



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Inhibice původce onemocnění moru včelího plodu pomocí
vybraných rostlinných silic**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

Autor: Adéla Zálabská

Vedoucí práce: Ing. Petr Mráz, PhD.

České Budějovice 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Inhibice původce onemocnění moru včelího plodu pomocí vybraných rostlinných silic“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 2. 5. 2023

Podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu své bakalářské práce Ing. Petru Mrázovi, PhD. za odbornou pomoc při psaní bakalářské práce a za pomoc při laboratorním zpracování výsledků.

Inhibice původce onemocnění moru včelího plodu pomocí vybraných rostlinných silic

Abstrakt

Onemocnění mor včelího plodu, způsobeno původcem *Paenibacillus larvae* je závažné onemocnění včely medonosné, které je v České republice zakázáno léčit antibiotiky. Při výskytu onemocnění v úlu je ze zákona dané spálení úlu. Rostlinné silice vykazují antimikrobiální aktivitu a jejich použití může přispět s bojem s touto nebezpečnou nemocí.

Cílem bakalářské práce bylo ověření baktericidního účinku vybraných rostlinných silic na původce onemocnění moru včelího plodu *P. larvae*. Dalším stanoveným cílem bylo stanovení minimální inhibiční a baktericidní koncentrace u vybraných rostlinných silic.

Celkem bylo použito 11 rostlinných silic, které se hodnotily jak samostatně, tak v kombinaci s ostatními rostlinnými silicemi. Vyhodnocení probíhalo na mikrotitračních destičkách pomocí spektrofotometru a na tuhém mediu na Petriho miskách. Nejúčinnější rostlinná silice byla silice česneku kuchyňského (*Allium sativum* bulb oil), která měla hodnoty minimální i baktericidní koncentrace 32 µl/mg. Mezi další velmi účinné rostlinné silice řadíme silici skořice (*Cinnamomum zeylanicum* bark oil). Mezi nejméně účinné řadíme silice mrkve seté (*Daucus carota sativa* seed oil), tymiánu červeného (*Thymus vulgaris* flower/leaf oil), dobromyslu (*Origanum vulgare*) nebo mateřídoušky (*Thymus serpyllum* oil).

Klíčová slova

Paenibacillus larvae; minimální inhibiční koncentrace; minimální baktericidní koncentrace; včela medonosná; onemocnění včely medonosné

Inhibition of the etiological agent of American foulbrood disease using selected essential oils

Abstract

American foulbrood disease, caused by etiological agent *Paenibacillus larvae* is serious disease which affects honey bee that is prohibited to treat with antibiotic in the Czech Republic. If the disease occurs in hive, it is a legal requirement to burn the hive. Essential oils have antimicrobial activity and their use can help fighting this dangerous disease.

The aim of the bachelor thesis was to verify the bactericidal effect of selected essential oils on the causative agent of the American foulbrood disease *P. Larvae*. Another stated aim was to determine the minimum inhibitory and bactericidal concentrations of the selected essential oils.

A total of 11 essential oils were used and evaluated both alone and in combination with other essential oils. The evaluation was carried out on microtiter plates using spectrophotometer and on agar medium in petri dishes. The most effective essential oil was garlic oil (*Allium sativum* bulb oil), which had minimum and bactericidal concentration values of 32 µl/mg. Other very effective plant essential oils include cinnamon essential oil (*Cinnamomum zeylanicum* bark oil). The least effective essential oils are carrot oil (*Daucus carota sativa* seed oil), thyme oils (*Thymus serpyllum* oil, *Thymus vulgaris* flower/leaf oil) or oregano oil (*Origanum vulgare*).

Key words

Paenibacillus larvae; minimal inhibitory concentration; minimal bactericidal concentration; honey bee; honey bee diseases

Obsah

| | |
|--|-----------|
| Úvod | 8 |
| 1. Teoretická část | 9 |
| 1.1 Včela medonosná | 9 |
| 1.1.1 Význam včely medonosné | 10 |
| 1.1.2 Ohrožení včely medonosné..... | 10 |
| 1.1.2.1 Virová onemocnění | 10 |
| 1.1.2.2 Onemocnění způsobená bakteriemi | 12 |
| 1.1.2.3 Onemocnění způsobená houbami | 13 |
| 1.1.2.4 Parazité včely medonosné | 15 |
| 1.1.3 Střevní mikroflóra včely medonosné | 16 |
| 1.2 Mor včelího plodu | 17 |
| 1.2.1 Obecně o původci | 17 |
| 1.2.2 Historie, klasifikace a taxonomie..... | 18 |
| 1.2.3 Postup při nákaze a rozšíření v ČR..... | 19 |
| 1.2.4 Virulence..... | 20 |
| 1.2.5 Klinické příznaky a patogeneze | 21 |
| 1.2.6 Diagnostika | 21 |
| 1.2.6.1 Nelaboratorní diagnostika | 21 |
| 1.2.6.2 Laboratorní diagnostika | 21 |
| 1.2.7 Léčení moru včelího plodu | 22 |
| 1.3 Rostlinné silice..... | 23 |
| 1.3.1 Složení | 23 |
| 1.3.2 Jejich antimikrobiální účinky..... | 24 |
| 1.3.2.1 Cytotoxicita..... | 24 |
| 2. Cíl práce a hypotézy | 26 |
| 3. Metodika..... | 27 |

| | | |
|------------|--------------------------------------|-----------|
| 3.1 | Zkoumané látky..... | 27 |
| 3.2 | Laboratorní analýza..... | 28 |
| 3.3 | Instrumentální analýza | 28 |
| 3.3.1 | Stanovení MIC | 30 |
| 3.3.2 | MBC..... | 34 |
| 4. | Výsledky | 36 |
| 5. | Diskuse..... | 43 |
| 6. | Závěr | 47 |
| 7. | Seznam literatury | 48 |
| 8. | Seznam tabulek..... | 54 |
| 9. | Seznam obrázků..... | 55 |
| 10. | Seznam použitých zkratk | 56 |

Úvod

Včela medonosná, *Apis mellifera*, má velký význam pro zemědělství, kde je nenahraditelným faktorem při opylování rostlin poskytující základní potraviny, jako je zelenina a ovoce, ale i kulturních a planě rostoucích rostlin. Bez včely by tento ekosystém nemohl fungovat. Další význam včely medonosné je ekonomického rázu, a to ekonomická hodnota medu a ostatních včelích produktů.

Původce onemocnění moru včelího plodu *P. larvae* je grampozitivní tyčinkovitá bakterie, která má jediného známého hostitele a tím je včela medonosná *A. mellifera*. Onemocnění napadá pouze včelí plod, ve kterém se množí a nadále ho rozkládá a produkuje velké množství patogenních spor. Spory jsou nadále roznášeny dělnicemi po celém úlu a dochází k úmrtí velkého množství larev, až dojde k nedostatku potomstva a k úhynu celé kolonie.

Onemocnění je v České republice ze zákona zakázáno léčit antibiotickými přípravky, jejichž metabolity by se nadále mohly dostávat do medu a ostatních včelích produktů.

