprojevoval žádné inhibiční účinky vůči ani jednomu bakteriálnímu kmenu *P. larvae* (Obr. 12). Pouze docházelo k tvorbě nazelenalého kroužku v místě jeho aplikace, což nejspíš způsobilo samotné zbarvení tohoto extraktu. Inhibiční zóny extraktu 593 byly mnohem větší než u extraktů vodných. Velikost vytvořených inhibičních zón se pohybovala okolo 20 mm. Největší antimikrobiální účinek vykazoval extrakt 593 proti bakteriálním kmenům CCM 38, CCM 4486 a CCM 4487. U kmene CCM 38 měla inhibiční zóna velikost dokonce i 24 mm. Naopak nejvíce rezistentní se proti tomuto extraktu jevil kmen CCM 4484, kterému se vytvořily inhibiční zóny pouze u tří ze šesti testování. Z tohoto důvodu jsem jej musela vyřadit z vyhodnocování krabicovými grafy, kde nelze udělat graf pouze ze tří hodnot (Krzywinski a Altman, 2014).



Obr. 12: Inhibiční zóny acetonových extraktů aplikované na médium inokulované bakteriálním kmenem *P. larvae* CCM 39. Extrakty byly nanášeny po 10 μl , což odpovídá množství 0,1 mg (10 $\text{mg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). V prvním řádku je extrakt 593, ve druhém řádku je 871. V posledním řádku je aceton jako kontrola.



Obr. 13: Velikosti inhibičních zón u acetonového extraktu řasy 593 testovaný proti všem sbírkovým bakteriálním kmenům *P. larvae* (n = 6 pro každý kmen).

Na krabicovém grafu (Obr. 13) vidíme, že velikosti zón se mezi bakteriálními kmeny *P. larvae* statisticky příliš nelišily (one-way ANOVA, $df = 7$, $p = 0,457$). Díky získané hodnotě p víme, že platí nulová hypotéza (H_0), neboť hodnota p je větší než 0,05. Inhibiční zóny se tvořily v rozmezí 13 – 24 mm. Největší rozdíly ve velikosti inhibičních zón byly u kmene CCM 39, kde nejmenší průměr inhibiční zóny byl 13 mm a největší 23 mm. Naopak nejmenší rozdíly byly u kmenů CCM 4488 a CCM 5680.

Ibrahim *et al.* (2015) testovali kromě vodného extraktu řasy *Chlorella vulgaris* i antimikrobiální účinky ethanolového extraktu řasy proti G+ bakteriím. Výsledky byly opět podobné, neboť vytvořené inhibiční zóny dosahovaly menších rozměrů (6 – 11 mm) i přesto, že koncentrace použitého extraktu *Chlorella vulgaris* byly větší (100 – 500 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) než koncentrace extraktů *Chlorella sorokiniana* (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Byly testovány i antimikrobiální účinky acetonového, ethanolového a chloroformového extraktu řasy *Chlorella vulgaris* proti G+ i G- bakteriím. Jejich studiem se zabývali Shabudeen *et al.* (2016) a ve svém výzkumu prokázali, že vykazují inhibiční účinky. Koncentrace aplikovaných extraktů řasy byla však opět vyšší (100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a velikosti inhibičních zón byly menší v porovnání s inhibičními zónami acetonového extraktu řasy *Chlorella sorokiniana*.

Antimikrobiální účinky proti *P. larvae* vykazují i výtažky a esenciální oleje z některých rostlin. Gonzalez a Marioli (2010) testovali antimikrobiální aktivitu u celkem 10 rostlin a většina z nich vykazovala antimikrobiální účinky. Také esenciální oleje z bylinných rostlin, jako jen např. tymián, saturejka a oregano, kterými se zabývali Alippi *et al.* (1996), vykazují antimikrobiální účinky proti *P. larvae*.

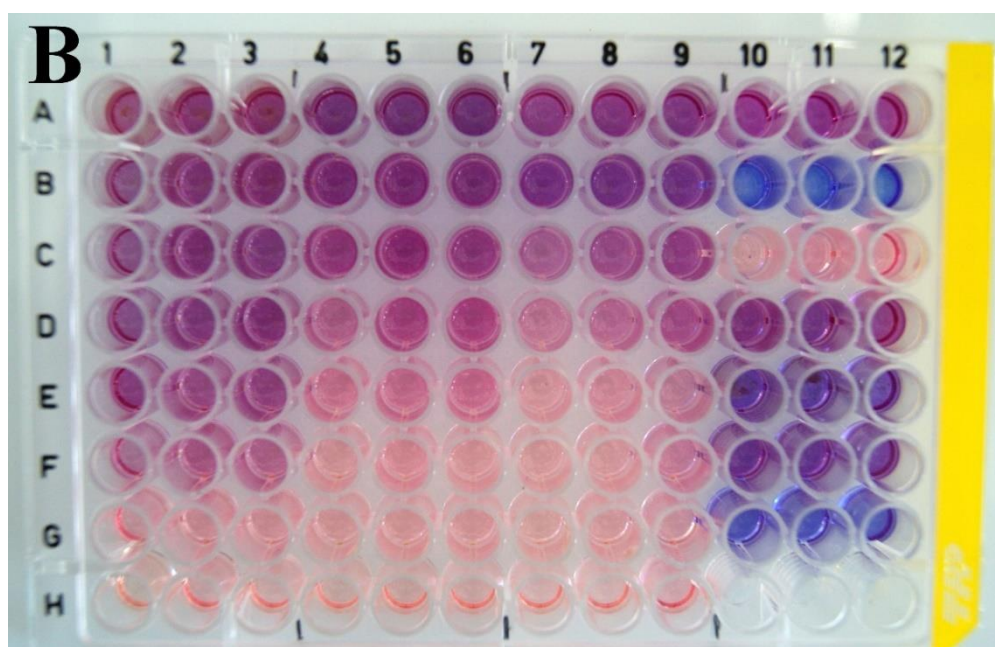
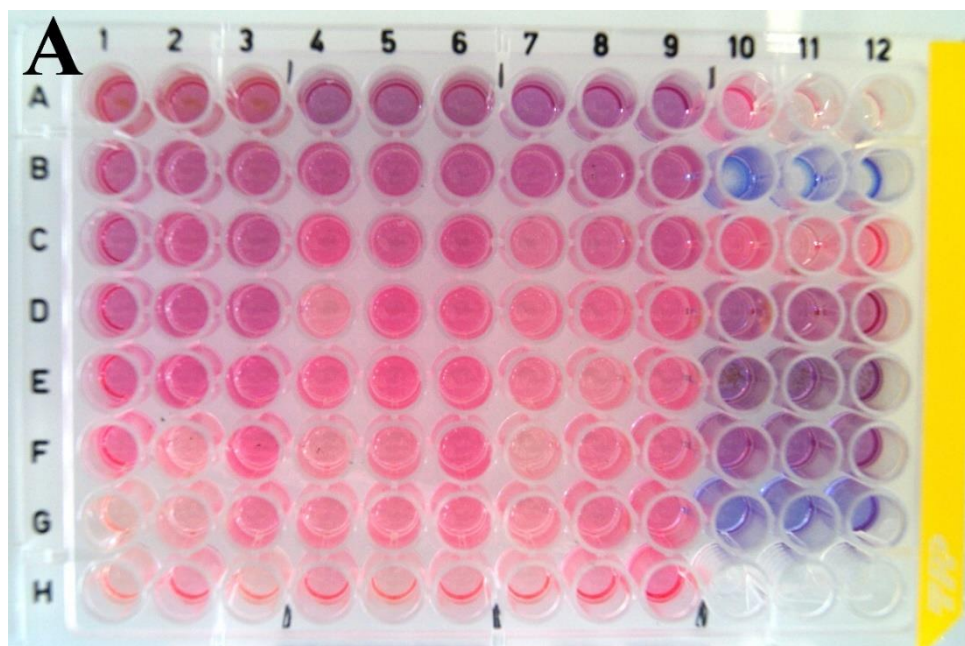
4.2 Stanovení MIC vodných extraktů řasy pro bakteriální kmeny *P. larvae*

