

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra rostlinné výroby



VYUŽITÍ SILIC PROTI PATOGENU *PAENIBACILLUS*
LARVAE, PŮVODCI MORU VČELÍHO PLODU

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Pavel Klouček, Ph.D.

Autor práce: David Binhack

2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Využití silic proti patogenu *Paenibacillus larvae*, původci moru včelího plodu“ vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne: 11. dubna 2010.

David Binhack

Poděkování

Rád bych poděkoval panu Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D. za trpělivé vedení mojí práce, za ochotu a pomoc, které se mi dostalo vždy, když bylo potřeba.

Mojí přítelkyni chci poděkovat za podporu a pochopení, jež mi dodávaly sílu pokaždé, když mi práce nešla tak, jak bych si představoval.

Souhrn

Cílem této práce je vytvořit ucelený přehled a vzájemné porovnání výsledků získaných z laboratorních testování rostlinných silic vzhledem k jejich inhibičnímu účinku na růst gram-pozitivních sporulujících bakterií *Paenibacillus larvae*, napadajících nejmladší stádia larev včely medonosné a způsobujících tak onemocnění AFB - mor včelího plodu (AFB – American Foulbrood). Toto onemocnění patří k nejzávažnějším chorobám, které postihují společenstva včely medonosné, je vysoce nakažlivé a pro infikovaná společenstva bývá většinou smrtelné.

Výsledky, které byly k vytvoření tohoto přehledu použity, byly získávány a v literatuře publikovány v poměrně širokém časovém horizontu a pocházejí z různých, často velmi vzdálených vědeckých pracovišť. Testované silice byly během testů aplikovány odlišnými metodami a v rozličných koncentracích. Dostupné výsledky jsou proto velmi nesourodé a jsou vyjádřeny různými způsoby. Na základě shromáždění a sjednocení těchto výsledků mohly být určeny nejúčinnější silice, byly porovnány jednotlivé metody použité k testování silic, byly posouzeny jejich výhody a nevýhody a mohly být srovnány výsledky jednotlivých silic testovaných více metodami.

Na základě srovnání výsledků 32 testovaných silic byly vyhodnoceny jako nejúčinnější silice extrahované z rostlin *Armoracia rusticana*, *Majorana syriaca* a *Thymus vulgaris*. Tyto silice vykazovaly silný inhibiční účinek v koncentracích nižších než 64 µl/l. Jako nejúčinnější metoda byla určena volatilizační metoda - disková difúzní metoda v plynné fázi.

Ze shromážděných dat je zřejmé, že rostlinné extrakty a silice mají velký potenciál inhibovat růst mikroorganismu *Paenibacillus larvae*. Vzhledem k tomu, že jediná současná možná léčba tohoto onemocnění, léčba antibiotiky, je z hygienických důvodů v Evropské unii zakázána, je mor včelího plodu likvidován pouze kompletním spálením nakažených včelstev a veškerého kontaminovaného příslušenství. Je proto nutné hledat alternativní cesty léčby a jednou z nich by mohly být právě silice, jejichž účinek je ve vědecké literatuře zdokumentován.

Klíčová slova: silice, včela medonosná, *Paenibacillus larvae*, mor včelího plodu

Summary

The objective of this paper is to create a complete list of results and their comparison, which have been obtained from different „*in vitro*“ tests of several plant essential oils. These compounds were tested for their inhibition effects against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood – one of the most serious honey bees (*Apis mellifera*) disease. This gram-positive spore-forming bacterium affects the youngest stadium of honey bee larvae, is a high infective and usually is lethal for whole honey bee colony.

Results, which have been used in this paper, were obtained and published in literature in wide time period and results were obtained by separate and long-distanced expert workplaces. Essential oils were tested by different methods and with different concentrations. Results, which I have used, were often expressed in different ways. When these results were collected and compared, the most effective essential oils were chosen, general methods used in “*in vitro*” tests were compared, their advantages and drawbacks were discussed and also results of same essential oils obtained by different methods could be compared.

On the basis of results of 32 tested pure essential oils, as the best ones were established essential oils gained from *Armoracia rusticana*, *Majorana syriaca* and *Thymus vulgaris*. These compounds had a lowest MIC (MIC – minimum inhibitory concentration) under 64 µl/l. The most effected method was established Disc volatilization method.

From all collected results there is evident that essential oils have a high potential to inhibit a growth of *Paenibacillus larvae*. Today, the only possible treatment – by antibiotics – is forbidden in European Union because of various hygienic hazards. The only practice against American foulbrood is to burn infected honey bee colonies and all contaminated accessories. So there is a great need to search an alternative treatment. One way can be using of essential oils, because their inhibition effect is well documented in scientific literature.

Key words: essential oils, *Apis mellifera*, *Paenibacllus larvae*, American foulbrood

Obsah

Prohlášení	2
Poděkování	3
Souhrn	4
Obsah	6
1. Úvod	7
2. Cíl práce	10
3. Literární rešerše	11
3.1. Nemoci včel	11
3.1.1. Mor včelího plodu	11
3.1.2. <i>Varroa destructor</i>	13
3.1.3. Nosemóza	13
3.1.4. Hniloba včelího plodu	14
3.1.5. Vápenatění včelího plodu	14
3.2. Silice	14
3.2.1. Chemické složení silic	15
3.2.2. Využití silic v historii	15
3.2.3. Současné využití silic	16
4. Výsledky	17
4.1. Úvod k výsledkům	17
4.2. TAB1 – porovnání MIC jednotlivých testovaných silic	18
4.3. Vyhodnocení	19
5. Diskuze	21
5.1. Metody aplikace silic „ <i>in vitro</i> “	21
5.1.1. Diluční metody	21
5.1.2. Difúzní metody	22
5.1.2.1. Volatilizační metoda	23
5.1.3. Určení nejúčinnější metody	23
5.2. Použití silic „ <i>In vivo</i> “	24
5.2.1. Chování včel	25
5.3. Spory <i>Paenibacillus larvae</i>	25
5.4. Silice a ostatní včelí onemocnění	26
6. Závěr	27
7. Seznam literatury	29

1. Úvod

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je od pradávna přirozenou součástí světových ekosystémů a včelařství patří mezi nejstarší obory lidské činnosti. Hlavní produkt včely medonosné (z hlediska historického využití) – včelí med - byl používán v evropské kuchyni jako hlavní sladidlo až do nástupu průmyslové výroby řepného cukru v 19. století. Další významný produkt – včelí vosk – byl již ve starověku využíván společně se zvířecím lojem k výrobě svíček, při zpracování kovů a v kosmetice. Tyto potřeby medu, vosku a dalších včelích produktů (např. pyl, propolis, mateří kašička, včelí jed) způsobily, že včela medonosná počala být již ve starověku cíleně chována a stala se tak postupně nedílnou součástí světového zemědělství.

V evropské flóře známe více než 200 druhů rostlin, které včela medonosná opyluje (Detzel a Wink 1993). Jak včely divoce žijící, tak včely chované v umělých chovech, hrály a hrají nezastupitelnou roli v opylování těchto hmyzosubných rostlin a to jak v přírodních podmínkách, tak i u rostlin zemědělsky pěstovaných. U řady zemědělských plodin hraje opylování včelou medonosnou zcela zásadní roli (např. *Brassica napus*) a bez její účasti by intenzivní produkce těchto plodin nebyla prakticky možná (Mesquida a kol. 1988).

Chov včely medonosné je proto dnes neoddělitelnou součástí a často i nutnou podmínkou řady odvětví rostlinné produkce. Také včelí produkty jsou na trhu neustále poptávány, a ačkoli řepný cukr vytlačil med, coby hlavní sladidlo, na okraj zájmu společnosti, jako potravina pro zdravou výživu je med neustále zákazníky vyhledáván. Ostatní včelí produkty jako vosk, pyl, jed a mateří kašička, nalézají své uplatnění ve farmacii, kosmetice a v neposlední řadě i v lidovém léčitelství. Včela medonosná je nepostradatelným faktorem v rostlinné i živočišné produkci a její chov, ať už zájmový či profesionální, má velmi podstatný ekonomický význam (Winston 1991).

Stejně jako většina hospodářských živočichů je i včela medonosná napadána celou řadou chorob a škůdců, proti kterým je nutno ji chránit a je třeba neustále pracovat na účinnějších metodách její ochrany.

Jedním z nejnebezpečnějších škůdců včely medonosné je gramm-pozitivní sporulující bakterie *Paenibacillus larvae*, způsobující vysoce infekční onemocnění AFB – mor včelího plodu (AFB – American Foulbrood). Tyto mikroorganismy napadají trávicí trakt nejmladšího stádia larev včely medonosné (Fuselli a kol. 2006) a působí jejich uhynutí přímo v buňce plástu. Tato celosvětově rozšířená choroba včely medonosné je nebezpečná nejen pro

napadené jedince, ale díky svému snadnému šíření ve včelstvu je potenciálně smrtelná pro celé infikované společenstvo (*Ashiralieva a Genersch 2006*).