1. Teoretická část

1.1 Včela medonosná

Včela (*Apis*) je označení rodu blanokřídlého hmyzu, který řadíme do kmene členovců, (Arthropod). Blanokřídlý hmyz se podle svého názvu vyznačuje blanitými křídly a dále se mimo jiné vyznačuje i drobnými háčky neboli "hamuli" na předním okraji zadního křídla, které slouží k upevnění křídel a kloubů k předním křídům, takže páry křídel fungují jako jeden pár. Tento rod se dále rozděluje do dvou podřádů dle znaků larev. Na širokopasé a štíhlopasé. Do širokopasých řadíme čeledě jako pilatkovití a do podřádu štíhlopasých řadíme čeledě jako jsou lumíčkovití nebo včelovití (*Apidae*), kam řadíme i druh včela medonosná, latinsky *Apis mellifera* (Faux, 2021).

Včela medonosná má jako bezobratlý živočich pevný exoskelet, který určuje její vnější tvar. Tělo včely se skládá ze tří odlišných částí: hlavy, hrudi a zadečku. Hlava se skládá z orgánů nervové soustavy jako je mozek, ústní ústrojí a smyslové orgány. Všechny pohybové orgány jsou připojeny k hrudi. Končetiny zahrnují dva páry křídel (přední a zadní) a tři páry nohou. Zadeček obsahuje většinu trávicího traktu a břišní dutinu s rozmnožovacími orgány. V případě samičky včely medonosné je zadeček zakončen žihadlem (Faux, 2021).

Včely medonosné jsou eusociální hmyz, který se vyznačuje několika specifickými znaky. Za prvé se vyznačují tím, že žijí v kolonii, která se skládá z překrývajících se generací. Za druhé mezi včelami existuje takzvaná reprodukční dělba práce, což znamená, že se neplodné dělnice celý život podílejí na podpoře reprodukce královny, která klade vajíčka, a každý člen včelstva spolupracuje v rámci vysoce strukturovaného sociálního řádu a podílí se na rozsáhlých koordinačních činnostech, včetně výchovy včelího plodu, obrany proti vetřelcům, shánění potravy a stavbě plástů (Chen, 2007). Včelí společenstvo se skládá z několika kast. Kastou můžeme chápat skupinu, která má úkol daný zrozením. Každá tato skupina plní ve včelstvu svůj jedinečný úkol, avšak jedna bez druhé by nemohla fungovat (Cramp, 2014). Každé včelstvo má dvě skupiny samiček. Dělí se na jedinou královnu a dělnice, kterých v jednom včelstvu může být od 20 000 až do 50 000. Mladé dělnice ošetřují a pečují o královnu a včelí plod a dále brání kolonii. Starší dělnice shánějí pyl, nektar a vodu. Homeostázu hnízda udržují dělnice, které navzdory vnějším podmínkám udržují téměř konstantní teplotu a vlhkost. Obvykle je k dispozici dostatek bílkovinné potravy a sacharidů. Život v koloniích je regulován

řadou feromonů, které vylučuje především královna. Kolonie má také samce, tzv. trubce, kteří slouží hlavně k oplodnění královny během jejího snubního letu. Celkový vývoj královny trvá přibližně 16 dní, dělnic 21 dní a trubců 24 dní. Královna může přežít několik let, ale dělnice a trubci obvykle žijí jen několik týdnů. V chladných obdobích zimní generace dělnic, které mohou přežívat i několik měsíců, se shlukují kolem královny, aby inkubovaly vajíčka nakladená během této doby a celkově zahřívaly a krmily plod (Sammatro et al., 2000).

1.1.1 Význam včely medonosné

V zemědělských systémech je ekonomická hodnota téměř 17 000 + druhů původních včel (převážně samotářských druhů žijících v neobhospodařovaném prostředí) zhruba stejná jako hodnota jediného koloniálního druhu obhospodařovaného člověkem, a to včely medonosné. Ačkoli jsou včely medonosné aktivně obhospodařovány včelaři, nejsou domestikované v pravém slova smyslu, protože stále volně hledají potravu, snadno zdivočí a jejich rozmnožování je obtížně kontrolovatelné (Amiri et al., 2021). Hlavním důvodem ochrany včel medonosných je jejich význam jako opylovatelů mnoha druhů planě rostoucích i kulturních rostlin. Opylování včelami a jiným hmyzem je prvním krokem v procesu tvorby semen, jehož výsledkem je růst základních potravin, jako je zelenina, ovoce a semena, které tvoří přibližně 35 % lidské stravy. Bez opylujícího hmyzu by ekosystém zkolaboval. Ekonomická hodnota medu a dalších včelích produktů je sice velká, ale nízká ve srovnání s historickými a společenskými hodnotami včelařství, a ještě nižší ve srovnání s přínosem včely medonosné pro zemědělství a biologickou rozmanitost (Ribièere et al., 2008).

1.1.2 Ohrožení včely medonosné

1.1.2.1 Virová onemocnění

Virová onemocnění jsou způsobena obligátními intracelulárními viry, které se mohou množit pouze uvnitř živých hostitelských buněk s využitím metabolických mechanismů napadené buňky. K tomu, aby viry přežily, musí mít způsoby, jak napadnout hostitele a přenášet se z něj na další hostitele. Procesy přenosu určují přetrvávání a šíření virů v populaci. Teoreticky přenos může probíhat horizontálně nebo vertikálně, případně oběma způsoby. Při horizontálním přenosu se viry přenášejí mezi různými jedinci téhož druhu. Při vertikálním přenosu se viry přenášejí z matky na potomka prostřednictvím

vajíčka nebo po dokončení vývoje vajíčka. K horizontálnímu přenosu viru může dojít následujícími způsoby: přenos potravinami, fekálně-orální přenos, pohlavní přenos, přenos vzduchem. Vertikální přenos může být dále rozdělen na přenos transovulační, při kterém se viry přenášejí na povrchu vajíčka a transovariální přenos, při kterém jsou viry přenášeny uvnitř vajíčka (Chen, 2007).

Poprvé byla virová nákaza včelího plodu popsána americkým vědcem Whitem v roce 1917 (White, 1917). Původce popsaného virového onemocnění plodu byl později nazván *Morator aetatulae*. Virus akutní a chronické paralýzy včel byl objeven v roce 1963, a od té doby byly popsány i skoro dvě desítky dalších včelích virů (Titěra, 2017). Přestože znalosti o včelích virech jsou stále omezené ve srovnání s poznatky o jiných dobře prozkoumaných hmyzích virech, jako jsou bakuloviry, se znalosti o virových infekcích včel medonosných za poslední roky značně rozšířily. Ze známých virů, které napadají včely medonosné, je šest virů, které jsou nejčastějšími původci onemocnění a jsou předmětem mnoha výzkumů v současné době. Jedná se o virus deformovaných křídel (DWV), virus černání matečniců (BQCV), virus pytlíčkovitosti včelího plodu (SBV), Kashmir bee virus (KBV), virus akutní paralýzy včel (ABPV) a virus chronické paralýzy včel (CBPV) (Chen, 2007).