MIC bakteriálních kmenů *P. larvae* jsem stanovovala pomocí 96-jamkové mikrotitrační destičky se všemi vodnými extrakty řasy (CA, CAD, CHM). První pokus o určení MIC pouze dle stupeň zákalu v jednotlivých jamkách (Votava *et al.*, 2010) s bakteriální suspenzí nebyl úspěšný. Proto jsem podle Damiani *et al.* (2014) pro další testování použila barvivo resazurin 0,01 % (w/v). Do každé jamky bylo přidáváno 10 μ l barviva, avšak určení MIC bylo i nadále obtížné, místo jasného fialového a růžového zbarvení bylo pozorováno tmavě růžové a světle růžové zbarvení (Obr. 14). Kvůli tomuto problému byla koncentrace resazurinu zvýšena na 0,3 mg.ml⁻¹. MIC byla stanovována z triplikátů všech vodných extraktů. Jako nejúčinnější vodný extrakt se jevil extrakt CA, který vykazoval nejsilnější antimikrobiální účinky (Tab. 9). MIC dosahovala u bakteriálních kmenů CCM 4484 a CCM 4486 pouze 0,039 mg.ml⁻¹. U dalších dvou vodných extraktů takto nízká MIC nebyla pozorována. Nejvíce rezistentní vůči tomuto extraktu byly pouze bakteriální kmeny CCM 39 a CCM 4483, které měly MIC 0,625 mg.ml⁻¹. Pro ostatní kmeny *P. larvae* byla MIC extraktu CA 0,156 mg.ml⁻¹ nebo 0,312 mg.ml⁻¹. Vodný extrakt CAD neměl tak silné inhibiční účinky jako extrakt CA (Tab. 9). Jeho nejnižší MIC byla 0,078 mg.ml⁻¹ u kmene CCM 4486, který se jevil jako nejcitlivější. Ostatní kmeny byly mnohem odolnější, u kmenů CCM 4483 a CCM 4488 byla stanovena MIC až 1,25 mg.ml⁻¹ a u kmenů CCM 39 a CCM 5680 dokonce až 2,5 mg.ml⁻¹. Extrakt heterotrofní řasy (CHM) měl antimikrobiální účinky nejslabší (Tab. 9). U většiny kmenů *P. larvae* byla stanovena MIC 2,5 mg.ml⁻¹ a pouze u dvou kmenů (CCM 4484 a CCM 4487) byla MIC 0,625 mg.ml⁻¹. Nejcitlivější byl vůči tomuto extraktu opět bakteriální kmen CCM 4486, u kterého byla stanovena MIC 0,156 mg.ml⁻¹.

Tab. 9: Průměrné hodnoty minimální inhibiční koncentrace vodných extraktů pro bakteriální kmeny *P. larvae* měřených pomocí resazurinu

