Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra biologických disciplín

Diplomová práce

Vliv vybraných emulgátorů na stabilitu krmných emulzí ve včelařství a jejich vliv na včelu medonosnou

Autorka práce: Bc. Ilona Matiášková

Vedoucí práce: Ing. Hýbl Marian, Ph.D.

České Budějovice

2025

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích dne 31. 3. 2025 .....

Podpis

Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo otestovat vybrané emulgátory a metody emulzifikace z hlediska jejich vlivu na stabilitu krmných emulzí určených pro včely medonosné (*Apis mellifera*) a ověřit případný vliv těchto emulzí na zdraví včel. Vzhledem k omezenému množství dostupných dat o použití emulgátorů ve včelařství byly testovány různé koncentrace několika typů emulgátorů v kombinaci s lipidovými bázemi a různými technologickými postupy emulzifikace (protřepání, vortexování, homogenizace). Stabilnější emulze byly následně podrobeny testům na živých včelách v rámci klíckových pokusů. V těchto experimentech byla hodnocena mortalita včel a spotřeba krmiva po dobu 14 až 21 dní. Výsledky ukazují, že typ emulgátoru i způsob emulzifikace významně ovlivňují stabilitu emulzí. Zároveň bylo zjištěno, že některé emulze lze aplikovat bez negativního dopadu na zdraví včel. Práce přináší nové poznatky využitelné při vývoji doplňkových krmných směsí ve včelařství.

Klíčová slova: včela medonosná, emulgátor, krmná emulze, stabilita, esenciální oleje, toxicita

Abstract

The aim of this thesis was to evaluate selected emulsifiers and emulsification methods in terms of their effect on the stability of feeding emulsions designed for the Western honey bee (*Apis mellifera*), and to assess their potential impact on bee health. Due to the limited data on the use of emulsifiers in beekeeping, various concentrations of selected emulsifiers were tested in combination with lipid bases and different emulsification techniques (shaking, vortexing, high-speed homogenization). The most stable emulsions were subsequently tested on live bees in cage experiments, where feed consumption and bee mortality were monitored over 14 to 21 days. The results show that both the type of emulsifier and the emulsification method significantly influence emulsion stability. Moreover, some emulsions were shown to be safe for bees. The study provides new insights for the development of supplementary feeding strategies in beekeeping.

Keywords: honey bee, emulsifier, feeding emulsion, stability, essential oils, toxicity

Obsah

Úvod 7

1. Význam včel 8

2. Kastovní systém 9

3. Vývoj včely 11

4. Morfologie 12

4.1. Hlava *Caput* 12

4.2. Hruď *Thorax* 12

4.3. Zadeček *Abdomen* 12

5. Trávicí soustava 14

6. Trofalaxe 16

7. Potrava 17

8. Zdroje potravy 19

9. Onemocnění včel 21

10. Stav včelaření v České republice 23

11. Esenciální oleje 25

11.1. Tymián 26

11.2. Thymol 26

11.3. Skořice kůra 27

11.4. Hřebíček 27

12. Emulgátory 28

12.1. Sucragel AP V2, Sucrablend SP V2 28

12.2. Emulmetik 100 J 28

12.3. Ethanol 28

12.4. MMB 29

12.5. Dermosoft GMCY MB 29

12.6. Dermofeel SL 29

12.7. Emulium mellifera MB 29

12.8. Tegin 4100 Pellets MB 29

12.9. Stearin 29

12.10. Natpure Sol SL 30

Praktická část 31

13. Příprava vzorků 31

13.1. Příprava cukerného roztoku ... 32
13.2. Příprava emulzí pro screening ... 32
14. Způsoby emulgace ... 34
15. Koncentrace emulgátoru ... 35
16. Testování různých esenciálních olejů ... 37
17. Ověření stability emulzí ... 38
18. Dlouhodobé pozorování připravených vzorků ... 39
19. Testování emulzí na včelách ... 40
20. Výsledky a diskuze ... 45
20.1. Screening emulzí ... 45
20.2. Způsoby emulgace ... 47
20.2.1. Sucragel AP V2 ... 47
20.2.2. Sucragel AP V2 a Sucrablend SP V2 ... 48
20.2.3. Natpure Sol SL ... 49
20.3. Koncentrace emulgátorů ... 51
20.3.1. Sucragel AP V2 ... 51
20.3.2. Sucragel AP V2 a Sucrablend SP V2 ... 53
20.3.3. Natpure Sol SL ... 55
20.4. Test různých esenciálních olejů ... 59
20.4.1. Esenciální olej skořice kůra ... 59
20.4.2. Esenciální olej z hřebíčku ... 62
20.5. Testování toxicity emulzí na včelách ... 67
20.6. Analýza dat ... 73
Závěr ... 75
Seznam použité literatury ... 77
Seznam obrázků ... 90
Seznam tabulek ... 92
Seznam grafů ... 93

Poděkování

Touto cestou děkuji vedoucímu mé diplomové práce, Ing. Marianu Hýblovi, Ph.D., za jeho odborné vedení, cenné rady a podporu během celé práce.

Mé poděkování patří také rodině a přátelům za jejich trpělivost, podporu a motivaci během celého studia.

Úvod

Včely patří mezi nejstarší druhy hmyzu s vysoce organizovaným sociálním způsobem života. Předpokládá se, že se vyvinuly z dravých vos v období, kdy se na Zemi začaly rozšiřovat kvetoucí rostliny, tedy přibližně před 100 miliony let. Evoluce včel probíhala v těsné návaznosti na vývoj krytosemenných rostlin, přičemž změna potravních zdrojů směrem k pylu a nektaru vedla k morfologickým i behaviorálním adaptacím umožňujícím efektivní opylování.

Včela medonosná *Apis mellifera* je taxonomicky řazena do říše Animalia, kmene Arthropoda, třídy Insecta a řádu Hymenoptera. V rámci řádu Hymenoptera je součástí podřádu Apocrita a nadčeledi Apoidea, čeledi Apidae a rodu *Apis*. Kromě toho se včely dělí na různé druhy a poddruhy na základě jejich fyzických vlastností, chování a preferencí stanovišť. V současnosti je popsáno kolem 20 000 druhů včel v rámci 7 různých čeledí na základě morfologických a morfometrických znaků. Taxonomické zařazení se neustále vyvíjí a průběžně se upravuje s ohledem na nové poznatky a objevy.

Apis mellifera patří k hospodářsky nejvýznamnějších zástupcům blanokřídlých. Tento druh sociálního hmyzu je rozšířen v širokém areálu s různými klimatickými podmínkami. V současnosti se uvádí existence přibližně 30 poddruhů, které lze rozdělit do několika hlavních evolučních skupin. Mezi jednotlivými poddruhy však dochází k neustálému toku genů v důsledku absence přirozených izolačních mechanismů, a dochází tak ke změnám v charakteristice poddruhů a jejich klasifikace musí být aktualizovány na základě genetických a morfologických údajů.

Za původní areál výskytu včely medonosné je považována oblast Blízkého východu. Historické prameny dokládají, že se včelařství na Arabském poloostrově rozvíjelo už ve 2. tisíciletí před naším letopočtem.

Nejčastěji chovanou včelou v našich středoevropských podmínkách je včela medonosná kraňská *Apis mellifera carnica*, která byla poprvé popsána v roce 1879 Augustem Pollmannem.

1. Význam včel

Včely hrají v našem ekosystému zásadní význam, a to především tím, že se jedná o klíčové opylovače značné části hospodářsky významných plodin. Bez včel by se mnoho rostlin nemohlo rozmnožovat a ztráta tohoto opylovače by mohla mít ničivé dopady na produkci potravin a též na biologickou rozmanitost. Včely medonosné produkují med, propolis, včelí vosk a další cenné produkty, které se používají v různých průmyslových odvětvích, jako je farmaceutický či kosmetický průmysl. Dlouholetý mutualistický vztah mezi včelami a lidmi je dnes ohrožen nedávným poklesem včelích populací. Zejména v Evropě a Severní Americe byl pozorován za uplynulých 50 let úbytek jak obhospodařovaných včelstev včely medonosné, tak úbytek volně žijících včelích opylovačů (Goulson et al., 2015). Úbytek populací včely medonosné v důsledku faktorů, jako je ztráta či úbytek stanovišť, změna ve využívání půdy, používání pesticidů, šíření parazitů a onemocnění, konkurence druhů, dostupnost zdrojů potravy a v neposlední řadě změna klimatu, zdůrazňuje potřebu chránit a zachovat tyto životně důležité opylovače pro zdraví přírodních i zemědělských systémů (Goulson et al., 2015).

2. Kastovní systém

Včelstvo je díky své komplexnosti a struktuře často vnímáno jako nedělitelný celek, jako integrovaný živý organismus, který je často označován i jako superorganismus. V závislosti na ročním období se v úlu nachází 20 až 40 000 včel (Page a Peng, 2001). Vzhledem k velkému počtu dělnic dokáže včelstvo během krátké doby za 20 až 30 dní nasbírat dostatek potravy na další rok. Velké množství včel žijících ve společenství též zajišťuje vhodné prostředí a teplo v chladných zimních dnech v úlech. Složitou strukturu sociální hierarchie vytváří kastovní systém.

Kolonie včely medonosné se skládají ze 3 kast, které mají odlišnou morfologii, fyziologii a chování, které koreluje s jejich rolemi ve společnosti. První kastou jsou samci, takzvaní trubci, samičí kasty jsou tvořeny dělnicemi a matkou.

Včelí matka je za normálních okolností jedinou reprodukční samicí ve včelstvu. Matka po oplodnění klade vajíčka a také hraje významnou roli při kontrole fyziologie a chování dělnic (Verheijen-Voogd, 1959). Její hlava a hrudník jsou podobné velikosti jako u dělnice, tělo je však delší a větší. Matka má také žihadlo, ale háčky na jeho povrchu jsou redukované. Z toho důvodu nedojde k jeho vytržení v případě použití a matka nezemře.

Včely dělnice jsou nereproduktivní samice odpovědné za všechny úkoly související s údržbou kolonie. Jejich úkolem je čistit úl, starat se o potomstvo, shánět potravu, živit dělnice, trubce a matku, produkovat vosk, budovat buňky v plástech (Winston, 1987). Fyzicky se jedná o nejmenší ze tří kast. Těla dělnic jsou specializovaná na sběr pylu a nektaru. Včely dělnice mají žihadlo opatřeno háčky. Při jeho použití dojde k vytržení neboli autotomii a nastává smrt jedince.

Samci sociálních blanokřídlých v dělbě práce zpravidla nehrají hlavní roli. Jejich hlavním úkolem je produkovat spermie a pářit se s matkou (Hrassnigg a Crailsheim, 2005). Páření s matkou probíhá ve vzduchu, kde dochází ke kompetici s dalšími trubci. V souladu s tím trubci vykazují anatomické a fyziologické adaptace pro výdrž při létání (Radloff, Hepburn a Koeniger, 2003). Trubce lze odlišit od včelích samic podle jejich větší velikosti, větších očí a chybějícího žihadla. Po úspěšném páření je splněna jejich reprodukční funkce a následně hynou.

Vzhledem k velkému počtu jednotlivých členů včelstva a těsnému kontaktu mezi nimi může docházet k šíření nemocí a parazitů, což je důsledkem přítomnosti mnoha jedinců na malém prostoru. Včelí kolonie jsou velmi citlivé na nákazy jako jsou viry, bakterie nebo parazité. Složité sociální interakce a sdílení potravy mezi včelami usnadňují přenos patogenů mezi jednotlivými členy. Například včely dělnice se při své práci často dostávají do kontaktu s larvami a vajíčky, což může vést k rychlému šíření infekce uvnitř kolonie. Také těsná spolupráce a vzájemná péče o potomstvo poskytují příležitosti pro šíření patogenů, protože včely sdílejí různé úkoly, které mohou zahrnovat kontakt s infikovanými oblastmi úlu. Toto může vést k masovému šíření nemocí mezi včelami a následnému oslabování celé kolonie (Schmid-Hempel, 1995; Fries a Camazine, 2001).

3. Vývoj včely

Všechny včely podstupují během svého vývoje úplnou metamorfózu, jedná se tedy o holometabolní hmyz, který prochází dokonalou proměnou. Během celého procesu jedinec absolvuje všechna stádia vývoje od vajíčka přes larvu, kuklu až po dospělce. Typická doba vývoje od vajíčka po dospělce se liší podle kasty. Nejdelší vývoj trvající 24 dní mají trubci, dělnice se vyvíjí 21 dní a matky s nejkratší dobou vývoje pouhých 15 až 16 dní (Butler, 1975).

Během období vrcholné snůšky produkuje matka 1 500 a více vajíček za den (Snodgrass, 1956). Vajíčka klade do jednotlivých šestihranných voskových buněk v plodišti. Stejně jako všichni blanokřídlí mají i včely medonosné haplodiploidní určení pohlaví. Z neoplozených vajíček se vyvíjejí haploidní trubci, z oplozených vajíček diploidní samičky. Po 3 dnech se z vajíček vylíhnou larvy.

U eusociálních včel existuje nutriční určení kast. Ze samičích larev, které jsou krmeny standardní stravou tvořenou pylem a nektarem, se stávají dospělé dělnice. Ze samičích larev, které jsou krmeny bohatou stravou tvořenou mateří kašičkou, se vyvinou matky. Vývoj larev trvá 5 až 6 dní (Page a Peng, 2001). Následně jsou larvy překryty v plodišti voskovým víčkem a mění se v kukly. V závislosti na kastě v tomto stádiu setrvávají 7 až 12 dní (Winston, 1987). Po prokousání voskového víčka se z nich stávají již plně vyvinutí dospělci, jejichž tělo je tvořeno 3 hlavními segmenty – hlava (*caput*), hruď (*thorax*), zadeček (*abdomen*).

4. Morfologie

Včela medonosná byla vždy objektem zájmu vědeckého bádání, z tohoto důvodu je její morfologie velmi dobře popsána. Morfologie je dokladem pozoruhodné adaptace a specializace, k níž došlo během milionů let evoluce, jež umožnila včelám prospívat v jejich přirozeném prostředí. U včely medonosné byly objeveny morfologické struktury, které vykazovaly různé adaptace pro hledání potravy, sběr nektaru, tvorbu medu, skladování pylu, odstraňování nečistot z úlu, čištění plodových buněk, komunikaci v úlu, krmení matky a larvy a odchovu larev v buňkách zhotovených z vosku vylučovaného včelími dělnicemi (Ajao et al., 2014).

4.1. Hlava *Caput*

Hlava je hypognátní, směřuje kolmo k podélné ose těla. Většinu boční části hlavy zabírají složené oči. Dále jsou na hlavě umístěny dvě článkovaná tykadla, která jsou nezbytná pro detekci feromonů a dalších chemických signálů. Ústní ústrojí včely medonosné je uzpůsobeno jak ke krmení nektarem a pylem, tak ke stavbě plástů z včelího vosku (Stephe, Bohart a Torchio, 1969).

4.2. Hruď *Thorax*

Struktura a funkce hrudníku včely medonosné je přizpůsobena náročným podmínkám při letu a hledání potravy. Sestává ze 3 segmentů - prothorax, mesothorax a metathorax. U včel, stejně jako u všech blanokřídlých, je pravý první břišní článek srostlý s metathoraxem. To s nejvyšší pravděpodobností umožnilo u podřádu Apocrita větší rozvoj letových svalů (Michener, 1944). Letové svaly zabírají u Hymenoptera nejméně 90 % objemu hrudníku (Hickey et al., 2022). Prothorax je u včel redukovaný, mesothorax je naopak největší segment a jsou na něj napojeny dva páry křídel. Na hrudi jsou též umístěny 3 páry kloubových nohou, jež jsou využívány k chůzi, uchopování a manipulaci s různými předměty a materiály.

4.3. Zadeček *Abdomen*

Zadeček včely medonosné obsahuje řadu důležitých orgánových struktur zahrnujících oběhovou, nervovou, dýchací a trávicí soustavu (Goncalves et al., 2006). Obranným orgánem uloženým v abdomenu je žihadlový aparát, který je strukturálně homologický s kladélkem u jiných druhů řádu Hymenoptera (Smith, 1969). Jeho primární funkcí je dopravit jed do agresora, aby ho buď usmrtil, nebo odradil od útoku na včelstvo. Při

použití žihadla velmi často dochází k autotomii, což má ve většině případů za následek smrt dělnice (Cunard, Breed, 1998). Na spodní straně zadečku jsou též umístěny specializované voskové žlázy, kterými dělnice při stavbě buněk plástů vylučují vosk. Celé tělo včely medonosné je pokryto jemnými chloupky, které pomáhají při sběru pylu a též se zde nachází celá řada žláz produkující feromony, jež slouží ke komunikaci a koordinaci uvnitř včelstva (Michener, 1944).

5. Trávicí soustava

Trávicí soustava včely medonosné je složitý systém, jehož primárním úkolem je zpracovávat nektar a pyl na med a poskytovat včelám živiny nezbytné pro přežití. Tento systém se skládá z několika specializovaných orgánů a struktur, které spolupracují, aby zajistily správné trávení potravy a vstřebávání živin. Orgány trávicí soustavy prochází celým tělem včely, z nichž velká část je uložena v abdomenu. Trávicí soustava se skládá ze 3 částí, a to z předního stomodea a zadního proctodea, které jsou ektodermálního původu, a mesenteronu endodermálního původu (Stell, 2012). Potrava je nejprve přijata na spodní straně hlavy umístěným ústním otvorem, jež je opatřen kusadly a sosákem. Dále potrava postupuje do hltanu, který je již součástí stomodea, následuje do jícnu, medného váčku a česla. V této části trávicí soustavy nejsou přítomny žlázy, nejsou vylučovány trávicí enzymy a nedochází ani ke vstřebávání živin. Medný váček má tenkou a flexibilní stěnu. Dochází v něm ke kumulaci nektaru, medovice a vody. Hltanovými žlázami ústícími do hltanu je produkován enzym invertáza, který se podílí na přeměně nektaru či medovice na med (Vorlová, Přidal, 2002). Ze 4 laloků složené česlo následně zabraňuje zpětnému pronikání obsahu žaludku do medného váčku. Navazující mesenteron má podobu protáhlého a na povrchu příčně zřaseného váčku. Peristaltický pohyb zajišťují podélné a okružní svalové buňky. Epitel mesenteronu je silně zřasený, což zaručuje velkou resorpční plochu. Důležitou součástí mesenteronu je. peritrofická membrána, jež je pro včelu medonosnou je hlavním místem trávení (Stell, 2012). Peritrofická membrána je tvořena proteiny, glykoproteiny a chitinovými mikrofibrilami uspořádanými v proteoglykanové matrici, která slouží jako ochranná bariéra před patogeny (Lehane, 1997). Též zde dochází k vylučování trávicích enzymů a ke vstřebávání živin. Voda, minerální látky a ostatní produkty buněčného metabolismu vyloučené do hemolymfy přecházejí do Malpighických trubic umístěných na hranici mesenteronu a proctodea. Mesenteron je od poslední částí trávicí soustavy proctodea oddělen pylorickou chlopní. V poslední části trávicí soustavy již nejsou sekretovány trávicí enzymy. Proctodeum je složeno z tenkého střeva, které přechází v rozšířený výkalový vak, jež ústí řitním otvorem umístěným mezi žihadlem a posledním hřbetním článkem zadečku.

Mesenteron a střevní sliznice působí jako ochranný štít a jsou odpovědné za vyvolávání imunitní reakce proti mnoha patogenům včely medonosné (Szymas et al., 2007). Z tohoto důvodu jsou tyto orgány často jednou z prvních oblastí, které jsou napadány a infikovány patogeny (Das Dores Teixeira et al., 2014). Mikrobiota osidlující především proctodeum hraje významnou roli při ochraně včel medonosných před škodlivými patogeny a prostřednictvím kompetitivního vyloučení a produkce antimikrobiálních sloučenin pomáhá udržovat vyvážené a zdravé mikrobiální společenství ve střevech včely medonosné, čímž snižuje riziko onemocnění a infekce. Vliv na udržování zdraví včely má především relativně stálá střevní mikroflóra (Zheng et al., 2017). Dospělé dělnice *A. mellifera* mají konzistentní soubor 9 bakteriálních druhů, které jsou pozorovány u včel napříč celým světem a které dominují jejich střevní mikroflóře (Jones et al., 2017). K výkyvům ve složení mikrobioty dochází v závislosti na kvalitě potravy, přítomnosti parazitů či chemických látek (Miller, Parish a Newton, 2019). Příkladem mohou být asijské včely *Apis cerana* krmené včelím chlebem, které mají ve srovnání s včelami krmenými běžným cukrovým sirupem, bohatší a rozmanitější mikrobiotu (Li et al., 2024). K narušení mikrobioty může dojít působením různých faktorů, jako je výskyt patogenů, nedostatek potravy, pesticidy či znečištění životního prostředí. Znalost a možnost ovlivnit či posílit přirozenou střevní mikroflóru poskytuje příležitost k vytvoření vhodné strategie pro vitalitu včely medonosné.

6. Trofalaxe

Trofalaxe hraje u pokročilých eusociálních druhů, jako jsou včely, zásadní roli v komunikaci a soudržnosti včelstva. Mechanismus funguje na základě redistribuce potravy (Basile, Pirk a Tautz, 2008). Toto chování jedinců komunity umožňuje výměnu tekuté potravy z úst do úst. Živiny tak přechází z podřízených jedinců na dominantní. Doba trvání kontaktu mezi dárcem a příjemcem je uváděna v rozmezí od několika sekund až po několik minut (Goyret a Farina, 2005). Během trofalaktické interakce rozevře dárce potravy doširoka svá kusadla, tykadla drží dolů, blízko hlavy, a různý počet příjemců začne kontaktovat jeho ústní ústrojí svými sosáky za účelem usrkávání nektaru. Jejich tykadla směřují k dárci (Free, 1959). Během této výměny získávají příjemci informace ve formě jak čichové, tak chuťové stimulace. Ziskovost zdroje je tak možné určit na základě měnící se intenzity (Frisch, 1967). U zdrojů nektaru je tato ziskovost závislá především na koncentraci sacharózy a rychlosti dodávání roztoku během trofalaxe (Wainselboim, Farina, 2000). Trofalaxe může ovlivnit reprodukci kolonií, stejně jako fyziologii kastovního určení, dělbu práce, distribuci feromonů a ustavení hierarchní dominance (Wilson, 1975). Na základě průběhu trofalaxe lze hodnotit i stav včelstva. Frekvence trofalaktických žádostí ze strany příjemců může mladším včelám signalizovat, že je v úlu nedostatek potravy a stimulovat jejich vývoj a přeměnu na včelu dělnici (Schulz et al. 2002).

7. Potrava

Mezi opylovači se pouze nepatrná část během celého svého životního cyklu živí výhradně z rostlinných zdrojů, a to kvůli ekologickým a fyziologickým problémům spojených s konzumací tohoto typu potravy. V důsledku potravní specializace včely medonosné došlo u tohoto druhu k mimořádným adaptacím, které zahrnují jak zpracování potravy, tak i její skladování. Nutriční deficit a hladovění pravděpodobně přispívají k příčinám ztrát včelstev na celém světě (Engelsdorp et al., 2009). Dostupnost, kvalita a rozmanitost stravy se promítá do živin dostupných pro včelstvo a odráží se na zdraví včel.

Pyl a nektar krytosemenných rostlin jsou základními zdroji potravy pro včely (Haydak 1970). Největší výzvou pro organismy závislé na pylu a nektaru je to, že se jedná o zdroj potravy, který je nepředvídatelný – dochází u něj k rychlým změnám v čase, prostoru a také je dočasně pomíjivý, prostorově variabilní a fytochemicky unikátní (Nicolson a Thornburg, 2007). Kolektivní sběr potravy umožňuje včelím koloniím efektivně využívat neustále se měnící zdroje (Frisch, 1967).

Rostlinný pyl má velmi proměnlivé složení závislé na jeho zdroji, sezóně, environmentálních faktorech a způsobu zpracování (De-Melo et al., 2016). Jedná se o primární zdroj bílkovin. Vysoká výživová hodnota je dána širokou škálou aminokyselin, vitaminů, minerálů a organických látek (Kalaycıoglu et al., 2017).

U nektaru, který se skládá převážně ze sacharidů, je výnosnost obvykle definována jeho energetickou hodnotou. Nektar však obsahuje také celou řadu stopových složek, jako jsou minerální látky, fenolické sloučeniny a aminokyseliny, z nichž některé ovlivňují atraktivitu nektaru pro včely (Seeley et al., 1991).