Zeměpisný původ původce moru včelího plodu, bakterie *Paenibacillus larvae*, je nejasný. Dnes je tato choroba celosvětově rozšířena, ucelené informace o intenzitě nákazy v jednotlivých státech však chybí nebo jsou nekompletní. Řada států totiž používá různá kritéria hodnocení intenzity nákazy, případně neposkytují ucelené informace do mezinárodních databází. V Evropě se předpokládá nákaza průměrně u 3 – 10% včelstev, v České republice je situace dlouhodobě příznivá, v ohniscích nákazy se jich nalézají necelých 0,1% (*Titěra 2007*).

Je jisté, že toto onemocnění bylo známo již ve starověku. Již Aristoteles popisuje ve svém díle onemocnění včel, projevující se „apatii a únavou části včel a nepříjemným zápachem vycházejícím z úlu“. V roce 1769 pojmenovává saský naturalista Schirach toto včelí onemocnění názvem „Foulbrood“ (překlad: mor). V roce 1906 bylo zjištěno, že tento název je ve skutečnosti používán pro dvě rozdílná onemocnění – pro mor včelího plodu způsobeného bakterií *Paenibacillus larvae* a pro hnilobu včelího plodu, jejímž původcem jsou méně nebezpečné (nesporulující) mikroorganismy *Melissococcus pluton* a *Bacillus alvei* (*Ashiralieva a Genersch 2006*).

V současnosti jsou ve světě používány dva způsoby kontroly nákazy včelstev morem včelího plodu – podávání antibiotik nebo likvidace ohnisek nákazy utracením nakažených včelstev a jejich spálením, spolu s veškerým kontaminovaným příslušenstvím (*Alippi a kol. 1996*). Léčba antibiotiky je velice problematická a v Evropské unii je legislativou zakázána (EEC Regulation 2377/90). Použití antibiotik je tak v Evropské unii nelegální (*Reybroeck 2003*). Používaná antibiotika jako Oxytetracyklin a Tylosin zanechávají rezidua ve včelích produktech, což je z hygienického hlediska nepřijatelné. Hlavním problémem je však postupný vznik rezistence původce choroby *Paenibacillus larvae* k antibiotikům a také fakt, že antibiotika pouze potlačují symptomy choroby, ale z dlouhodobého hlediska nemohou infikované včelstvo zcela vyléčit (*Titěra 2007*). Antibiotika totiž nepůsobí na stádium spory původce onemocnění, takže po ústupu účinku antibiotik může dojít k vyklíčení spor a k opětovnému propuknutí nemoci. Druhá možná alternativa - utracení a pálení nakažených včelstev a veškerého kontaminovaného příslušenství je problematická především tím, že působí velké ekonomické škody jak profesionálním, tak i zájmovým včelařům (*Fuselli a kol. 2008*). Z tohoto faktu vyvstávají další rizika způsobená především lidským faktorem - například méně zodpovědní včelaři bojíci se finanční ztráty často odmítají svá včelstva na přítomnost moru včelího plodu nechat vyšetřit, případně mohou zjištěnou nákazu tajit a

podobně. Toto počínání vede obvykle v ohnisku nákazy ke zhoršení situace a k postupnému šíření nemoci z ohniska ven. Důsledky pro postižené včelaře bývají na konec samozřejmě o to horší a často na jejich počínání doplácí i včelaři sousedící. Přesto je však v současnosti oprávněnými autoritami pokládán tento postup za jediný zodpovědný způsob kontroly této nebezpečné a vysoce nakažlivé nákazy.

Obě tyto metody kontroly onemocnění mají tedy svá nezanedbatelná rizika a nevýhody. Je zřejmé, že by měly být hledány nové, alternativní způsoby léčby, které by přinesly uspokojivé výsledky a zároveň potlačily nevýhody metod v současnosti používaných. Jednou z cest by mohlo být používání rostlinných silic či jiných rostlinných extraktů s baktericidními účinky. Tato praxe není pro včelařství dnes nikterak neznámá – různé organické látky včetně silic se pro léčbu jiných onemocnění včel již úspěšně používají. Například kyselina mravenčí (u nás výrobek Formidol) je s úspěchem používán pro tlumení nákazy roztočem *Varroa destructor* (Kanga a kol. 2002), velmi vhodná je taktéž pro prevenci vzniku nose mózy včel (původce *Nosema apis*). Z rostlinných extraktů se, taktéž jako účinná látka proti *Varroa destructor*, používá přípravek Apilife - účinnou látkou je sloučenina izolovaná z rostliny *Thymus vulgaris* - thymol (Bogdanov a kol. 1998).

Mnoho silic, rostlinných extraktů a organických látek bylo již laboratorně testováno na svůj inhibiční vliv na původce choroby, bakterii *Paenibacillus larvae*. Mnoho z nich se prokázalo jako účinných, zejména silice ukázaly velký potenciál. Právě silice by se mohly stát látkami, které v budoucnu nahradí stávající způsoby léčby a likvidace moru včelího plodu a to metodou nedestruktivní a hygienicky nezávadnou.

2. Cíl práce

V této práci bych rád shrnul veškeré dostupné výsledky získané během testování rostlinných silic jako inhibičních látek proti původci moru včelího plodu - gramm-pozitivní sporulující bakterii *Paenibacillus larvae*. Uvedené silice byly převážně testovány „*in vitro*“ během laboratorních pokusů. Testy, jejichž výsledky jsem pro svou práci použil, probíhaly na různých pracovištích nezávisle na sobě, v různých časech a bylo použito několik typů metod, které se svým způsobem aplikace silic proti bakterii *Paenibacillus larvae* navzájem liší. Použité silice byly extrahovány z rostlin pocházejících z různých částí Země a jejich chemické složení bylo s největší pravděpodobností rozdílné. Výsledky jsou často vyjádřeny odlišnými způsoby. Získaný soubor dat je proto značně nesourodý, veškeré závěry vyvozené z jejich vzájemného porovnání by proto měly být chápány pouze jako orientační vyhodnocení.

Cílem této práce je maximálně sjednotit získané výsledky, porovnat je, s přihlédnutím k metodě, kterými byly dosaženy, dále orientačně určit silice, které vykazují nejvyšší aktivitu a mohly by proto v budoucnu sloužit jako alternativní léčivo. Budou porovnány jednotlivé metody aplikace silic, budou popsány jejich výhody a nevýhody a bude určena metoda nejúčinnější a pro případné využití v praxi nejvhodnější.

3. Literární rešerše

3.1. Nemoci včel

Mor včelího plodu (*Paenibacillus larvae*) a hniloba včelího plodu (*Melissococcus pluton*) jsou dvě nejzávažnější bakteriální onemocnění napadající včelu medonosnou. Včelstva jsou však ohrožována i celou řadou onemocnění nebakteriálního původu, především roztoči, houbami a dalšími parazity. Mezi nejvýznamnější škůdce patří roztoč *Varroa destructor*, dále parazitické onemocnění „nosemóza“ způsobené hmyzomorkou včelí (*Nosema apis*). Závažné onemocnění působí houba *Ascosphaera apis* – vápenatění včelího plodu.

3.1.1. Mor včelího plodu

Jak již bylo zmíněno, mor včelího plodu (AFB – American Foulbrood) je nejzávažnějším onemocněním včely medonosné (*Apis mellifera*). Je způsobeno gram-pozitivní bakterií *Paenibacillus larvae* z kmene *Firmicutes*. Napadá nejmladší stádia larev včely medonosné - kontaminace sporami nastává s příjmem potravy, ve které jsou tyto spory obsaženy. Larvy jsou k propuknutí nemoci nejnáchylnější několik hodin po vylíhnutí z vajíček (*Riessberger-Galle a kol. 2001*). Spory následně vyklíčí ve střevě, vzniklé vegetativní buňky se hemolymfou rozšíří do celého těla, dojde k jejich namnožení na miliony jedinců a nakažená larva umírá. Vegetativní buňky *Paenibacillus larvae* v této fázi začnou vytvářet novou generaci spor, které jsou okamžitě připraveny infikovat další čerstvě vylíhlé larvy (*Steinkraus a Morse 1996*). Tyto spory se po včelí kolonii šíří na dospělých dělnicích, především na těch, které mají ve včelstvu na starosti čištění buněk v plástu. Pokud včelí dělnice čistí buňku, ve které zemřela larva na mor včelího plodu, přijde do kontaktu se sporami a ty potom roznáší po celém společenstvu. Dospělí jedinci jsou proti těmto sporám odolné a žádné příznaky nemoci u nich nejsou pozorovány (*Crailsheim a Riessberger-Galle 2001*). V další etapě svého života se dělnice, které vyklízejí a čistí buňky plástu, starají právě o vajíčka a čerstvě vylíhlé larvy – zajišťují jejich krmění. Zde se spory nemoci dostávají do potravy, kterou pak včely „pečovatelky“ podávají právě vylíhnutým larvičkám a celý cyklus se opakuje (*Alippi 1999*).