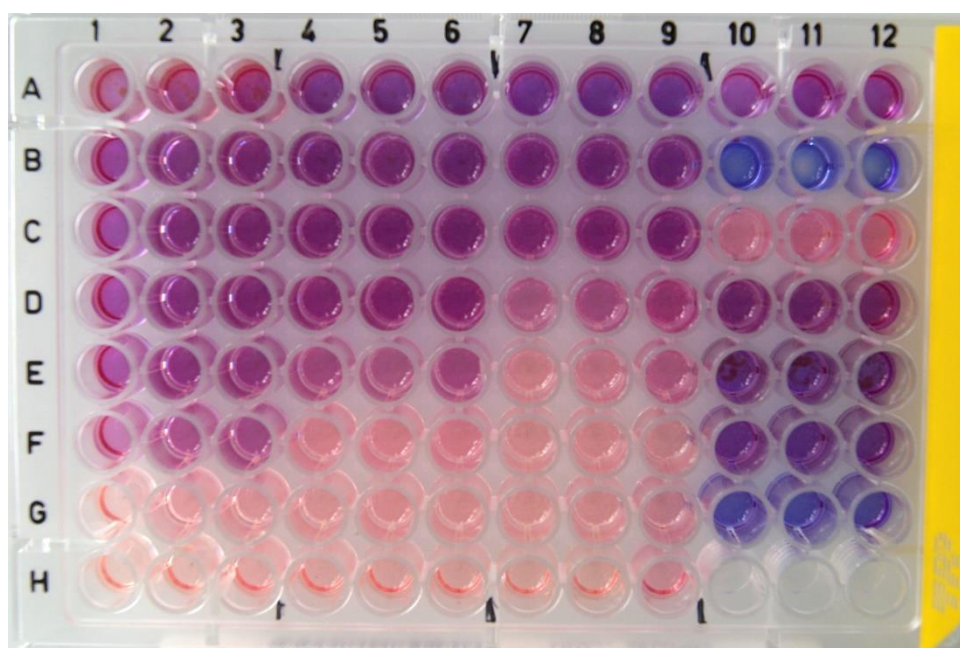
Označení kmene <i>P. larvae</i>	Vodné extrakty řasy		
	CA	CAD	CHM
	Koncentrace (mg.ml ⁻¹)		
CCM 38	0,156	0,625	1,25
CCM 39	0,625	2,5	2,5
CCM 4483	0,625	1,25	2,5
CCM 4484	0,039	0,156	0,625
CCM 4485	0,312	1,25	2,5
CCM 4486	0,039	0,078	0,156
CCM 4487	0,156	0,312	0,625
CCM 4488	0,156	1,25	2,5
CCM 5680	0,312	2,5	2,5

Jako kontrola bylo použito mj. antibiotikum TTC (200 μmol.l⁻¹), který by měl být natolik účinný, aby dokázal usmrtit bakteriální buňky. Jak však můžeme vidět na Obr. 14-A, k usmrcení bakterií nedošlo, bakteriální suspenze byla zbarvena do růžova. Tento roztok TTC jsem připravovala asi půl roku před tím, než byla MIC stanovována, což patrně způsobovalo jeho neúčinnost. Byl proto připraven čerstvý roztok, který vykazoval antimikrobiální účinky (Obr. 14-B).



Obr. 14: Porovnání zbarvení média s bakteriální suspenzí po přidavku resazurinu o koncentraci $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ a bakteriálního kmene CCM 39 (A) a resazurinu o koncentraci $0,3 \text{ mg.ml}^{-1}$ a bakteriálního kmene CCM 38 (B). Koncentrace extraktů v řadách: A – 5 mg.ml^{-1} , B – $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$, C – $1,25 \text{ mg.ml}^{-1}$, D – $0,625 \text{ mg.ml}^{-1}$, E – $0,312 \text{ mg.ml}^{-1}$, F – $0,156 \text{ mg.ml}^{-1}$, G – $0,078 \text{ mg.ml}^{-1}$, H – $0,039 \text{ mg.ml}^{-1}$. Sloupce 1 – 3: CA extrakt, sloupce 4 – 6: CAD extrakt, sloupce 7 – 9: CHM extrakt. 10 – 12A: TTC (100 μmol.l^{-1}), 10 – 12B: mrtvé buňky, 10 – 12C: živé buňky, 10 – 12D: MYPGP médium, 10 – 12E: suspenze mrtvých buněk + CA extrakt (10 mg.ml^{-1}), 10 – 12F: suspenze mrtvých buněk + CAD extrakt (10 mg.ml^{-1}), 10 – 12G: suspenze mrtvých buněk + CHM extrakt (10 mg.ml^{-1}).

MIC jsem stanovovala podle toho, k jaké barevné změně došlo. Změnil-li se původně modrý resazurin na fialový, tak bakteriální buňky byly usmrceny. Pokud došlo ke změně na růžový produkt, znamenalo to, že bakteriální buňky usmrceny nebyly. V poslední řadě v mikrotitrační destičce, kde byl resazurin fialový, jsem odečetla MIC. Na Obr. 15 vidíme výsledek z testování vodných extraktů řasy s bakteriálním kmenem CCM 4487. Pro CA extrakt jsem stanovila MIC v řádku F, která odpovídá $0,156 \text{ mg.ml}^{-1}$. U CAD extraktu vidíme poslední fialový řádek v řadě E, kde je koncentrace CAD extraktu $0,312 \text{ mg.ml}^{-1}$. Pro poslední extrakt CHM jste stanovila MIC $0,625 \text{ mg.ml}^{-1}$, tedy v řádku D.



Obr. 15: Stanovení MIC vodných extraktů s bakteriálním kmenem CCM 4487. Koncentrace extraktů v řadách: A – 5 mg.ml^{-1} , B – $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$, C – $1,25 \text{ mg.ml}^{-1}$, D – $0,625 \text{ mg.ml}^{-1}$, E – $0,312 \text{ mg.ml}^{-1}$, F – $0,156 \text{ mg.ml}^{-1}$, G – $0,078 \text{ mg.ml}^{-1}$, H – $0,0,39 \text{ mg.ml}^{-1}$. Sloupce 1 – 3: CA extrakt, sloupce 4 – 6: CAD extrakt, sloupce 7 – 9: CHM extrakt. 10 – 12A: TTC ($100 \mu\text{mol.l}^{-1}$), 10 – 12B: mrtvé buňky, 10 – 12C: živé buňky, 10 – 12D: MYPGP médium, 10 – 12E: suspenze mrtvých buněk + CA extrakt (10 mg.ml^{-1}), 10 – 12F: suspenze mrtvých buněk + CAD extrakt (10 mg.ml^{-1}), 10 – 12G: suspenze mrtvých buněk + CHM extrakt (10 mg.ml^{-1}).