Původci virových nákaz se mohou množit jak v těle dospělé včely, tak i ve včelím plodu nebo v přenašečích jako je roztoč *Varroa destructor* (Titěra, 2017). Včely medonosné mohou být nositeli několika druhů virů, které obvykle nevyvolávají žádné viditelné příznaky. Kvůli asymptomatickosti těchto virů je možné zjistit nákazu jen pomocí speciálních metod a vyšetření. Avšak po několika měsících asymptomatické infekce může dojít ke spuštění množení viru z neznámých důvodů, což má za následek klinické projevení onemocnění a může dojít k zeslabení nebo úhynu včelstva. Některé včelí viry jsou schopné vyvolávat změny v chování, menší adaptaci na chlad a změny v péči o plod nebo v získávání potravy (Ribière et al, 2008).

Tabulka 1 Přehled virových onemocnění včely medonosné

| Virové onemocnění | Zkratka | Přenos | Symptomy |
|----------------------------|---------|---|--------------------------------|
| Virus akutní paralýzy včel | ABPV | Horizontální (per os), vertikální (transovariální) | Úhyn plodu i dospělých včel |

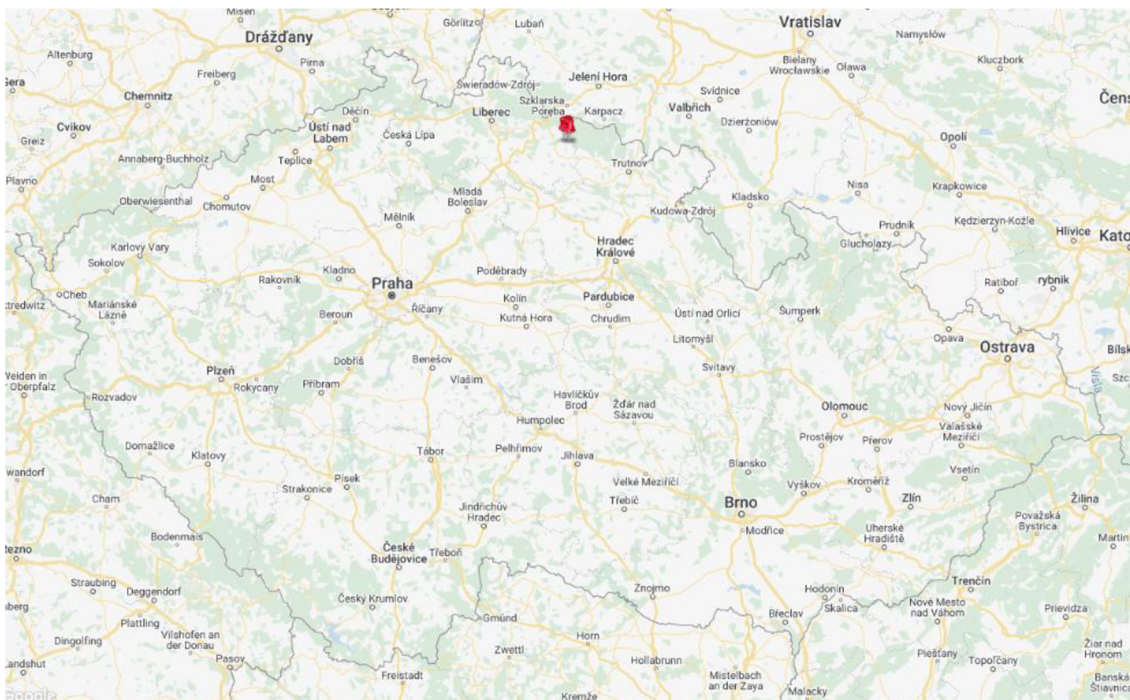
| | | | |
|-------------------------------------|------|---|--|
| Virus černání matečníků | BQCV | Horizontální (per os) | Úhyn plodu v matečníku, typické černé skvrny na stěně matečníku |
| Virus chronické paralýzy včel | CBPV | Horizontální (kontaktem, per os), vertikálně | Hromadné paralýzy, jedinci vizuálně tmavší, menší, bez chloupků |
| Virus deformovaných křídel | DWV | Horizontální, přes roztoče <i>Varroa destructor</i> | Deformace křídel, zadečku, končetin |
| Kashmir bee virus | KBV | Horizontální (per os), vertikální (transovariální), přes roztoče <i>Varroa destructor</i> | Rychlý úhyn plodu i dospělých včel |
| Virus pytlíčkovitosti včelího plodu | SBV | Horizontální (per os), vertikální (transovariální), přes roztoče <i>Varroa destructor</i> | Nahromadění tekutiny mezi starou a novou pokožkou larvy, úhyn larev i dospělých včel |

Zdroj: (Titěra, 2017).

1.1.2.2 Onemocnění způsobená bakteriemi

Mezi bakteriální infekce včely medonosné řadíme dvě nejčastější onemocnění, a to hnilobu včelího plodu a mor včelího plodu. Zpočátku se tyto dvě onemocnění nerozlišovala a obě onemocnění se označovala pouze jako hniloba. Mor včelího plodu, způsobený bakterií *Paenibacillus larvae*, se v angličtině a němčině označuje jako „americká hniloba plodu“ a hniloba včelího plodu, způsobená nejčastěji bakterií *Melisococcus plutonius*, se označuje jako „evropská hniloba plodu“ (Titěra, 2017). Tyto názvy však nemají nic společného s původem nebo rozšířením onemocnění, ale byly takto pojmenovány podle oblastí, kde došlo k prvnímu vědeckému zkoumání. Obě nemoci jsou rozšířeny po celém světě a vyskytují se téměř všude, kde se chovají včely

medonosné (Milbrath, 2021). Jako obligátní původce hniloby včelího plodu byla označena kulovitá gram-pozitivní anaerobní bakterie *Melicoccus plutonis*. U tohoto onemocnění bývá přítomen i *Paenibacillus alvei*, *Streptococcus fecalis* a další oportunní infekce, které nasedají na primární infekci a napomáhají rozkládat uhynulé larvy. Metabolity těchto mikroorganismů zpravidla způsobují typický hnilobný až kyselý zápach. Bakterie *Melicoccus plutonis* je velmi nakažlivá (Titěra, 2017) a šíří se dospělými včelami dělnicemi, které ji přenášejí v rámci včelstva, mezi ostatními včelstvy a včelíny. K přenosu může dojít také prostřednictvím loupeže medu, kdy včely vstupují do oslabeného včelstva a odnášejí kontaminovaný med zpět do vlastního včelstva, nebo přesunem úlových materiálů v rámci včelaření (Milbrath, 2021). Pokud se prokáže onemocnění hniloby včelího plodu, musí se ohlásit na Krajskou veterinární správu, jelikož se jedná o nákazu povinnou hlášení. Po ohlášení je stanoveno ohnisko nákazy s vymezeným ochranným pásmem a jsou stanovena ochranná opatření, které je včelař povinen dodržet (Titěra, 2017).