Mimořádná odolnost spor moru včelího plodu je při kontrole této nemoci největším problémem. Dokáží odolat totálnímu vysušení, teplotám nad 100°C (více než 10 minut),

dokáží odolat expozici UV záření a jsou odolné i proti běžným desinfekčním prostředkům (např. 10% roztok formaldehydu) po dobu více než 5 hodin (*Alippi 1999*). Tyto vlastnosti spor dělají tuto nemoc právě tak obtížně zvládnutelnou, protože i když dojde například antibiotiky k potlačení symptomů nemoci, spory zůstávají životaschopné a ve vhodných podmínkách způsobí opětovné propuknutí nemoci (*Titěra 2007*). Proto se v Evropské unii volí k bezpečné likvidaci obvykle cesta utracení nakažených včelstev a následnému spálení úlů a dalšího příslušenství, které by mohlo být sporami kontaminováno.

Šíření nemoci mezi jednotlivými uměle chovanými včelstvy, případně mezi jednotlivými včelařskými stanovišti, je usnadněno běžnou včelařskou praxí – sdílením včelařského náčiní i chovného materiálu a jeho používáním ve všech obhospodařovaných včelstvech v provozu. Kočování se včelami za vhodnými zdroji snůšky medu a také obchod se včelími produkty, ve kterých jsou spory choroby obsaženy, usnadňuje přenos nemoci na velké vzdálenosti a dochází jednoduše ke vzniku dalších ohnisek nákazy (*Ashiraliyeva a Genersch 2006*).

K jiným způsobům šíření onemocnění dochází jak u včel divoce žijících, tak u včel uměle chovaných. K šíření dochází prostřednictvím procesů ve včelstvech, která jsou pro ně přirozená – jedná se především o rojení, loupeže a migrace určitého počtu včelích dělnic a trubců do cizích včelstev.

Rojení označujeme jako vertikální přenos nemoci (*Fries a kol. 2006*). Během rojení se včelstvo rozděluje na mateřské včelstvo a dceřiný roj – roj vzniklý z infikovaného včelstva sice nemá při opuštění mateřského včelstva plod a larvy, u kterých by nemoc propukala, ale dospělí jedinci migrující s rojem do nového místa usídlení na sobě nesou spory nemoci, které při usazení roje a založení první generace larev tyto larvy opět infikují. Roje se navíc mohou pohybovat na velké vzdálenosti a zakládat nová ohniska nákazy v místech dosud nepostížených. I proto mimo jiné ve včelařské praxi platí více či méně dodržovaná zásada o nutnosti likvidace rojů neznámého původu.

Mezi horizontální způsoby přenosu nemoci patří včelí loupeže a migrace jedinců mezi včelstvy. Je-li včelstvo z nějakého důvodu oslabeno (jedním z důvodů může být například nákaza morem včelího plodu), jeho schopnost bránit samo sebe a své zásoby medu se snižuje. Často se pak stává obětí jiných, silnějších včelstev, která pak med z těchto oslabených včelstev považují za snadný zdroj snůšky pro sebe, oslabené včelstvo napadnou a vydrancují. V tomto medu jsou již obsaženy spory moru včelího plodu a další množství spor odnášejí včely na svých tělech. V jejich mateřských včelstvech pak nemoc snadno propuká (*Genersch 2008*).

Migrace dospělých včelích dělnic a trubců je dalším způsobem přenosu nemoci. Tam, kde je koncentrace včelstev vysoká (umělé chovy), určitá část včel zalétá do včelstev cizích, především trubci často nedodržují svou příslušnost k mateřskému včelstvu. Pokud mají ze svého mateřského včelstva po svém těle spory moru včelího plodu, mohou jím tato nová včelstva nakazit. Ve volné přírodě, kde jsou divoce žijící včelstva od sebe navzájem daleko více izolována vzdálenostmi, nebyl tento způsob přenosu nemoci zatím pozorován (*Fries a Camazine 2001*).

Jak již bylo zmíněno v úvodu, tato nemoc je svými důsledky a svojí schopností se šířit, považována za nejnebezpečnější onemocnění postihující včelu medonosnou. Shrnutí baktericidních vlastností rostlinných silic, jako potenciálních alternativních léčiv, je proto vztaženo k tomuto onemocnění.

3.1.2. *Varroa destructor*

Varroa destructor (kleštík včelí) je parazitický roztoč včely medonosné a včely východní. Patří do čeledi kleštíkovití (*Varroidae*). Vzhledem k tomu, že v evropských podmínkách je invazním druhem, včela medonosná není nijak vybavena k přirozenému boji s tímto škůdcem a bez lidských zásahů může mít nákaza zničující účinky. Roztoč je dnes téměř celosvětově rozšířen a jeho potlačování a kontrola patří v evropském včelařství k běžné praxi (*Imdorf a kol. 1999*). Tento roztoč parazituje na larvách včel, jejichž hemolymfou se živí (*Ariana a kol. 2002*). Snižuje celkově kondici včelstva, letovou aktivitu a působí změny v přirozeném chování (*Ellis a Delaplane 2009*). Vzhledem ke svému poměrně pomalému rozmnožování dosahuje nebezpečného množství ve včelstvu cca 2 – 3 roky po nákaze. V této situaci oslabené včelstvo není obvykle schopno přečkat zimu a uhyne. *Varroa destructor* také díky tomu, že zhoršuje kondici včelstva, tvoří postižená včelstva daleko náchylnější k ostatním včelím onemocněním.

Pro tlumení nákazy se s úspěchem používá látka Thymol (rostlinný extrakt z *Thymus vulgaris*), z organických těkavých látek kyselina mravenčí (*Underwood a Currie 2003*).

3.1.3. Nosemóza

Toto onemocnění vyvolává mikroskopická houba hmyzomorka včelí (*Nosema apis*) z čeledi *Nosematidae*. Jedná se o vnitrobuněčného parazita, žijícího v trávicím traktu dospělých včel, později proniká do hemolymfy a způsobuje celkové selhání trávicího a

vylučovacího traktu (*Olsen a kol. 1986*) a následný úhyn. Ve včelstvu se šíří sporami obsaženými ve stravě. Nákaza se projevuje především průjmovým onemocněním, které během zimního období nadměrně zatěžuje výkalové váčky. Bez možnosti vyprázdnění během proletu v zimě včelstvo snadno zkolabuje.

Velmi účinným léčivem nose mózy je Formidol - kyselina mravenčí.

3.1.4. Hniloba včelího plodu

Původcem onemocnění hnilobou včelího plodu (EFB – European Foulbrood) je gram-pozitivní bakterie *Melissococcus pluton*. Symptomy této nemoci jsou velmi podobné symptomům moru včelího plodu a dlouhou dobu byla hniloba včelího plodu za mor také považována. Bakterie napadají nejmladší stádia larev včely medonosné, a pokud není zahájena včasná léčba, může dojít k brzkému úhynu celého včelstva. Na rozdíl od patogenu *Paenibacillus larvae*, původci moru včelího plodu, však *Melissococcus pluton* nesporuluje a jeho infekčnost je proto nižší. Díky tomu je nákaza tímto onemocněním daleko lépe kontrolovatelná a často dobře léčitelná (*Alippi 1999*).

3.1.5. Vápenatění včelího plodu

Jedná se o onemocnění vyvolané houbou *Ascospheara apis*. Nejohroženější jsou larvy včely medonosné staré cca 3 – 4 dny. Při nákaze jsou larvy nejprve obrůstány bílým myceliem, které postupně rozruší buněčnou stavbu a larvy umírají (*Larran a kol. 2001*). *Ascospheara apis* je společně s *Paenibacillus larvae* často zkoumána na citlivost rostlinných extraktů a silic, které by v budoucnu mohly být použity jako alternativní, přírodní léčivo i proti tomuto onemocnění.

3.2. Silice

Rostliny vytvářejí více než 100000 rozličných látek, z nichž mnoho vykazuje antimikrobiální účinky (*Lewis a Ausubel 2006*). Z těchto důvodů byla řada rostlinných látek využívána k léčebným a konzervačním účelům již od pradávna. Tyto léčivé a antimikrobiální účinky rostlin jsou přičítány často silicím – tj. přírodním těkavým, ve vodě nerozpustným, olejovitým kapalným látkám, které mají často výraznou vůni a palčivou chuť. Chemicky se

jedná o skupinu látek skládající se převážně z terpenů, terpenových derivátů a celé řady dalších látek. Jejich hustota je obvykle nižší než hustota vody. Z rostlin se obvykle získávají parní destilací nebo hydrodestilací, lisováním, fermentací a pod. (Edris 2007). V rostlinách se vyskytují převážně v květech, semenech, listech, pupenech, dále ve dřevu, kůře a v kořenech. V současnosti je k získávání silic komerčně využíváno okolo 300 rostlinných druhů z celkového počtu asi 3000 druhů, které silice vytvářejí (Burt 2004).