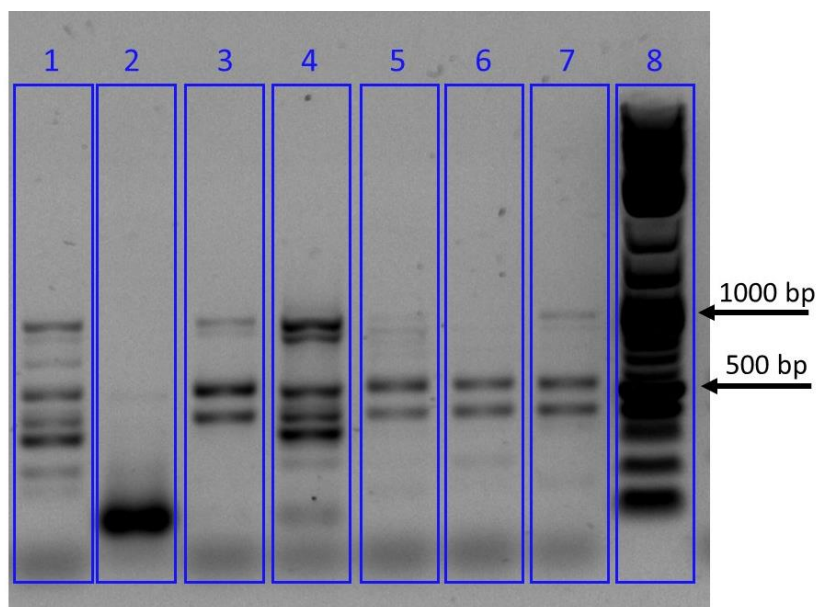
4.3 Klasifikace *P. larvae* podle genotypů ERIC I-IV

Podle protokolu de Graaf *et al.* (2013) jsem k izolaci DNA použila lyzační pufr InstaGene matrix, izolovanou DNA jsem pak zředila na koncentraci $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

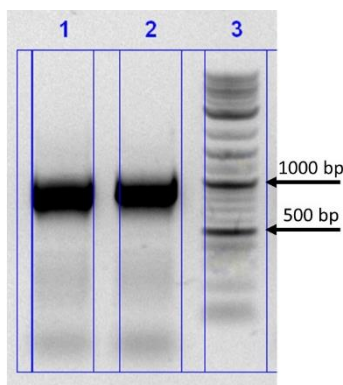
Před začátkem měření bylo nutné optimalizovat přidávané množství DNA do PCR směsi. Otestovala jsme celkem sedm různých objemů, resp. koncentrací DNA ($1 \mu\text{l}$; $1,5 \mu\text{l}$; $2 \mu\text{l}$; $2,5 \mu\text{l}$; $3 \mu\text{l}$; $3,5 \mu\text{l}$ a $4 \mu\text{l}$) které odpovídaly dané koncentraci $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Z výsledků (Obr. 16) jsem poté vybrala přidávání DNA po $1 \mu\text{l}$, kde se tvořilo nejvíce viditelných bandů. Dále bylo třeba optimalizovat koncentraci použitého markeru (BioLabs). Výrobci udávají koncentraci $1000 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, tato koncentrace byla však vysoká, neboť byly příliš výrazné a nerozdělené bandy. Po zředění na koncentraci $250 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ poskytoval marker bandy rozdělené a lépe čitelné.

4.3.1 Typizace bakteriálních kmenů *P. larvae*

K typizaci bakterie *P. larvae* jsem použila primery (Tab. 4) podle de Graaf *et al.* (2013), kteří dále uvádějí, že cílový produkt PCR pro bakterii *P. larvae* je tvořen 1106 páry bází (bp, base pair). Určila jsem, že referenční kmeny ERIC I a ERIC II patří mezi *P. larvae*, neboť u obou kmenů vznikly PCR produkty v dané velikosti (Obr. 17).



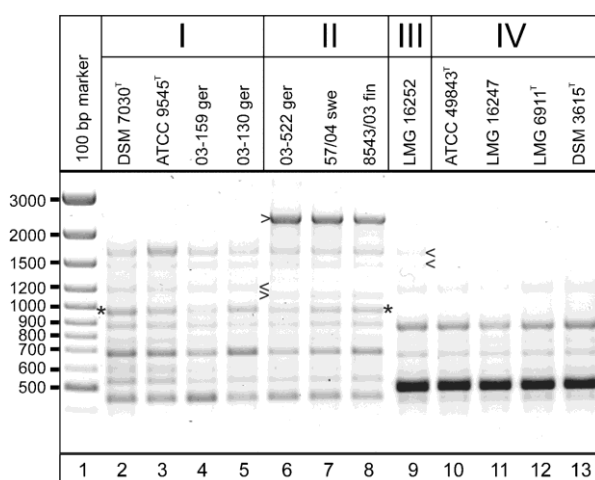
Obr. 16: Testování vhodné koncentrace DNA izolátu bakteriálního kmene CCM 39. 1: $1 \mu\text{l}$ DNA ($130 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$); 2: $1,5 \mu\text{l}$ DNA; 3: $2 \mu\text{l}$ DNA; 4: $2,5 \mu\text{l}$ DNA; 5: $3 \mu\text{l}$ DNA; 6: $3,5 \mu\text{l}$ DNA; 7: $4 \mu\text{l}$ DNA; 8: marker ($1000 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$).



Obr. 17: Rozlišení bakterie *P. larvae* pro ERIC I a ERIC II. 1: ERIC I (103 ng.ml⁻¹), 2: ERIC II (100 ng.ml⁻¹), 3: marker (250 µl.ml⁻¹).