Obrázek 1 Mapa výskytu hniloby včelího plodu v roce 2021

zdroj: Státní veterinární správa

1.1.2.3 Onemocnění způsobená houbami

Mezi houbová onemocnění včely medonosné způsobené houbami řadíme zvápenatění včelího plodu způsobené plísní *Ascosphaera apis*, zkamenění včelího plodu způsobené

plísněmi rodu *Aspergillus* a nově i Nosematózu způsobenou mikrosporidií rodu *nosema* (Chen, 2021). Význam plísněných infekcí včely medonosné se v posledních desetiletích významně zvýšil v souvislosti s novým výskytem *Nosema ceranae*, vysoce virulentního a specializovaného houbového patogenu. Zatímco většina houbových infekcí zřídka kdy zahubí celé včelstvo, může však významně snížit celkovou odolnost a efektivitu hledání potravy, a tím oslabit včelstvo a učinit jej náchylnějším k dalším chorobám a škůdcům. Proti vypuknutí houbové infekce mohou včely samy bojovat správným hygienickým chováním jako je detekce a odstraňování nemocných či mrtvých larev a včel a čištění buněk včelího plástu a prostorů úlu. Včelaři bojují proti infekcím správnou zoohygienu, jako je pravidelné čištění úlů, obnova rámečků nebo udržování včelstev a všech nástrojů na včelnici v čistotě.

Tabulka 2 Přehled onemocnění včely medonosné způsobené houbami

| Český název | Půvoce | Přenos | Symptomy |
|---------------------------|---|--|--|
| Zvápenatění včelího plodu | <i>Ascospaera apis</i> | Myceliem, výtrusy, potravou, přes pokožku | Skvrnitá a propadlá víčka, nažloutlý plod, zápenatění plodu bílé, šedo zelené až černé barvy |
| Zkamenění včelího plodu | Rod <i>Aspergillus</i> | Sporami přítomnými ve vodě nebo potravě | Vyschnutí a zkamenění plodu |
| Nosematóza | <i>Nosema ceranae</i> , <i>Nosema apis</i> | Sporami přítomnými ve vodě nebo potravě, zanesení včelařem | Počáteční infekce bez klinických symptomů, zvětšený zadeček, bělavý žaludek |

Zdroj: Titěra, 2017

1.1.2.4 Parazit včely medonosné

Čas od času se uvnitř úlu objevují i další členovci např. pavouci, švábi a svlušky. Tento hmyz má jen malý nebo žádný vliv na zdraví nebo produktivitu včelstva a nezpůsobují ekonomicky významné škody, a tak se proti těmto parazitům neprovádějí žádná opatření (PennState Extension 2017). Nejproblematictějším parazitem včel medonosných je parazitický roztoč *Varroa destructor* (Amiri et al., 2021), v češtině nazývaný jako Kleštík včelí (Titěra, 2017). Významní parazité včely medonosné, jako je *Varroa destructor*, oslabují včelstva a mohou být přenašeči virových patogenů. Proto potlačení výskytu parazitů nejen sníží jejich přímý dopad na včely medonosné, ale také zmenší jejich roli jako mikrobiálních vektorů (Amiri et al., 2021).

Tabulka 3 Přehled parazitů včely medonosné

| Parazit – český název | Latinský název | Prostorový vztah parazita ke včele medonosné | Klinické příznaky a sekundární symptomy |
|-----------------------|-----------------------------|--|---|
| Kleštík včelí | <i>Varroa destructor</i> | Ektoparazit | Druhotná infekce virem DWV, špatně vyvinutá křídla, zadeček i nohy, úhyn kukel, mezerovitý plod |
| Včelomorka | <i>Braula coeca</i> | Ektoparazit | Výskyt vláskovitých chodbiček ve víčkách plástů |
| Lesknáček úlový | <i>Aethina tumida</i> | Ektoparazit | Poničený plod a plásty, zápach zásob včelstva |
| Dravá masařka | <i>Senotainia tricuspis</i> | Ektoparazit | Muší larvy mezi hlavou a hrudí, napadení létacích svalů |

| | | | |
|----------------|---------------------------------|-------------|---|
| Sršeň asijská | <i>Vespa velutina</i> | Ektoparazit | Poškození a úbytek včelstva |
| Roztočik včelí | <i>Acarapis woody</i> | Endoparazit | Včely neschopné letu, poškozená křídla |
| Měňavka včelí | <i>Malpighamoeba mellificae</i> | Endoparazit | Řídké výkaly, slabý jedinci ve včelstvu |

Zdroj: Titěra, 2017

1.1.3 Střevní mikroflóra včely medonosné

Mikroorganismy ve střevech různých živočichů mohou svým hostitelům prospívat tím, že pomáhají trávit potravu, detoxikovat organismus a odstraňovat toxiny a chránit organismus před napadením patogeny a parazity a napomáhat vývoji imunity. Střevní mikrobiální osazení včely medonosné je podobné střevnímu mikroflóře savců, protože oba jsou většinou tvořeny hostiteli přizpůsobenými, fakultativně anaerobními a mikroaerofilními bakteriemi (Kwon et al., 2016). Trávicí trakt včely medonosné je osídlen řadou mikroorganismů, které se liší v morfologii, fyziologii a metabolismem. Mikroflóra trávicího traktu se skládá z kvasinek (1 %), grampozitivních bakterií (29 %) a gramnegativních a gramvariabilních bakterií (70 %). Mezi mikroorganismy spojené se včelou medonosnou a její potravou patří bakterie (gramvariabilní pleomorfní bakterie, *Bacillus* spp. a *Enterobacteriaceae*), plísňe (především *aspergilli* a *penicillia*) a kvasinky (především *Torulopsis* spp) (Gilliam, 1997). První výzkumy mikrobiot trávicího traktu včely medonosné byly publikovány na začátku 20. století a byla zjištěna přítomnost bakterií jako jsou *Lactobacillus rigidus apis*, *Lactobacillus constellatus* a *Bacillus influenzae apis*. Později bylo zjištěno, že mezi jediné přítomné probiotické druhy bakterie byly bifidobakterie (Kačániová et al., 2020).

Včelí larvy, vajíčka, kukly a dělnice vylézající z buněk jako dospělci, kteří jsou obvykle bez vnitřních mikrobů. Mikroorganismy, které larvy získaly pozřením kontaminované potravy, jsou obvykle odstraněny jednorázovým vyprázdněním, ke kterému dochází na konci období krmení před zakuklením. Dospělé včely získávají střevní mikroflóru výměnou potravy s ostatními včelami v kolonii a konzumací pylu. Zdá se, že se vyvinulo spojení *Bacillus* spp. se včelami, včetně včel medonosných, včel bez žihadel a samotářských včel z tropických a mírných pásem, v němž včelí samičky očkují zdroje