Oba typy výživy, nektari pyl, obsahují biologicky aktivní látky, jako jsou flavonoidy, fenolické látky, terpenoidy a alkaloidy. Zmíněné fotochemikálie, a zejména pak fenolické látky a alkaloidy, mají antimikrobiální vlastnosti a zajišťují též obrannou funkci u rostliny. Jejich úkolem je odstrašit nevhodné opylovače. Fenolické sloučeniny ovlivňují chuť nektaru i při velmi nízkých koncentracích (Baker, 1977) a v některých případech se předpokládá, že dokonce včely medonosné odpuzují (Adler, 2000).

Konzumace pylu stimuluje produkci hydrolázy v hlavových žlázách včelích dělnic, jež usnadňuje přeměnu nektaru na med. Aby mohly včely zpracovat a uložit sacharidy ve

formě medu, musí nejprve rozložit disacharidy na monosacharidy, protože pouze monosacharidy mohou projít stěnou mesenteronu do hemolymfy včely pro pozdější využití buňkami (Crailsheim, 1988). Proto musí být všechny komplexní cukry, které včely přijímají, enzymaticky transformovány, aby se pro ně staly biologicky dostupné (Hausman, Wäckers a Dorn, 2005). Skladování nektaru ve formě medu v plástech minimalizuje problémy s nepředvídatelností a pomíjivostí zdroje a také s náchylností k mikrobiální kontaminaci. Med je komplexní viskózní látka složená ze 60 až 85 % sacharidů a 12 až 23 % vody. Obsahuje také malé množství dalších sloučenin, jako jsou organické kyseliny, minerální látky, vitaminy, enzymy, bílkoviny, aminokyseliny, těkavé a bioaktivní látky a v neposlední řadě pylová zrna. Na základě jejich identifikace lze určit botanický původ medu (De-Melo et al., 2018).

8. Zdroje potravy

Včely mohou létat do značných vzdáleností ke zdrojům potravy. Kolonie vykazují velkou schopnost nasměrovat své sběrače k nejvydatnějším zdrojům (Seeley et al., 1991). Komunikační systém včely medonosné při shánění potravy je poměrně dobře popsán. Shánění nektaru je koordinováno několika komunikačními signály, které jsou souhrnně označovány jako včelí tanec. Atraktivita nektaru pro opylovače je pravděpodobně nejvíce ovlivněna jeho chutí (Adler, 2000), ale může být také ovlivněna vůní (Raguso, 2004) a barvou (Thorp et al., 1975). Chuti nektaru dominuje vysoká koncentrace cukru. Dle výzkumu bylo prokázáno, že včely medonosné dávají přednost roztoku s poměrem cukrů 1:1:1 (sacharóza/fruktóza/glukóza) před roztokem čisté sacharózy (Wykes, 1952). Zdroj nektaru a následně medu závisí na umístění úlu. Ve specifických podmínkách včely produkují jednodruhový med, ale běžnější jsou vícedruhové medy. Med v České republice vykazuje významný podíl pylu *Brassica*, který byl potvrzen ve většině medů, a to především z toho důvodu, že se jedná o jednu z nejběžnějších zemědělských plodin pěstovaných na území České republiky (Pospiech et al., 2021).

V některých obdobích roku, jako je zima nebo období sucha, jsou zdroje potravy drasticky omezeny. Nedostupnost přirozené potravy způsobuje pokles počtu včelích dělnic, snížení kladení vajíček a snížení odolnosti vůči nemocem (Morais et al., 2013). Aby bylo včelstvo udržováno v dobré kondici a minimalizovaly se případné ztráty, používají včelaři v chovech k doplňkovému dokrmování před zazimováním domácí cukerný roztok (rafinovaný cukr rozpuštěný v kohoutkové vodě) nebo komerčně dostupné sirupy (Lipiński, 2018). Krmné sirupy mají oproti cukernému roztoku řadu výhod - jsou dodávány hotové, takže není potřeba cukr před krmením rozpouštět a nemají tendenci krystalizovat. Pravděpodobnost zkvašení je velmi nízká díky vysokému osmotickému tlaku (Semkiw a Skubida, 2016). Dodatečné krmení před zimou často chrání včely před podvýživou, která může vést k poškození imunitního systému a zvýšené citlivosti na pesticidy (Alaux et al., 2010; Wahl a Ulm, 1983).

V některých specifických případech je zapotřebí průběžné sezónní podněcování, a to například při nedostatku cukerných zásob v předjaří. K tomuto účelu se využívá především cukerný roztok či medocukrové těsto. Tyto zdroje sacharidů jsou

dávkovány v menším množství ve vyšší frekvenci, aby došlo k navození stavu stálé snůšky a včelstvo plodovalo (Lipiński, 2018).

9. Onemocnění včel

Včely medonosné jsou náchylné k řadě virových, bakteriálních a plísňových onemocnění, která představují významné ohrožení jejich kolonií a mohou způsobit i jejich úhyn. K šíření onemocnění může dojít horizontálním či vertikálním přenosem. Při horizontálním přenosu dochází mezi jedinci stejné generace, zatímco u vertikálního probíhá přenos z matky na potomky. Včelstvo představuje vysoce organizovanou strukturu s velmi vysokou populační hustotou, kde je vysoké riziko pro šíření nákazy. Ve vztahu k onemocnění trávicí soustavy včel jsou onemocnění způsobené mikroorganismy *Melissococcus pluton*, *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae, Aspergillius flavus* či *A. fumigatus*, *Malpighamoeba mellificae, Nosema ceranae*, *Nosema apis Zander* nejvýznamnější.

Hniloba včelího plodu je závažné bakteriální onemocnění včelího plodu způsobené anaerobní grampozitivní bakterií *Melissocccus plutonius,* lokalizované na povrchu peritrofické membrány larválního střeva (Takamasu, Sato, Yoshiyama, 2016). S tímto onemocněním je spojeno i několik dalších bakterií včetně *Achromobacter eurydice*, *Brevibacillus laterosporus, Enterococcus faecalis* a *Paenibacillus alvei* (Forsgren, 2010). Jejich role při vývoji onemocnění však není zcela objasněná. Mezi obecné symptomy, pozorované u včelstva trpícího hnilobou včelího plodu, patří nepravidelné zavíčkování plodu - zavíčkované a nezavíčkované buňky jsou nepravidelně rozptýlené v plodišti. Infikované larvy obvykle hynou okolo 3 až 5 dnů stáří, dají se identifikovat na dně buňky díky své průhledné barvě s viditelnou průdušnicí. V těžkých případech mohou být ztraceny celé kolonie.

Zvápenatění včelího plodu je způsobeno heterotalickou houbou *Ascosphaera apis* napadající včelí plod. Jakmile jsou oválné askospory požity s kontaminovanou potravou, aktivují se vystavením se oxidu uhličitého a začnou klíčit ve střevě. Později mycelium poruší peritrofickou membránu a proroste skrz larvy. Na začátku infekce larvy přestanou konzumovat potravu, nabobtnají, a nakonec se pokryjí myceliem plísní. Za 5 až 7 dní po nakažení je většina larev mumifikovaných.

Onemocnění nazvané jako mor včelího plodu, jehož původcem je sporotvorná bakterie *Paenibacillus larvae*, naopak infikuje pouze mesenteron larev (Yue et al., 2008). Klíčící spory se v trávicím traktu rychle množí po dobu několika dní, aniž by narušily

integritu epitelu. Onemocnění se projevuje zhnědnutím jedince a následně se jejich těla mění v amorfní tmavě hnědou lepkavou hmotu.

Řada druhů rodu *Aspergillus* jsou fakultativními parazity a byly identifikovány jako původci onemocnění zkamenění včelího plodu. Jako primární druh je uváděn *Aspergillus flavus*, minoritně *Aspergillus fumigatus* (Gillian, Prest, Morton, 1974). V koloniích vykazujících symptomy onemocnění jsou v buňkách plodu viditelné tvrdé mumifikované larvy, které byly transformovány saprofytickou houbou. Aspergillus spp. mohou infikovat včely ve všech vývojových stádiích (Foley et al., 2012).

Malpighamoeba mellificae neboli měňavka včelí je prvok, jež infikuje malpighické trubice dospělých včel. Výsledná atrofie malpighických trubic v trávicí soustavě může vyvolat nerovnováhu vylučování odpadu a výměny hemolymfy. Postupně dochází k namnožení měňavek v těle včely, a proto v důsledku hromadění toxických látek dojde k úhynu jedince. Toto onemocnění se nazývá amébóza. Může se vyskytovat současně s infekcemi *Nosema* (Bailey, 1968).

Onemocnění nosemóza, způsobená 2 druhy mikrosporidních hub *Nosema ceranae* (hmyzomorka východní) a *Nosema apis* Zander (hmyzomorka včelí), se projevuje průjmem. Tyto houby infikují epiteliální vrstvu mesenteronu dospělých včel, způsobují poruchy trávení a zkracují délku jejich života. V Evropě nyní převládá výskyt hmyzomorky východní, nicméně jsou i včelstva, u nichž dochází ke smíšené infekci oběma druhy.

10. Stav včelaření v České republice

Včelařství má v českých zemích dlouhou historii sahající až do 12. století. Nicméně zásadní vliv na rozvoj organizovaného včelařství měla až Marie Terezie, jež založila v roce 1769 ve Vídni první včelařskou školu a podnítila další aktivity v tomto směru (Pechhacker a Moosbeckhofer, 2003). V současné době je dle veřejně přístupných údajů Českého svazu včelařů, z. s., evidováno 56 474 členů, kteří obhospodařují 610 209 včelstev.

Vzhledem k významu obhospodařovaných včelstev ve vztahu k ekonomice a ekologii byly v posledních letech v centru pozornosti výzkumy zabývající se ztrátami včelstev. K selhání včelstva může dojít kdykoli během roku, ale v mírném podnebí je pro včelstva výzvou zimní období, kdy není k dispozici píce, produkce plodu je zastavena a dělnice musí přežít několik měsíců. Dle výsledků dotazníků vyplňovaných a zasílaných chovateli včel na jaře každého roku asociaci COLLOS došlo na přelomu roku 2023/2024 v meziročním srovnání k úhynu 12,2 % včelstev (www.coloss.cz). Ztráty včelstev jsou dnes však považovány za multifaktoriální problém kombinující vliv biotických a abiotických stresorů, např. výživy nebo pesticidů, ale také klimatických změn. V kolapsu včelstev může hrát roli také nedostatek dlouhověkých včel, které zajišťují přežití včelstva přes zimní období. Důvodem může být delší období bez kladoucí matky, nedostatek pylu či zásob, ometání včel na tvorbu oddělků, jiné masivní zásahy do plodiště a v neposlední řadě onemocnění (Titěra, 2020). Příčinou úhynu včel, potažmo zániku celých včelstev, jsou onemocnění způsobená především viry, které se mohou množit v důsledku oslabení imunity včel. Ačkoli je dnes zaregistrováno více veterinárních léčivých přípravků než v minulosti, jež mohou chovatelé využít při léčbě různých onemocnění, problémem je snižování účinnosti preparátů, a naopak vzrůstajícírezistence původců onemocnění. Neúčinnost léčby může též spočívat v nesprávném načasování nebo nesprávné technické aplikaci léčebného roztoku (www.coloss.cz). Co se týká rozšíření onemocnění, dle studie provedené v roce 2021 Mrázem et al. jsou nejčastějšími eukaryotními patogeny v populacích včel v České republice *Lotmaria passim* a *Nosema cerane*, následované *Crithidia mellificae*. V minoritním zastoupení pak *Paenibacillus larvae* a *Melissococcus plutonius*. Nejrozšířenějšími viry byly původci onemocnění označovaných jako virus deformovaných křídel včel a virové paralýzy

včely medonosné. V České republice je na 1 kilometr čtvereční až 9 včelstev. Tato hustota znamená častější kontakt jedinců a vysoké riziko přenosu nemocí (Titěra, 2020). Zároveň je zde i větší kompetice o zdroje potravy.

11. Esenciální oleje

Esenciální oleje jsou získávány z různých siličnatých rostlin. Jedná se o soubor sekundárních metabolitů, které pomáhají rostlinám při kontrole jejich růstu a interakci s jinými druhy nebo rostlinami. Složení těchto hydrofobních těkavých olejů se liší v závislosti na rostlinném druhu, z něhož jsou extrahovány, na podmínkách pěstování a též na způsobu extrakce. Odhaduje se, že v těchto olejích může být přítomno až 400 sloučenin (De Groot a Schmidt, 2016). Obecně se jedná o směs nasycených a nenasycených uhlovodíků, alkoholů, aldehydů, esterů, etherů, ketonů, oxidů, fenolů a terpenů. Nejvíce zastoupenou skupinou chemických látek nalezenou v esenciálních olejích jsou terpeny, z nichž nejvýznamnější jsou monoterpeny a seskviterpeny, které jsou odpovědné za charakteristickou vůni oleje a jsou zdrojem biologické aktivity (De Groot a Schmidt 2016; Masyita et al., 2022). Esenciální oleje jsou však známé především pro své antioxidační, antibakteriální, antibiotické a antivirové vlastnosti (Smith, Collins a Crowther, 2011). Používání esenciálních olejů v různých odvětvích v poslední dekádě zaznamenalo významný růst. Velký potenciál mají ve veterinární medicíně především při vývoji veterinárních léčivých přípravků. Vzhledem k variabilitě složení jednotlivých olejů je značně zkomplikováno hodnocení zdravotních účinků při každém jejich použití.

Potřeba omezit nebo nahradit syntetické pesticidy přírodními alternativami vedla k současnému hledání ekologicky přijatelných metod ošetření. Rostlinná říše se ukázala jako velmi užitečná a bohatá na zdroje pro léčbu různých lidských a zvířecích onemocnění. Aplikace esenciálních olejů do včelstev vykazuje antimikrobiální účinky, jež mohou vést k celkovému zlepšení zdravotního stavu včelstev (Eguaras et al., 2005). Například v souvislosti s původcem onemocnění zvápenatění včelího plodu *Ascosphaera apis* bylo testováno 27 rostlinných silic. U většiny z nich se prokázala potenciální antimykotická aktivita. Nejvýznamnější výsledky vykazoval například olej *Litsea cubeba* či olej z hřebíčku. Teorie o inhibici mikroorganismů *Aspergillus flavus* a taktéž *Ascosphaera apis* 17 chemicky definovanými esenciálními oleji byla testována týmem S. Nardoni v roce 2018. Antimykotická aktivita byla potvrzena u esenciálních olejů *Litsea cubeba* a *Pelargonium graveolens* a jejich směsí s *Cymbopogon flexuosus* a *C. zeylanicum*.

U esenciálního oleje ze slézu lesního *M. sylvestris var. mauritiana* byla s pozitivním výsledkem testována biologická aktivita proti 2 grampozitivním bakteriím odpovědným za nejzávažnější a nejrozšířenější infekční onemocnění včely medonosné v larválním stadiu, a to *Paenibacillus larvae* a *Melissococcus plutonius*, původcům moru včelího plodu a hniloby včelího plodu (Cecotti et al., 2016).

V kontextu s onemocněním nosemóza byly úspěšně testovány esenciální oleje čilského stálezeleného stromu *Cryptocarya alba*, dále pak česneku, tymiánu, máty peprné či eukalyptu (Bravo et al., 2017; Kuvanci et al., 2020; Özuicli et al., 2023).

Použití netoxických přírodních sloučenin by mohlo představovat přirozenou alternativu k syntetickým léčivům při kontrole onemocnění včelstev, což by mělo snížit rezistenci vůči dlouhodobě užívaným léčivům, antibiotikům a zároveň snížit hladiny reziduí antibiotik.

I v případě používání alternativních přírodních přípravků výzkumy naznačily opatrnost při preventivních, nekontrolovaných a nadměrných užíváních esenciálních olejů, a to především z důvodu jejich toxicity pro organismus. K odhalení negativních vlivů a také mechanismů působení těchto fytogenních doplňků na podporu imunity je potřeba dalších výzkumů.

11.1. Tymián

Z původně středozemní byliny pocházející z rodu Thymus, čeledi Lamiaceae, je parní destilací z čerstvých kvetoucích nadzemních částí extrahován esenciální olej složený zejména z 30 až 55 % thymolu a 1 až 5 % karvakrolu (Peter, 2012). Zejména díky významnému obsahu thymolu byl zařazen mezi medicínsky využívané látky. Působí antibakteriálně na grampozitivní i gramnegativní bakterie a má antivirovou, antimykotickou, antioxidační, protizánětlivou a spasmolytickou aktivitu. Přestože má ve vysokých koncentracích cytotoxické vlastnosti a může při orálním použití způsobit poškození střevních buněk, nebyla při běžně používaných dávkách hlášena žádná toxicita.

11.2. Thymol

Thymol, člen rodiny fenolických monoterpenů, se nachází v různých druzích tymiánu a jedná se o klíčovou složku tymiánového esenciálního oleje. Jak je uvedeno výše, tento olej má velmi komplexní účinky, nicméně přímo thymol vykazuje akaricidní

účinky. Díky této vlastnosti rychle získal na popularitě a je nyní používán ke kontrole *V. destructor* (Mondet, Goodwin a Mercer, 2011). V případě této látky bylo prokázáno, že není toxická pro včely medonosné při fyzickém kontaktu ani perorálně (Imdorf et al., 1995, Detzel a Wink, 1993; Ebert et al., 2007). Díky své nízké toxicitě (Lenga, 1988) a nízké reziduálnosti v medu (Bogdanov et al., 1998) je thymol schválen pro použití při kontrole varroázy v ekologickém včelařství podle Nařízení EU 834/2007 o ekologické produkci.

11.3. Skořice kůra

Čeleď Lauraceae a rod Cinnamomum zahrnuje na 250 druhů. Olej získávaný parní destilací z kůry skořice, která jej obsahuje 0,4 až 2,8 %, sestává až z 300 látek. Nejvýznamnější jsou především cinnamaldehyd, cinnamylacetát, karyofylen, linalool, eugenol, benzaldehyd, 4-terpineol (Kamaliroosta et al., 2012). Tento olej je používán jako tradiční bylinný lék pro své antimikrobiální, antioxidační a antikarcinogenní účinky. V posledních letech některé studie uvádějí, že skořicový olej měl široký rozsah antimikrobiálních aktivit proti grampozitivním a gramnegativní bakteriím.

11.4. Hřebíček

Hřebíček patřící do čeledi Myrtaceae, rodu Syzygium, je široce pěstován na Madagaskaru, Srí Lance, Indonésii a na jihu Číny. Parní destilací získávaný olej z hřebíčkových pupenů má biologické aktivity. Připisují se mu antibakteriální, protiplísňové, insekticidní a antioxidační účinky. Eugenol tvoří 70 % až 90 % esenciálního oleje a 15 % suché hmotnosti pupenů hřebíčku (Rani et al., 2012). Právě vysoké hladiny eugenolu obsažené v hřebíčkovém esenciálním oleji zajišťují jeho silnou antimikrobiální aktivitu (Chaieb et al. 2007).

12. Emulgátory

Emulze jsou disperze jedné nemísitelné kapaliny v druhé ve formě kapiček. Za účelem smísení těchto 2 fází a zabránění zpětné fúzi kapiček se používají povrchově aktivní látky a emulgátory, které přispívají různým způsobem ke stabilizaci emulze. Obecně se termín emulgátor používá k označení vysokomolekulárních polymerů a koloidních částic, jež jsou schopné se adsorbovat na rozhraní olej-voda a chránit kapičky emulze před agregací. Emulgátory výrazně snižují mezifázové napětí (Bouyer et al., 2012).

Konvenční produkty na bázi emulzí jsou v našem každodenním životě široce používány, ať už jde o potravinářský, kosmetický či farmaceutický průmysl. V kontextu farmaceutických aplikací jsou emulze široce používány především jako nosiče či enkapsulační systémy pro bioaktivní sloučeniny, jimž poskytují ochranu před vnějšími vlivy a umožňují řízené uvolňování (Schramm, 2005).

12.1. Sucragel AP V2, Sucrablend SP V2

Sucragel AP V2 je tekutý, bezbarvý a univerzální emulgátor sestávající ze 3 složek – glycerinu, vody a laurátu sacharózy. Sucrablend SP V2, bílý prášek složený ze stearátu sacharózy a palmitátu sacharózy, je vhodný pro použití v kombinaci se Sucragel AP V2 za účelem zvýšení stability emulze. Laurát, stearát a palmitát sacharózy jsou součástí skupiny esterů sacharózy. Tyto látky jsou široce používány v potravinářském a kosmetickém průmyslu. V poslední době o ně vzrostl velký zájem v různých farmaceutických oborech. Jsou to přírodní a biologicky odbouratelné pomocné látky s dobře známým emulgačním a solubilizačním chováním, nízkou toxicitou a vynikající biologickou rozložitelností (Szűts, Szabó-Révész, 2012).

12.2. Emulmetik 100 J

Tato viskózní, výrazně žlutá tekutina je komerčně užívaný emulgátor lecitin. Lecitiny jsou přírodní, ze sójových bobů extrahované amfifilní molekuly složené z různých fosfolipidů, které jsou široce používány v potravinářském průmyslu (Gaudino et al., 2012). Lecitiny se také využívají pro farmaceutické účely jako složky liposomů, směsných micel a nanoemulzí. Všechny tyto struktury jsou vhodnými nosiči lipofilních léčiv (Sznitowska, Dabrowska a Janicki, 2002).

12.3. Ethanol

Ethanol je snadno dostupná bezbarvá tekutina s charakteristickým zápachem.

12.4. MMB

Tato čirá a ve vodě zcela rozpustná kapalina s mírným zápachem sestávající z 3-methoxy-3-methyl-1-butanolu s nízkou toxicitou a rychlou biodegradabilitou je vhodná pro různé aplikace. Významné je jeho použití v parfumérském průmyslu jako solvent pro esenciální oleje (Une, Bondarde, Some, 2022).

12.5. Dermosoft GMCY MB

Jedinou složkou tohoto emulgátoru je glyceryl kaprylát. Konzistencí se jedná o bílou sklovitou hmotu. Glyceryl kaprylát je známý jako multifunkční látka, která působí jako přírodní konzervant, ale také jako změkčovadlo a emulgátor (Manning, Orawski, 2005).

12.6. Dermofeel SL

Sodium stearoyl lactylate je bílá práškovitá sloučenina kyseliny stearové a laktylátu. Jedná se o běžně používaný emulgátor v potravinářství (Du, Meng, 2023). V některých případech může vytvářet pěnu na povrchu emulze.

12.7. Emulium mellifera MB

Tento směsný emulgátor sestává z látek polyglyceryl-6 distearát, polyglyceryl-3 beeswax, jojobové estery a cetyl alkohol. Svou konzistencí, připomínající vosk, vytváří stabilní emulze. Polyglycerolové estery, jež jsou součástí tohoto emulgátoru, se široce používají v potravinářském průmyslu díky své amfifilní povaze v různých typech potravin. Mají též uplatnění ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu (Norn, 2014).

12.8. Tegin 4100 Pellets MB

Tyto nažloutlé voskové pelety jsou tvořeny glyceryl stearátem. Jedná se o derivát mastné kyseliny vyrobené z glycerinu a kyseliny stearové. Emulgátor se používá v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu.

12.9. Stearin

Tato směs kyseliny stearové a palmitové má voskovou konzistenci ve tvaru vloček bílé barvy. Emulgátor získaný jako frakce palmového oleje se nejčastěji používá v potravinářství (Subroto, Nurannisa, 2020).

12.10. Natpure Sol SL

Tento bezbarvý tekutý emulgátor se skládá z glycerinu, vody, hydrogenovaného škrobového hydrolyzátu a laurátu sacharózy. Ve vztahu k esenciálním olejům se používá jako solubilizátor. Je získáván z přírodních obnovitelných zdrojů potravinářské kvality, a to z cukrové třtiny. Hydrogenované škrobové hydrolyzáty byly hodnoceny jako bezpečné a jsou schváleny jako činidla upravující viskozitu v potravinářství (Modderman, 1993).