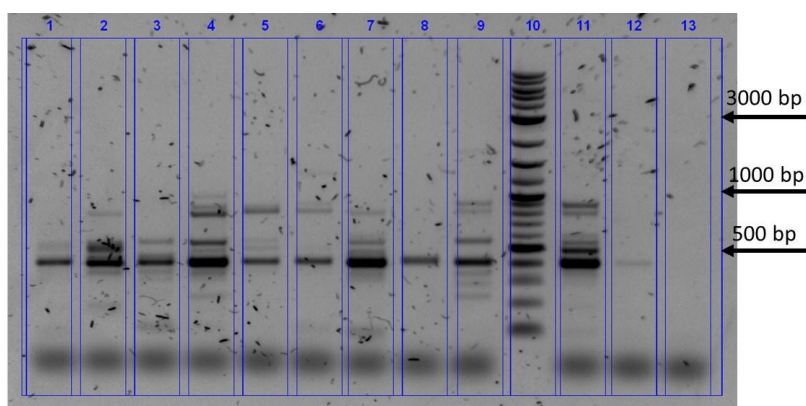
4.3.2 Klasifikace bakteriálních kmenů *P. larvae* do systému ERIC I-IV

Pro klasifikaci bakterií *P. larvae* do systému ERIC jsem použila primery (Tab. 1) navržené Versalovic *et al.* (1994). Produkty PCR byly separovány v 0,8% agarosovém gelu, podle typických bandů je možné jednotlivé genotypy rozlišit. Genersch *et al.* (2006) uvádějí, že pro ERIC I a ERIC II je typický band produkt o velikosti 970 bp. K rozlišení genotypu ERIC I a II slouží produkt o velikosti 2800 bp, který je právě charakteristický pro ERIC II a produkt o velikosti 1200 bp, který je naopak typický pro genotyp ERIC I. Genotyp ERIC III se vyznačuje dvěma bandy produktů o velikosti mezi 1500 – 2000 bp. Takto velké produkty se vykytují také u ERIC I a ERIC II, avšak u ERIC III není produkt o velikosti 970 bp charakteristický pro ERIC I a II (viz Obr. 18).



Obr. 18: Charakteristické velikosti PCR produktů znázorněné hvězdičkou nebo šipkou pro dané genotypy ERIC I-IV. 1: marker, 2 – 5: referenční bakteriální kmeny pro ERIC I, 6 – 8: referenční bakteriální kmeny pro ERIC II, 9: referenční bakteriální kmen pro ERIC III, 10 – 13: referenční bakteriální kmeny pro ERIC IV (převzato od Genersch *et al.*, 2006)

Kromě těchto rozdílů popisují Ashiralieva a Genersch (2006) i barevné rozdíly mezi genotypy. ERIC II a ERIC III se vyznačují oranžovým zbarvením bakteriálních kolonií, čímž se od zbylých dvou odlišují. ERIC I a ERIC IV mají spíše naředěné kolonie. Z testovaných kmenů měl jako jediný oranžové kolonie kmen CCM 38, proto je možné, že se jedná o ERIC II nebo ERIC III. Pravděpodobnější je však ERIC II, jehož výskyt je v Evropě velmi častý, na rozdíl od ERIC III (i ERIC IV), který byl izolován jen velmi zřídka (Genersch, 2010, Bassi *et al.*, 2015). Avšak prokázat se mi to nepodařilo a ani ostatní bakteriální kmeny jsem nemohla zařadit do jakého genotypu dle ERIC systému patří, neboť nejvýraznější bandy se pohybovali pouze okolo 400 bp a ani u jednoho kmene nebyly pozorovány bandy specifické pro daný genotyp ERIC (Obr. 19). Stejný výsledek jsem pozorovala i u testovaných referenčních kmenů – ERIC I a ERIC II. Zkusila jsem navýšit počet opakování 2 – 4 kroku (rozvolnění DNA – připojení primerů – syntéza DNA) z 34 na 50 cyklů jak uvádí Bassi *et al.* (2015). Při vyšším počtu cyklů, než je 30, se také zvyšuje riziko degradace polymerasy, což pravděpodobně nastalo v našem případě, a proto nebylo možné sbírkové kmeny *P. larvae* klasifikovat. Do reakční směsi PCR jsem přidávala GoTaq polymerasu Green Master Mix, zatímco Bassi *et al.* (2015) používali FastStart Taq DNA polymerasu (Roche), pomocí které dokázali přiřadit každý ze 117 testovaných bakteriálních kmenů *P. larvae* k určitému ERIC genotypu. Většinou se jednalo o nejrozšířenější genotyp ERIC I a pouhých 16 se řadilo mezi ERIC II. Nepodařilo se mi určit do jakého genotypu patří mé testované sbírkové kmeny *P. larvae*, proto bude potřeba nadále metodu optimalizovat a vyzkoušet případně jiný kit polymerasy.



Obr. 19: Rozlišení genotypů ERIC pro každý kmen *P. larvae*. 1: CCM 38 (122 ng.μl⁻¹), 2: CCM 39 (130 ng.μl⁻¹), 3: CCM 5680 (153 ng.μl⁻¹), 4: CCM 4483 (160 ng.μl⁻¹), 5: CCM 4484 (140 ng.μl⁻¹), 6: CCM 4485 (150 ng.μl⁻¹), 7: CCM 4486 (140 ng.μl⁻¹), 8: CCM 4487 (118 ng.μl⁻¹), 9: CCM 4488 (130 ng.μl⁻¹), 10: marker (250 μl.ml⁻¹), 11: ERIC I (101 ng.μl⁻¹), 12: ERIC II (80 ng.μl⁻¹), 13: PCR voda

5 ZÁVĚR

V teoretické části jsem vypracovala literární rešerši o imunitním systému včel se zaměřením na obranné mechanismy proti bakteriálním nákazám, dále pak o metodách a testování antimikrobiálních látek a také o možnostech praktického využití řasy *Chlorella sorokiniana*.

Předmětem mé praktické části bylo optimalizovat metodu pro stanovení antimikrobiální aktivity vodných a acetonových extraktů řasy *Chlorella sorokiniana* vůči různým sbírkovým kmenům *P. larvae*. Jako nejvhodnější se jevila metoda aplikace extraktů řasy přímo na médium, které bylo v případě vodných extraktů inokulované na povrchu a u acetonových extraktů byla bakteriální kultura do média zalita. Při aplikaci extraktů na difuzní disky nebo do uměle vytvořených jamek v médiu docházelo k slabé nebo žádné antimikrobiální aktivitě. Nejsilnější inhibiční účinky z vodných extraktů vykazoval CA extrakt, který tvořil v průměru největší inhibiční zóny v porovnání s CAD a CHM extraktem. U acetonových extraktů vykazoval antimikrobiální aktivitu pouze extrakt 593.