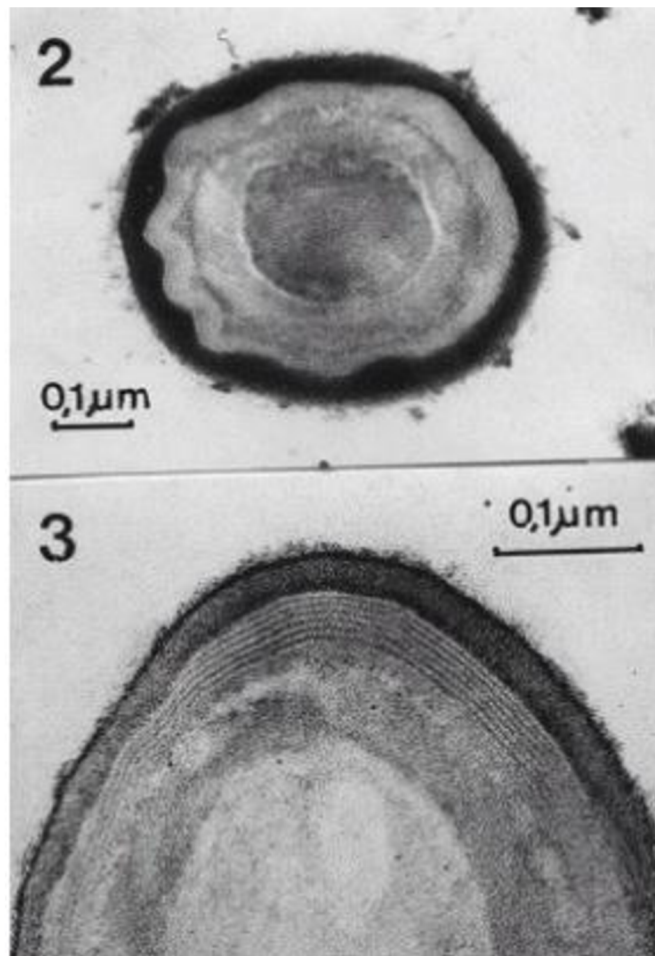
potravy těmito bakteriemi, jejichž chemické produkty přispívají k vypracování a ochraně před zkázou potravy, která je uložena v hníždě. Tato asociace je prastará na základě výsledků získaných od včel bez žihadel uchovaných v jantaru po dobu 25-40 milionů let. Z toho vyplývá, že včely, jejich produkty a s nimi spojené mikroorganismy jsou potenciálními zdroji bioaktivních produktů včetně antimikrobiálních sloučenin (Gilliam, 1997).

1.2 Mor včelího plodu

1.2.1 Obecně o původci

Mor včelího plodu, v angličtině nazývaný jako American foulbrood disease, je onemocnění způsobené aerobní, grampozitivní, spory tvořící tyčinkovitou bakterií *Paenibacillus larvae* (Kačániová et al., 2020). Avšak pouze spory *P. larvae* jsou schopny vyvolat onemocnění. Tyto spory mohou zůstat životaschopné po několik let a přežívají i v extrémních podmínkách díky mnohvrstevnatým obalům viz. obrázek 2 (Milbrath, 2021). *P. larvae* je považován za entomopatogen značného významu ve veterinární medicíně. Entomopatogen je organismus, který způsobuje onemocnění u hmyzu. *P. larvae* je vysoce specializovaný patogen s jediným známým hostitelem, larvou včely medonosné, žádný jiný hostitel zatím nebyl objeven (Ebeling et al., 2016). V rámci druhu *P. larvae* byly zjištěny čtyři genotypy, *P. larvae* ERIC I-IV, které byly definovány na základě PCR s repetitivními prvky (repPCR) provedené s enterobakteriálními repetitivními intergenovými prvky (ERIC) (Genersch et al. 2006). V roce 2019 byl navíc izolován nový genotyp ERIC V ze vzorku španělského medu (Beims et al., 2020). Rozhodující tohoto typizačního schématu je to, že tyto genotypy mají fenotypové rozdíly, včetně rozdílů ve virulenci (Ebeling et al., 2016). Tyto čtyři kmeny ERIC jsou dále rozdělovány do přibližně 20 sekvenčních typů pomocí multilokusové sekvenační typizaci (Heyndrickx et al., 1996). V posledních desetiletích byl *P. larvae* kmen ERIC I a II často izolován z medu nebo z medu infikovaného včelstva morem včelího plodu, zatímco *P. larvae* kmen ERIC III a IV je zastoupen pouze v historických izolátech ve sbírkách typových kultur (Genersch et al., 2006).

Obrázek 2 Mnohovrstevné obaly spory *P. larvae*



zdroj: foto J. Ludvík

1.2.2 Historie, klasifikace a taxonomie

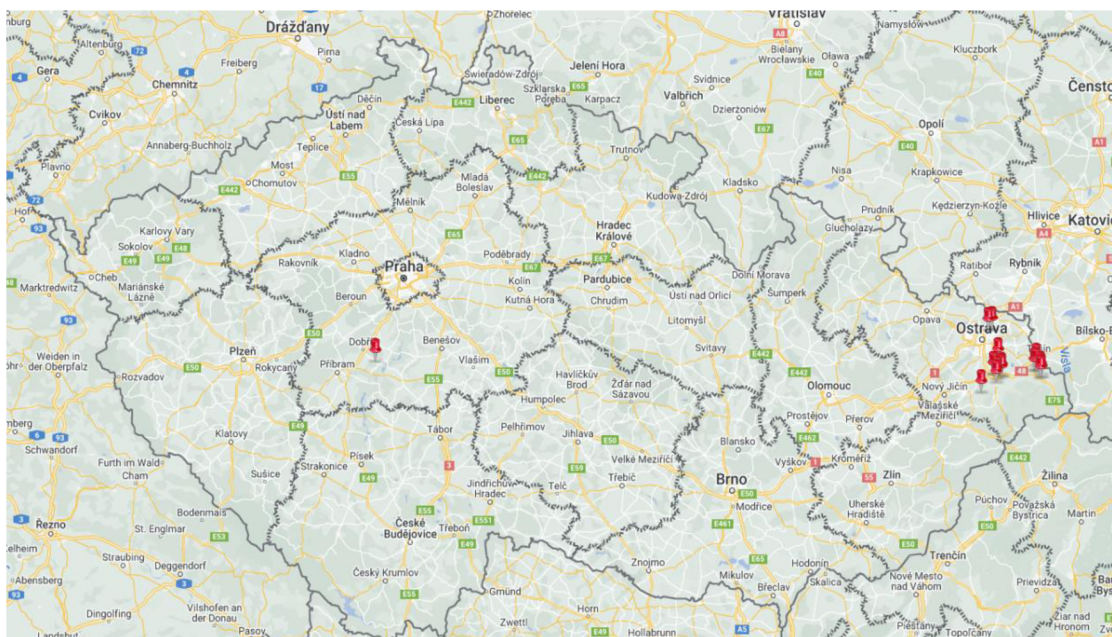
V posledním desetiletí došlo k obrovskému pokroku v poznání *P. larvae* a jeho interakcí s larvami včely medonosné na molekulární úrovni. V roce 1771 používal Schirach pro abnormální stav včelího plodu termín "foul brood " neboli hniloba plodu, ale z jeho pojetí příčiny této nemoci lze usuzovat, že se tímto termínem označovalo více než jedno onemocnění. V roce 1906 se americkému mikrobiologovi Whiteovi nepodařilo izolovat *Bacillus alvei* a místo toho kultivoval neznámou bakterii v čisté kultuře. Na základě tyčinkovité morfologie a schopnosti tvořit endospory klasifikoval bakterii, která byla důsledně nalézána v nemocných a mrtvých larvách jako *Bacillus larvae*. Byl to také on, kdo si uvědomil, že existují tzv. dvě různá onemocnění způsobená různými patogeny, které vyvolávají různé komplexy symptomů. Na jedné straně hniloba včelího plodu (European foulbrood) způsobená *Melissococcus plutonius*

Bailey,1973), a na druhé straně American foulbrood neboli onemocnění moru včelího plodu způsobené *P. larvae* (Genersch et al., 2006).