Praktická část

13. Příprava vzorků

V rámci této diplomové práce byly připraveny emulze s disperzním prostředím tvořeným cukerným roztokem a s disperzním podílem esenciálního oleje. Screening probíhal s 11 vybranými emulgátory, u nichž byla stabilita ověřována za pomoci stolní odstředivky. V rámci práce bylo připraveno celkem 41 vzorků. Připravené vzorky byly uskladněny při laboratorní teplotě a v časových intervalech byly dále pozorovány.

Použité suroviny a přístroje:

cukerný roztok.

Esenciální oleje:

esenciální olej Tymián červený;

esenciální olej Skořice kůra;

esenciální olej Hřebíček;

thymol.

Emulgátory:

Sucragel AP V2;

Emulmetik 100 J;

ethanol;

MMB;

Sucrablend SP V2;

Dermosoft GMCY MB;

Dermofeel SL;

Emulium mellifera MB;

Tegin 4100 Pellets MB;

Stearin;

Natpure Sol SL.

Přístroje a pomůcky:

běžné laboratorní sklo a pomůcky;

analytická váha Boeco Germany BBI-41;

homogenizátor IKA T18 Ultra Turrax;

centrifuga Hettich ROTINA 380R;

magnetická míchačka s topením Heidolph MR 3001 K;

třepačka Heidolph Reax Top;

inkubátor chlazený Q-Cell POL-LAB.

13.1. Příprava cukerného roztoku

Nejprve byl připraven cukerný roztok v poměru 3:2 cukr/voda, který se dále využíval při přípravě emulzí. Na analytických vahách bylo naváženo 300 g cukru a 200 g vody do skleněné kádinky. Tato směs byla následně promíchávána po dobu 30 minut při teplotě 70 °C do úplného rozpuštění cukru.

13.2. Příprava emulzí pro screening

Postup při přípravě emulzí o celkové hmotnosti 10,0 g byl následující. Dle tabulky č. 1 byly na analytických vahách postupně naváženy emulgátory.

U emulze č. 5 byla dle doporučení výrobce použita kombinace emulgátoru a ko-emulgátoru v poměru 2:1 pro zlepšení stability.

Emulgátory u emulzí č. 7 až 10 byly nejprve rozpuštěny při teplotě 40 °C. Poté byl do zkumavek s emulgátory navážen esenciální olej v množství 0,15 g a cukerný roztok o hmotnosti 9,55 g.

Následně byla každá směs homogenizována po dobu 1 minuty při 10 000 otáčkách za minutu pomocí homogenizátoru.

U každého vzorku následovalo ověření stability na stolní odstředivce.

Na základě tohoto ověření bylo zjištěno, že nejvhodnějšími emulzemi k následným pokusům budou emulze č. 1, 5 a 11.

Označení emulze	Látka	Koncentrace [%]	Množství [g]
1	Cukerný roztok	95,50	9,55
	Sucragel AP V2	3,00	0,30
	Tymián	1,50	0,15
2	Cukerný roztok	95,50	9,55
	Emulmetik 100 J	3,00	0,30
	Tymián	1,50	0,15
3	Cukerný roztok	95,50	9,55
	Ethanol	3,00	0,30
	Tymián	1,50	0,15
4	Cukerný roztok	95,50	9,55
	MMB	3,00	0,30
	Tymián	1,50	0,15
5	Cukerný roztok	95,50	9,55
	Sucragel AP V2/Sucrablend SP V2 2:1	3,00	0,30
	Tymián	1,50	0,15
6	Cukerný roztok	95,50	9,55
	Dermosoft GMCY MB	3,00	0,30
	Tymián	1,50	0,15
7	Cukerný roztok	95,50	9,55
	Dermofeel SL	3,00	0,30
	Tymián	1,50	0,15
8	Cukerný roztok	95,50	9,55
	Emulium mellifera MB	3,00	0,30
	Tymián	1,50	0,15
9	Cukerný roztok	95,50	9,55
	Tegin 4100 Pellets MB	3,00	0,30
	Tymián	1,50	0,15
10	Cukerný roztok	95,50	9,55
	Stearin	3,00	0,30
	Tymián	1,50	0,15
11	Cukerný roztok	95,50	9,55
	Natpure Sol SL	3,00	0,30
	Tymián	1,50	0,15

Tabulka 1: Receptury emulzí.

14. Způsoby emulgace

Emulzifikace probíhala 4 způsoby, které byly mezi sebou porovnávány ve vztahu ke stabilitě emulze, a to:

- homogenizování,
- míchání v ruce skleněnou tyčinkou,
- míchání magnetickou míchačkou,
- vortexování.

Pro stanovení stability při různých způsobech emulgace byly vybrány na základě prvotního screeningu emulze č. 1, 5 a 11. Byla použitá totožná receptura jako v tabulce č.1. Každá receptura byla připravována ve 3 exemplářích.

Nejprve byl navážen emulgátor, poté byl přidán esenciální olej a cukerný roztok dle tabulky č. 1.

Při přípravě emulzí pomocí homogenizátoru byla každá směs homogenizována po dobu 1 minuty při 10 000 otáčkách za minutu.

Emulze připravované ručním mícháním byly promíchávány skleněnou tyčinkou po dobu 1 minuty.

Příprava emulzí pomocí magnetické míchačky probíhala bez ohřevu po dobu 1 minuty při 400 otáčkách za minutu.

Poslední způsob přípravy emulzí proběhl za pomoci zařízení vortex, kdy byly emulze protřepávány po dobu 1 minuty na stupni 3, který odpovídá 1 250 otáčkám za minutu.

U každého vzorku následovalo ověření stability na stolní odstředivce.

15. Koncentrace emulgátoru

U vybraných emulzí č. 1, 5 a 11 byla postupně snižována koncentrace emulgátoru, a to postupně v koncentracích 2,5 %; 2,0 %; 1,5 %; 1,0 % a 0,5 % w/v. Řada vzorků každé emulze byla navážena dle receptur v tabulkách č. 2, 3 a 4.

Nejprve byl na analytických vahách do zkumavky navážen emulgátor, následoval esenciální olej o konstantní hmotnosti 0,15 g. K dosažení celkové hmotnost 10,0 g byl přidán cukerný roztok. Následovala homogenizace připravených směsí na homogenizátoru po dobu 1 minuty při rychlosti 3. Tato rychlost je ekvivalentní 14 000 otáčkám za minutu.

U každého vzorku následovalo ověření stability na stolní odstředivce.

Označení emulze	Látka	Koncentrace [%]	Množství [g]
1	Cukerný roztok	96,00	9,60
	Sucragel AP V2	2,50	0,25
	Tymián	1,50	0,15
	Cukerný roztok	96,50	9,65
	Sucragel AP V2	2,00	0,20
	Tymián	1,50	0,15
	Cukerný roztok	97,00	9,70
	Sucragel AP V2	1,50	0,15
	Tymián	1,50	0,15
	Cukerný roztok	97,50	9,75
	Sucragel AP V2	1,00	0,10
	Tymián	1,50	0,15
	Cukerný roztok	98,00	9,80
	Sucragel AP V2	0,50	0,05
	Tymián	1,50	0,15

Tabulka 2: Receptura emulze č. 1.

Označení emulze	Látka	Koncentrace [%]	Množství [g]
5	Cukerný roztok	96,00	9,60
	Sucragel AP V2/Sucrablend SP V2 2:1	2,50	0,25
	Tymián	1,50	0,15
	Cukerný roztok	96,50	9,65
	Sucragel AP V2/Sucrablend SP V2 2:1	2,00	0,20
	Tymián	1,50	0,15
	Cukerný roztok	97,00	9,70
	Sucragel AP V2/Sucrablend SP V2 2:1	1,50	0,15
	Tymián	1,50	0,15
	Cukerný roztok	97,50	9,75
	Sucragel AP V2/Sucrablend SP V2 2:1	1,00	0,10
	Tymián	1,50	0,15
	Cukerný roztok	98,00	9,80
	Sucragel AP V2/Sucrablend SP V2 2:1	0,50	0,05
	Tymián	1,50	0,15

Tabulka 3: Receptura emulze č. 5.

Označení emulze	Látka	Koncentrace [%]	Množství [g]
11	Cukerný roztok	96,00	9,60
	Natpure Sol SL	2,50	0,25
	Tymián	1,50	0,15
	Cukerný roztok	96,50	9,65
	Natpure Sol SL	2,00	0,20
	Tymián	1,50	0,15
	Cukerný roztok	97,00	9,70
	Natpure Sol SL	1,50	0,15
	Tymián	1,50	0,15
	Cukerný roztok	97,50	9,75
	Natpure Sol SL	1,00	0,10
	Tymián	1,50	0,15
	Cukerný roztok	98,00	9,80
	Natpure Sol SL	0,50	0,05
	Tymián	1,50	0,15

Tabulka 4: Receptura emulze č. 11.

16. Testování různých esenciálních olejů

V rámci pokusu byly u původních receptur emulzí č. 1, 5 a 11 otestovány vybrané esenciální oleje z hřebíčku a skořicové kůry a jejich možný vliv na stabilitu emulze.

Nejprve byly naváženy emulgátory v množství 0,30 g a následně k nim byly přidány esenciální oleje o hmotnosti 0,15 g a 9,55 g cukerného roztoku (viz tabulka č. 5 a 6).

Dispergace složek probíhala s pomocí homogenizátoru po dobu 1 minuty při nastavení rychlosti 3, což odpovídalo 14 000 otáčkám za minutu.

U každého vzorku následovalo ověření stability na stolní odstředivce.

Označení emulze	Látka	Koncentrace [%]	Množství [g]
1	Cukerný roztok	95,50	9,55
	Sucragel AP V2	3,00	0,30
	Hřebíček	1,50	0,15
5	Cukerný roztok	95,50	9,55
	Sucragel AP V2/Sucrablend SP V2 2:1	3,00	0,30
	Hřebíček	1,50	0,15
11	Cukerný roztok	95,50	9,55
	Natpure Sol SL	3,00	0,30
	Hřebíček	1,50	0,15

Tabulka 5: Receptura emulze s esenciálním olejem z hřebíčku.

Označení emulze	Látka	Koncentrace [%]	Množství [g]
1	Cukerný roztok	95,50	9,55
	Sucragel AP V2	3,00	0,30
	Skořice kůra	1,50	0,15
5	Cukerný roztok	95,50	9,55
	Sucragel AP V2/Sucrablend SP V2 2:1	3,00	0,30
	Skořice kůra	1,50	0,15
11	Cukerný roztok	95,50	9,55
	Natpure Sol SL	3,00	0,30
	Skořice kůra	1,50	0,15

Tabulka 6: Receptura emulze s esenciálním olejem z kůry skořice.

17. Ověření stability emulzí

Ověření stability proběhlo prostřednictvím stolní odstředivky s vysokým výkonem Rotina 380R od firmy Hettich. Všechny připravené vzorky byly v plastových nádobkách postupně vloženy do nástavců. Test probíhal při nastavení zařízení na 1 500 otáček za minutu a na teplotu 20 °C po dobu 10 minut. Po proběhlém testu byl zhodnocen stav každého vzorku.

18. Dlouhodobé pozorování připravených vzorků

Pozorování vzorků a jejich případných změn uskladněných v průhledných plastových uzavíratelných zkumavkách při běžné pokojové teplotě probíhalo po dobu 3 dnů. Následně byl interval prodloužen na 14 dní. Celkově probíhalo pozorování 1 měsíc od přípravy vzorků. Výsledky byly zaznamenávány pořízením fotografie.

19. Testování emulzí na včelách

Emulze vybrané na základě testu stability byly následně postoupeny prvotnímu testování vlivu na včelu medonosnou.

Dle následující tabulky s recepturami byly připraveny emulze č. 1, 5 a 11. Postup přípravy byl shodný s předchozím experimentem.

Nejprve byly naváženy na celkové množství 40 g emulze emulgátory o koncentraci 1 %, následně k nim bylo přidáno 1,5 % esenciálního oleje a tato směs byla doplněna odpovídajícím množstvím cukerného roztoku. Dispergace složek probíhala s pomocí homogenizátoru po dobu 1 minuty při nastavení rychlosti 3, což odpovídalo 14 000 otáčkám za minutu.

Označení emulze	Látka	Koncentrace [%]	Množství [g]
1	Cukerný roztok	97,50	39,00
	Sucragel AP V2	1,00	0,40
	Éterický olej*	1,50	0,60
5	Cukerný roztok	97,50	39,00
	Sucragel AP V2/Sucrablend SP V2 2:1	1,00	0,40
	Éterický olej*	1,50	0,60
11	Cukerný roztok	97,50	39,00
	Natpure Sol SL	1,00	0,40
	Éterický olej*	1,50	0,60
* Skořice kůra, hřebíček			

Tabulka 7: Receptury emulzí použitých při prvním pokusu na včelách.

Pro tento experiment byl jako kontrola použit cukerný roztok v poměru 3:2 cukr/voda společně s emulgátorem v koncentraci 1 %. Abychom vyloučili vliv esenciálního oleje na životaschopnost včel, bylo sledováno působení směsi cukerného roztoku a emulgátoru. Při pokusu s esenciálními oleji byly použity 2 testované oleje – skořicový i hřebíčkový.

Pro experiment byly připraveny klícky z plastových nádob, do nichž byly vytvořeny dýchací otvory a přidána 2 krmítka vytvořená z mikrozkumavek o objemu 2 ml pro emulzi a vodu. Následně bylo do takto připravených klícek odchyceno 30 včel. Každá testovaná emulze byla zastoupena třemi shodnými vzorky. Celkem tedy bylo použito 27 klícek.

Obrázek 1: Pohled shora na klícku se včelami.

Obrázek 2: Boční pohled na klícku se včelami.

Takto připravené klícky byly uloženy do inkubátoru, v němž se teplota pohybovala okolo 28 ±0,5 °C. Tento experiment byl naplánován na 14 dní, přičemž každý den

probíhalo odečítání a odstraňování uhynulých včel, odečet spotřeby krmiva a také jeho následné doplňování. Na závěr byla doplněna i voda a včely byly opět uloženy do inkubátoru.

Během prvního testování 1,5% koncentrace esenciálního oleje bylo zjištěno, že tato koncentrace je pro včely příliš toxická, jelikož došlo k úhynu větší části včel hned po 3 dnech od počátku experimentu. Na základě této informace byla snížena koncentrace esenciálních olejů, a to na 0,5 % (viz tabulka 8). Postup experimentu byl totožný. Výsledky jsou vyhodnoceny v následující kapitole.

Označení emulze	Látka	Koncentrace [%]	Množství [g]
1	Cukerný roztok	98,50	39,40
	Sucragel AP V2	1,00	0,40
	Éterický olej*	0,50	0,20
5	Cukerný roztok	98,50	39,40
	Sucragel AP V2/Sucrablend SP V2 2:1	1,00	0,40
	Éterický olej*	0,50	0,20
11	Cukerný roztok	98,50	39,40
	Natpure Sol SL	1,00	0,40
	Éterický olej*	0,50	0,20
* Skořice kůra, hřebíček			

Tabulka 8: Receptury emulzí použitých při druhém pokusu na včelách.

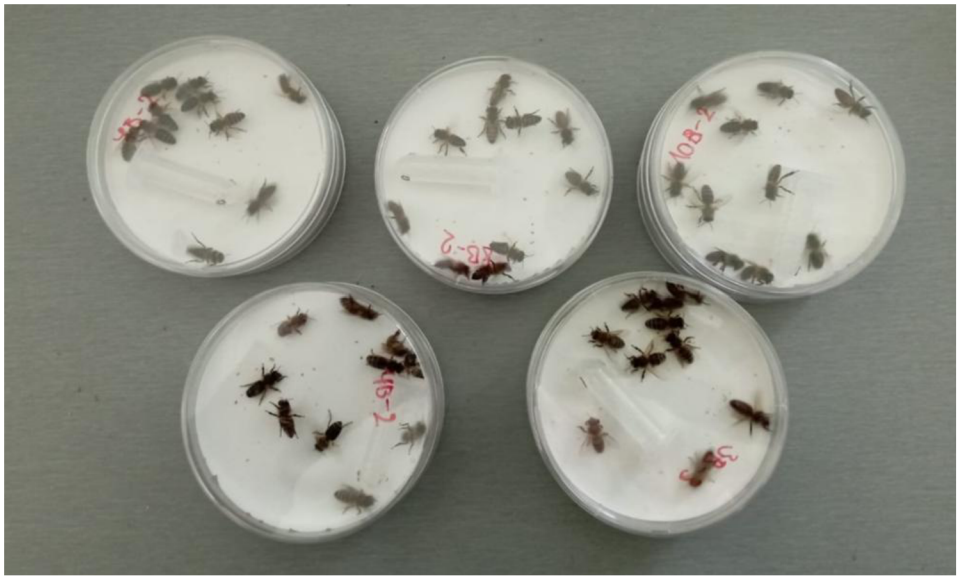
Na základě předchozích experimentů byl proveden poslední experiment s esenciálními oleji o koncentraci 0,1 % a pouze 2 emulgátory – Sucragel AP a Natpure Sol SL. Do testování byl navíc přidán esenciální olej tymiánu červeného a thymol. Postup přípravy emulzí byl totožný s předchozími experimenty.

V tabulce níže jsou opět uvedeny receptury testovaných emulzí při závěrečném pokusu.

Označení emulze	Látka	Koncentrace [%]	Množství [g]
1	Cukerný roztok	98,90	98,90
	Sucragel AP V2	1,00	1,00
	Éterický olej*	0,10	0,10
11	Cukerný roztok	98,90	98,90
	Natpure Sol SL	1,00	1,00
	Éterický olej*	0,10	0,10
* Skořice kůra, hřebíček, tymián červený, thymol			

Tabulka 9: Receptury emulzí použitých při 3. pokusu na včelách

Pro tento experiment byly vytvořeny klícky z Petriho misek. Byly vybaveny filtračním papírem a zkumavkou o objemu 2 ml, v níž byla krmná emulze. Následně bylo do klícek odchyceno 10 včel. Každá testovaná emulze byla zastoupena třemi shodnými vzorky. Celkem tedy bylo použito 30 klícek.

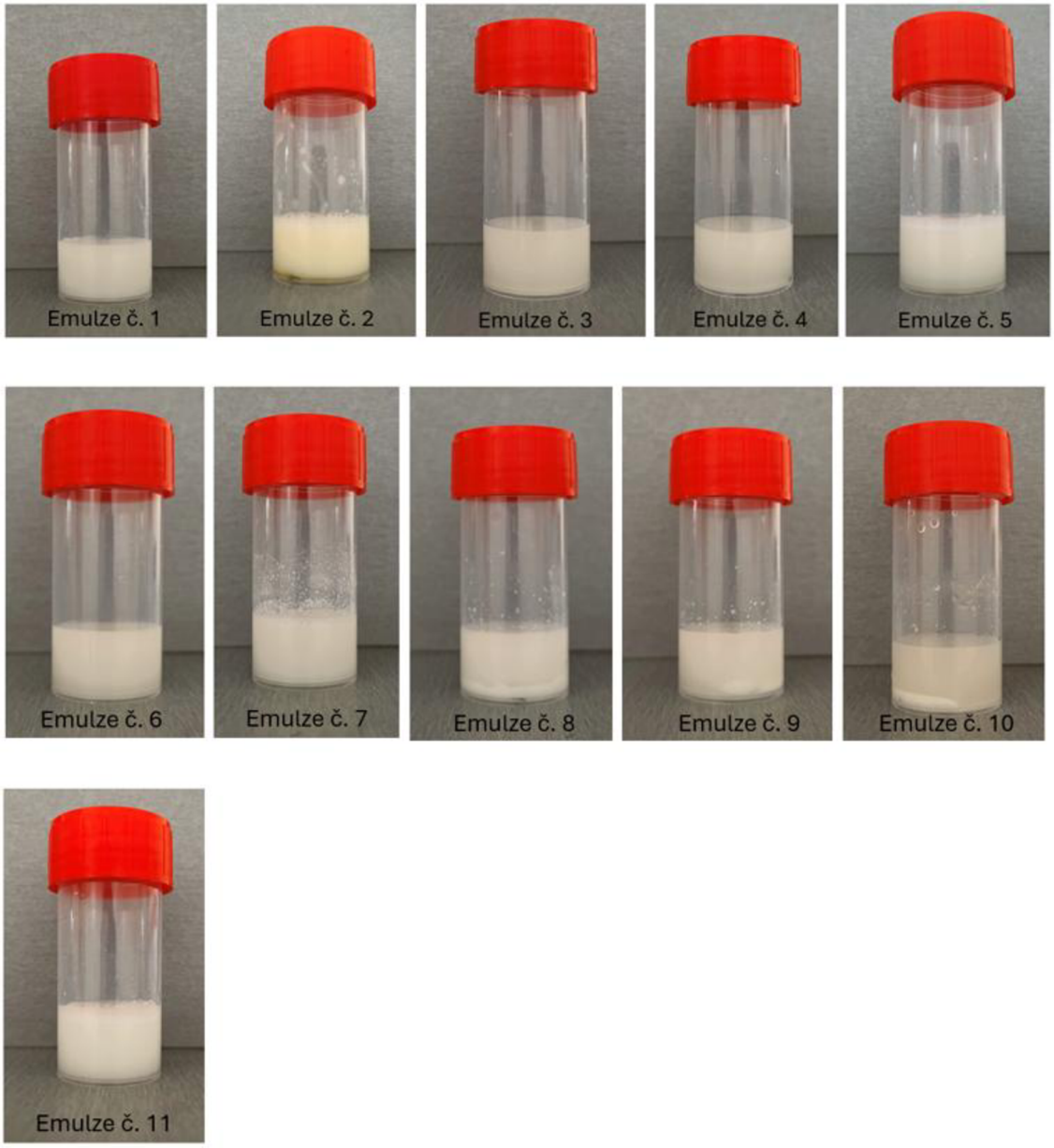


Obrázek 3: Petriho misky se včelami.

Obrázek 4: Petriho miska se včelami v detailu.

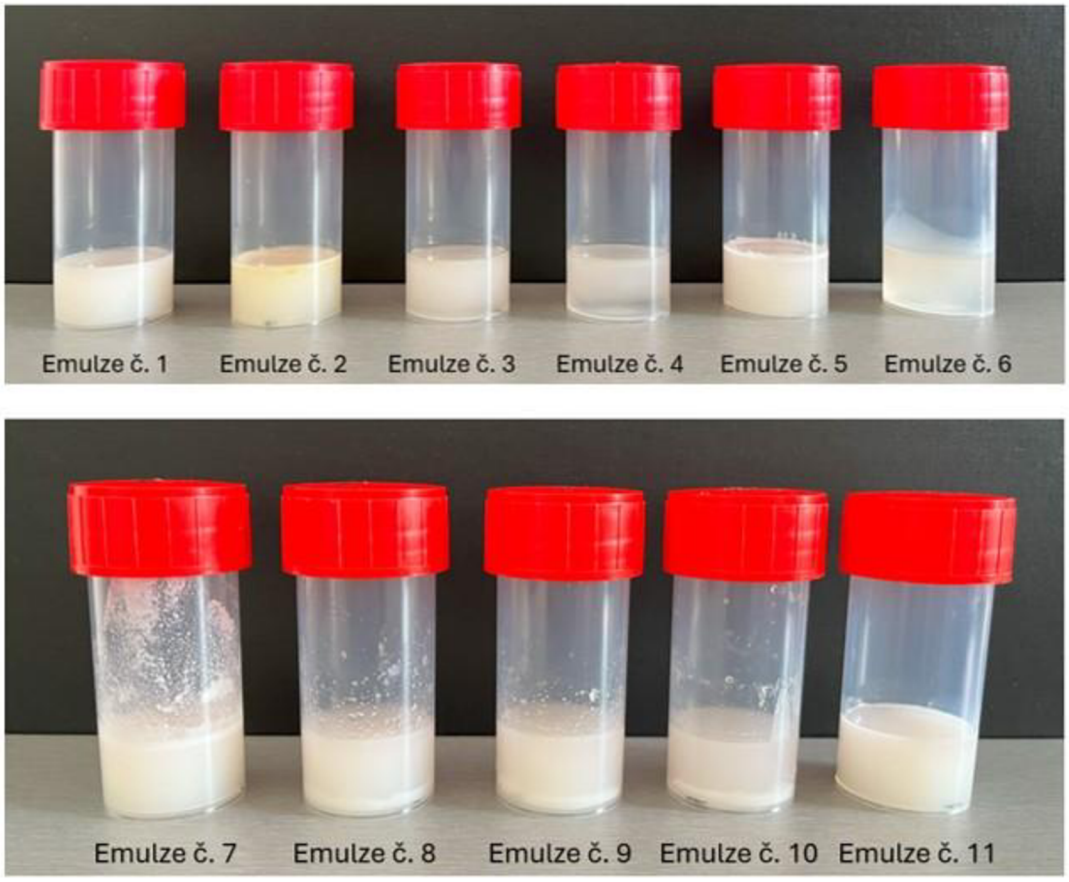
20. Výsledky a diskuze

20.1. Screening emulzí



Obrázek 5: Příprava emulzí pomocí homogenizátoru.