Dále jsem stanovovala pomocí 96-jamkové mikrotitrační destičky MIC vodných extraktů řasy se všemi testovanými bakteriálními kmeny *P. larvae*. Největší antimikrobiální aktivitu měl opět CA extrakt, jehož hodnoty MIC dosahovaly nižších hodnot než u extraktů CAD nebo CHM, čímž jsem si potvrdila výsledek z předchozího experimentu.

Posledním bodem bylo metodou PCR zařadit testované kmeny *P. larvae* do mezinárodního klasifikačního rámce genotypů ERIC I-IV. Metodu se však nepodařilo optimalizovat, proto jsem nebyla schopna dané bakteriální kmeny zařadit.

6 LITERATURA

- Alippi A. M., Ringuelet J. A., Cerimele E. L., Re M. S., Henning, C. P. (1996): Antimicrobial activity of some essential oils against paenibacillus larvae, the Causal Agent of American Foulbrood Disease. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* **4**, 9-16.
- Ashiralieva A., Genersch E. (2006): Reclassification, genotypes and virulence of Paenibacillus larvae, the etiological agent of American foulbrood in honeybees - a review. *Apidologie* **37**, 411-420.
- Atkinson A. W., Gunning B. E. S., John P. C. L. (1972): Sporopollenin in the cell wall of Chlorella and other algae: Ultrastructure, chemistry, and incorporation of ¹⁴C-acetate, studied in synchronous cultures. *Planta* **107**, 1-32.
- Baicha Z., Salar-Garcia M., Ortiz-Martinez V. M., Hernandez-Fernandez F., de los Rios A. P., Labjar N., Lotfi E., Elmahi M. (2016): A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells. *Fuel Processing Technology* **154**, 104-116.
- Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S. K. (2016): Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **6**, 71-79.
- Bamrick J. F., Rothenbuhler W. C. (1961): Resistance to American foulbrood in honey bees. IV. The relationship between larval age at inoculation and mortality in a resistant and in a susceptible line. *Journal of Insect Pathology* **3**, 381-390.
- Barker R. J. (1977): Are algae toxic to honey bees? *Journal of the Arizona Academy of Science* **12**, 84-85.
- Bassi S., Formato G., Milito M., Trevisiol K., Salogni C., Carra E. (2015): Phenotypic characterization and ERIC-PCR based genotyping of Paenibacillus larvae isolates recovered from American foulbrood outbreaks in honey bees from Italy. *Veterinary Quarterly* **35**, 27-32.
- Bastos E., Simone M., Jorge D. M., Soares A. E. E., Spivak M. (2008): In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against Paenibacillus larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* **97**, 273-281.
- Bilikova K., Popova M., Trusheva B., Bankova V. (2013): New anti-Paenibacillus larvae substances purified from propolis. *Apidologie* **44**, 278-285.
- Bock C., Krienitz L., Proschold T. (2011): Taxonomic reassessment of the genus Chlorella (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea* **11**, 293-312.
- Boman H. G., Hultmark D. (1987): Cell-free immunity in insects. *Annual Review of Microbiology* **41**, 103-126.
- Brennan L., Owende P. (2010): Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and CO-products. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* **14**, 557-577.
- Bulet P., Hetru C., Dimarcq J. L., Hoffmann D. (1999): Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology* **23**, 329-344.
- Bulková V. (2011): *Rostlinné potraviny*. 1st ed., Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno, Česká republika, 162 stran.
- Buttstedt A., Moritz R. F., Erler S. (2013): More than royal food - Major royal jelly protein genes in sexuals and workers of the honeybee Apis mellifera. *Frontiers in Zoology* **10**, 72.
- Damiani N., Fernandez N. J., Porrini M. P., Gende L. B., Alvarez E., Buffa F., Brasesco C., Maggi M. D., Marcangeli J. A., Eguaras M. J. (2014): Laurel leaf extracts for honeybee pest and disease management: antimicrobial, microsporidicidal, and acaricidal activity. *Parasitology Research* **113**, 701-709.
- de Graaf D. C., Alippi A. M., Antunez K., Aronstein K. A., Budge G., de Koker D., de Smet L., Dingman D. W., Evans J. D., Foster L. J., Funfhaus A., Garcia-Gonzalez E., Gregorc A., Human H., Murray K. D., Nguyen B. K., Poppinga L., Spivak M., Vanengelsdorp D., Wilkins S., Genersch E. (2013): Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research* **52**, 1-28.