1.2.3 Postup při nákaze a rozšíření v ČR

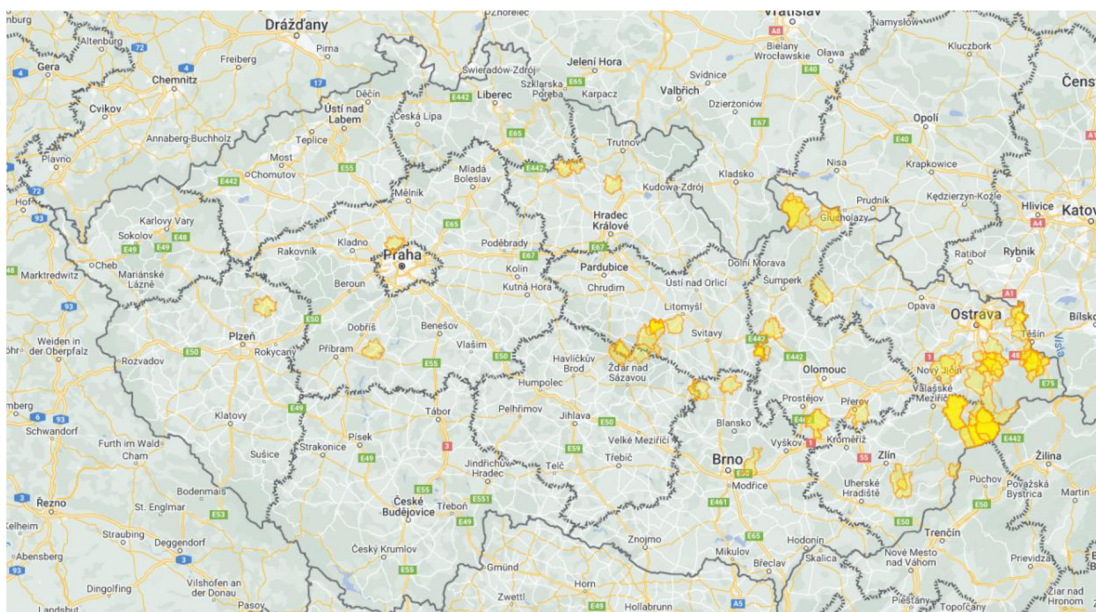
Veterinární ústavy, přesněji státní veterinární správa za spolupráce s referenty včelařských spolků nařizují přísná opatření při výskytu moru včelího plodu, aby dále nedocházelo k rozšiřování nákazy a většímu úhynu včelstev. Ze zákona se při výskytu nákazy vyhláší ochranné pásmo a ohnisko nákazy (Pohl, 2022).

Když se úředně potvrdí, že se opravdu jedná o onemocnění moru včelího plodu, dojde k co nejrychlejšímu vymezení a vyhlášení ohniska, kde platí pro včelaře přísná pravidla. Ohnisko nákazy (obr. 3) je místo, ve kterém se nachází všechna nemocná včelstva. Ochranné pásmo (obr. 4) je stanoveno v okruhu velkém minimálně 3 kilometry. Všechna včelstva v ohnisku nákazy jsou posléze laboratorně testována na přítomnost nakažlivých spor a je zjišťován zdroj nákazy. Včelař má přísný zákaz jakkoliv včelstva přesouvat nebo přemísťovat. Dále je nařízena likvidace nemocných včelstev a spálení mrtvých včel. Všechn včelařský materiál nadále podléhá důkladné dezinfekci a pokud k dezinfekci nemůže dojít je dána likvidace materiálu. Po likvidaci nemocných včelstev dochází k opakovanému laboratornímu testování včelstev v ohnisku nákazy a k vyloučení dalšího výskytu nákazy (Pohl, 2022).



Obrázek 3 Mapové výstupy ohnisek nákaz včel ke dni 16.1.2023

Zdroj: Státní veterinární správa



Obrázek 4 Mapové výstupy ochranných pásem ke dni 16.1.2023

Zdroj: Státní veterinární správa

1.2.4 Virulence

Doba, kterou každý z pěti genotypů potřebuje k usmrcení 100 % infikovaných včelích larev, se nazývá latentní čas (LT100). V in vivo pokusech byla stanovena porovnáním odpovídajících genů virulence referenčních kmenů a nového genotypu ERIC V pomocí porovnání celého genomu. Vzácně izolované genotypy *P. larvae* ERIC III-V s fenotypem rychlého zabíjení, s latentním časem 3 dny, obsahují geny, které mají vysoký stupeň podobnosti se složkami virulence jiných onemocnění hmyzu. Epidemiologicky běžné genotypy ERIC I (LT100 12 dní) a ERIC II (LT100 7 dní), které mají opožděné usmrcující vlastnosti, tyto geny virulence postrádají. Absence faktorů virulence může vysvětlovat epidemiologickou prevalenci, protože je známo, že zpomalení usmrcování zhoršuje úspěšnost hygienického čištění včelími ošetřovatelkami. Identifikace izolátu *P. larvae* ERIC V zvyšuje možnost, že se ve včelstvech vyskytuje více neidentifikovaných genotypů ERIC. Tyto zřídka izolované genotypy mohou sloužit jako tajný rezervoár pro budoucí ohniska moru včelího plodu, protože absence nebo inaktivace několika genů může změnit rychle zabíjející fenotyp na nebezpečnější pomalu zabíjející fenotyp (Beims et al., 2020).

Genotypy *P. larvae* se od sebe liší fenotypově, včetně odolnosti endospor vůči teplotě, rychlosti sporulace, doby do smrti hostitele a je předpokládáno, že všechny genotypy mají jiný způsob, jak usmrcují larvy (Ebeling et al., 2016). Mezi funkčně

charakterizovanými virulencemi faktorů jsme zjistili, že geny kódující enzym degradující chitin PICBP49 (Garcia-Gonzales a Genersch, 2013) byly přítomny ve všech pěti genotypech. Podobně všechny genotypy kódují toxin Plx2 a C3 larvinový toxin. Naproti tomu gen pro toxin Plx1 byl přítomen pouze u genů ERIC I, III a IV (Fünfhaus et al., 2013).