Jak je možné vidět na obrázku 5, homogenizací byly připraveny mléčně až žlutě zabarvené emulze, v některých případech s jemnou pěnou na povrchu. Emulze č. 2 ihned po přípravě vykazovala nestabilitu. Rozdělení olejové a vodné fáze bylo možné identifikovat jako žlutý prstenec na povrchu. U emulzí č. 7 až 10 došlo k vysrážení emulgátoru ve formě tuhého vosku.



Obrázek 6: Homogenizace po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min.

Výsledek po zatížení emulzí na stolní odstředivce je zobrazen na obrázku (viz obrázek 6). V případě emulze č. 2 došlo k úplnému vyvázání emulgátoru lecitinu, který společně se zbytkem olejové fáze vytvořil zřetelný žlutý prstenec na povrchu emulze. U emulzí č. 3, 4 a 6 je okem znatelné postupné rozdělování olejové a vodné fáze.

Po homogenizaci vykazovaly emulze mléčnou až žlutou barvu, což je charakteristické pro emulze s jemně dispergovanou olejovou fází ve vodné fázi. V některých případech se na povrchu objevila jemná pěna, což je u emulzí běžný jev. Nicméně výsledky ukázaly, že stabilita emulzí byla různá, což může mít významný vliv na jejich použitelnost a chování při skladování.

Emulze č. 2 vykazovala ihned po přípravě nestabilitu, což se projevilo separací olejové a vodné fáze. Tento jev byl pozorován jako zřetelný žlutý prstenec na povrchu, což naznačuje, že emulze nebyla schopná udržet stabilní disperzi a olejová fáze se oddělila od vodné. Tato nestabilita může být způsobena buď nedostatečnou koncentrací

emulgátoru, nevhodnými podmínkami homogenizace, nebo nevhodností použitého emulgátoru pro tento konkrétní typ emulze.

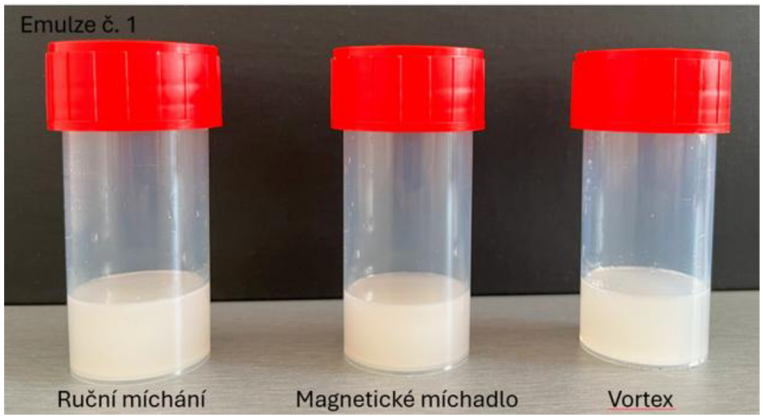
U emulzí č. 7 až 10 došlo k vysrážení emulgátoru ve formě tuhého vosku. Tyto typy emulgátorů nejsou vhodné pro zamýšlenou aplikaci.

U emulzí č. 3, 4 a 6 bylo okem patrné postupné rozdělování olejové a vodné fáze, což znamená, že i tyto emulze byly náchylné k destabilizaci, ačkoli tento proces probíhal pomaleji než u emulze č. 2. Tyto emulze vykazovaly známky nedostatečné stability, ale proces oddělování nebyl tak výrazný, což může naznačovat, že byly stabilizovány ve větší míře než emulze č. 2, ale i přesto byly stále náchylné k separaci.

Z výše zmíněných důvodů byly emulze č. 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 z dalších pokusů vyřazeny.

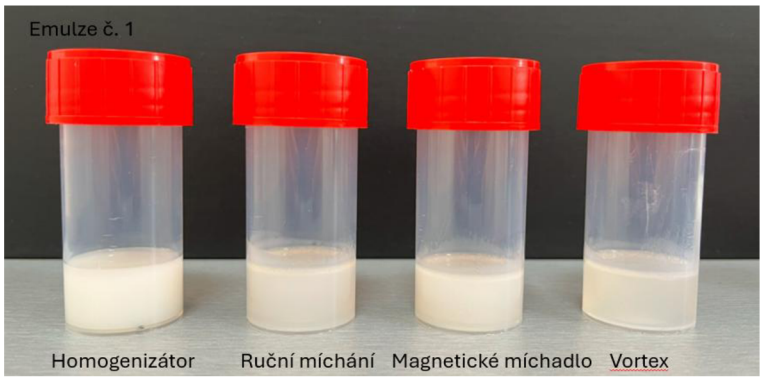
20.2. Způsoby emulgace

20.2.1. Sucragel AP V2



Obrázek 7: Emulze č. 1 připravená různými způsoby.

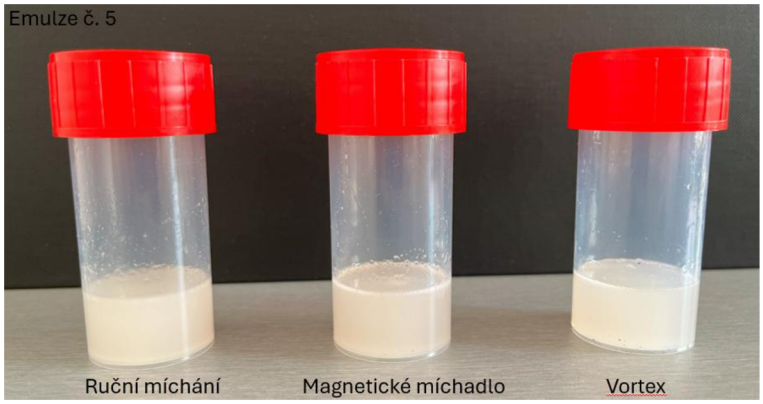
Emulze č. 1 byla ihned po přípravě ručním mícháním, magnetickým míchadlem a vortexem stabilní (viz obr. 7).



Obrázek 8: Emulze č. 1 připravená různými způsoby po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min.

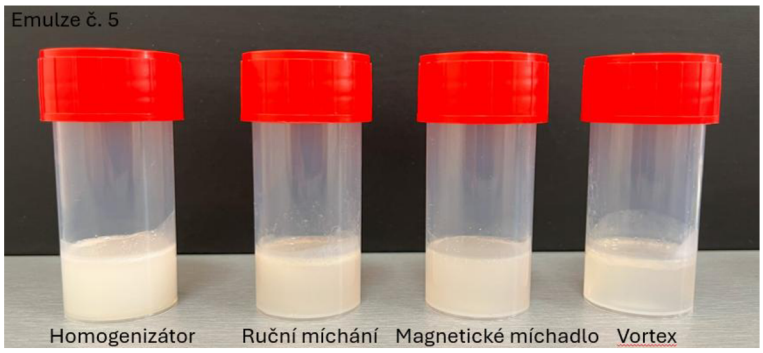
V porovnání s emulzí připravenou pomocí homogenizátoru IKA T18 Ultra Turrax vykazovala největší nestabilitu emulze připravená ručním mícháním, v níž po zatížení emulzí na stolní odstředice došlo rychle k rozdělování olejové a vodné fáze. Druhý nejméně stabilní vzorek byl připravený vortexováním. Emulze zhotovená pomocí magnetického míchadla byla vizuálně zhodnocena jako stabilnější, nicméně i ta vykazovala postupné změny ve stabilitě. Po 10 minutách od provedení experimentu se obě fáze již rozdělovaly.

20.2.2. Sucragel AP V2 a Sucrablend SP V2



Obrázek 9: Emulze č. 5 připravená různými způsoby.

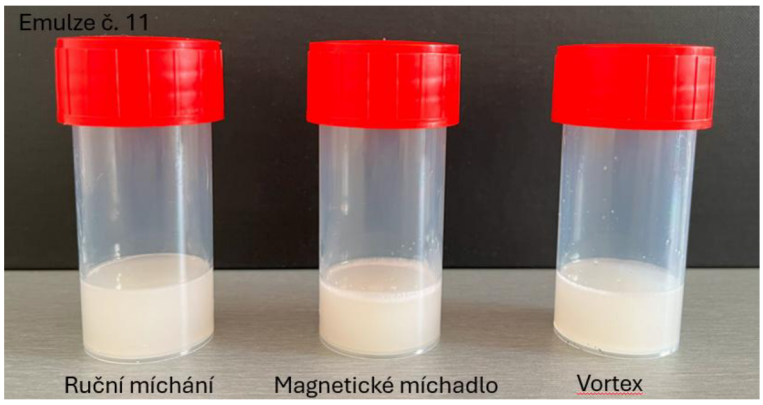
Emulze č. 5 byla ihned po přípravě ručním mícháním, magnetickým míchadlem a vortexem stabilní (viz obr. 9).



Obrázek 10: Emulze č. 5 připravená různými způsoby po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min.

Nejmenší stabilitu vykazovala emulze připravená vortexováním, jak je zřejmé na obrázku (viz obr. 10). Ručním mícháním a přípravou vzorku na magnetickém míchadle taktéž nebylo dosaženo stabilní emulze, po zatížení emulze došlo k její destabilizaci a postupnému oddělování jednotlivých fází.

20.2.3. Natpure Sol SL



Obrázek 11: Emulze č. 11 připravená různými způsoby.

Emulze byla ihned po přípravě ručním mícháním, magnetickým míchadlem a vortexem stabilní. Při míchání magnetickým míchadlem došlo k vytvoření jemné pěny na povrchu (viz obr. 11).

Obrázek 12: Emulze č. 11 připravená různými způsoby po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min.

Po zatížení emulze odstředivkou došlo u vzorku připraveného ručním mícháním k úplnému oddělení olejové a vodné fáze za vzniku okem identifikovatelného olejového prstence na povrchu emulze. V případě vzorků připravených za pomoci vortexu a magnetického míchadla docházelo k postupnému oddělování fází do 15 minut po ustálení po zatížení odstředivkou.

V této diplomové práci byly porovnány různé metody emulgace, které byly použity k přípravě emulzí s různými složkami a jež byly hodnoceny za účelem zjištění nejvhodnějších emulzí pro následující experimenty. Všechny pokusy zahrnovaly homogenizátor, ruční míchání, magnetické míchadlo a vortexování, přičemž stabilita emulzí byla hodnocena jak bezprostředně po přípravě, tak i po 10 minutách při 1 500 otáčkách za minutu zatížení na stolní odstředivce.

Dle zjištěných výsledků lze konstatovat, že všechny emulze č. 1, 5 a 11 byly ihned po přípravě stabilní u všech použitých metod (ruční míchání, magnetické míchadlo, vortex). Tyto výsledky naznačují, že všechny 3 metody byly schopné vytvořit emulzi s počáteční stabilitou. Nicméně, jak je vidět na obrázcích, po zátěžovém testu na odstředivce po 10 minutách míchání se stabilita těchto emulzí dramaticky změnila.

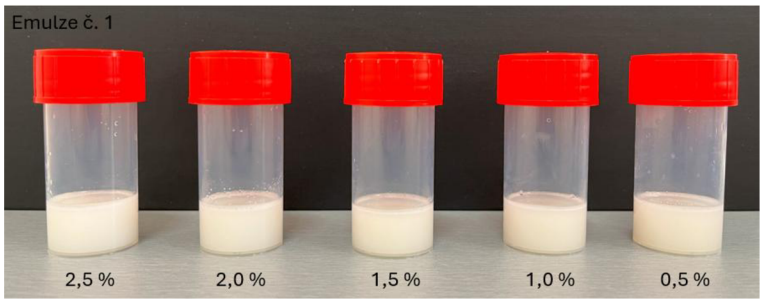
Největší nestabilitu vykázala emulze připravená ručním mícháním, která se ihned po odstředění začala dělit na olejovou a vodnou fázi. Tento jev může být způsoben nedostatečným energetickým vkladem do disperze při ručním míchání, což může bránit stabilnímu rozptýlení olejových kapek ve vodní fázi. Vortexování, druhá metoda s nižší stabilitou, také vedla k separaci fází, ale v menší míře než u ručního míchání. Emulze připravená magnetickým míchadlem vykazovala relativně lepší stabilitu,

ačkoli i u těchto vzorků bylo patrné, že po určitém čase došlo k postupnému oddělování fází.

V porovnání s použitím homogenizátoru, jež vytvořil nejstabilnější emulzi, byly všechny zmíněné metody méně efektivní, což ukazuje, jak klíčový je intenzivní mechanický zásah pro dosažení stabilních emulzí. Podobné závěry přináší také zahraniční literatura, například studie zaměřená na stabilitu nanoemulzí, která potvrzuje, že výběr metody emulgace zásadně ovlivňuje flokulaci a separaci fází (Urbina-Villalba et al., 2012). Dále studie věnující se stabilizaci emulzí přírodními emulgátory uvádí, že jak volba emulgátoru, tak metoda emulgace hrají zásadní roli při tvorbě stabilních systémů (Tcholakova et al., 2017).

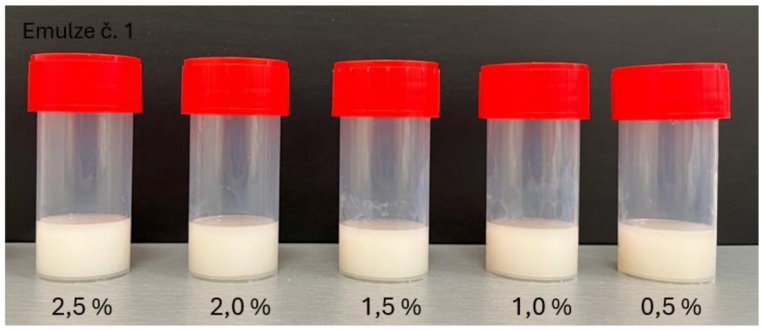
20.3. Koncentrace emulgátorů

20.3.1. Sucragel AP V2

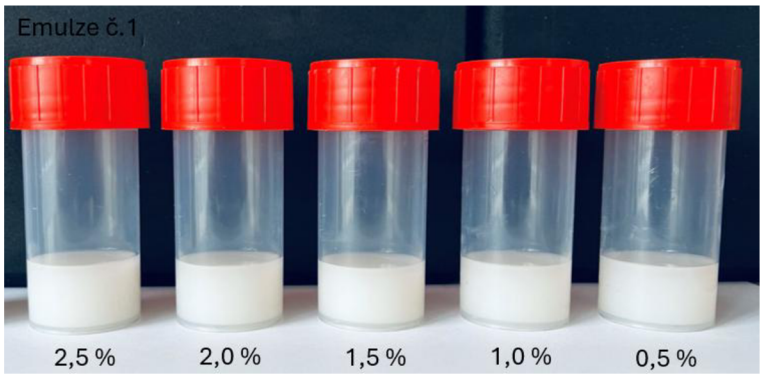


Obrázek 13: Emulze č. 1 s různými koncentracemi emulgátoru.

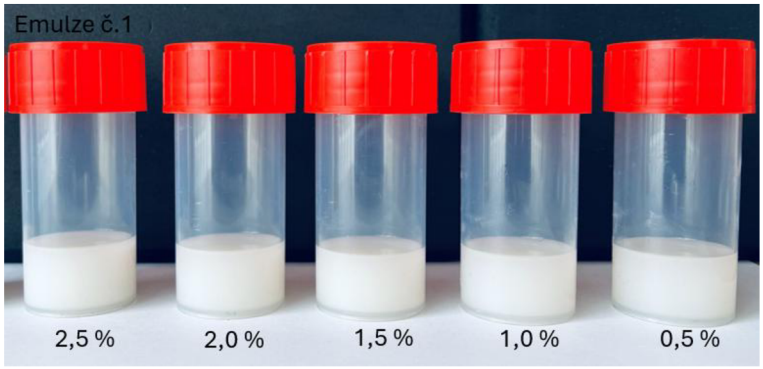
Vzorky emulze č. 1 s jednotlivými koncentracemi emulgátoru byly po přípravě za pomoci homogenizátoru stabilní (viz obr. 13).



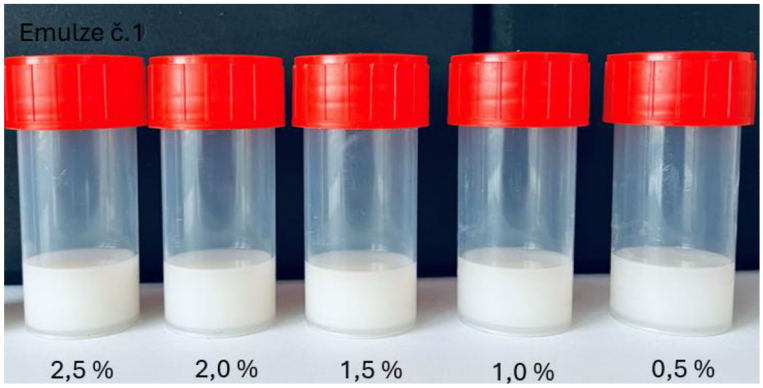
Obrázek 14: Emulze č. 1 s různými koncentracemi emulgátoru po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min.



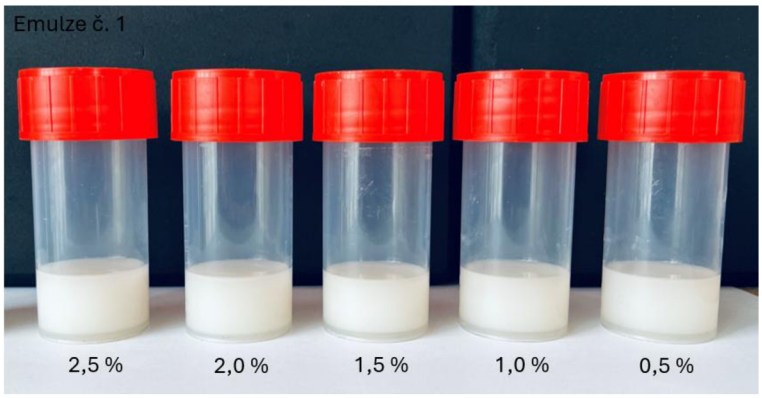
Obrázek 15: Emulze č. 1 s různými koncentracemi emulgátoru po 24 hodinách.



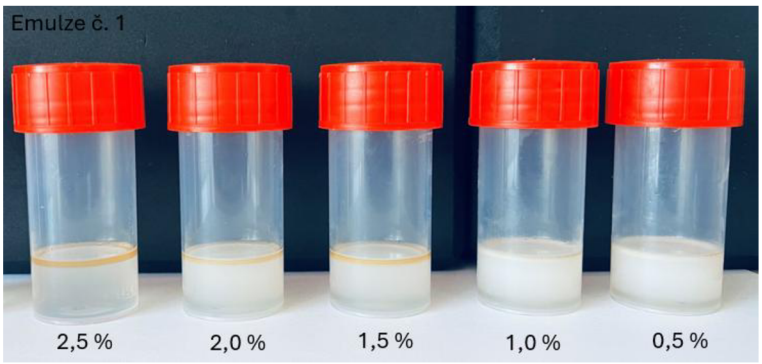
Obrázek 16: Emulze č. 1 s různými koncentracemi emulgátoru po 48 hodinách.



Obrázek 17: Emulze č. 1 s různými koncentracemi emulgátoru po 72 hodinách.



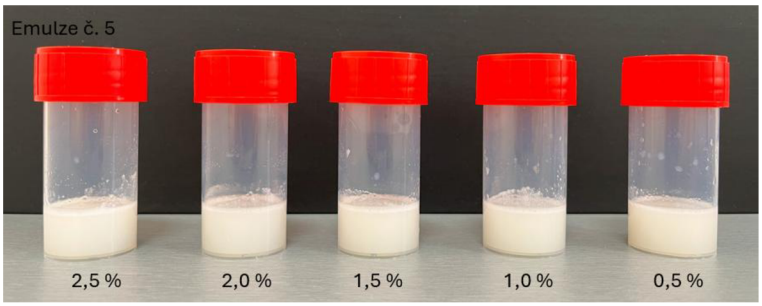
Obrázek 18: Emulze č. 1 s různými koncentracemi emulgátoru po 14 dnech.



Obrázek 19: Emulze č. 1 s různými koncentracemi emulgátoru po 30 dnech.

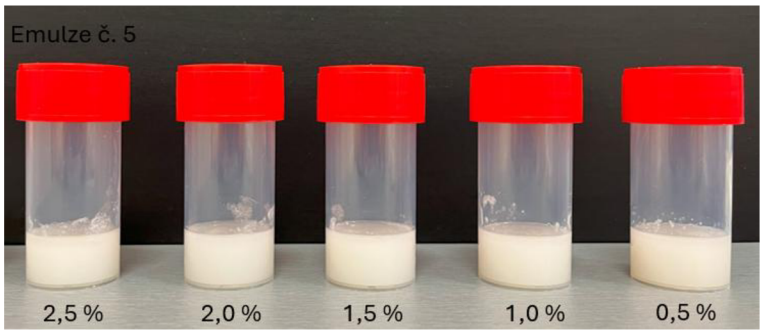
Vzorky emulze č. 1 nevykazovaly znaky destabilizace v žádné testované koncentraci emulgátoru po zatížení na odstředivce, ani během pozorování po dobu následujících 3 dní. Po 14 dnech byly všechny emulze o různých koncentracích emulgátoru stále stabilní, po 30 dnech již byl zřetelný žlutý kroužek vysráženého emulgátoru s esenciálním olejem na povrchu všech emulzí.

20.3.2. Sucragel AP V2 a Sucrablend SP V2

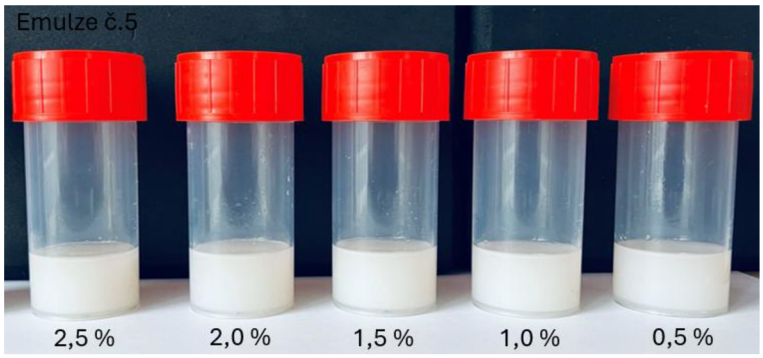


Obrázek 20: Emulze č. 5 s různými koncentracemi emulgátoru.

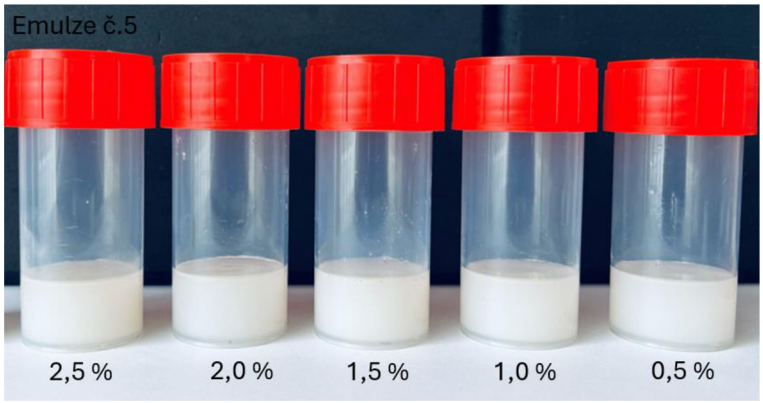
Vzorky emulze č. 5 s jednotlivými koncentracemi emulgátoru byly po přípravě za pomoci homogenizátoru stabilní (viz obr. 20).