- Eguaras M. J., Fuselli S., Gende L., Fritz R., Ruffinengo S. R., Clemente G., Gonzalez A., Bailac P. N., Ponzi M. I. (2005): An in vitro evaluation of *Tagetes minuta* essential oil for the control of the honeybee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the parasitic mite *Varroa destructor*. *Journal of Essential Oil Research* **17**, 336-340.
- Eremia N., Bahcivanji M., Zagareanu A. (2013): Study of influence of algal "*Chlorella Vulgaris*" suspension on growth and productivity of bees families. *Lucrari Stiintifice-Seria Zootehnie* **59**, 148-152.
- Flesar J., Havlik J., Kloucek P., Rada V., Titera D., Bednar M., Stropnický M., Kokoska L. (2010): In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus larvae* and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Veterinary Microbiology* **145**, 129-133.
- Forsgren E. (2010): European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, 5-9.
- Forsgren E., Budge G. E., Charriere J. D., Hornitzky M. A. Z. (2013): Standard methods for European foulbrood research. *Journal of Apicultural Research* **52**.
- Genersch E. (2008): *Paenibacillus larvae* and American Foulbrood - long since known and still surprising. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety* **3**, 429-434.
- Genersch E. (2010): American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, 10-19.
- Genersch E., Ashiralieva A., Fries I. (2005): Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 7551-7555.
- Genersch E., Forsgren E., Pentikainen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J., Fries I. (2006): Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 501-511.
- Glinski Z., Jarosz J. (1993): Further evidence for cell-free immunity in the honeybee, *Apis mellifera*. *Apiacta* **28**, 69-78.
- González-Santoyo I., Córdoba-Aguilar A. (2012): Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **142**, 1-16.
- Gonzalez M. J., Marioli J. M. (2010): Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology* **104**, 209-213.
- Guedes A. C., Barbosa C. R., Amaro H. M., Pereira C. I., Malcata F. X. (2011): Microalgal and cyanobacterial cell extracts for use as natural antibacterial additives against food pathogens. *International Journal of Food Science and Technology* **46**, 862-870.
- Gupta A. P. (2001). Immunology of Invertebrates: Humoral. *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Hořejší V., Bartůňková J. (2005). *Základy imunologie*. 3rd ed., Triton, Praha, Česká republika, 280 stran.
- Hultmark D. (1993): Immune-reactions in drosophila and other insects - a model for innate immunity. *Trends in Genetics* **9**, 178-183.
- Huss V. A. R., Frank C., Hartmann E. C., Hirmer M., Kloboucek A., Seidel B. M., Wenzeler P., Kessler E. (1999): Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *Journal of Phycology* **35**, 587-598.
- Chisti Y. (2008): Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology* **26**, 126-131.
- Chollet R., Ribault S. (2012): *Use of ATP Bioluminescence for Rapid Detection and Enumeration of Contaminants: The Milliflex Rapid Microbiology Detection and Enumeration System*. In: *Bioluminescence - Recent Advances in Oceanic Measurements and Laboratory Applications*. (Lapota D. ed.), InTech, Croatia, 99-118.
- Choma I. M., Grzelak E. M. (2011): Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A* **1218**, 2684-2691.

- Ibrahim K., Ramli R., Rashid A., Halim A., Yusof M., Anum Y. (2015): Antimicrobial Property of Water and Ethanol Extract *Chlorella vulgaris*: A Value-Added Advantage for a New Wound Dressing Material. *International Medical Journal* **22**, 399-401.
- Isidorov V. A., Buczek K., Zambrowski G., Miastkowski K., Swiecicka I. (2017): In vitro study of the antimicrobial activity of European propolis against *Paenibacillus* larvae. *Apidologie* **48**, 411-422.
- Isidorov V. A., Szczepaniak L., Bakier S. (2014): Rapid GC/MS determination of botanical precursors of Eurasian propolis. *Food Chemistry* **142**, 101-106.
- Jorgensen J. H., Ferraro M. J. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* **49**, 1749-1755.
- Juarez A. B., Velez C. G., Iniguez A. R., Martinez D. E., Rodriguez M. C., Vigna M. S., de Molina M. D. R. (2011): A *Parachlorella kessleri* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) strain from an extremely acidic geothermal pond in Argentina. *Phycologia* **50**, 413-421.
- Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze: <http://botany.natur.cuni.cz/algo/database/node/104> (29. 4. 2017).
- Krienitz L., Hegewald E. H., Hepperle D., Huss V. A. R., Rohrs T., Wolf M. (2004): Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia* **43**, 529-542.
- Krzywinski M., Altman N. (2014): Visualizing samples with box plots. *Nature Methods* **11**, 119-120.
- Kujungiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R., Popov S. (1999): Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* **64**, 235-240.
- Lampeitl F. (1995). *Chováme včely: Úvod do včelaření*, 1st ed., BLESK, Ostrava, Česká republika, 173 stran.
- Laughton A. M., Boots M., Siva-Jothy M. T. (2011): The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology* **57**, 1023-1032.
- Lavine M. D., Strand M. R. (2002): Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**, 1295-1309.
- Lee H. J., Churey J. J., Worobo R. W. (2008): Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *International Journal of Food Microbiology* **126**, 240-244.
- Lee H., Churey J. J., Worobo R. W. (2009): Isolation and characterization of a protective bacterial culture isolated from honey active against American Foulbrood disease. *Fems Microbiology Letters* **296**, 39-44.
- Li Y. M., Xiang Q., Zhang Q. H., Huang Y. D., Su Z. J. (2012): Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* **37**, 207-215.
- Loncaric I., Derakhshifar I., Oberlerchner J. T., Koglbberger H., Moosbeckhofer R. (2009): Genetic diversity among isolates of *Paenibacillus* larvae from Austria. *Journal of Invertebrate Pathology* **100**, 44-46.
- Mariscal A., Lopez-Gigosos R. M., Carnero-Varo M., Fernandez-Crehuet J. (2009): Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology* **82**, 773-783.
- Merchant R. E., Cynthia A. (2001): Dietary Supplementation with *Chlorella pyrenoidosa* produces positive results in patients with cancer or suffering from certain common chronic illnesses. *Townsend Letter for Doctors and Patients* **211-212**, 74-80.
- Mihai C. M., Marghitas L. A., Dezmiorean D. S., Chirila F., Moritz R. F. A., Schluns H. (2012): Interactions among flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* **110**, 68-72.
- Miyagi T., Peng C. Y. S., Chuang R. Y., Mussen E. C., Spivak M. S., Doi, R. H. (2000): Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus* larvae in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* **75**, 95-96.
- Molan P. C. (1992a): The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* **73**, 5-28.