Nejvýznamnější rostlinné čeledi, které tvoří silice jsou borovicovité (*Pinaceae*), hluchavkovité (*Lamiaceae*), kakostovité (*Geraniaceae*), vavřínovité (*Lauraceae*), růžovité (*Rosaceae*), miříkovité (*Apiaceae*) a myrtovité (*Myrtaceae*).

3.2.1. Chemické složení silic

Silice jsou přírodní látky vznikající u celé řady rostlin. Jedná se o kapaliny, jejichž objemová hmotnost je obvykle v rozmezí od 0,7 do 1,0 násobku hmotnosti vody. Jsou ve vodě nerozpustné, rozpustné jsou v nepolárních látkách, např. v tucích, alkoholech a etherech. Za nízkých teplot snadno těkají, jsou vonné, často s výraznou svíravou chutí. (Hay a Waterman 1993; Baser a Buchbauer 2010)

Jedná se převážně o směsi terpenů (organické sloučeniny rostlinného původu), především o monoterpeny a seskviterpeny. Jako další látky mohou být v silicích přítomny diterpeny, dále široké spektrum alifatických uhlovodíků, vyskytují se i alkoholy, aldehydy, karboxylové kyseliny a estery. Výjimečně se mohou také vyskytovat sloučeniny dusíku a síry (Dorman a Deans 2000).

Za své specifické vlastnosti, ceněné v kosmetice (vůně), v kulinářství (chutě) a v medicíně vděčí silice především terpenům. Terpeny jsou látky skládající se z molekul isoprenu (isopren: 2-methyl-1,3-butadien) Dvě isoprenové jednotky tvoří monoterpeny, tři jednotky seskviterpeny, atd. Tyto látky nazýváme také isoprenoidy.

3.2.2. Využití silic v historii

Silice byly již ve starověku využívány pro své aromatické, chuťové a ochranné účinky, především k výrobě vonných esencí, jako koření k ochucování stravy a také v léčitelství. Získávány byly destilací již před více než 2000 lety v oblasti Indie, Persie a Egypta. Do Evropy znalost jejich používání a získávání dostala okolo 9. století s Araby. Jejich využití, převážně ve farmacii se však masově rozšířilo až v 16. století, především v Anglii. Využívány

byly především silice ze skořice (*Cinnamomum*), anýzu (*Pimpinella anisum*), muškátu (*Myristica fragrans*), z kůry jalovců (*Juniperus*) dále z rozmarýnu (*Rosmarinus*) a z levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) a vzácně i z dalších (Burt 2004).

Během 19. století byly experimentálně ověřovány jejich antimikrobiální účinky. I přesto, že se řada silic prokázala jako účinná proti řadě druhů bakterií, během 19. a 20. století se jejich využití v medicíně stává pouze okrajovou záležitostí, hlavním využitím silic se stává především kosmetika a potravinářství, které využívají jejich výrazných chutí a aroma.

3.2.3. Současné využití silic

V současné době se silice využívají především v potravinářství jako ochucovadla a konzervační látky, dále v kosmetice jako vonné esence a ve farmacii. Jejich antibakteriální a antiseptické vlastnosti nacházejí použití například u přípravků na ochranu zubů (např. pasty, výplně kanálků zubních kořenů). V zemědělství se s nimi lze setkat například jako s výživovým doplňkem, přidávající se do náhradního mléka u mladých kojících se prasat v chovech a podobně (Burt 2004).

4. Výsledky

4.1. Úvod k výsledkům

V následující tabulce (TAB1) je uveden seznam silic, které byly na různých pracovištích testovány proti původci moru včelího plodu, gramm-pozitivní bakterii kmene *Firmicutes*, *Paenibacillus larvae*. Testy byly prováděny „*in vitro*“ a celkem bylo používáno pět různých metod – makrodiluční metoda (TDM - tube dilution method) (*Waisbren a kol. 1951*), mikrodiluční metoda (BMM - broth microdilution method), agarová diluční metoda (ADM - agar dilution method) (*Alcala a kol. 1998*), agarová difúzní metoda (ADFM - agar diffusion method) (*Bonev a kol. 2008*) a disková difúzní metoda v plynné fázi (DVM - disc volatilization method) – dále volatilizační metoda (*Nedorostova a kol. 2009*).

U většiny testovaných silic byla zjištěna hodnota minimální inhibiční koncentrace – MIC (minimum inhibitory concentration) – koncentrace, kdy testovaná silice počala být proti bakteriím účinná (*Burt 2004*). Prostřednictvím hodnot MIC lze účinnost jednotlivých silic navzájem porovnávat. V této práci považuji jednotlivé MIC za srovnatelné z hlediska účinku na *Paenibacillus larvae*, nehledě na metodu, kterou byly dosaženy. Toto je umožněno díky sjednocení uváděných koncentrací na dvě srovnatelné hodnoty – $\mu\text{l/l}$ (mikrolitr na litr) a mg/l (miligram na litr). Objemová hmotnost silic se pohybuje obvykle v rozmezí 0,7 – 1,0 g/ml^3 , při použitých koncentracích a především při uváděných rozpětích těchto koncentrací, proto považuji μl a mg silice za porovnatelné množství. U některých silic bylo z literatury zjištěno pouze to, že se během testů prokázaly jako aktivní. Tyto silice jsou v tabulce označeny „aktivní“ a znamená to, že byl prokázán jejich inhibiční vliv na *Paenibacillus larvae*, nebyla však zaznamenána nebo změřena jejich MIC. U některých silic nebyla zjištěna metoda, kterou byly testovány. Tyto silice jsou zahrnuty do vzájemného porovnání účinností proti patogenu *Paenibacillus larvae*, nejsou však zohledňovány při vzájemném porovnávání metod.

Přesto však mezi jednotlivými metodami testování silic existují podstatné rozdíly, vycházející z principů, na kterých metody pracují, a které mohou ovlivňovat konečné výsledky. Porovnání metod a jejich výhod a nevýhod bude provedeno dále.

Celkem byly nalezeny výsledky z testování 32 různých silic. Nejčastěji testovanými silicemi byly silice získané z *Thymus vulgaris* (tymián obecný) – třikrát - a *Tagetes minuta* (askamitník malý) - třikrát. Více než jednou byly testovány silice z *Cinnamomun zeylanicum*

(skořicovník cejlonský), *Citrus sinensis* (citrónovník čínský) a *Satureja hortensis* (saturejka zahradní).

4.2. TAB1 – porovnání MIC jednotlivých testovaných silic

Původ silice	MIC (zdroj)	Jednotky	Metoda	Český název
<i>Acantholippia seriphoides</i>	200 – 250 (1)	mg/l	TDM	tymián andský
<i>Allium sativum</i>	350 (2)	μl/l	BMM	česnek kuchyňský
<i>Armoracia rusticana</i>	16 (3)	μl/l	DVM	křen selský
<i>Cinnamomum glandulifera</i>	Aktivní (4)			skořicovník žlaznatý
<i>Cinnamomun zeylanicum</i>	50 – 150 (5)	mg/l	TDM	skořicovník cejlonský
<i>Cinnamomun zeylanicum</i>	50 – 100 (6)	mg/l	ADFM	skořicovník cejlonský
<i>Citrus sinensis</i>	50 – 400 (6)	mg/l	ADFM	citroník čínský
<i>Citrus sinensis</i>	840 (7)	mg/l	BMM	citroník čínský
<i>Citrus paradisi</i>	385 (7)	mg/l	BMM	citroník rajský
<i>Citrus nobilis</i>	815 (7)	mg/l	BMM	citroník ušlechtilý
<i>Citrus limon</i>	764 (7)	mg/l	BMM	citroník limonový
<i>Coriandrum sativum</i>	Aktivní (4)			koriandr setý
<i>Cuminum cyminum</i>	50 – 400 (6)	mg/l	ADFM	kmín římský
<i>Cymbopogon citratus</i>	50 – 100 (4)	μl/l	ADM	voňatka citrónová
<i>Eucaliptus globulus</i>	700 (4)	μl/l	ADM	blahovičník kulatoplodý
<i>Heterothalamus alienus</i>	800 – 900 (8)	mg/l	ADM	
<i>Laurus nobilis</i>	350 – 450 (4)	mg/l		vavřík vznešený
<i>Lavandula hybrida</i>	450 – 600 (4)	μl/l	ADM	levandule hybridní
<i>Lippia turbinata</i>	800 – 1000 (1)	mg/l	TDM	
<i>Majorana syriaca</i>	64 (3)	μl/l	DVM	majoránka zahradní
<i>Mentha x piperita</i>	600 – 650 (4)	μl/l	ADM	máta peprná
<i>Mintosthachys mollis</i>	700 – 800 (1)	mg/l	TDM	
<i>Myristica fragrans</i>	Aktivní (9)			muškátovník pravý
<i>Ocimum basilicum</i>	350 – 450 (4)	mg/l		bazalka vonná
<i>Origanum vulgare</i>	250 – 450 (4)	μl/l	ADM	dobromysl obecná
<i>Pelargonium graveolens</i>	Aktivní (9)			muškát vonný
<i>Piper nigrum</i>	Aktivní (9)			pepř černý