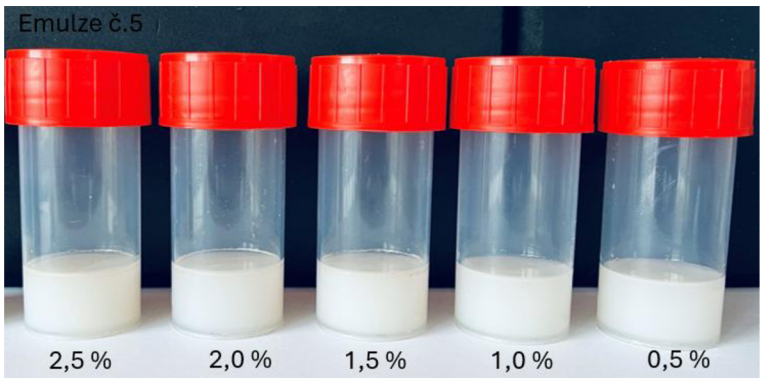
Obrázek 21: Emulze č. 5 s různými koncentracemi emulgátoru po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min.



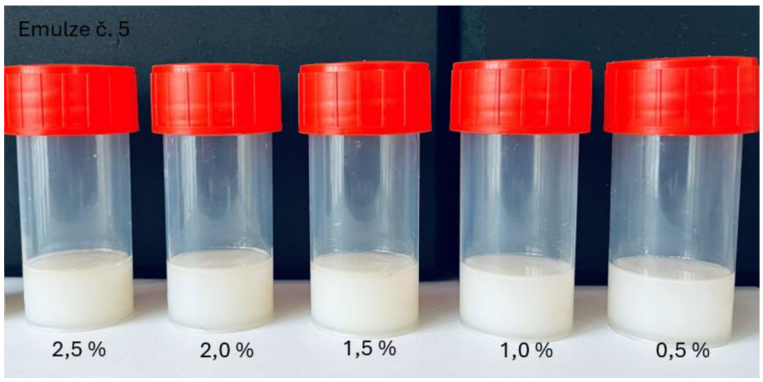
Obrázek 22: Emulze č. 5 s různými koncentracemi emulgátoru po 24 hodinách.



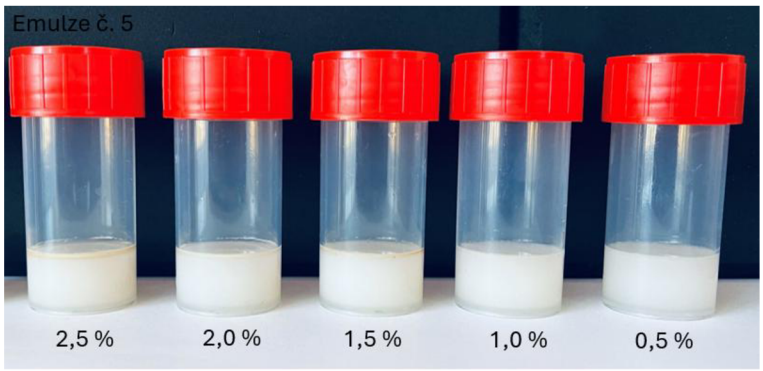
Obrázek 23: Emulze č. 5 s různými koncentracemi emulgátoru po 48 hodinách.



Obrázek 24: Emulze č. 5 s různými koncentracemi emulgátoru po 72 hodinách.



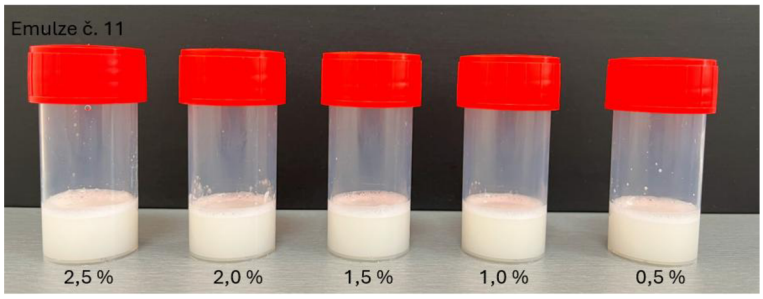
Obrázek 25: Emulze č. 5 s různými koncentracemi emulgátoru po 14 dnech.



Obrázek 26: Emulze č. 5 s různými koncentracemi emulgátoru po 30 dnech.

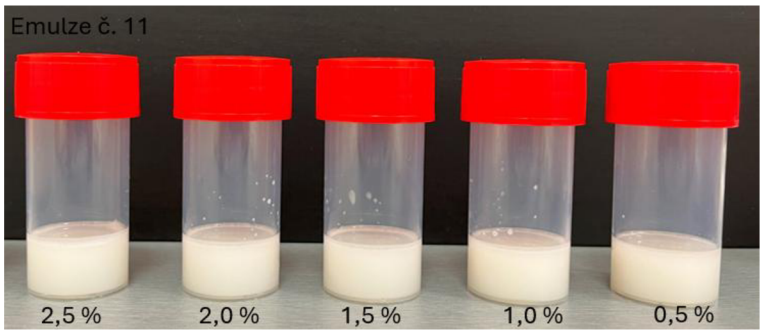
Vzorky emulze č. 5 nevykazovaly znaky destabilizace v žádné testované koncentraci emulgátoru po zatížení na odstředivce ani během pozorování po dobu následujících 3 dní. Po 14 dnech byly všechny emulze o různých koncentracích emulgátoru stále stabilní, po 30 dnech již byl zřetelný žlutý kroužek vysráženého emulgátoru s esenciálním olejem na povrchu emulzí o koncentracích 2,5 %, 2,0 % a 1,5 %. U emulzí s koncentrací 1,0 % a 0,5 % bylo stále možné pozorovat stabilní emulzi.

20.3.3. Natpure Sol SL

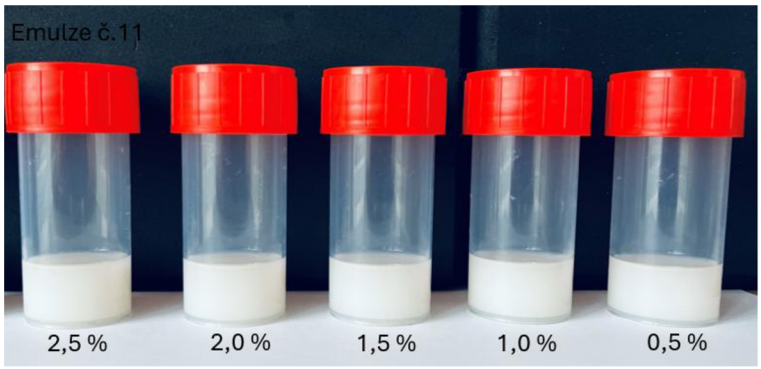


Obrázek 27: Emulze č. 11 s různými koncentracemi emulgátoru.

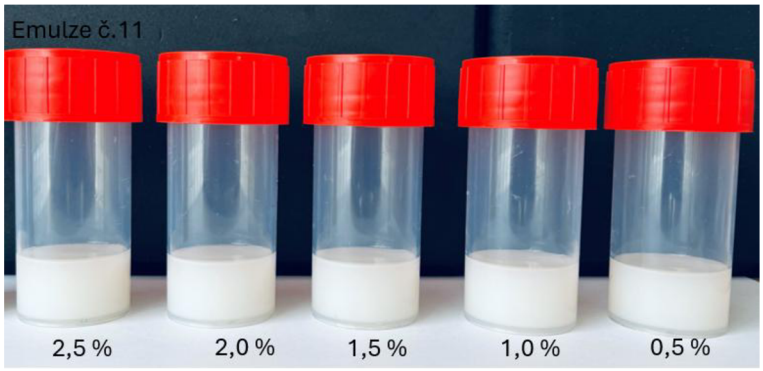
Vzorky emulze č. 11 s jednotlivými koncentracemi emulgátoru byly po přípravě za pomoci homogenizátoru stabilní (viz obr. 27).



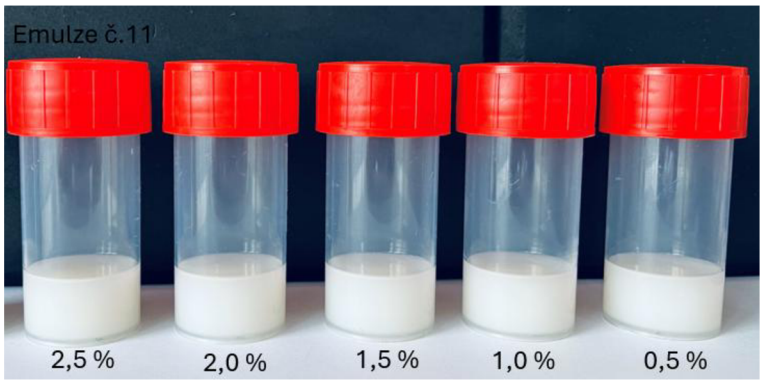
Obrázek 28: Emulze č. 11 s různými koncentracemi emulgátoru po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min.



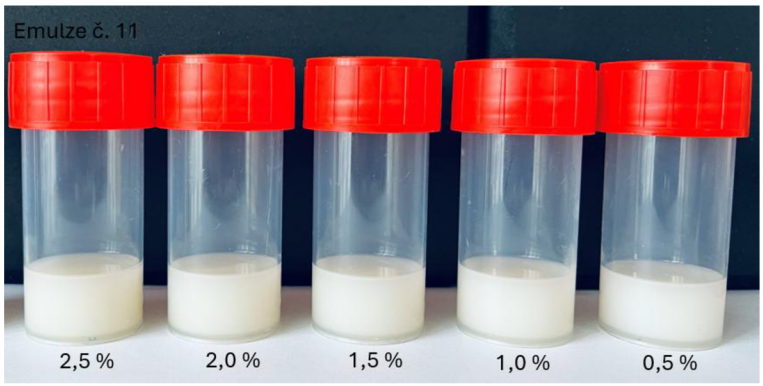
Obrázek 29: Emulze č. 11 s různými koncentracemi emulgátoru po 24 hodinách.



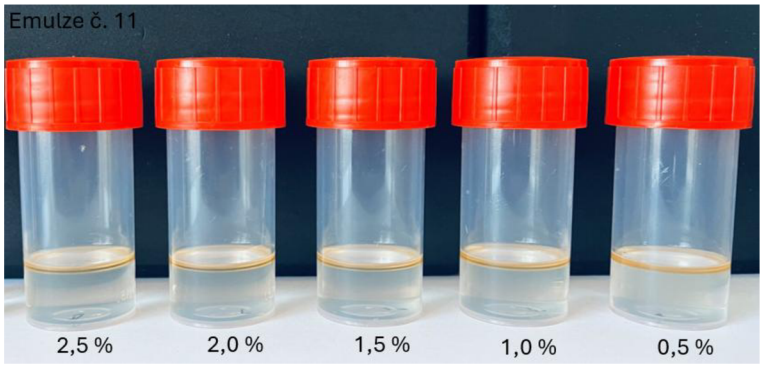
Obrázek 30: Emulze č. 11 s různými koncentracemi emulgátoru po 48 hodinách.



Obrázek 31: Emulze č. 11 s různými koncentracemi emulgátoru po 72 hodinách.



Obrázek 32: Emulze č. 11 s různými koncentracemi emulgátoru po 14 dnech.



Obrázek 33: Emulze č. 11 s různými koncentracemi emulgátoru po 30 dnech.

Vzorky emulze č. 11 nevykazovaly znaky destabilizace v žádné testované koncentraci emulgátoru po zatížení na odstředivce, ani během pozorování po dobu následujících 3 dní. Po 14 dnech byly všechny emulze o různých koncentracích emulgátoru stále stabilní, po 30 dnech již byl zřetelný žlutý kroužek vysráženého emulgátoru s esenciálním olejem na povrchu všech emulzí.

V této části práce byl zjišťován vliv různých koncentrací emulgátorů na stabilitu emulzí, konkrétně na emulze č. 1, č. 5 a č. 11. Byly testovány vzorky připravené homogenizátorem, a to při různých koncentracích emulgátoru. Hodnocení stability bylo provedeno nejen bezprostředně po přípravě, ale také po různých časových intervalech až do 30 dní od přípravy emulzí.

Obr. 13 ukazuje, že všechny vzorky emulze č. 1, připravené s různými koncentracemi emulgátoru, byly ihned po přípravě stabilní, což je očekávaný výsledek při použití homogenizátoru. Po 10 minutách zátěžového testu, jak je zobrazeno na Obr. 14 a po 24 hodinách (viz Obr. 15), nebyla pozorována žádná destabilizace, což svědčí o silné stabilitě těchto emulzí v krátkodobém horizontu. Emulze č. 1 s různými koncentracemi

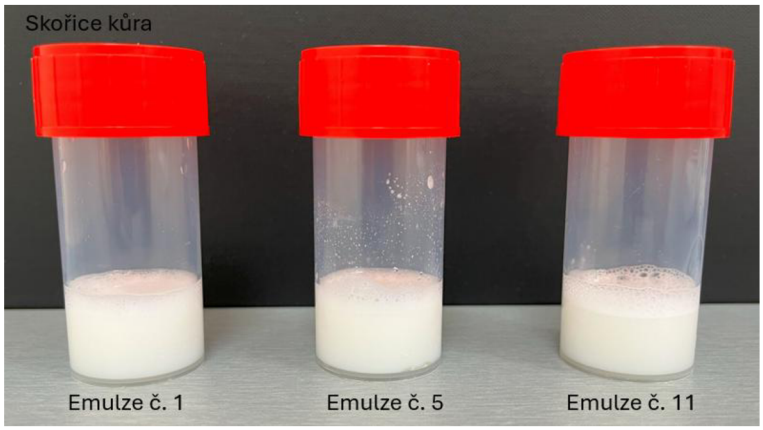
emulgátoru tedy vykazovaly v těchto fázích podobnou stabilitu. Po 48 hodinách (viz Obr. 16) a 72 hodinách (viz Obr. 17) zůstaly emulze stále stabilní. Avšak po 14 dnech (viz Obr. 18) a zejména po 30 dnech (viz Obr. 19) začal být patrný žlutý prstenec vysráženého emulgátoru, a to především v emulzích s vyššími koncentracemi emulgátoru. To naznačuje, že i při použití homogenizátoru může docházet k postupné destabilizaci emulze při delším skladování, zejména u vyšších koncentrací emulgátoru. Tento jev je způsoben vyčerpáním stabilizačních schopností emulgátoru a následným vyvázáním jeho části na povrch.

Podobně jako u emulze č. 1 byly všechny vzorky emulze č. 5 po přípravě stabilní (viz Obr. 20). Po 10 minutách zatížení a 24 hodinách nebyly pozorovány žádné známky destabilizace (viz Obr. 21, Obr. 22). Stabilita se udržela i po 48 a 72 hodinách (viz Obr. 23, Obr. 24). Po 14 dnech (viz Obr. 25) zůstaly všechny emulze stabilní, ačkoli po 30 dnech (viz Obr. 26) byly patrné žluté kroužky vysráženého emulgátoru a esenciálního oleje, a to především u emulzí s vyššími koncentracemi (2,5 %; 2,0 % a 1,5 %). U emulzí s nižšími koncentracemi (1,0 % a 0,5 %) nebyl tento jev patrný, což naznačuje, že nižší koncentrace emulgátoru zajišťují dlouhodobější stabilitu.

U emulzí č. 11 připravených s různými koncentracemi emulgátoru zůstaly vzorky po přípravě stabilní (viz Obr. 27). Stabilita se udržela i po 10 minutách odstřeďování a po 24 hodinách (viz Obr. 28, Obr. 29). V následujících dnech (viz Obr. 30, Obr. 31) byla pozorována stabilita, ale po 14 dnech (viz Obr. 32) a zejména po 30 dnech (viz Obr. 33) se u všech emulzí začaly objevovat známky destabilizace. Stejně jako u předchozích emulzí došlo k tvorbě žlutého prstence na povrchu, což dokazuje, že i při použití vyšších koncentrací není emulgátor schopen zajistit stabilitu emulzí na dlouhou dobu. Tento jev byl patrný u všech koncentrací, ale více u vyšších koncentrací emulgátoru.

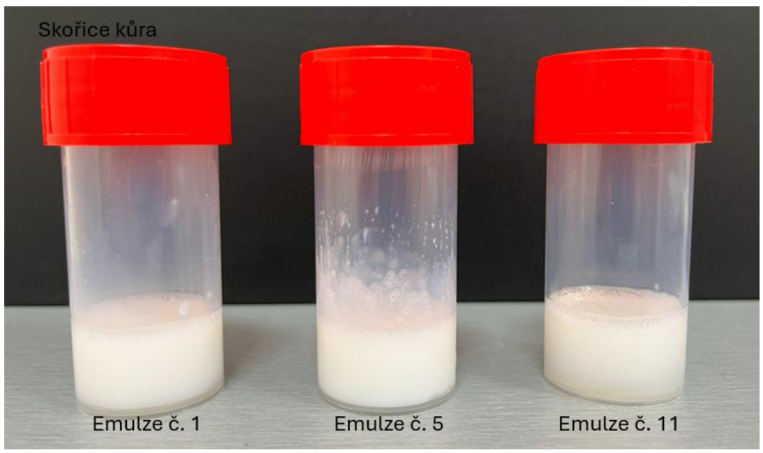
20.4. Test různých esenciálních olejů

20.4.1. Esenciální olej skořice kůra

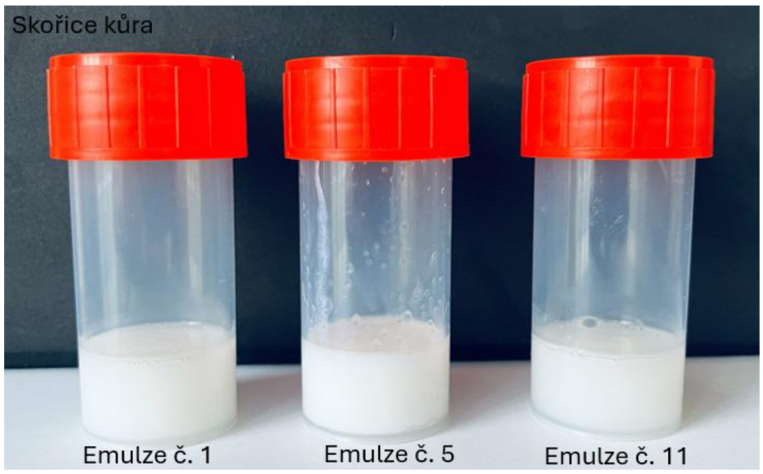


Obrázek 34: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z kůry skořice.

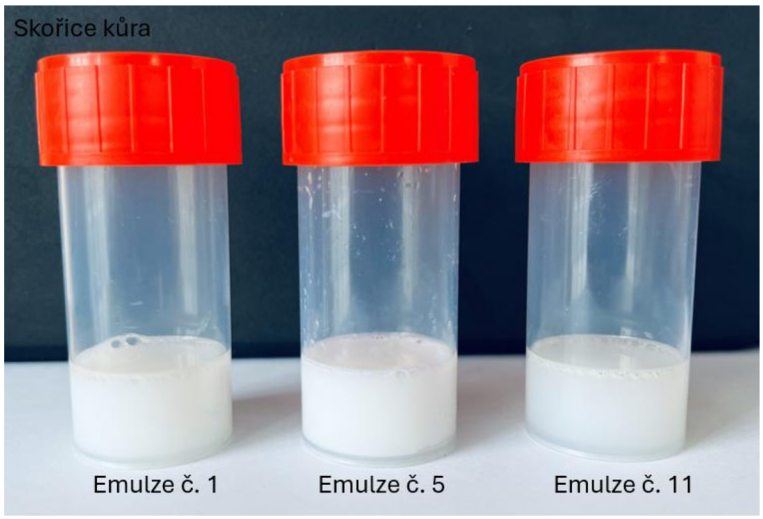
Vzorky emulzí obsahující esenciální olej z kůry skořice byly ihned po přípravě za pomoci homogenizátoru stabilní (viz obr. 34).



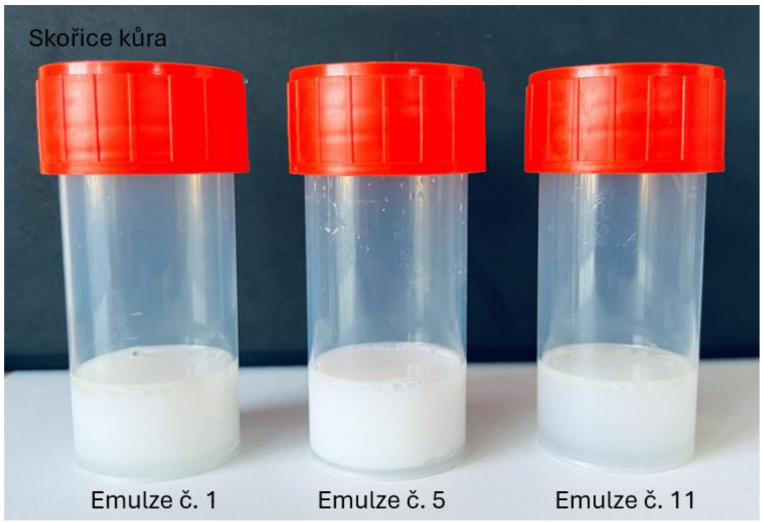
Obrázek 35: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z kůry skořice po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min.



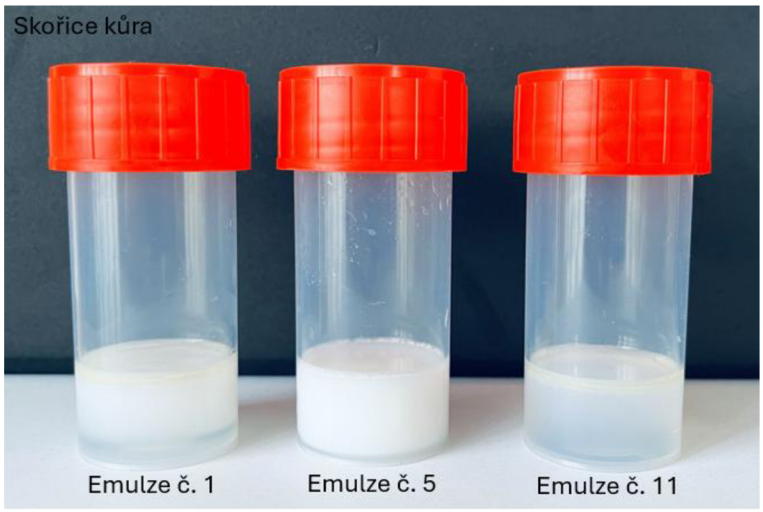
Obrázek 36: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z kůry skořice po 24 hodinách.



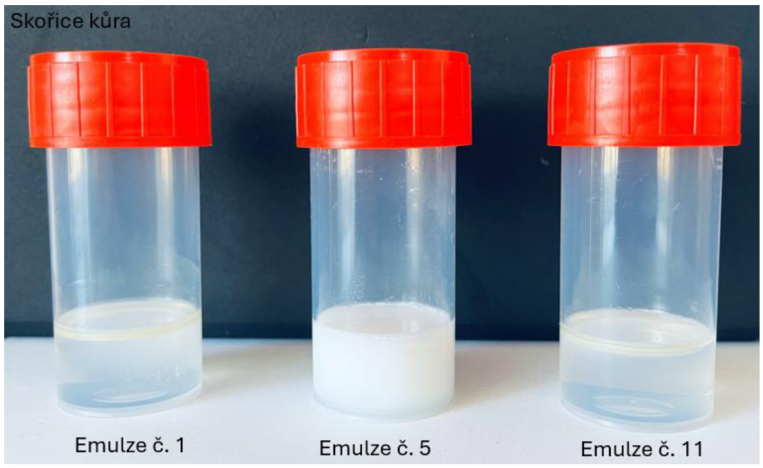
Obrázek 37: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z kůry skořice po 48 hodinách.



Obrázek 38: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z kůry skořice po 72 hodinách.