1.2.5 Klinické příznaky a patogeneze

Mezi prvními příznaky, které můžeme pozorovat je tzv. mezerovitý plod. U zdravých včelstev je plod ucelený, maximální mezerovitost nebo vynechávání buněk, které je ještě přirozené, se pohybuje kolem pěti procent. Mezi časté, nenakažlivé příčiny mezerovitosti plodu patří špatně kladoucí matka a po její výměně mezerovitost mizí. Mezi závažné příčiny mezerovitosti plodu řadíme onemocnění moru včelího plodu (Titěra et al., 2009). Larvy včely medonosné se nakazí pozřením potravy kontaminované spory *P. larvae*, které jim poskytnou dospělé dělnice. Životní cyklus *P. larvae* lze rozdělit na neinvazivní, komenzální fázi, po níž následuje invazivní a destruktivní fáze. Spory klíčí v lumenu středního střeva a vegetativní bakterie se zde masivně množí, než nakonec napadnou a proniknou do epitelu středního střeva, čímž larvu usmrtí. Uhybnou larvu bakterie stále rozkládá na hrudkovitou hmotu. Při vyčerpání živin z uhybnulé larvy začne *P. larvae* sporulovat a zbytky larvy vysychají na takzvaný příškvár. Spory jsou dále roznášeny dospělými včelami v rámci včelstva a mezi včelstvy, což usnadňuje šíření nákazy na zdravé larvy. Úspěšnost *P. larvae* při patogenezi a přenosu závisí na úhynu infikované larvy, celkový rozklad infikované larvy a přítomnosti saprofytů (Poppinga et al., 2015). V dalším průběhu onemocnění na úrovni kolonie se infikuje a umírá stále více larev, takže v průběhu nakonec dojde k nedostatku larev, a tedy i potomstva a k úhynu celé kolonie (Genersch 2008, 2010).

1.2.6 Diagnostika

1.2.6.1 Nelaboratorní diagnostika

Mezi nelaboratorní test můžeme pokládat takzvaný zápalkový test. Do podezřelé buňky napadené morem včelího plodu se vnoří sirka, za kterou by se po vytáhnutí mělo táhnout vlákno, které může dosahovat délky několik centimetrů. Avšak tento test není spolehlivý, jelikož toto vlákno nemusí být viditelné nebo přítomné (Titěra, 2017).

1.2.6.2 Laboratorní diagnostika

Pokud dojde k podezření na nákazu mor včelího plodu, musí být onemocnění potvrzeno laboratorním vyšetřením. Z nakaženého plástu se dá odebrat a připravit preparát, který se specificky barví a mikroskopicky zobrazuje při zvětšení 1000×. Při mikroskopickém zobrazení jsou viditelná typická vegetativní stadia bakterie a spory. Avšak mikroskopické zobrazení nemusí být při některých případech průkazné, a proto se provádí i kultivace bakterie. Tento test provádíme ze stěru z nakaženého plástu, plodu, medu či vosku kultivací na speciálních mediích (Titěra et al., 2009). Jelikož *P. larvae* je bakterie tvořící spory, její izolace z biologických materiálů obvykle předchází tepelnému zpracování. Tepelným zpracováním se usmrtí všechny bakterie vegetativních mikroorganismů. Tento krok významně snižuje riziko že kolonie *P. larvae* budou maskovány konkurenty. Různé genotypy *P. larvae* vykazují rozdíly v reakcích na tepelné ošetření (Forsgren et al., 2008). V posledním desetiletí metody založené na genetické analýze získaly větší pozornost. Různé strategie pro hodnocení genetické diverzity *P. larvae*, mezi něž patří například restrikce endonukleázových fragmentových vzorců (Djordjevic et al., 1994; Alippi et al., 2002), gelová elektroforéza s pulzním polem (Wu et al., 2005; Genersch et al., 2006), polymorfismem délky amplifikovaných fragmentů (de Graaf et al., 2006), ribotypizace a denaturační gradientová gelová elektroforéza (Antúnez et al., 2007).

Zkoumání exprese genů *P. larvae* za různých experimentálních podmínek se může na transkripční úrovni využít metodiky kvantitativní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkriptázou (qRT-PCR). Současný stav analýzy dat qRT-PCR se opírá o normalizované údaje a kalibrované relativní veličiny (Vandesompele et al., 2002; Hellemans et al., 2007). Za účelem normalizace dat qRT-PCR na cílových genech se používají normalizační faktory (NF), založené na geometrických přepočtených prahových hodnotách cyklu (Ct-hodnoty). Před výpočtem NF je třeba rozhodnout, kolik referenčních genů by mělo být do tohoto výpočtu zahrnuto. Toto rozhodnutí je založeno na stabilitě exprese kandidátních referenčních genů za všech zkoumaných experimentálních podmínek (De Graaf et al., 2013).

1.2.7 Léčení moru včelího plodu

V mnoha zemích je povoleno používat k léčení moru včelího plodu Sulfathiazol nebo oxytetracyklin-hydrochlorid (OTC). Používá se především profylakticky u zdravých včelstev a k zabránění tvorbě infekčních spor při probíhající infekci. Avšak rezidua

těchto antibiotik byla nalezena dále v medu a v ostatních včelích produktech. OTC se využívá i v léčbě lidských bakteriálních infekcí, a proto léčení včelstva antibiotiky není vhodné (Hansen et al. 1999). V České republice je v II. Hlavě, prvního oddílu, paragraf 5 zákona č. 166/1999 Sb, „Zákon o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon)“ je dáno, že mor včelího plodu je zakázán léčit antibiotiky spolu s hnilobou včelího plodu.

1.3 Rostlinné silice

V posledních letech je pozorována čím dál tím více rostoucí odolnost mikroorganismů proti běžně používaným chemickým látkám a lékům. Jedná se o závažný a zjevný problém, který započal výzkum v oblasti objevování a identifikace nových biocidních přípravků se širokospektrovou účinností. Rostliny a jejich deriváty, jako jsou např. rostlinné silice, se často používají v lidovém léčitelství. V přírodě hrají rostlinné silice velmi důležitou roli, např. v ochraně rostlin. Rostlinné silice obsahují širokou škálu sekundárních metabolitů, které jsou schopny inhibovat nebo zpomalovat růst bakterií, kvasinek a plísní. Jejich složky působí proti různým cílům, mohou působit na membránu a cytoplazmu, a v některých případech zcela mění morfologii buněk (Nazzaro et al., 2013).

1.3.1 Složení

Rostlinné silice jsou těkavé a vonné látky s olejovitou konzistencí, které jsou produkovány rostlinami. Při pokojové teplotě mohou být kapalné, i když některé z nich mohou být tuhé nebo polotuhé a vykazují různé barvy od světle žluté po tmavě zelenou nebo od modré po tmavě hnědočervenou. Rostlinné silice jsou produkovány všemi rostlinnými orgány jako jsou pupeny, květy, listy, stonky, větvičky, semeny, plody, kořeny, dřevem nebo kůrou, a jsou uloženy v sekrečních buňkách, dutinách, kanálcích, epidermálních buňkách nebo žláznatých trichomech. K extrakci rostlinných silic lze použít několik technik podle různých částí aromatických rostlin, včetně destilace vodou nebo vodní parou, extrakce rozpouštědly, exprese za tlaku, extrakce superkritickou kapalinou a subkritickou vodou (Bassole et al., 2012).

Silice jsou velmi složité přírodní směsi, které mohou obsahovat mnoho chemicky rozdílných složek v různých koncentracích. Vyznačují se dvěma nebo třemi hlavními složkami v poměrně vysokých koncentracích (20-70 %) ve srovnání s ostatními

složkami přítomnými ve stopovém množství. Hlavní složky zásadně podmiňují jejich biologické vlastnosti. Hlavní skupina se skládá z terpenů a terpenoidů a dalších aromatických a alifatických složek, které se vyznačují nízkou molekulovou hmotností (Bakkali et al., 2008).