<i>Rosmarinus officinalis</i>	700 (4)	µl/l	ADM	rozmarýn lékařský
<i>Salvia tomentosa</i>	Aktivní (9)			šalvěj plstnatá
<i>Satureja hortensis</i>	250 – 300 (4)	µl/l	ADM	saturejka zahradní
<i>Satureja hortensis</i>	128 (3)	µl/l	DVM	saturejka zahradní
<i>Schinus molle var. areira L</i>	600 – 750 (1)	mg/l	TDM	pepřovec balzámový
<i>Syzygium aromaticum</i>	Aktivní (9)			hřebíčkovce kořený
<i>Tagetes minuta</i>	700 – 900 (1)	mg/l	TDM	aksamitník malý
<i>Tagetes minuta</i>	700 – 800 (10)	µl/l	DVM	aksamitník malý
<i>Tagetes minuta</i>	Aktivní (4)			aksamitník malý
<i>Thymus vulgaris</i>	64 (3)	µl/l	DVM	tymián obecný
<i>Thymus vulgaris</i>	50 – 400 (6)	mg/l	ADFM	tymián obecný
<i>Thymus vulgaris</i>	100 – 150 (4)	µl/l	ADM	tymián obecný

1 - Fuselli a kol. 2006; 2 - Aronstein a Hayes 2004; 3 - Klouček a kol. 2008; 4 - Alippi a kol. 1996; 5 - Gende a kol. 2008; 6 - Floris a kol. 1996; 7 - Fuselli a kol. 2008; 8 - Ruffinengo a kol. 2006; 9 - Dorman a Deans 2000; 10 - Eguaras a kol. 2005

4.3. Vyhodnocení

Nejnižší hodnota MIC byla zjištěna u silice pocházející z křenu selského (*Armoracia rusticana*) – 16 µl/l, dále z tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*) a majoránky zahradní (*Majorana syriaca*) – 64 µl/l. Další výsledky s MIC nižší než 100 µl/l (mg/l) dosáhly ještě silice z rostlin skořicovník cejlonský (*Cinnamomun zeylanicum*) - 50 – 100 mg/l, do tohoto rozpětí spadá i citroník čínský (*Citrus sinensis*) - 50 – 400 mg/l a kmín římský (*Cuminum cyminum*), opět tymián obecný (*Thymus vulgaris*) s MIC 50 – 400 mg/l a voňatka citrónová (*Cymbopogon citratus*) - 50 – 100 µl/l.

Lze konstatovat, že nejúčinnější (MIC s hodnotou bezpečně nižší než 100 µl/l nebo mg/l) proti původci moru včelího plodu *Paenibacillus larveae* jsou tyto následující silice: křen selský (*Armoracia rusticana*), tymián obecný (*Thymus vulgaris*), majoránka zahradní (*Majorana syriaca*), skořicovník cejlonský (*Cinnamomun zeylanicum*) a voňatka citrónová (*Cymbopogon citratus*).

Silice s vysokou účinností, tj. silice s MIC bezpečně nižší než 100 µl/l (mg/l), bylo nalezeno 5 druhů z celkového počtu 32 testovaných. Pokud by byly uvažovány pouze silice, u

kterých byla zjištěna konkrétní MIC (a nebyly uvedeny pouze jako aktivní), jednalo by se o 5 druhů silic z počtu 25 testovaných.

Všechny uvedené silice v TAB1 tedy prokázaly schopnost inhibovat růst původce onemocnění moru včelího plodu, gramm-pozitivní bakterii *Paenibacillus larvae*, v laboratorních podmínkách. Před jejich praktickým použitím však musí následovat řada testování přímo v nakažených včelstvech. Musí být vybrán vhodný způsob aplikace, zjištěno chování včel v přítomnosti těkavých aromatických látek, kterými silice jsou a také musí být zjištěno, zda silice nebudou v účinných koncentracích toxické i pro samotné léčené včely. Tato problematika bude diskutována v jedné z následujících kapitol.

5. Diskuze

5.1. Metody aplikace silic „*in vitro*“

Díky sjednocení výsledků jednotlivých MIC silic a díky jejich převedení na srovnatelné jednotky a také s pomocí zanedbání rozdílů ve specifických hmotnostech jednotlivých druhů silic, můžeme, alespoň přibližně, posoudit účinnost jejich jednotlivých druhů proti bakterii *Paenibacillus larvae*. Výsledky je však potřeba brát pouze jako orientační hodnoty, sloužící k přibližnému porovnání aktivity silic. Z tabulky výsledků TAB1 je patrné, že silice, které byly testovány vícekrát, poskytly často rozdílné výsledky. Toto může být způsobeno rozdílným rostlinným materiálem, ze kterého byly silice získávány a následnými rozdíly v jejich chemickém složení. Dále však vznikají rozdílné výsledky v závislosti na rozdílné účinnosti použitých metod aplikace. Liší se výsledky získané různými metodami za použití stejného materiálu a za dodržení stejných podmínek, jsou ve vědecké literatuře zdokumentovány (*Fang a kol. 2006*).

Všechny tyto metody pracují na obdobném principu – v živném médiu jsou založeny kolonie mikroorganismů a ty jsou následně vystaveny kontaktu s testovanými silicemi, které, podle své účinnosti, inhibují růst těchto kolonií. Všechny metody, s výjimkou volatilizační, jsou založeny na přímém kontaktu kapalné silice a patogenu. Volatilizační metoda (disková difúzní v plynné fázi) používá ke kontaktu s bakteriemi pouze plynnou fázi silic. Nejvíce silic v tabulce výsledků TAB1 bylo testováno agarovou diluční a makrodiluční metodou.

Podle způsobu aplikace můžeme tyto metody rozdělit na metody diluční (*Waisbren a kol. 1951; Alcalá a kol. 1998*) a difúzní metody (*Bonev a kol. 2008; Nedorostova a kol. 2009*).

5.1.1. Diluční metody

Mezi diluční metody patří zejména makrodiluční metoda a agarová diluční metoda. Tyto dvě metody patří k nejčastěji použitým (TAB1). Dále sem zařazujeme ještě mikrodiluční metodu. Všechny diluční metody pracují na principu smíchávání silice a živného média a každá z nich má své výhody i nevýhody.

Například mikrodiluční metoda je velice jednoduchá, časově nenáročná, jejíž výsledky jsou proto snadno ověřitelné opakováním testů. Oproti tomu agarová diluční metoda je časově

velice náročná, náchylná k ovlivnění výsledků různými faktory, umožňuje však na jednom živném médiu (jedna miska s agarem) například testovat více mikrobiálních druhů najednou (Fang a kol. 2006). Nevýhody metod s tekutým médiem (tedy mikrodiluční a makrodiluční) spočívají především v tom, že jsou často použity doprovodné látky napomáhající rozpustnosti silic (Tween 80, DMSO, ethanol) a tyto látky mohou snadno ovlivnit konečné výsledky (Nedorostova a kol. 2009). U metody používající jako médium tuhý agar (agarová diluční), zase může docházet k zachycení části silice v agaru a na kolonii inhibovaných bakterií pak působí pouze část zamýšleného množství (Fang a kol. 2006).

Použití různých dilučních metod může přinést rozdílné výsledky. Při provádění stejných testů, například pomocí agarové diluční a mikrodiluční metody (Fang a kol. 2006), bylo zjištěno, že hodnoty získané během testů mikrodiluční metodou jsou nižší, než hodnoty získané, při dodržení stejných podmínek, pomocí metody agarové diluční.