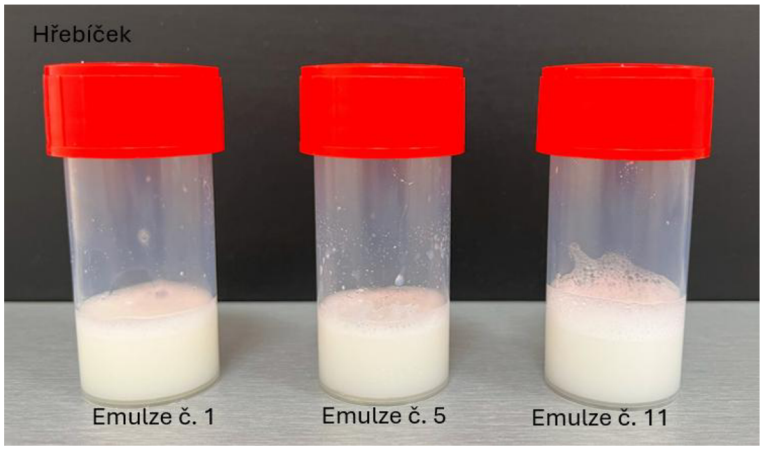
Obrázek 39: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z kůry skořice po 14 dnech.



Obrázek 40: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z kůry skořice po 30 dnech.

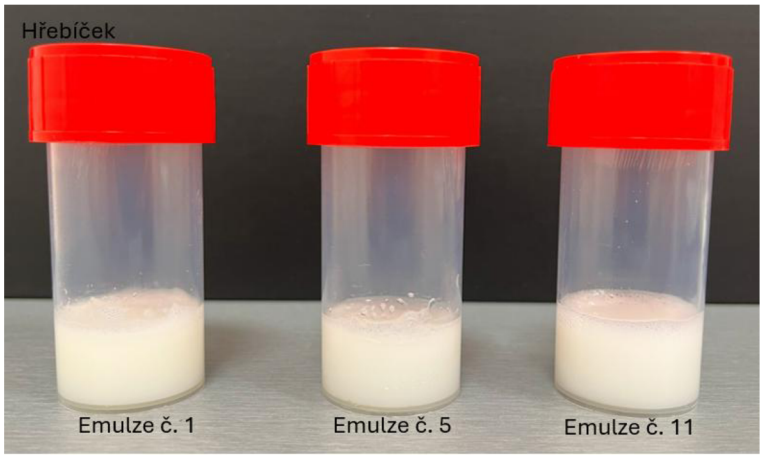
Vzorky emulzí s esenciálním olejem skořice byly po zatížení na odstředivce homogenní, totéž po 24 hodinách. Po 48 hodinách vykazovaly emulze č. 1 a 11 počátek rozpadu. Na povrchu emulze č. 1 se vytvořily kapénky vyvázané olejové fáze. Emulze č. 11 vytvořila taktéž prstenec olejové fáze na povrchu a vyčeřila se. Emulze č. 5 byla stabilní. Po 14 a 30 dnech bylo možné identifikovat výrazný rozpad emulzí č. 1 a 11 (viz obr. 39, 40). Emulze č. 5 byla stále stabilní.

20.4.2. Esenciální olej z hřebíčku

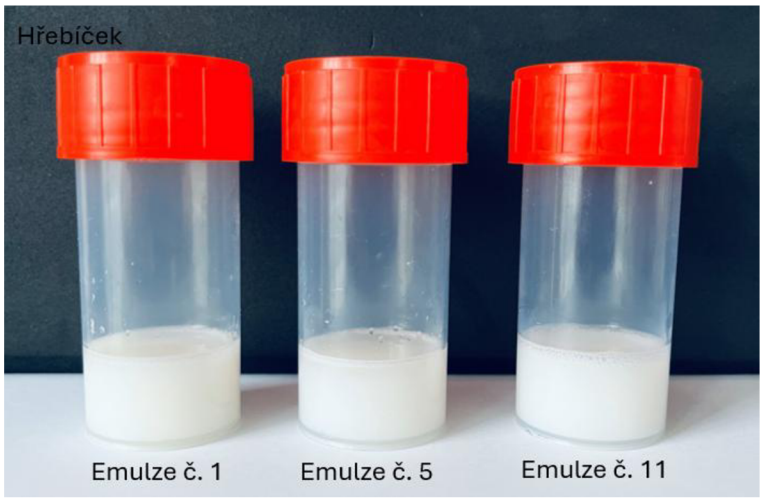


Obrázek 41: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z hřebíčku.

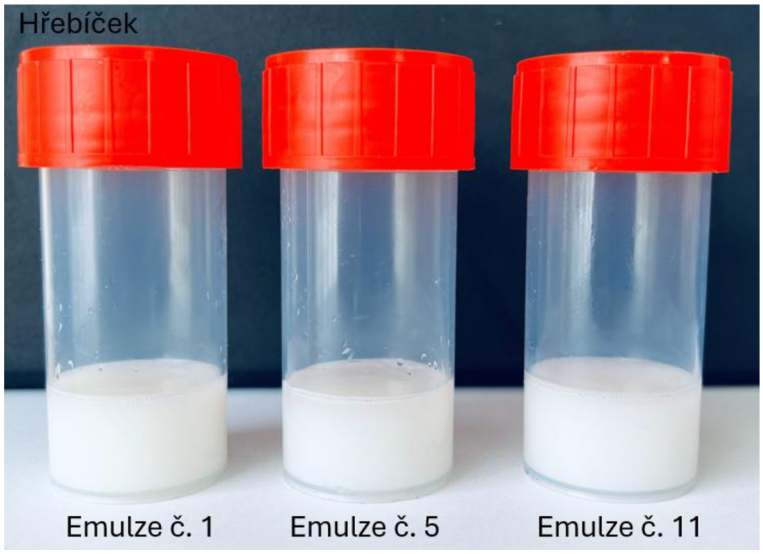
Vzorky emulzí obsahující esenciální olej z hřebíčku byly ihned po přípravě za pomoci homogenizátoru stabilní (viz obr. 41).



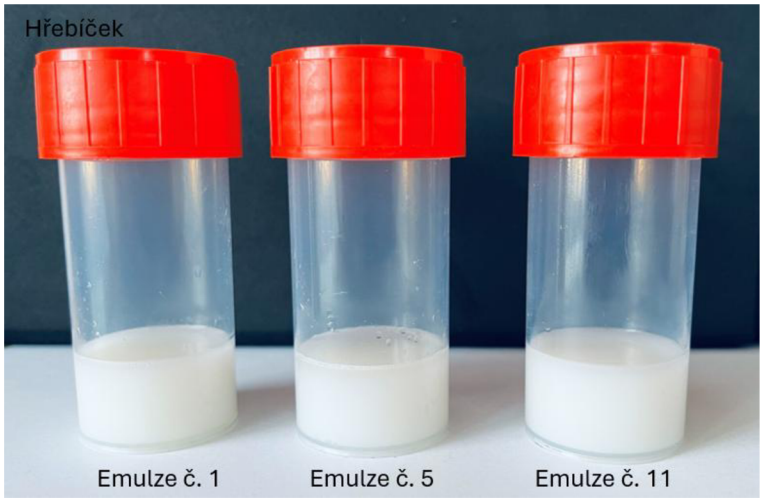
Obrázek 42: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z hřebíčku po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min.



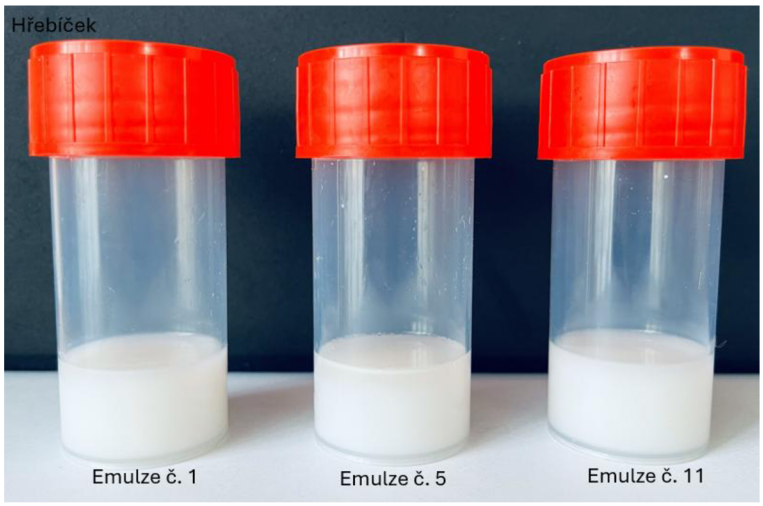
Obrázek 43: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z hřebíčku po 24 hodinách.



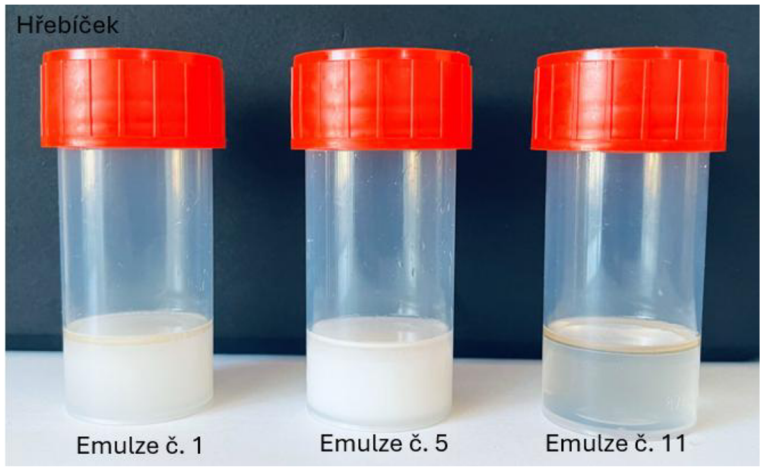
Obrázek 44: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z hřebíčku po 48 hodinách.



Obrázek 45: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z hřebíčku po 72 hodinách.



Obrázek 46: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z hřebíčku po 14 dnech.



Obrázek 47: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z hřebíčku po 30 dnech.

Vzorky emulzí s esenciálním olejem z hřebíčku byly po zatížení na odstředivce homogenní, totéž po 24, 48 a 72 hodinách. Po 14 dnech byly všechny emulze stabilní. Po 30 dnech všechny emulze již vykazovaly rozpad, nejvýraznější prstenec esenciálního oleje byl zřetelný na povrchu emulzí č. 1 a 11. U emulze č. 5 byl identifikovatelný počínající rozpad emulze.

V této části byly testovány 3 různé emulze (č. 1, 5 a 11) s esenciálním olejem z kůry skořice a esenciálním olejem z hřebíčku. Po přípravě byly emulze okamžitě stabilní, ale jejich dlouhodobá stabilita byla pozorována na základě rozpadů a separace fází v různých časových intervalech až do 30 dnů.

Obr. 34 až 40 ukazují stabilitu emulzí obsahujících esenciální olej z kůry skořice. Vzorky připravené pomocí homogenizátoru byly po přípravě stabilní, což je vidět na

Obr. 34. Po 10 minutách míchání na stolní odstředivce (viz Obr. 35) a po 24 hodinách (viz Obr. 36) emulze stále vykazovaly stabilitu, bez známek separace fází. Po 48 hodinách (viz Obr. 37) začaly emulze č. 1 a 11 vykazovat počáteční známky destabilizace. U emulze č. 1 byly pozorovány kapénky olejové fáze na povrchu, zatímco emulze č. 11 vytvořila olejový prstenec na povrchu a začala se oddělovat. Emulze č. 5 však zůstala stabilní. Po 14 dnech (viz Obr. 39) a 30 dnech (viz Obr. 40) byl rozpad emulzí č. 1 a 11 zřetelný. U těchto emulzí došlo k výrazné separaci olejové a vodné fáze, přičemž na povrchu byla patrná olejová vrstva. Naopak emulze č. 5 byla stále stabilní i po 30 dnech, což naznačuje, že použitý emulgátor vykazuje větší stabilitu při použití tohoto konkrétního esenciálního oleje.

Podobně jako u esenciálního oleje z kůry skořice, byly vzorky emulzí s esenciálním olejem z hřebíčku po přípravě stabilní (viz Obr. 41). Po 10 minutách zátěžového testu (viz Obr. 42) a po 24 hodinách (viz Obr. 43) nebyla pozorována žádná destabilizace. Emulze byly stále homogenní i po 48 hodinách (viz Obr. 44) a 72 hodinách (viz Obr. 45). Po 14 dnech (viz Obr. 46) se emulze č. 1, 5 a 11 stále jevily jako stabilní. Avšak po 30 dnech (viz Obr. 47) všechny emulze vykazovaly rozpad, přičemž na povrchu emulzí č. 1 a 11 byl patrný výrazný prstenec oleje. U emulze č. 5 byl pozorován počínající rozpad, ale v menší míře než u ostatních 2 emulzí.

Tyto výsledky potvrzují, že typ použitého esenciálního oleje zásadně ovlivňují fyzikálně-chemickou stabilitu emulzí při dlouhodobém skladování. U emulzí s esenciálním olejem z kůry skořice i hřebíčku bylo zřejmé, že rozdíly ve stabilitě mezi jednotlivými vzorky jsou dány nejen koncentrací emulgátoru, ale také jeho interakcí s daným typem oleje. Tato pozorování jsou v souladu se závěry zahraniční studie publikované týmem Đekić et al. z roku 2023, která se zabývala vývojem emulzí s obsahem esenciálních olejů. Autoři této studie zjistili, že různé esenciální oleje vykazují odlišnou míru interakce s emulgátory, což se projevuje nejen v počátečních reologických vlastnostech, ale i v dlouhodobé stabilitě během skladování.

Ačkoli všechny 3 testované emulgátory vykazovaly obdobnou stabilitu emulzí, pro následující experiment se včelami byly vybrány pouze 2 z nich – Sucragel AP V2 a Natpure Sol SL. Hlavním důvodem jejich volby byla snadná aplikace jak v experimentálních podmínkách, tak v praktickém využití. Zároveň byly cenově příznivější ve srovnání s alternativním emulgátorem tvořeným kombinací Sucragel AP

V2 a Sucrablend SP V2, který sice nabízel obdobnou stabilitu, avšak za vyšší náklady. Při výběru emulgátorů bylo zároveň nutné zohlednit ekonomickou stránku výzkumu, zejména s ohledem na možnou budoucí aplikaci v praxi.

20.5. Testování toxicity emulzí na včelách

Cílem experimentu bylo analyzovat vliv emulgátorů na úmrtnost včel a jejich spotřebu emulzí. Zvláštní pozornost byla věnována tomu, jak vybrané emulgátory ovlivňují životaschopnost včel. Nezbytnou součástí bylo vyloučit vliv esenciálních olejů na tento parametr. V rámci experimentu byly testovány tři různé koncentrace esenciálních olejů: 1,5 %; 0,5 % a 0,1 %.

V průběhu experimentu byly zaznamenávány hodnoty úmrtnosti včel a spotřeby emulzí. Výsledky ukázaly, že koncentrace esenciálních olejů měla významný vliv na životaschopnost včel. Konkrétně tedy, že s rostoucí koncentrací docházelo k významnému zvýšení úmrtnosti včel.

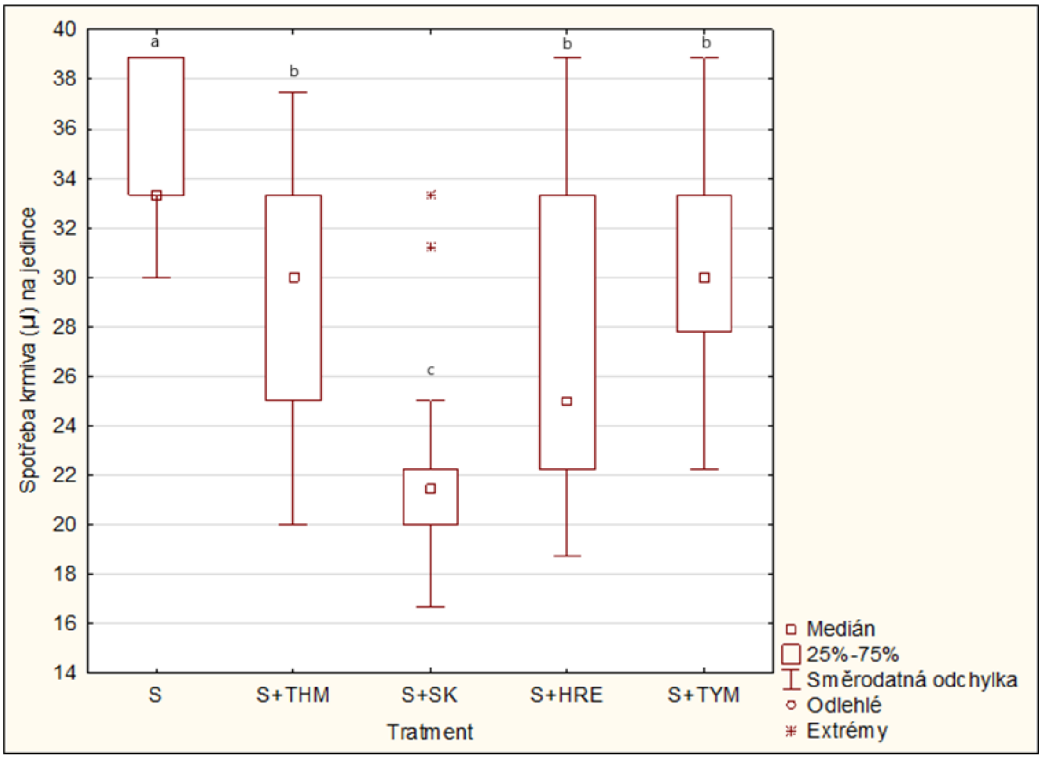
- První experiment (1,5 % esenciálního oleje): Po 3 dnech došlo k úhynu většiny včel, což ukázalo vysokou toxicitu použité koncentrace esenciálních olejů. Z tohoto důvodu byla koncentrace esenciálního oleje snížena.
- Druhý experiment (0,5 % esenciálního oleje): Po snížení koncentrace se mortalita včel snížila. Přesto byla mortalita vyšší než u kontrolní skupiny, což poukazuje na stále přítomný toxický účinek. Grafické znázornění výsledků je uvedeno v tabulce 10. Vysoká úmrtnost v kontrolní skupině byla pravděpodobně způsobena experimentálními a environmentálními podmínkami, zejména dostupností vody a vlivem teploty. Samotné emulgátory bez přítomnosti esenciálních olejů nevykazovaly toxické účinky, což naznačuje, že hlavním faktorem ovlivňujícím přežití včel byla koncentrace esenciálních olejů. Pro další experiment bylo proto nezbytné upravit koncentraci esenciálních olejů tak, aby se minimalizoval jejich negativní dopad na životaschopnost včel.

Emulze	Klícka	7. den		8. den		9. den		13. den
		Úhyn	Spotřeba (ml)	Úhyn	Spotřeba (ml)	Úhyn	Spotřeba (ml)	Počet živých
Kontrola	1	15	1,8	0	1	0	0,8	8
	2	17	1,9	0	1,5	0	0,6	0
	3	30	0,4	†	†	†	†	0
S	1	3	0,6	0	1	0	0,1	6
	2	1	1	1	1	1	0,5	8
	3	1	1,7	0	0,2	1	0,45	8
S+SK	1	11	0,5	2	0,5	2	0	0
	2	30	0,5	†	†	†	†	0
	3	13	0,6	7	0,5	1	0,05	1
S+HRE	1	14	0,5	1	0,5	8	0	0
	2	7	0,6	0	1	8	0,1	0
	3	9	1	0	1,5	1	0,1	0
S/S	1	3	1,3	1	0,2	0	0	9
	2	1	1	0	0,2	0	0	6
	3	2	1,8	0	0,5	0	0,1	9
S/S+SK	1	12	0,5	5	0,8	3	0,1	0
	2	16	0,7	6	1	8	0,05	0
	3	2	0,65	0	1	3	0,1	3
S/S+HRE	1	11	1,7	3	0,2	12	0,1	0
	2	30	1,8	†	†	†	†	0
	3	30	1,9	†	†	†	†	0
N	1	5	1,9	0	0,5	1	0,5	24
	2	7	1,6	0	0,5	0	0,2	13
	3	5	1,8	3	0,2	3	0,5	13
N+SK	1	6	0,6	7	0,8	6	0,1	0
	2	26	0,5	4	0,3	0	0	0
	3	16	0,5	12	0,5	2	0	0
N+HRE	1	15	1	10	0	†	†	0
	2	13	1,5	10	0	1	0	0
	3	12	1,2	1	0,3	12	0	0
†= všechny včely uhynuly								

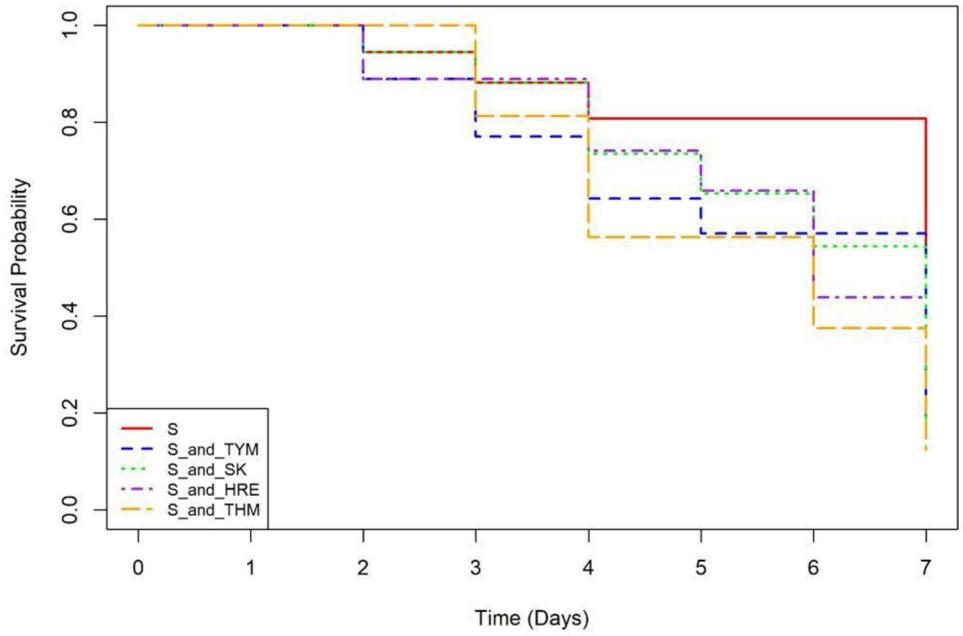
Tabulka 10: Úhyn včel a spotřeba emulzí v průběhu experimentu s 0,5 % esenciálního oleje.

- Třetí experiment (0,1 % esenciálního oleje): Při nejnižší testované koncentraci byla mortalita včel nejnižší a přibližovala se hodnotám kontrolní skupiny. Tento výsledek demonstruje, že koncentrace 0,1 % může být potenciálně bezpečná. Spotřeba krmiva na jedince byla významným sledovaným parametrem. Jak je patrné z grafu 1, jehož data byla zpracována pomocí statistické metody ANOVA s post-hoc Tukeyovým HSD testem, u emulgátoru Sucragel AP V2 byly výrazné rozdíly ve spotřebě mezi emulzí s obsahem esenciálního oleje a emulzí bez něj. Emulze s tymiánovým a hřebíčkovým olejem, stejně jako emulze s thymolem, byly spotřebovávány v obdobném množství. Naopak včely vykazovaly nižší spotřebu emulze se skořicovým olejem, což znamená její nižší přijatelnost. Graf 2, který znázorňuje pravděpodobnost přežití včel, ukazuje, že pokles přežití byl u všech emulzí (s výjimkou emulze bez esenciálního oleje) téměř shodný. Tento trend naznačuje, že přítomnost esenciálních olejů měla srovnatelný vliv na

pravděpodobnost přežití včel, bez výraznějších rozdílů mezi jednotlivými variantami.