- Molan, P. C. 1992b. The antibacterial activity of honey: 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World* **73**, 59-76.
- Nakano S., Takekoshi H., Nakano M. (2010): Chlorella pyrenoidosa Supplementation Reduces the Risk of Anemia, Proteinuria and Edema in Pregnant Women. *Plant Foods for Human Nutrition* **65**, 25-30.
- Neubauerová T., Macková M., Koutek B. (2009): Kationické antimikrobiální peptidy. *Chemické listy* **103**, 460-468.
- Neustupa J., Němcová Y., Eliáš M., Škaloud P. (2009): Kalinella bambusicola gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid Chlorella-like subaerial alga from Southeast Asia. *Phycological Research* **57**, 159-169.
- Northcote D. H., Goulding K. J., Horne R. W. (1958): The chemical composition and structure of the cell wall of Chlorella pyrenoidosa. *Biochemical Journal* **70**, 391-397.
- Otvos L. (2000): Antibacterial peptides isolated from insects. *Journal of Peptide Science* **6**, 497-511.
- Pentikainen J., Kalliainen E., Pelkonen S. (2009): Molecular epidemiology of Paenibacillus larvae infection in Finland. *Apidologie* **40**, 73-81.
- Popova M. P., Bankova V. S., Bogdanov S., Tsvetkova I., Naydenski C., Marcuzzan G. L., Sabatini A. G. (2007): Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie* **38**, 306-311.
- Proschold T., Bock C., Luo W., Krienitz L. (2010): Polyphyletic distribution of bristle formation in Chlorellaceae: Micractinium, Diacanthos, Didymogenes and Hegewaldia gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycological Research* **58**, 1-8.
- Rathouský V. (2008): *Chlorella pyrenoidosa: učebnice zelených potravin*. 1st ed., Green Ways, Staré Město, Česká republika, 108 stran.
- Roussel M., Villay A., Delbac F., Michaud P., Laroche C., Roriza D., El Alaoui H., Diogon M. (2015): Antimicrosporidian activity of sulphated polysaccharides from algae and their potential to control honeybee nosemosis. *Carbohydrate Polymers* **133**, 213-220.
- Shabudeen S., Ashok A., Indhumathi P. (2016): The Uses of Chlorella Vulgaris as Antimicrobial Agent and as a Diet: the Presence of Bio-active Compounds which caters the Vitamins, Minerals in General. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology* **7**, 186-190.
- Schafer M. O., Genersch E., Funfhaus A., Poppinga L., Formella N., Bettin B., Karger A. (2014): Rapid identification of differentially virulent genotypes of Paenibacillus larvae, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Veterinary Microbiology* **170**, 291-297.
- Singh S. P., Singh P. (2014): Effect of CO2 concentration on algal growth: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* **38**, 172-179.
- Soderhall K., Cerenius L. (1998): Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* **10**, 23-28.
- Standifer L. N., Moeller F. E., Kauffeld N. M., Herbert E. W., Jr. and H. Shimanuki (1978): Supplemental Feeding of Honey Bee Colonies, *Department of Agriculture, Science and Education Administration*. No. 413, 8pp.
- Tang G., Suter P. M. (2011): Vitamin A, nutrition, and health values of algae: Spirulina, Chlorella, and Dunaliella. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences* **1**, 111-118.
- Turner R. J. (1994). *Immunology: A Comparative Approach*. 1st ed., Wiley, New York, USA, 222 stran.
- Van Herreweghe J. M., Michiels C. W. (2012): Invertebrate lysozymes: Diversity and distribution, molecular mechanism and in vivo function. *Journal of Biosciences* **37**, 327-348.
- Vaz B. D., Moreira J. B., de Moraes M. G., Costa J. A. V. (2016): Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Current Opinion in Food Science* **7**, 73-77.
- Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F. J., Lipski J. R. (1994): Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* **5**, 25-40.
- Veselý V., Bacílek J., Čermák K., Drobníková V., Haragsim O., Kamler F., Krieg P., Kubišová S., Peroutka M., Ptáček V., Škrobal D., Titěra D. (2003): *Včelařství*. 2nd ed., Brázda, Praha, Česká republika, 289 stran.

- Vezeteu T. V., Bobis O., Moritz R. F., Buttstedt A. (2016): Food to some, poison to others- honeybee royal jelly and its growth inhibiting effect on European Foulbrood bacteria. *MicrobiologyOpen* **6**, 1-7.
- Vilmos P., Kurucz E. (1998): Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters* **62**, 59-66.
- Votava M., Růžička F., Woznicová V., Černohorská L., Dvořáčková M., Dvořáková Heroldová M., Holá V., Zahradníček O. (2010): *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Neptun, Brno, Česká republika, 495 stran.
- Malpositioned and discoloured larvae in brood with symptoms of European foulbrood.
- Wu M. H., Sugimura Y., Iwata K., Takaya N., Takamatsu D., Kobayashi M., Taylor D., Kimura K., Yoshiyama M. (2014): Inhibitory effect of gut bacteria from the Japanese honey bee, *Apis cerana japonica*, against *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood disease. *Journal of Insect Science* **14**.
- Yamamoto M., Kurihara I., Kawano S. (2005): Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta* **221**, 766-775.
- Yi H. Y., Chowdhury M., Huang Y. D., Yu X. Q. (2014): Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**, 5807-5822.
- Yu H. F., Jia S. R., Dai Y. J. (2009): Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. *Journal of Applied Phycology* **21**, 127-133.
- Zhang X., Zhu Y. T., Li X. J., Wang S. C., Li D., Li W. W., Wang Q. (2016): Lipopolysaccharide and beta-1, 3-glucan binding protein (LGBP) stimulates prophenoloxidase activating system in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Developmental and Comparative Immunology* **61**, 70-79.
- Zumla A., Lulat A. (1989): Honey - a remedy rediscovered. *Journal of the Royal Society of Medicine* **82**, 384-385.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFB	American foulbrood (mor včelího plodu)
AmP	antimikrobiální peptidy
CA	autotrofní řasa
CAD	autotrofní degradovaná řasa
CGF	Chlorella growth factor
EFB	European foulbrood (hniloba včelího plodu)
ERIC	enterobacterial repetitive intergenic consensus
G-	gram-negativní
G+	gram-pozitivní
CHM	heterotrofní řasa
KTJ	kolonii tvořící jednotka
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MJRP	major royal jelly protein
OD	optical density (optická hustota)
PC	papírová chromatografie
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PO	fenoloxidasa
proPO	profenoloxidasa
RLU	relativní světelná jednotka
TAE	Tris-acetát-EDTA pufr
TTC	tetracyklin