5.1.2. Difúzní metody

Difúzní metody pracují na principu šíření (difúzi) silic v prostředí. Difúze může probíhat v pevné fázi – agarová difúzní metoda nebo v plynné fázi – volatilizační metoda (Nedorostova a kol. 2009). Oproti dilučním metodám mají tyto metody výhodu, že při nich není používán žádný přídavek sloužící k zvýšení rozpustnosti silic (Lopez a kol. 2005). V pevné fázi však může nastávat problém s rozdílnou schopností silic šířit se difúzí v prostředí agaru – část silic může v agaru uvíznout a k inhibovaným koloniím se vůbec nedostanou. Méně účinné silice, které se prostředím šíří lépe, mohou ve výsledku způsobit lepší výsledek, než účinnější silice, které se v prostředí šíří hůře. Oproti tomu, u metody v plynné fázi, se silice šíří v celém prostředí nad povrchem agaru a testované mikroorganismy jsou se silicí v nejsilnějším kontaktu. Přesto však bylo v literatuře zjištěno, že během srovnávání agarové difúzní a volatilizační metody, byla volatilizační metoda označena za metodu se slabší účinností. Účinnost této metody souvisí se schopností silic tékat do prostředí a šířit se v plynné fázi v závislosti na jejich chemickém složení (Lopez a kol. 2005). Vzhledem ke zjištěným výsledkům se však proti původci moru včelího plodu (*Paenibacillus larvae*) celkově jeví volatilizační metoda jako nejúčinnější. Z tabulky výsledků TAB1 je patrné, že výrazně nejlepších výsledků bylo dosaženo právě za použití volatilizační metody. (Kloucek a kol. 2008).

5.1.2.1. Volatilizační metoda (disková difúzní metoda v plynné fázi)

U této metody jsou, podobně jako u agarové difúzní metody, použity Petriho misky s živným médiem (agar) a s naočkovaným mikroorganismem. Živné médium zde může být přítomno i ve víčku Petriho misky – na toto médium se umístí papírové terčíky napuštěné příslušnými silicemi. Po uzavření Petriho misek zde vzniká uzavřené prostředí, ve kterém silice těká z papírových terčků do prostředí a dostává se k mikroorganismům v plynné fázi. Silice v plynné fázi je přítomna v celém prostředí uvnitř Petriho misky. Agar v uzávěru Petriho misky navíc slouží jako těsnění a znemožňuje unikání plynné fáze silic ven z misek do okolí a také znemožňuje adsorpci silic na povrchu Petriho misek (*Nedorostova a kol. 2009*). Z hlediska zjištěných MIC v TAB1 se tato metoda ukázala jako neúčinnější.

5.1.3. Určení neúčinnější metody

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole a jak lze vyčíst i z tabulky výsledků TAB1, jako neúspěšnější metoda se ukázala volatilizační metoda (disková difúzní v plynné fázi). Z pěti neúčinnějších silic proti *Paenibacillus larvae* byly tři silice s nejlepším výsledkem testovány právě touto metodou. Jejich MIC také dosáhly nejlepších hodnot – *Armoracia rusticana* s MIC 16 $\mu\text{l/l}$, *Thymus vulgaris* a *Majorana syriaca*, obě silice s MIC 64 $\mu\text{l/l}$ (*Klouček a kol. 2008*). Dvě zbylé silice s MIC do 100 $\mu\text{l/l}$ (mg/l) - *Cinnamomum zeylanicum* (*Floris a kol. 1996*) a *Cymbopogon citratus* (*Alippi a kol. 1996*) byly testovány metodami makrodiluční a agarovou difúzní, obě s výsledkem v rozpětí 50 – 100 $\mu\text{l/l}$ (mg/l).

Na příkladu *Thymus vulgaris* může být pozorován rozdíl ve výsledcích metod, které hovoří ve prospěch volatilizační metody. S agarovou difúzní metodou bylo zjištěno rozpětí MIC 50 – 400 mg/l, s agarovou diluční 100 – 150 $\mu\text{l/l}$ a nakonec s volatilizační metodou byla určena MIC 64 $\mu\text{l/l}$. Podobný případ lze uvést i pro silici z rostliny *Satureja hortensis* – s agarovou diluční metodou dosáhla silice MIC 250 – 300 $\mu\text{l/l}$, s volatilizační metodou byla zjištěna MIC 128 $\mu\text{l/l}$.

Plynnou fázi silic lze považovat za perspektivní také z hlediska budoucí aplikace silic v „*in vivo*“ testech a praxi. Odparné desky s kyselinou mravenčí se s úspěchem používají v úlech jako léčba varroázy (*Underwood a Currie 2003*) a také noseμόzy včel (*Underwood a Currie 2009*). Právě plynná fáze silic má největší předpoklady k rozšíření se po celém úle a zasáhnutí co největšího počtu nakažených včel.

5.2. Použití silic „*In vivo*“

Z vědecké literatury je zřejmé, že se silicemi již probíhaly „*in vivo*“ testy a výzkumy u včelstev nakažených morem včelího plodu. Tyto pokusy narazily na celou řadu otázek, které je třeba, před plošným nasazením silic jako alternativního léčiva, zodpovědět. Jaká by mohla být nejefektivnější aplikace silic ve včelstvech, jaké je rozpětí toxicity silic - od jaké koncentrace jsou jednotlivé silice účinné proti *Paenibacillus larvae* a nejsou ještě nebezpečné pro samotné včely a jejich plod, jaké bude chování včelstva, pokud budou v úle umístěny těkavé aromatické látky, hrozí-li rezidua silic ve včelích produktech – to jsou jen některé z otázek, které by měly být před nasazením silic ve včelstvech zodpovězeny.

V roce 1990 byl proveden polní test na včelstvech nakažených morem včelího plodu, konkrétně za použití silice ze skořicovníku cejlonského *Cinnamomum zeylanicum* (*Floris a Carta 1990*). V tomto testu byla silice podávána včelstvu v cukerném roztoku, tj. v kapalné formě. Ukázalo se, že silice byla účinná, a že skutečně došlo ke zlepšení zdravotního stavu včelstva, plod ve včelstvu přestal po podání silice vykazovat symptomy nákazy. Opakování testu však ukázalo, že úspěch testu závisel nejen na samotné silici, ale i na množství dalších faktorů, jako počasí, způsob distribuce silice ve včelstvu, mikroklima v okolí úlu, roční období, kdy se pokus prováděl a podobně. Problematickým faktorem se ukázala být nestálá ochota včel odebírat cukerný roztok se smíchanou silicí - pokud okolní prostředí bylo bohaté na přirozený zdroj nektaru, ochota včel brát cukerný roztok silně poklesla. Pokud byla teplota v úle vlivem horkého počasí vysoká, silice rychle vytékala z cukerného roztoku a další obdobné problémy ovlivňovaly výsledky testů.

Při jiném „*in vivo*“ pokusu, kdy byly testovány silice získané z *Satureja hortensis*, *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* a *Origanum Vulgare* (*Albo a kol. 2003*), se ukázalo, že silice v použitých koncentracích oslabily ve výsledku nakažená včelstva natolik, že došlo k nárůstu symptomů nemoci, oproti jejich potlačení. Zde byla prokázána důležitost stanovení rozpětí toxicity silic, aby nedocházelo k přímému ohrožení včelstev. V jiném pokusu bylo zjištěno, že konkrétní silice mohou být přímo toxické a vysoce nebezpečné jak pro dospělé včely, tak pro jejich larvy a vajíčka (*Gashout a Guzman-Novoa 2009*).

Z uvedených příkladů je patrné, že určení bezpečných silic a jejich správných koncentrací, bude zásadním předpokladem pro budoucí použití. Dalším důležitým faktorem budou klimatické podmínky, za kterých bude možno silice aplikovat. Podle polního testu z roku 1990 (*Floris a Carta 1990*) je zřejmé, že podání silic v tekuté fázi (v cukerném roztoku) není ideální. Zde se otevírá cesta pro aplikaci upravené volatilizační metody.

5.2.1. Chování včel

Speciální kapitolou se může při budoucím použití silic jako alternativního léku stát chování včel, v reakci na přítomnost aromatických těkavých látek v úle. Během pokusů, kdy byl včelám podáván cukerný roztok s přísadkou rozličných silic, bylo zjištěno, že určité silice mají na včely odpuzující efekt a včely preferují kontrolní vzorek cukerného roztoku bez přidaných silic. U jiných silic (citrusová silice, caryophyllene) bylo naopak zjištěno, že včely cukerný roztok s touto silicí preferují před kontrolním vzorkem (*Detzel a Wink 1993*). Veškeré uvažované silice by měly být tímto způsobem otestovány a mohou značně pozměnit pomyslný žebříček vhodných silic – silice s dobrými výsledky proti *Paenibacillus larvae* a s přijatelnou tolerancí včelou medonosnou z hlediska toxicity, může být včelami v potravě odmítána z důvodů, které zatím neznáme.

Obdobné problémy se dají očekávat i při použití silic v plynné fázi. Schopnost včel odvětrávat prostor úlu (*Southwick a Moritz 1987*) se může stát překážkou pro budoucí využití volatilizační metody. Je však faktem, že léčiva, podávaná včelám odpařovací metodou, jsou již dnes úspěšně používána (komerční přípravky v ČR: Formidol, Gabon).