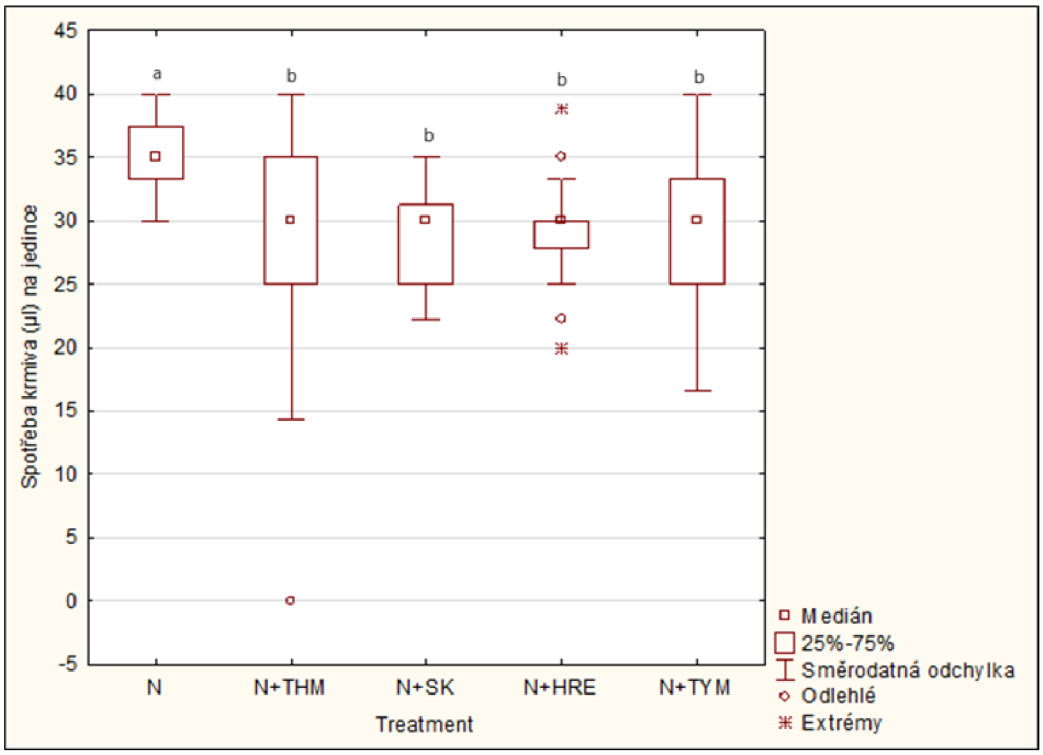


Graf 1: Spotřeba krmiva (µl) na jedince při použití emulgátoru Sucragel AP V2.

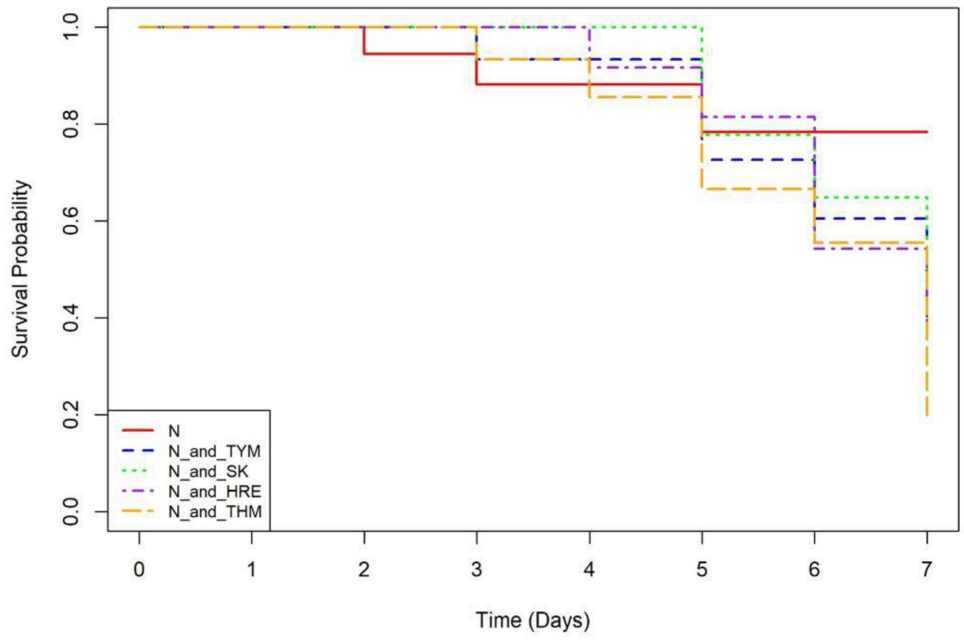


Graf 2: Pravděpodobnost přežití včel během 7 dní při použití emulgátoru Sucragel AP V2.

Stejné statistické vyhodnocení bylo provedeno i pro druhý testovaný emulgátor Natpure Sol SL. Jak je patrné z grafu 3, výkyvy ve spotřebě krmiva nebyly výrazné a žádná z emulzí nebyla nijak zvlášť preferována oproti ostatním. Co se týká pravděpodobnosti přežití, ani u tohoto emulgátoru nebyly zaznamenány významné rozdíly. Pokles přežití byl u všech emulzí obdobný, opět s výjimkou emulze bez esenciálního oleje, která vykazovala mírně odlišný trend.



Graf 3: Spotřeba krmiva (µl) na jedince při použití emulgátoru Natpure Sol SL.



Graf 4: Pravděpodobnost přežití včel během 7 dní při použití emulgátoru Natpure Sol SL.

Výsledky jasně ukázaly, že koncentrace esenciálních olejů má přímý vliv na přežití včel. S rostoucí koncentrací docházelo k významnému zvýšení mortality, což potvrzuje jejich potenciální toxicitu při vyšších dávkách. Nejvyšší testovaná koncentrace 1,5 % způsobila masivní úhyn včel již během prvních 3 dnů, což jednoznačně prokazuje nepřijatelnost této koncentrace pro praktické využití ve včelařství. Podobné závěry přinesla i nedávná studie týmu Ewert et al. (2023), která zkoumala účinky požitých esenciálních olejů a propolisových extraktů na zdraví včel a případný vliv na jejich délku života. Autoři zaznamenali výraznou dávkově závislou toxicitu tymiánového oleje – včely krmené nízkou dávkou (0,1 %) měly nejkratší střední délku života ze všech skupin. Obdobně studie týmu Bava et al. z roku 2023 potvrzuje, že účinnost a toxicita esenciálních olejů se výrazně liší v závislosti na koncentraci, způsobu aplikace a složení oleje. Tato pozorování potvrzují závěry mého experimentu, v němž koncentrace 1,5 % způsobila masivní úhyn včel, zatímco koncentrace 0,1 % byla včelami dobře tolerována a vykazovala nejnižší mortalitu. Obě studie tak ukazují, že esenciální oleje, včetně tymiánového, mohou mít při vyšších dávkách toxické účinky, zatímco při nízké koncentraci mohou být relativně bezpečné. Například studie zaměřené na vliv thymolu na včely ukázaly, že při vyšších koncentracích může docházet k toxickým účinkům, zatímco při nízkých dávkách zůstává jeho účinek mírný nebo zanedbatelný (Charpentier et al., 2014; Glavinic et al., 2022).

Snížením koncentrace na 0,5 % došlo k redukci úmrtnosti, avšak mortalita byla stále významně vyšší, a proto stále přetrvával toxický účinek esenciálních olejů. Důležitým zjištěním byla také neočekávaně vyšší úmrtnost v kontrolní skupině, která nebyla vystavena esenciálním olejům. Tato skutečnost může být důsledkem experimentálních a environmentálních faktorů, zejména nedostatečné dostupnosti vody a následnému vlivu teploty, což poukazuje na potřebu lepší kontroly těchto podmínek v budoucích experimentech.

Nejnižší testovaná koncentrace 0,1 % vykazovala nejnižší mortalitu včel, jež se přibližovala hodnotám kontrolní skupiny. Tento výsledek znamená, že koncentrace 0,1 % může být pro včely potenciálně bezpečná a měla by být zvážena jako možná varianta pro aplikaci v praxi.

Kromě úmrtnosti byla sledována také spotřeba krmiva na jedince, která se liší v závislosti na použitém emulgátoru. U emulgátoru Sucragel AP V2 byly

zaznamenány výrazné rozdíly ve spotřebě mezi emulzí s obsahem a bez obsahu esenciálního oleje, což indikuje, že přítomnost esenciálních olejů ovlivňuje ochotu včel konzumovat krmivo. Emulze s tymiánovým a hřebíčkovým olejem a thymolem byly spotřebovávány v obdobném množství, zatímco emulze se skořicovým olejem vykazovala nižší spotřebu, tedy i nižší přijatelnost pro včely.

U druhého testovaného emulgátoru, Natpure Sol SL, byly rozdíly ve spotřebě méně výrazné a žádná z emulzí nebyla jednoznačně preferována oproti ostatním. Tato vyrovnaná spotřeba může naznačovat, že emulgátor Natpure Sol SL méně ovlivňuje senzorické vlastnosti emulzí nebo částečně potlačuje rozdíly mezi jednotlivými esenciálními oleji, což vede k podobné přijatelnosti krmiv včelami. Podobné závěry ohledně vlivu esenciálních olejů na chování včel uvádí i práce týmu Lazăra et al. z roku 2022, která zkoumá vliv přídavku esenciálních olejů do krmiva nejen na vlastnosti výsledného medu, ale i na celkové přijetí krmiva včelami. Autoři pozorovali, že některé esenciální oleje byly včelami přijímány lépe než jiné, což je v souladu s výsledky této práce, kde se ukazuje nižší přijatelnost skořicového oleje.

Co se týká pravděpodobnosti přežití včel, pokles byl u všech emulzí s esenciálními oleji obdobný, s výjimkou emulzí bez esenciálního oleje, jež vykazovaly mírně odlišný trend. To znamená, že přítomnost esenciálních olejů měla srovnatelný vliv na přežití včel, bez výraznějších rozdílů mezi jednotlivými variantami.

Výsledky grafu znázorňujícího pravděpodobnost přežití nejsou dostatečně průkazné, a proto by bylo vhodné provést další opakované pokusy, které by zajistily vyšší statistickou validitu získaných dat. Pro potvrzení pozorovaných trendů by bylo nutné zvýšit počet testovaných jedinců a případně prodloužit dobu sledování, aby bylo možné spolehlivě posoudit vliv jednotlivých faktorů na přežití včel.

20.6. Analýza dat

Křivky přežití byly vytvořeny pomocí Kaplan-Meierovy metody, na jejímž základě byla odhadnuta pravděpodobnost přežití jednotlivých testovaných látek během sledovaného 7denního období. Rozdíly mezi křivkami přežití byly vyhodnoceny pomocí Log-rank testu, který porovnává počet sledovaných případů s počtem případů, které by se očekávaly podle nulové hypotézy (tj. při předpokladu identických křivek

přežití). Všechna data týkající se přežití byla analyzována ve statistickém programu R (R Core Team, 2017).

Denní příjem potravy byl analyzován pomocí programu Statistica 12. Vliv jednotlivých zkrmovaných látek na rychlost konzumace potravy byl testován analýzou rozptylu (ANOVA), které předcházel test normality. Pro vícenásobné porovnání byla použita post-hoc analýza s využitím Tukeyova testu. Statistická významnost byla posuzována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Závěr

Tato diplomová práce se zabývala vlivem vybraných emulgátorů na stabilitu krmných emulzí ve včelařství a jejich dopadem na včelu medonosnou (*Apis mellifera*). Cílem bylo posoudit stabilitu emulzí vytvořených s různými emulgátory a analyzovat jejich přijatelnost pro včely, zejména z hlediska spotřeby krmiva a přežití včel při různých koncentracích esenciálních olejů.

Výsledky ukázaly, že stabilita emulzí byla výrazně ovlivněna jak typem použitého emulgátoru, tak zvolenou metodou emulzifikace. Nejstabilnější emulze byly získány pomocí vysokorychlostní homogenizace a při použití emuglátorů Natpure Sol SL, Sucragel AP V2 a dále pak kombinace Sucragel AP V2 se Sucrablend SP V2. Naopak některé emulgátory nebo způsoby míchání vedly ke vzniku nestabilních emulzí, u nichž docházelo k fázové separaci nebo pěnění, což může omezovat jejich praktické využití. Na základě výsledků analýz byly, pro další testování biologického vlivu na včely, vybrány dvě nejstabilnější emulze, které zároveň splňovaly požadavky na konzistenci, aplikovatelnost v terénních podmínkách a ekonomickou dostupnost použitých emulgátorů.

Dále bylo zjištěno, že volba emulgátoru hraje významnou roli nejen při stabilizaci emulzí, ale také při přijetí krmiva včelami. U emulgátoru Sucragel AP V2 byly zaznamenány výrazné rozdíly ve spotřebě krmiva mezi emulzí s obsahem a bez obsahu esenciálního oleje, zatímco u Natpure Sol SL nebyla zjištěna žádná výrazná preference mezi jednotlivými emulzemi. Tento rozdíl může naznačovat, že typ emulgátoru ovlivňuje přijatelnost krmné směsi pro včely, což je důležité z hlediska praktického využití včelaři.

Rovněž bylo prokázáno, že koncentrace esenciálních olejů zásadně ovlivňuje životaschopnost včel. Při nejvyšší testované koncentraci 1,5 % došlo k masivnímu úhynu včel již během 3 dnů, a proto tento výsledek potvrzuje její nevhodnost pro aplikaci ve včelařství. Snížením koncentrace na 0,5 % se mortalita včel snížila, avšak stále byla vyšší než u kontrolní skupiny. Toto zjištění svědčí o přetrvávajícím toxickém účinku esenciálních olejů. Nejnižší testovaná koncentrace 0,1 % vykázala nejnižší mortalitu, která se blížila kontrolní skupině, což naznačuje její potenciální bezpečnost pro včely.

Významným zjištěním byla také neočekávaně vyšší úmrtnost v kontrolní skupině, což mohlo být způsobeno experimentálními a environmentálními faktory, zejména nedostatečnou dostupností vody a teplotními podmínkami. Tento aspekt by měl být v budoucích experimentech pečlivěji sledován a kontrolován.

Při dalších experimentech by bylo vhodné zaměřit se na ověřování dlouhodobých účinků nízkých koncentrací esenciálních olejů na životaschopnost včelstev v reálném prostředí úlů a detailně analyzovat příjem krmiva při různých podmínkách, aby bylo možné určit optimální složení emulzí z hlediska výživy a zdravotního stavu včel.

Tato práce přispěla k lepší znalosti vlivu emulgátorů na stabilitu krmných emulzí a jejich přijetí včelami, což může být cenné zjištění pro budoucí vývoj bezpečných a efektivních doplňkových krmiv ve včelařství. Výsledky mohou napomoci optimalizaci aplikace esenciálních olejů, které mohou sloužit jako přírodní alternativa k syntetickým léčivům používaným v ochraně včelstev.

Seznam použité literatury

1. ADLER, Lynn S. The ecological significance of toxic nectar. *Oikos*. 2000, vol. 91, no. 3, pp. 409-420. ISSN 0030-1299. Available at: https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.910301.x.
2. AJAO, A. M., OLADIMEJI, Y. U., IDOWU, A. B., BABATUNDE, S. K. and OBEMBE, A. Morphological characteristics of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) in Kwara State, Nigeria. *International Journal of Agricultural Sciences*. 2014, vol. 4, no. 4, pp. 171-175. ISSN 2167-0447. Available at: www.internationalscholarsjournals.org.
3. ALAUX, Cédric, BRUNET, Jean-Luc, DUSSAUBAT, Claudia, MONDET, Fanny, TCHAMITCHAN, Sylvie, et al. Interactions between Nosema microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*. 2010, vol. 12, no. 3, pp. 774-782. ISSN 1462-2912. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x.
4. ALQARNI, Abdulaziz, HANNAN, Mohammed, OWAYSS, Ayman and ENGEL, Michael. The indigenous honey bees of Saudi Arabia (Hymenoptera, Apidae, *Apis mellifera jemenitica* Ruttner): Their natural history and role in beekeeping. *ZooKeys*. 2011, vol. 134, pp. 83-98. ISSN 1313-2970. Available at: https://doi.org/10.3897/zookeys.134.1677.
5. ASCHER, J. S. and PICKERING, J. Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). 2014. [online]. [cit. 2019-04]. Available at: http://www.discoverlife.org/.
6. BAILEY, L. The measurement and interrelationships of infections with *Nosema apis* and *Malpighamoeba mellificae* of honey-bee populations. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1968, vol. 12, no. 2, pp. 175-179. ISSN 0022-2011. Available at: https://doi.org/10.1016/0022-2011(68)90174-2.
7. BAKER, Herbert G. Non-sugar chemical constituents of nectar. *Apidologie*. 1977, vol. 8, no. 4, pp. 349-356. ISSN 0044-8435. Available at: https://doi.org/10.1051/apido:19770405.
8. BASILE, Rebecca, PIRK, Christian W.W., and TAUTZ, Jürgen. Trophallactic activities in the honeybee brood nest – Heaters get supplied with high performance

fuel. *Zoology*. 2008, vol. 111, no. 6, pp. 433-441. ISSN 0944-2006. Available at: https://doi.org/10.1016/j.zool.2007.11.002.

9. BAVA, Roberto, CASTAGNA, Fabio, PALMA, Ernesto, MARRELLI, Mariangela, CONFORTI, Filomena, MUSOLINO, Vincenzo, CARRESI, Cristina, LUPIA, Carmine, CENITI, Carlotta, TILOCCA, Bruno, RONCADA, Paola, BRITTI, Domenico a MUSELLA, Vincenzo. Essential Oils for a Sustainable Control of Honeybee Varroosis. *Veterinary Sciences* [online]. 2023, **10**(5), 308. ISSN 2306-7381. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/vetsci10050308
10. BOGDANOV, S., KILCHENMANN, V., IMDORF, A., and FLURI, P. Residues in honey after application of thymol against Varroa using the Franko thymol frame. *American Bee Journal*. 1998, vol. 133, pp. 610–611.
11. BOUYER, Eléonore, MEKHLOUFI, Ghozlene, ROSILIO, Véronique, GROSSIORD, Jean-Louis, and AGNELY, Florence. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, vol. 436, no. 1-2, pp. 359-378. ISSN 0378-5173. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.052.
12. BOŽIČ, Janko; ZURC, Jelena; ZORC, Minja; SUŠNIK BAJEC, Simona; PREŠERN, Janez et al. Novel aspects in characterisation of Carniolan honey bee (Apis mellifera carnica, Pollmann 1879). *Online*. Acta agriculturae Slovenica. Suplement. 2024, roč. 5, s. 18-27. ISSN 1854-4819. Dostupné z: https://doi.org/10.14720/aas-s.2016.5.18835.
13. BRAVO, J.; CARBONELL, V.; SEPÚLVEDA, B.; DELPORTE, C.; VALDOVINOS, C.E. et al. Antifungal activity of the essential oil obtained from Cryptocarya alba against infection in honey bees by Nosema ceranae. *Online*. Journal of Invertebrate Pathology. 2017, roč. 149, s. 141-147. ISSN 00222011. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.08.012.
14. BUTLER, C. G. The honey bee colony life history. In: *The Hive and the Honey Bee*. Hamilton, Ill.: Dadant & Sons, 1975, s. 39-74.
15. CECOTTI, Roberto; BERGOMI, Patrizia; CARPANA, Emanuele a TAVA, Aldo. Chemical Characterization of the Volatiles of Leaves and Flowers from Cultivated Malva sylvestris var. mauritiana and their Antimicrobial Activity Against the Aetiological Agents of the European and American Foulbrood of Honeybees (Apis

mellifera). *Online.* Natural Product Communications. 2016, roč. 11, č. 10. ISSN 1934-578X. Dostupné z: https://doi.org/10.1177/1934578X1601101026.

16. CHARPENTIER, Gael; VIDAU, Cyril; FERDY, Jean-Baptiste; TABART, Jeremy; VETILLARD, Angelique. Lethal and sub-lethal effects of thymol on honeybee (Apis mellifera) larvae reared in vitro. *Pest Management Science* [online]. 2014, **70**(1), 140–147. ISSN 1526-4998. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/ps.3539
17. COLLOSS. [online]. Dostupné z: http://www.coloss.cz.
18. CRAILSHEIM, Karl. Intestinal transport of sugars in the honeybee (Apis mellifera L.). *Online.* Journal of Insect Physiology. 1988, roč. 34, č. 9, s. 839-845. ISSN 00221910. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/0022-1910(88)90117-5.
19. CUNARD, S. J. a BREED, M. D. Post-Stinging Behavior of Worker Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Online.* Annals of the Entomological Society of America. 1998, roč. 91, č. 5, s. 754-757. ISSN 1938-2901. Dostupné z: https://doi.org/10.1093/aesa/91.5.754.
20. DE GROOT, Anton C. a SCHMIDT, Erich. Essential Oils, Part III: Chemical Composition. *Online.* Dermatitis. 2016, roč. 27, č. 4, s. 161-169. ISSN 2162-5220. Dostupné z: https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000193.
21. DE-MELO, A. A. M.; DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; SANCHO, M. T.; PASCUAL-MATÉ, A. Composition and properties of Apis mellifera honey: A review. Journal of Apicultural Research [online]. Abingdon: Taylor & Francis, [2018], 57(1), 5–37. ISSN 0021-8839. [cit. 2025-03-30]. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444
22. DE-MELO, Adriane Alexandre Machado; ESTEVINHO, Maria Leticia Miranda Fernandes; SATTLER, José Augusto Gasparotto; SOUZA, Bianca Rodrigues; FREITAS, Alex da Silva et al. Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. *Online.* LWT. 2016, roč. 65, s. 808-815. ISSN 00236438. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.014.
23. ĐEKIĆ, Ljiljana; ĆIRIĆ, Ana; MILINKOVIĆ, Sandra; BUDINČIĆ, Jelena Milinković; FRAJ, Jadranka; PETROVIĆ, Lidija. Film-Forming Microemulsions with Essential Oils: Elucidating Relationships Between Formulation Parameters, Thermodynamic Stability, and Quality Attributes. *Processes* [online]. 2025, roč.

13, č. 4, s. 990. [cit. 2025-03-30]. ISSN 2227-9717. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/pr13040990.

24. DETZEL, Andreas a WINK, Michael. Attraction, deterrence or intoxication of bees (Apis mellifera) by plant allelochemicals. *Online.* Chemoecology. 1993, roč. 4, č. 1, s. 8-18. ISSN 0937-7409. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/BF01245891.
25. DORES TEIXEIRA, A., MARQUES-ARAÚJO, S., ZANUNCIO, J. C., SERRÃO, J. E. Peritrophic membrane origin in adult bees (Hymenoptera): immunolocalization. *Micron.* 2014, roč. 68, s. 91–97. DOI: 10.1016/j.micron.2014.09.009.
26. DU, Liyang a MENG, Zong. Oleofoams and emulsion foams stabilized by sodium stearoyl lactylate: Insight into their relations based on microstructure, rheology and tribology. *Online.* Food Hydrocolloids. 2023, roč. 137. ISSN 0268005X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108317.
27. EBERT, Timothy A; KEVAN, Peter G; BISHOP, Bert L; KEVAN, Sherrene D a DOWNER, Roger A. Oral toxicity of essential oils and organic acids fed to honey bees (Apis mellifera). *Online.* Journal of Apicultural Research. 2015, roč. 46, č. 4, s. 220-224. ISSN 0021-8839. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/00218839.2007.11101398.
28. EGUARAS, Martín J.; FUSELLI, S.; GENDE, L.; FRITZ, R.; RUFFINENGO, Sergio R. et al. 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. *Online.* Journal of Essential Oil Research. 2005, roč. 17, č. 3, s. 336-340. ISSN 1041-2905. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698924.
29. EWERT, A. M.; SIMONE-FINSTROM, M.; READ, Q. D.; HUSSENEDER, C.; RICIGLIANO, V. A. Effects of Ingested Essential Oils and Propolis Extracts on Honey Bee (*Hymenoptera: Apidae*) Health and Gut Microbiota. *Journal of Insect Science* [online]. 2023, roč. 23, č. 6, s. 15. ISSN 1536-2442. Dostupné z: https://doi.org/10.1093/jisesa/iead087.
30. FOLEY, Kirsten; FAZIO, Géraldine; JENSEN, Annette B. a HUGHES, William O.H. Nutritional limitation and resistance to opportunistic Aspergillus parasites in

honey bee larvae. *Online*. Journal of Invertebrate Pathology. 2012, roč. 111, č. 1, s. 68-73. ISSN 00222011. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.06.006.

31. FORSGREN, Eva. European foulbrood in honey bees. *Online*. Journal of Invertebrate Pathology. 2010, roč. 103, s. S5-S9. ISSN 00222011. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.016.
32. FREE, J. B. The transfer of food between the adult members of a honeybee community. *Bee World.* 1959, roč. 40, s. 193–201.
33. FRIES, I. a SCAMAZINE, S. *Impaired response of hygienic honey bees (Apis mellifera L.) to disease infected brood after long-term exposure to fluvalinate*. Apidologie. Paris: EDP Sciences, [2001], 32(6), 455–465. ISSN 0044-8435. Dostupné také z: https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/2001/06/fries.pdf
34. FRISCH, K. von. The dance language and orientation of bees. Cambridge, Mass.: Harvard University Press, 1967.
35. GAUDINO, Nicole; GHAZANI, Saeed Mirzaee; CLARK, Stephanie; MARANGONI, Alejandro G. a ACEVEDO, Nuria C. Development of lecithin and stearic acid based oleogels and oleogel emulsions for edible semisolid applications. *Online*. Food Research International.
36. GILLIAM, Martha; PREST, Dorothy B. a MORTON, Howard L. Fungi isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2,4-D and antibiotics. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1974, roč. 24, č. 2, s. 213-217. ISSN 0022-2011. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/0022-2011(74)90013-5.
37. GLAVINIĆ, Uroš; BLAGOJEVIĆ, Jovan; RISTANIĆ, Marko; STEVANOVIĆ, Jevrosima; LAKIĆ, Nada; MIRILOVIĆ, Milorad; STANIMIROVIĆ, Zoran. Use of Thymol in *Nosema ceranae* Control and Health Improvement of Infected Honey Bees. *Insects* [online]. 24. června 2022, **13**(7), 574. ISSN 2075-4450. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/insects13070574
38. GONÇALVES SANTOS, C.; SERRÃO, J. E. Histology of the Ileum in Bees (Hymenoptera, Apoidea). *Braz. J. Morphol. Sci.* 2006, roč. 23, s. 405-413.
39. GOULSON, Dave; NICHOLLS, Elizabeth; BOTÍAS, Cristina a ROTHERAY, Ellen L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*. 2015, roč. 347, č. 6229. ISSN 0036-8075. Dostupné z: https://doi.org/10.1126/science.1255957.

40. GOYRET, Joaquín a FARINA, Walter M. Trophallactic chains in honeybees: a quantitative approach of the nectar circulation amongst workers. *Apidologie*. 2005, roč. 36, č. 4, s. 595-600. ISSN 0044-8435. Dostupné z: https://doi.org/10.1051/apido:2005050.
41. GUPTA, Rakesh Kumar; REYBROECK, Wim; VAN VEEN, Johan W. a GUPTA, Anuradha (ed.). *Beekeeping for Poverty Alleviation and Livelihood Security*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. ISBN 978-94-017-9198-4. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-94-017-9199-1.
42. HAUSMANN, Claudia; WÄCKERS, Felix L. a DORN, Silvia. Sugar convertibility in the parasitoid *Cotesia glomerata* (Hymenoptera: Braconidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 2005, roč. 60, č. 4, s. 223-229. ISSN 0739-4462. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/arch.20093.
43. HAYDAK, Mykola H. Honey Bee Nutrition. *Annual Review of Entomology*. 1970, roč. 15, č. 1, s. 143-156. ISSN 0066-4170. Dostupné z: https://doi.org/10.1146/annurev.en.15.010170.001043.
44. HICKEY, Tony; DEVAUX, Jules; RAJAGOPAL, Vijay; POWER, Amelia a CROSSMAN, David. Paradoxes of Hymenoptera flight muscles, extreme machines. *Biophysical Reviews*. 2022, roč. 14, č. 1, s. 403-412. ISSN 1867-2450. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s12551-022-00937-7.
45. HRASSNIGG, Norbert a CRAILSHEIM, Karl. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 2005, roč. 36, č. 2, s. 255-277. ISSN 0044-8435. Dostupné z: https://doi.org/10.1051/apido:2005015.
46. CHAIEB, Kamel; HAJLAOUI, Hafedh; ZMANTAR, Tarek; KAHLA-NAKBI, Amel Ben; ROUABHIA, Mahmoud et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (Syzygium aromaticum L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research*. 2007, roč. 21, č. 6, s. 501-506. ISSN 0951-418X. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/ptr.2124.
47. ILYASOV, Rustem A.; LEE, Myeong-lyeol; TAKAHASHI, Jun-ichi; KWON, Hyung Wook a NIKOLENKO, Alexey G. A revision of subspecies structure of western honey bee *Apis mellifera*. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020, roč. 27, č. 12, s. 3615-3621. ISSN 1319-562X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.001.

48. IMDORF, Anton; BOGDANOV, Stefan; OCHOA, Rubén Ibáñez a CALDERONE, Nicholas W. Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. *Apidologie*. 1999, roč. 30, č. 2-3, s. 209-228. ISSN 0044-8435. Dostupné z: https://doi.org/10.1051/apido:19990210.
49. JONES, Julia C; FRUCIANO, Carmelo; HILDEBRAND, Falk; AL TOUFALILIA, Hasan; BALFOUR, Nicholas J et al. Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. *Ecology and Evolution*. 2018, roč. 8, č. 1, s. 441-451. ISSN 2045-7758. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/ece3.3597.
50. KALAYCIOĞLU, Zeynep; KAYGUSUZ, Hakan; DÖKER, Serhat; KOLAYLI, Sevgi a ERIM, F. Bedia. Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. *LWT*. 2017, roč. 84, s. 402-408. ISSN 0023-6438. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.003.
51. KAMALIROOSTA, L. Extraction of cinnamon essential oil and identification of its chemical compounds. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012, roč. 6, č. 4. ISSN 1996-0875. Dostupné z: https://doi.org/10.5897/JMPR11.1215.
52. KUVANCI, Ahmet; KONAK, Feyzullah; ÖZTÜRK, Seyit Hasan; ŞAHIN, Ahmet Emir a YILMAZ, Fatih. The effects of some essential oils against Nosemosis. *Bee Studies - Apiculture Research Institute*. 2020, roč. 12, č. 2, s. 37-41. ISSN 2757-5438. Dostupné z: https://doi.org/10.51458/BSTD.2021.7.
53. LAZĂR, Roxana Nicoleta, ALEXA, Ersilia, OBÎŞTIU, Diana, COCAN, Ileana a PĂTRUICĂ, Silvia. The Effect of the Use of Essential Oils in the Feed of Bee Families on Honey Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Applied Sciences* [online]. 2022, **12**, 1094. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/app12031094
54. LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*. 1997, roč. 42, s. 525-550. DOI: 10.1146/annurev.ento.42.1.525.
55. LENGA, Robert E. *The Sigma-Aldrich library of chemical safety data*. Vol. 2, M-Z and indices. 2. vyd. Milwaukee: Sigma-Aldrich, 1988. ISBN 0-941633-16-0.
56. LI, J.-L.; LI, W.-L.; ZHANG, J.; PANG, Y.-T.; XIONG, J.; WU, P.; WEI, B.-R.; LI, X.-J.; HUANG, Q.; TANG, Q.-H.; ZHAO, C.-H.; WANG, Q.; LIU, Z.-L.; CHEN, Y.; DONG, Z.-X.; ZHAO, Y.-Z.; GUO, J. *Seasonal dynamics of the*

microbiota and nutritional composition in bee bread from Apis cerana and Apis mellifera colonies. Food Research International [online]. Amsterdam: Elsevier, [2024], 170, 113905. ISSN 0963-9969. [cit. 2025-03-30]. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113905

57. LIPIŃSKI, Z. Honey bee nutrition and feeding in the temperate/continental climate of the northern hemisphere. Olsztyn: Eva Crane Trust, 2018.
58. MANNING, M.; ORAWSKI, P. Food grade esters used as personal care antimicrobials. *Cosmetics & Toiletries*. 2005, roč. 120, s. 63-68.
59. MASYITA, Ayu; MUSTIKA SARI, Reka; DWI ASTUTI, Ayun; YASIR, Budiman; RAHMA RUMATA, Nur et al. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chemistry: X*. 2022, roč. 13. ISSN 2590-1575. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100217.
60. MICHENER, C. D. Comparative external morphology, phylogeny, and a classification of the bees (Hymenoptera). 1944.
61. MILLER, Delaney L.; PARISH, Audrey J. a NEWTON, Irene L.G. Transitions and transmission: behavior and physiology as drivers of honey bee-associated microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*. 2019, roč. 50, s. 1-7. ISSN 1369-5274. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.08.001.
62. MODDERMAN, J.P. Safety Assessment of Hydrogenated Starch Hydrolysates. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1993, roč. 18, č. 1, s. 80-114. ISSN 0273-2300. Dostupné z: https://doi.org/10.1006/rtph.1993.1047.
63. MONDET, Fanny; GOODWIN, Mark a MERCER, Alison. Age-related changes in the behavioural response of honeybees to Apiguard®, a thymol-based treatment used to control the mite *Varroa destructor*. *Journal of Comparative Physiology A*. 2011, roč. 197, č. 11, s. 1055-1062. ISSN 0340-7594. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00359-011-0666-1.
64. MORAIS, Michelle M.; TURCATTO, Aline P.; FRANCOY, Tiago M.; GONÇALVES, Lionel S.; CAPPELARI, Fabrício A. et al. Evaluation of inexpensive pollen substitute diets through quantification of haemolymph proteins. *Journal of Apicultural Research*. 2015, roč. 52, č. 3, s. 119-121. ISSN 0021-8839. Dostupné z: https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.3.01.

65. NICOLSON, Susan W. a THORNBURG, Robert W. Nectar chemistry. In: NICOLSON, Susan W.; NEPI, Massimo a PACINI, Ettore (ed.). *Nectaries and Nectar*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007, s. 215-264. ISBN 978-1-4020-5936-0. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5937-7_5.
66. NORN, Viggo (ed.). *Emulsifiers in Food Technology*. Online. Wiley, 2014. ISBN 978-0470670637. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/9781118921265.
67. ÖZÜİÇLİ, Mehmet; GİRİŞGİN, Ahmet Onur; DİKER, Ali İhsan; BAYKALIR, Yasin; KISADERE, İhsan et al. The Efficacy of Thyme, Peppermint, Eucalyptus Essential Oils, and Nanoparticle Ozone on Nosemosis in Honey Bees. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. 2023. ISSN 1300-6045. Dostupné z: https://doi.org/10.9775/kvfd.2023.29167.
68. PAGE, Robert E. a PENG, Christine Y.-S. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*. 2001, roč. 36, č. 4-6, s. 695-711. ISSN 0531-5565. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00236-9.
69. PECHHACKER, H.; MOOSBECKHOFER, R. *Die Bienenkunde in Österreich*. 2003.
70. PETER, K. V. (ed.). *Handbook of herbs and spices*. Volume 2. Second edition. Woodhead publishing series in food science, technology and nutrition. Oxford: Woodhead Publishing, [2012]. ISBN 978-0-85709-568-8. Dostupné také z: http://www.sciencedirect.com/science/book/9780857090409.
71. POSPIECH, Matej; JAVŮRKOVÁ, Zdeňka; HRABEC, Pavel; ČÍŽKOVÁ, Helena; TITĚRA, Dalibor et al. Physico-Chemical and Melissopalynological Characterization of Czech Honey. *Applied Sciences*. 2021, roč. 11, č. 11. ISSN 2076-3417. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/app11114989.
72. RADLOFF, Sarah E.; HEPBURN, H. Randall a KOENIGER, Gudrun. Comparison of flight design of Asian honeybee drones. *Apidologie*. 2003, roč. 34, č. 4, s. 353-358. ISSN 0044-8435. Dostupné z: https://doi.org/10.1051/apido:2003031.
73. RAGUSO, Robert A. WHY ARE SOME FLORAL NECTARS SCENTED? *Ecology*. 2004, roč. 85, č. 6, s. 1486-1494. ISSN 0012-9658. Dostupné z: https://doi.org/10.1890/03-0410.

74. RANI, B.; KACHHAWA, G. R.; YADAV, R. K.; CHAOHAN, V.; MAHESHWARI, R. Phytochemical effectiveness of clove oil: a review. *International Journal of Research in Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 2012, roč. 1, č. 2, s. 230–233.
75. SEELEY, T. D.; CAMAZINE, S.; SNEYD, J. *Collective decision-making in honey bees: How colonies choose among nectar sources*. Behavioral Ecology and Sociobiology. Berlin: Springer, [1991], 28(4), 277–290. ISSN 0340-5443. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/BF00175101
76. SEMKIW, Piotr a SKUBIDA, Piotr. Suitability of Starch Syrups for Winter Feeding of Honeybee Colonies. *Journal of Apicultural Science*. 2016, roč. 60, č. 2, s. 141-152. ISSN 2299-4831. Dostupné z: https://doi.org/10.1515/jas-2016-0025.
77. SCHMID-HEMPEL, P. *Parasites and social insects*. Apidologie. Paris: EDP Sciences, [1995], 26(3), 255–271. ISSN 0044-8435. Dostupné také z: https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00891895/document
78. SCHRAMM, Laurier Lincoln. *Emulsions, foams, and suspensions: fundamentals and applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. ISBN 978-3-527-30743-2.
79. SCHULZ, D. J.; VERMIGLIO, M. J.; HUANG, Z. Y. a ROBINSON, G. E. Effects of colony food shortage on social interactions in honey bee colonies. *Insectes Sociaux*. 2002, roč. 49, č. 1, s. 50-55. ISSN 0020-1812. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00040-002-8279-x.
80. SMITH, E. L. Evolutionary morphology of external insect genitalia. 1. Origin and relationships to other appendages. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1969, roč. 62, s. 1051–1079.
81. SMITH, Caroline A.; COLLINS, Carmel T. a CROWTHER, Caroline A. Aromatherapy for pain management in labour. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. ISSN 1465-1858. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/14651858.CD009215.
82. SNODGRASS, R. E. *Anatomy of the honey bee*. Ithaca, New York: Comstock Publishers Associates, 1956. ISBN 978-0801493027.
83. STELL, Ian. *Understanding bee anatomy: a full colour guide*. [Teddington]: The Catford Press, 2012. ISBN 978-0-9574228-0-3.

84. STEPHEN, W. P.; BOHART, G. E. a TORCHIO, P. F. *The Biology and External Morphology of Bees with a Synopsis of the Genera of North-western America*. Corvallis: Agr. Exp. Sta., Oregon State University, 1969. 140 s.
85. SUBROTO, E.; NURANNISA, R. L. The recent application of palm stearin in food industry: A review. *International Journal of Scientific & Technology Research*. 2020, roč. 9, č. 2, s. 2593. ISSN 2277-8616. Dostupné z: https://www.ijstr.org/final-print/feb2020/The-Recent-Application-Of-Palm-Stearin-In-Food-Industry-A-Review.pdf.
86. SZNITOWSKA, Malgorzata; DABROWSKA, Ewa A. a JANICKI, Stanislaw. Solubilizing potential of submicron emulsions and aqueous dispersions of lecithin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002, roč. 246, č. 1-2, s. 203-206. ISSN 0378-5173. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00395-2.
87. SZŰTS, Angéla a SZABÓ-RÉVÉSZ, Piroska. Sucrose esters as natural surfactants in drug delivery systems—A mini-review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, roč. 433, č. 1-2, s. 1-9. ISSN 0378-5173. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.076.
88. SZYMAŚ, B.; PRZYBYŁ, A. Midgut histological picture of the honey bee (*Apis mellifera* L.) following consumption of substitute feeds supplemented with feed additives. *Nauka Przyroda Technologie*. 2007, roč. 1, č. 4, s. 48–53. DOI: 0.2478/v10289-012-0001-2.
89. TAKAMATSU, Daisuke; SATO, Masumi a YOSHIYAMA, Mikio. Infection of *Melissococcus plutonius* clonal complex 12 strain in European honeybee larvae is essentially confined to the digestive tract. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2016, roč. 78, č. 1, s. 29-34. ISSN 0916-7250. Dostupné z: https://doi.org/10.1292/jvms.15-0405.
90. TCHOLAKOVA, Slavka, DENKOV, Nikolai D. a CAMPBELL, Barry. Stabilization of multiple emulsions using natural surfactants. *arXiv* [online]. 2017. Dostupné z: https://arxiv.org/abs/1705.08296
91. THORP, Robbin W.; BRIGGS, Dennis L.; ESTES, James R. a ERICKSON, Eric H. Nectar Fluorescence under Ultraviolet Irradiation. *Science*. 1975, roč. 189, č. 4201, s. 476-478. ISSN 0036-8075. Dostupné z: https://doi.org/10.1126/science.189.4201.476.

92. TITĚRA, M. Co všechno může stát za ztrátami včelstev. *Ministerstvo zemědělství ČR* [online]. 2020. Dostupné z: https://mze.gov.cz/public/portal/-q321783---E2EYc0OL/co-vsechno-muze-stat-za-ztratami.
93. UNE, Vidhita R.; BONDARDE, Mahesh P. a SOME, Surajit. Formulation and development of water-based fragrance from patchouli essential oils using nonionic surfactant. *Applied Nanoscience*. 2022, roč. 12, č. 7, s. 2117-2125. ISSN 2190-5509. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s13204-022-02489-4.
94. URBINA-VILLALBA, German. Nanoemulsion stability: experimental evaluation of the flocculation rate from turbidity measurements. *arXiv* [online]. 2012. Dostupné z: https://arxiv.org/abs/1205.4745
95. VANENGELSDORP, Dennis; EVANS, Jay D.; SAEGERMAN, Claude; MULLIN, Chris; HAUBRUGE, Eric et al. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE*. 2009, roč. 4, č. 8. ISSN 1932-6203. Dostupné z: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481.
96. VERHEIJEN-VOOGD, Christina. How worker bees perceive the presence of their queen. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*. 1959, roč. 41, č. 6, s. 527-582. ISSN 0340-7594. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/BF00299267.
97. VORLOVÁ, L.; PŘIDAL, A. Invertase and diastase activity in honeys of Czech provenance. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2002, roč. 50, č. 5, s. 57–66.
98. WAHL, Oscar a ULM, Kurt. Influence of pollen feeding and physiological condition on pesticide sensitivity of the honey bee *Apis mellifera carnica*. *Oecologia*. 1983, roč. 59, č. 1, s. 106-128. ISSN 0029-8549. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/BF00388082.
99. WAINSELBOIM, A. J. a FARINA, W. M. Trophallaxis in filled-crop honeybees (*Apis mellifera* L.): food-loading time affects unloading behaviour. *Naturwissenschaften*. 2000, roč. 87, č. 6, s. 280-282. ISSN 0028-1042. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s001140050722.
100. WILSON, Edward O. *Sociobiology: the new synthesis*. Cambridge: Harvard University Press, 1975.
101. WINSTON, Mark L. *The biology of the honey bee*. Cambridge, Mass.: Harvard University Press, 1991, c1987. ISBN 0-674-07409-2.

102. WYKES, G. R. The Preferences of Honeybees for Solutions of Various Sugars Which Occur in Nectar. *Journal of Experimental Biology*. 1952, roč. 29, č. 4, s. 511-519. ISSN 0022-0949. Dostupné z: https://doi.org/10.1242/jeb.29.4.511.

103. YUE, Dominique; NORDHOFF, Marcel; WIELER, Lothar H. a GENERSCH, Elke. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*. 2008, roč. 10, č. 6, s. 1612-1620. ISSN 1462-2912. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01579.x.

104. ZHENG, Hao; POWELL, J. Elijah; STEELE, Margaret I.; DIETRICH, Carsten a MORAN, Nancy A. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017, roč. 114, č. 18, s. 4775-4780. ISSN 0027-8424. Dostupné z: https://doi.org/10.1073/pnas.1701819114.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Pohled shora na klícku se včelami. 41
Obrázek 2: Boční pohled na klícku se včelami. 41
Obrázek 3: Petriho misky se včelami. 43
Obrázek 4: Petriho miska se včelami v detailu. 44
Obrázek 5: Příprava emulzí pomocí homogenizátoru. 45
Obrázek 6: Homogenizace po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min. 46
Obrázek 7: Emulze č. 1 připravená různými způsoby. 47
Obrázek 8: Emulze č. 1 připravená různými způsoby po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min. 48
Obrázek 9: Emulze č. 5 připravená různými způsoby. 48
Obrázek 10: Emulze č. 5 připravená různými způsoby po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min. 49
Obrázek 11: Emulze č. 11 připravená různými způsoby. 49
Obrázek 12: Emulze č. 11 připravená různými způsoby po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min. 50
Obrázek 13: Emulze č. 1 s různými koncentracemi emulgátoru. 51
Obrázek 14: Emulze č. 1 s různými koncentracemi emulgátoru po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min. 51
Obrázek 15: Emulze č. 1 s různými koncentracemi emulgátoru po 24 hodinách. 52
Obrázek 16: Emulze č. 1 s různými koncentracemi emulgátoru po 48 hodinách. 52
Obrázek 17: Emulze č. 1 s různými koncentracemi emulgátoru po 72 hodinách. 52
Obrázek 18: Emulze č. 1 s různými koncentracemi emulgátoru po 14 dnech. 53
Obrázek 19: Emulze č. 1 s různými koncentracemi emulgátoru po 30 dnech. 53
Obrázek 20: Emulze č. 5 s různými koncentracemi emulgátoru. 53
Obrázek 21: Emulze č. 5 s různými koncentracemi emulgátoru po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min. 54
Obrázek 22: Emulze č. 5 s různými koncentracemi emulgátoru po 24 hodinách. 54
Obrázek 23: Emulze č. 5 s různými koncentracemi emulgátoru po 48 hodinách. 54
Obrázek 24: Emulze č. 5 s různými koncentracemi emulgátoru po 72 hodinách. 54
Obrázek 25: Emulze č. 5 s různými koncentracemi emulgátoru po 14 dnech. 55
Obrázek 26: Emulze č. 5 s různými koncentracemi emulgátoru po 30 dnech. 55

Obrázek 27: Emulze č. 11 s různými koncentracemi emulgátoru. 55
Obrázek 28: Emulze č. 11 s různými koncentracemi emulgátoru po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min. 56
Obrázek 29: Emulze č. 11 s různými koncentracemi emulgátoru po 24 hodinách. ... 56
Obrázek 30: Emulze č. 11 s různými koncentracemi emulgátoru po 48 hodinách. ... 56
Obrázek 31: Emulze č. 11 s různými koncentracemi emulgátoru po 72 hodinách. ... 56
Obrázek 32: Emulze č. 11 s různými koncentracemi emulgátoru po 14 dnech. 57
Obrázek 33: Emulze č. 11 s různými koncentracemi emulgátoru po 30 dnech. 57
Obrázek 34: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z kůry skořice. 59
Obrázek 35: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z kůry skořice po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min. 59
Obrázek 36: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z kůry skořice po 24 hodinách. 60
Obrázek 37: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z kůry skořice po 48 hodinách. 60
Obrázek 38: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z kůry skořice po 72 hodinách. 60
Obrázek 39: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z kůry skořice po 14 dnech.. 61
Obrázek 40: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z kůry skořice po 30 dnech.. 61
Obrázek 41: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z hřebíčku. 62
Obrázek 42: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z hřebíčku po době míchání 10 minut, 20 °C při 1 500 ot./min. 62
Obrázek 43: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z hřebíčku po 24 hodinách. . 63
Obrázek 44: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z hřebíčku po 48 hodinách. . 63
Obrázek 45: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z hřebíčku po 72 hodinách. . 63
Obrázek 46: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z hřebíčku po 14 dnech..... 64
Obrázek 47: Emulze č. 1, 5 a 11 s esenciálním olejem z hřebíčku po 30 dnech..... 64

Seznam tabulek

Tabulka 1: Receptury emulzí. 33
Tabulka 2: Receptura emulze č. 1. 35
Tabulka 3: Receptura emulze č. 5. 36
Tabulka 4: Receptura emulze č. 11. 36
Tabulka 5: Receptura emulze s esenciálním olejem z hřebíčku. 37
Tabulka 6: Receptura emulze s esenciálním olejem z kůry skořice. 37
Tabulka 7: Receptury emulzí použitých při prvním pokusu na včelách. 40
Tabulka 8: Receptury emulzí použitých při druhém pokusu na včelách. 42
Tabulka 9: Receptury emulzí použitých při 3. pokusu na včelách 43
Tabulka 10: Úhyn včel a spotřeba emulzí v průběhu experimentu s 0,5 % esenciálního oleje. 68

Seznam grafů

Graf 1: Spotřeba krmiva (µl) na jedince při použití emulgátoru Sucragel AP V2. 69
Graf 2: Pravděpodobnost přežití včel během 7 dní při použití emulgátoru Sucragel AP V2. 70
Graf 3: Spotřeba krmiva (µl) na jedince při použití emulgátoru Natpure Sol SL. 71
Graf 4: Pravděpodobnost přežití včel během 7 dní při použití emulgátoru Natpure Sol SL. 71