5.3. Spory *Paenibacillus larvae*

Stádium spory patogenu *Paenibacillus larvae* je u této nebezpečné nákazy asi největším problémem. Schopnost spor čelit extrémním podmínkám - totální vysušení, více než 10 minut odolávají teplotám nad 100°C, odolávají expozici UV záření a jsou odolné i proti běžným desinfekčním prostředkům (*Alippi 1999*) – znesnadňují jakýkoli pokus o úplné vyléčení nakažených včelstev. V úle mohou navíc setrávat v životaschopné formě i několik desítek let. Tato skutečnost je největší komplikací také při sporné léčbě antibiotiky – dochází k potlačení symptomů, nikoliv však k likvidaci spor v úle (*Katznelson 1950*). Použití silic se bude potýkat velmi pravděpodobně s obdobným problémem – oproti antibiotikům má však výhodu, že se jedná o čistě přírodní látky, jejichž potenciální rezidua by neměla působit ve včelích produktech závažnější komplikace. Mnoho silic se běžně používá v potravinářství a kosmetice, nevykazují žádné negativní vlastnosti vzhledem k lidskému zdraví a nejsou proto považovány za látky toxické, byť například proti hmyzu vykazují jedovaté vlastnosti (*Isman 2000*). I přes to by však společně s výzkumem silic měl ruku v ruce probíhat výzkum, který by řešil problém spor. Jednou z cest by mohlo být například dodání látek do infikovaného včelstva, které by působily na příslušné receptory spor a způsobily tak vyklíčení všech spor

do stádia, které není imunní proti antibiotikům a nebude imunní ani proti vybraným použitým silicím (Setlow 2003).

5.4. Silice a ostatní včelí onemocnění

Léčivý potenciál silic se u včelích onemocnění nemusí nutně orientovat pouze na mor včelího plodu. Další onemocnění, jehož léčba by v budoucnu mohla být prováděna rostlinnými silicemi, je například choroba způsobená patogenem *Ascosphaera apis* (Larran a kol. 2001). Toto houbové onemocnění, nazývané „vápenatění včelího plodu“ bylo opakovaně testováno na citlivost vůči vybraným typům silic. V následující tabulce TAB2 jsou uvedeny silice, které se ukázaly jako aktivní. U některých jsou uvedeny známé MIC v $\mu\text{l/l}$. Není-li MIC vyznačena, silice se prokázaly jako „aktivní“ a inhibovaly růst kolonií *Ascosphaera apis* na živném médiu. I zde byly použity různé metody „*in vitro*“ aplikace – mikrodiluční metoda, agarová difúzní metoda a volatilizační metoda. Při porovnání dat s daty z TAB1 je patrné, že *Paenibacillus larvae* je vůči silicím méně odolný, než *Ascosphaera apis* – MIC v TAB1 nabývají výrazně nižších hodnot než v TAB2. Nejsilnější silicí se zde ukázala silice z aksamitníku malého (*Tagetes minuta*) Tato silice byla také aplikována volatilizační metodou (Eguaras a kol. 2005).

TAB2 – Vliv vybraných druhů silic na houbu *Ascosphaera apis*

Původ silice	MIC (autor)	Jednotky	Český název
<i>Allium sativum</i>	250 (1)	$\mu\text{l/l}$	česnek kuchyňský
<i>Aloysia gratissima</i>	Aktivní (2)		
<i>Cinnamomum glanddulfifera</i>	900 (3)	$\mu\text{l/l}$	skořicovník žlaznatý
<i>Coriandrum sativum</i>	700 (3)	$\mu\text{l/l}$	koriandr setý
<i>Eucaliptus globulus</i>	900 (3)	$\mu\text{l/l}$	blahovičník kulatoplodý
<i>Heterotheca latifolia</i>	Aktivní (2)		
<i>Lavandula intermedia</i>	900 (3)	$\mu\text{l/l}$	levandule prostřední
<i>Laurus nobilis</i>	800 (3)	$\mu\text{l/l}$	vavřín vznešený
<i>Lippia juneliana</i>	Aktivní (2)		
<i>Lippia integrifolia</i>	Aktivní (2)		
<i>Lippia turbinata</i>	Aktivní (2)		

<i>Ocimum basilicum</i>	800 (3)	μl/l	bazalka vonná
<i>Origanum vulgare</i>	Aktivní (4)		dobromysl obecná
<i>Rosmarinus officinalis</i>	900 (3)	μl/l	rozmarýn lékařský
<i>Satureja montana</i>	Aktivní (4)		saturejka horská
<i>Tagetes minuta</i>	200 (5)	μl/l	askamitník malý
<i>Tagetes minuta</i>	900 (3)	μl/l	askamitník malý
<i>Tessaria absinthioides</i>	Aktivní (2)		
<i>Thymus vulgaris</i>	Aktivní (4)		tymián obecný

1 - Aronstein a Hayes 2004; 2 - Dellacasa a kol. 2003; 3 - Larran a kol. 2001; 4 - Colin a kol. 1989; 5 - Eguaras a kol. 2005

Je zřejmé, že silice mají léčivý potenciál nejen proti původci moru včelího plodu *Paenibacillus larvae*, ale stejně tak proti houbovému původci vápenatění plodu *Ascosphaera apis*. Dá se předpokládat, že obdobné inhibiční účinky by silice mohly mít i proti dalším včelím patogenům, jako *Melissococcus pluton* (hniloba včelího plodu), *Varroa destructor* a *Nosema apis*. Testy silic proti těmto organismům však nebyly předmětem této práce a nebyly tak proto v odborné literatuře vyhledávány.

6. Závěr

V práci byla představena jednotlivá onemocnění včely medonosné (*Apis mellifera*), byly popsány symptomy nejnebezpečnějších chorob a byly zmíněny současné způsoby jejich léčby. Dále se práce soustředila na nejnebezpečnější onemocnění, na mor včelího plodu, způsobený gramm-pozitivní bakterií *Paenibacillus larvae*.

Byla provedena literární rešerše, ve které byla rozebrána problematika této nemoci, byly popsány současné způsoby její kontroly a poukázalo se na jejich zřetelné nevýhody. Z těchto výsledků rešerše byla definována nutnost hledání alternativního způsobu léčby, kterým by se mohly stát, pro své baktericidní výsledky, právě rostlinné silice. Během rešerše byly vyhledány a sjednoceny výsledky testů silic, testovaných pro své inhibiční účinky na původce moru včelího plodu, výsledky byly vzájemně porovnány a byly určeny silice, které vykazaly největší aktivitu.

Byly popsány jednotlivé metody aplikace silic v „*in vitro*“ testech, byly popsány jejich principy, jejich výhody a nevýhody a byla vybrána nejúčinnější metoda.

V diskuzi byla rozebrána problematika budoucího nasazení silic jako alternativního léčiva proti moru včelího plodu, byly popsány některé z „*in vivo*“ experimentů, které byly uskutečněny a byly poukázány nejvýznamnější problémy, které se během těchto experimentů objevily. Způsob aplikace silic v úle, výběr vhodné silice, která bude dostatečně účinná proti původci onemocnění a zároveň neohrozí samotné včely v nakaženém včelstvu, průzkum chování včel a jejich reakce na přítomnost těkavých aromatických sloučenin v úlech – to vše jsou problémy, které byly předestřeny a jejichž vyřešení musí nutně předcházet aplikaci silic jako alternativního způsobu léčby onemocnění morem včelího plodu.

Byla zmíněna i problematika spor bakterií *Paenibacillus larvae*, jako největšího problému při léčbě moru včelího plodu. Tyto spory jsou, díky své mimořádné odolnosti proti běžně dostupným prostředkům likvidace, pro úspěšné vyléčení nemoci největší překážkou. Tento fakt nesmí být při hledání alternativních cest léčby opomenut a ruku v ruce s výzkumem silic jako léčiva, musí probíhat výzkum spor a možnosti jejich odstranění z nakaženého včelstva. Byla naznačena cesta, kterou by mohlo být nastavení takových podmínek ve včelstvu, při kterém by došlo k vyklíčení spor a k jejich přechodu do stádia, kdy by byly silicemi zlikvidovatelné.

Byla dotčena i problematika ostatních včelích onemocnění ve vztahu k silicím, jako k možným budoucím alternativním léčivům chorob a škůdců včely medonosné.

7. Seznam literatury

- Albo, G. N., C. Henning, et al. (2003). "Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees." Apidologie 34(5): 417-427.
- Alcala, L., F. Garcia-Garrote, et al. (1998). "Comparison of broth microdilution method using Haemophilus test medium and agar dilution method for susceptibility testing of Eikenella corrodens." Journal of Clinical Microbiology 36: 2386-2388.
- Alippi, A. M. (1999). "Bacterial Diseases." Bee Disease Diagnosis. (Eds. Colin, M.E.;Ball, B.V. and Kilani, M.) 25: 31-55.
- Alippi, A. M., J. A. Ringuelet, et al. (1996). "Antimicrobial activity of some essential oils against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease." Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants 1996. 4: 2, 9-16.
- Ariana, A., R. Ebadi, et al. (2002). "Laboratory evaluation of some plant essences to control Varroa destructor (Acari : Varroidae)." Experimental and Applied Acarology 27(4): 319-327.
- Aronstein, K. A. and G. W. Hayes (2004). "Antimicrobial activity of allicin against honey bee pathogens." Journal of Apicultural Research 43(2): 57-59.
- Ashiralieva, A. and E. Genersch (2006). "Reclassification, genotypes and virulence of Paenibacillus larvae, the etiological agent of American foulbrood in honeybees - a review." Apidologie 37(4): 411-420.
- Baser, K. H. C. and G. Buchbauer (2010). Handbook of Essential Oils. Oxon, UK, Taylor and Francis Group, LLC.
- Bogdanov, S., A. Imdorf, et al. (1998). "Residues in wax and honey after Apilife VAR (R) treatment." Apidologie 29(6): 513-524.
- Bonev, B., J. Hooper, et al. (2008). "Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61(6): 1295-1301.
- Burt, S. (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review." International Journal of Food Microbiology 94(3): 223-253.
- Colin, M. E., J. D. Delahitte, et al. (1989). "Activity of essential oils of *Labiaceae* on *Ascosphaera apis* and treatment of an apiary." Apidologie 20(3): 221-228.
- Crailsheim, K. and U. Riessberger-Galle (2001). "Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood." Apidologie 32(1): 91-103.

- Dellacasa, A. D., P. N. Bailac, et al. (2003). "In vitro activity of essential oils from San Luis-Argentina against *Ascosphaera apis*." Journal of Essential Oil Research 15(4): 282-285.
- Detzel, A. and M. Wink (1993). "Attraction, deterrence or intoxication of bees (*Apis mellifera*) by plant allelochemicals." Chemoecology(1, 8-18): 1993.
- Dorman, H. J. D. and S. G. Deans (2000). "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils." Journal of Applied Microbiology 88(2): 308-316.
- Edris, A. E. (2007). "Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review." Phytotherapy Research 21(4): 308-323.
- Eguaras, M. J., S. Fuselli, et al. (2005). "An in vitro evaluation of *Tagetes minuta* essential oil for the control of the honeybee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the parasitic mite *Varroa destructor*." Journal of Essential Oil Research 17(3): 336-340.
- Ellis, A. and K. S. Delaplane (2009). "Individual forager profits in *Apis mellifera* unaffected by a range of colony *Varroa destructor* densities." Insectes Sociaux 56(4): 419-424.
- Fang, M., J. H. Chen, et al. (2006). "Antibacterial activities of inorganic agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests." International Journal of Antimicrobial Agents 27(6): 513-517.
- Floris, I. and C. Carta (1990). "*In vivo* activity of *Cinnamomum zeylanicum* Nees essential oil against *Bacillus larvae* White." Apicoltura(57-61): 1990.
- Floris, I., C. Carta, et al. (1996). "Activity of various essential oils against *Bacillus larvae* White in vitro and in apiary trials." Apidologie 27(2): 111-119.
- Fries, I. and S. Camazine (2001). "Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology." Apidologie 32(3): 199-214.
- Fries, I., A. Lindstrom, et al. (2006). "Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*)." Veterinary Microbiology 114(3-4): 269-274.
- Fuselli, S. R., S. B. G. de la Rosa, et al. (2008). "Chemical composition and antimicrobial activity of Citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood." World Journal of Microbiology & Biotechnology 24(10): 2067-2072.
- Fuselli, S. R., S. B. G. de la Rosa, et al. (2006). "Antimicrobial activity of some Argentinian wild plant essential oils against *Paenibacillus larvae* larvae, causal agent of American foulbrood (AFB)." Journal of Apicultural Research 45(1): 2-7.

- Gashout, H. A. and E. Guzman-Novoa (2009). "Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.)." Journal of Apicultural Research 48(4): 263-269.
- Gende, L. B., I. Floris, et al. (2008). "Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus* larvae from Argentina." Bulletin of Insectology 61(1): 1-4.
- Genersch, E. (2008). "Paenibacillus larvae and American Foulbrood - long since known and still surprising." Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety 3(4): 429-434.
- Hay, R. K. M. and P. G. Waterman (1993). Volatile Oil Crops: Their Biology, Biochemistry and Production. Essex, England, Longman Group UK Limited.
- Imdorf, A., S. Bogdanov, et al. (1999). "Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies." Apidologie 30(2-3): 209-228.
- Isman, M. B. (2000). "Plant essential oils for pest and disease management." Crop Protection 19(8-10): 603-608.
- Kanga, L. H. B., R. R. James, et al. (2002). "Hirsutella thompsonii and Metarhizium anisopliae as potential microbial control agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite." Journal of Invertebrate Pathology 81(3): 175-184.
- Katznelson, H. (1950). "The influence of antibiotics and sulfa drugs on *Bacillus larvae*, cause of American foulbrood of the honey bee, *In vitro* and *In vivo*." Journal of Bacteriology 59(4): 471-479.
- Kloucek , P., J. Flesar, et al. (2008). Activity of essential oils in vapour phase against *Paenibacillus larvae*. Natural products. Athens Greece.
- Larran, S., J. A. Ringuelet, et al. (2001). "In vitro fungistatic effect of essential oils against *Ascosphaera apis*." Journal of Essential Oil Research 13(2): 122-124.
- Lewis, K. and F. M. Ausubel (2006). "Prospects for plant-derived antibacterials." Nature Biotechnology 24(12): 1504-1507.
- Lopez, P., C. Sanchez, et al. (2005). "Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains." Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(17): 6939-6946.
- Mesquida, J., M. Renard, et al. (1988). "Rapeseed (*Brassica napus*) productivity - The effect of honeybees (*Apis mellifera*) and different pollination conditions in cage and field-tests." Apidologie 19(1): 51-72.

- Nedorostova, L., P. Kloucek, et al. (2009). "Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria." Food Control 20(2): 157-160.
- Olsen, P. E., W. A. Rice, et al. (1986). "In vitro germination of *Nosema apis* spores under conditions favourable for the generation and maintenance of sporoplasms." Journal of Invertebrate Pathology 1986. 47: 1, 65-73.
- Reybroeck, W. (2003). "Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian market." Apiacta 38: 23 - 30.
- Riessberger-Galle, U., W. von der Ohe, et al. (2001). "Adult honeybee's resistance against *Paenibacillus larvae larvae*, the causative agent of the American foulbrood." Journal of Invertebrate Pathology 77(4): 231-236.
- Ruffinengo, S. R., M. Maggi, et al. (2006). "Laboratory evaluation of Heterothalamus alienus essential oil against different pests of Apis mellifera." Journal of Essential Oil Research 18(6): 704-707.
- Setlow, P. (2003). "Spore germination." Current Opinion in Microbiology 6(6): 550-556.
- Southwick, E. E. and R. F. A. Moritz (1987). "Social control of air ventilation in colonies of honey bees, Apis mellifera." Journal of Insect Physiology 33(9): 623-626.
- Steinkraus, K. H. and R. A. Morse (1996). "Media for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey." Acta Biotechnologica 16(1): 57-64.
- Titěra, D. (2007). Výroční zpráva za rok 2007 o plnění úkolů vyplývajících ze Smlouvy o dílo č. 3-7805-16230-2007uzavřené mezi MZe ČR a VÚVč Dol k monitoringu výskytu původce moru včelího plodu v ochranných pásmech ohnisek a dalších indikovaných lokalitách. M. z. ČR. Praha, Výzkumný ústav včelařský, s.r.o., Dol.
- Underwood, R. M. and R. W. Currie (2003). "The effects of temperature and dose of formic acid on treatment efficacy against Varroa destructor (Acari : Varroidae), a parasite of Apis mellifera (Hymenoptera : Apidae)." Experimental and Applied Acarology 29(3-4): 303-313.
- Underwood, R. M. and R. W. Currie (2009). "Indoor Winter Fumigation With Formic Acid for Control of Acarapis woodi (Acari: Tarsonemidae) and Nosema Disease, Nosema sp." Journal of Economic Entomology 102(5): 1729-1736.
- Waisbren, B. A., C. Carr, et al. (1951). "The tube dilution method of determining bacterial sensitivity to antibiotics." American Journal of Clinical Pathology 21(9): 884-891.
- Winston, M. L. (1991). "The biology of the honey bee." First Harward University Press.