Terpeny jsou v chemické struktuře rostlinných silic nejvíce zastoupeny, tvoří většinu chemických složek rostlinných silic. Typické rozmezí rozeznávaných složek je 100 až 250, přičemž některé oleje (levandule, pelargonie a rozmarýn) obsahují až 500 chemických látek (de Groot et al., 2016).

1.3.2 Jejich antimikrobiální účinky

Antimikrobiální aktivita silic, podobně jako u všech přírodních extraktů, závisí na jejich chemickém složení a množství jednotlivých složek. Mnohé z antimikrobiálních sloučenin jsou neustále exprimovány rostlinami a jiné mohou být syntetizovány jako mechanismus sebeobrany v rostlinách jako reakce na patogeny. Zelenina, koření a ovoce s vysokým obsahem silic jsou vynikajícími zdroji přírodních prvků s aktivitou proti zemědělsky a zdravotně významným mikroorganismům. Tyto molekuly mohou být přirozeně přítomny v aktivní formě v rostlině nebo mohou být aktivovány specifickými enzymy, když je rostlinný organismus vystaven určitému biotickému nebo abiotickému stresu. Různé množství specifických sloučenin může ovlivnit antimikrobiální aktivitu (Nazzaro et al., 2013).

1.3.2.1 Cytotoxicita

Rostlinné silice, které jsou lipofilní, procházejí přes buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu a poté permeabilizují různé vrstvy polysacharidů, mastných kyselin a fosfolipidů. Mění tak propustnost membrán a mění se míra difuze částic. U bakterií je permeabilizace membrány doprovázena ztrátou iontů, poklesem membránového potenciálu, selháním protonové pumpy a vyčerpáním zásob ATP. Silice mají také schopnost srážet cytoplazmu a poškozovat proteiny a lipidy. Poškození buněčné stěny a cytoplazmatické membrány může vést k úniku cytoplazmy a makromolekul a dochází tím k lýze buňky. U eukaryotních organismů mitochondrie produkují superoxidové anionty a peroxidy vodíku, které reagují s rostlinnými silicemi a vytváří meziproducty jako jsou hydroxylové radikály. Tyto meziproducty závažně poškozují mitochondriální

DNA, která nadále inhibuje expresi proteinů a transport elektronů a tím dochází k nahromadění bílkovin (Bakkali et al., 2008).

2. Cíl práce a hypotézy

Cíl práce

1. Ověření baktericidního vlivu u vybraných silic
2. Stanovení minimální inhibiční a baktericidní koncentrace u vybraných rostlinných silic

Hypotézy

- H1. Má kombinace určitých rostlinných silic větší inhibiční koncentraci než silice samotné?
- H2. Bude kombinace určitých rostlinných silic působit aditivně nebo synergicky?

3. Metodika

3.1 Zkoumané látky

Celkem bylo testováno 11 rostlinných silic, které byly vybrány na základě chemického složení a jejich antimikrobiální aktivity. Všechny rostlinné silice byly získány od firmy 1. Aromaterapeutická KH a.s. a po dobu zkoumání byly uchovávány na Fakultě zemědělské a technologické Jihočeské univerzity. Rostlinné silice byly uchovávány v chladícím boxu při teplotě kolem 2,5 °C.

Testovaný kmen *P. larvae* CCM 4488, který byl pořízen z České sbírky mikroorganismů v Brně, je uchován na Fakultě zemědělské a technologické Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Pro zachování genetické struktury a virulence pro uchování bakterie po delší časové období jsou kryozkumavky s roztokem patogenu a glycerolu udržovány při teplotě -80 °C.

Tabulka 4 Seznam vybraných rostlinných silic a jejich zkratky

| | |
|-----|--|
| SAT | Saturejka horská (<i>Satureia hortensis</i> oil) |
| PLG | Pelargonie (<i>Pelargonium graveolens</i> flower oil) |
| HM | Heřmáněk modrý (<i>Chamomilla recutita</i> flower oil) |
| MAN | Manuka (<i>Leptospermum scoparium</i> branch/leaf oil) |
| ČES | Česnek kuchyňský (<i>Allium sativum</i> bulb oil) |
| MRK | Mrkev setá (<i>Daucus carota sativa</i> seed oil) |
| SKO | Skořice (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> bark oil) |
| LIT | Litsea cubeba (<i>Litsea cubeba</i> fruit oil) |
| TYM | Tymián červený (<i>Thymus vulgaris</i> flower/leaf oil) |
| MAT | Mateřídouška (<i>Thymus serpyllum</i> oil) |
| DOB | Dobromysl/Oregano (<i>Origanum vulgare</i>) |

3.2 *Laboratorní analýza*

Laboratorní analýza praktické části bakalářské práce byla prováděna v laboratořích Fakulty zemědělské a technologické na kampusu Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Postup na stanovení minimální inhibiční koncentrace byl prováděn dle článku *In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against Paenibacillus larvae and their acute oral toxicity to adult honey bees* (Flesar et al., 2010), kde je popsána práce se 26 přírodními směsi.

Kultivace bakterie byla prováděna na speciálně sestaveném MYPGP mediu, který se výhradně používá ke kultivaci *P.larvae*, který poprvé popsal Digman a Stahly v roce 1983 (Digman a Stahly., 1983).

3.3 *Instrumentální analýza*

Vybavení

- kultura *Paenibacillus larvae* kmen CCM 4488 České sbírky mikroorganismů, Brno (Czech collection of microorganisms)
- MYPGP médium (tuhé i tekuté)
- Petriho misky, plastové o průměru 90 mm
- laboratorní sklo (kádinky, Erlenmeyerovy baňky, laboratorní lahve se šroubovacím uzávěrem)
- inokulační kličky
- 96 jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem a víkem
- uzavíratelné plastové zkumavky 2 ml (Eppendorfova zkumavka)
- dimethylsulfoxid (DMSO)
- plastové navažovací lodičky
- pipety
- multikanálová pipeta
- špičky na pipety různých velikostí
- lihový fix

Přístroje

- Velp scientifica Vortex mixer
- Denzitometr DEN-1 bioSan

- Ultrazvukový sonikátor Tesla
- Spektrofotometr
- Počítač
- Laminární box nebo flowbox Telstar
- Laboratorní termostat LabTech
- Lednice
- Termostat s teplotou -80 °C Panasonic
- Analytické váhy Kern
- Autokláv Schoeller

Příprava MYPGP media (na litr)

- 10 g Mueller-Hinton bujón (Condalab)
- 15 g kvasinkový extrakt (HIMEDIA)
- 3 g hydrogenufosforečnan didraselný K_2HPO_4
- 1 g Na-pyruvát
- 20 ml 10% glukózy přidané odděleně po sterilizaci (Lach-ner)
- 20 g agar (pokud se jednalo o tuhé medium) (Lach-ner)

Postup přípravy MYPGP media na 100 ml

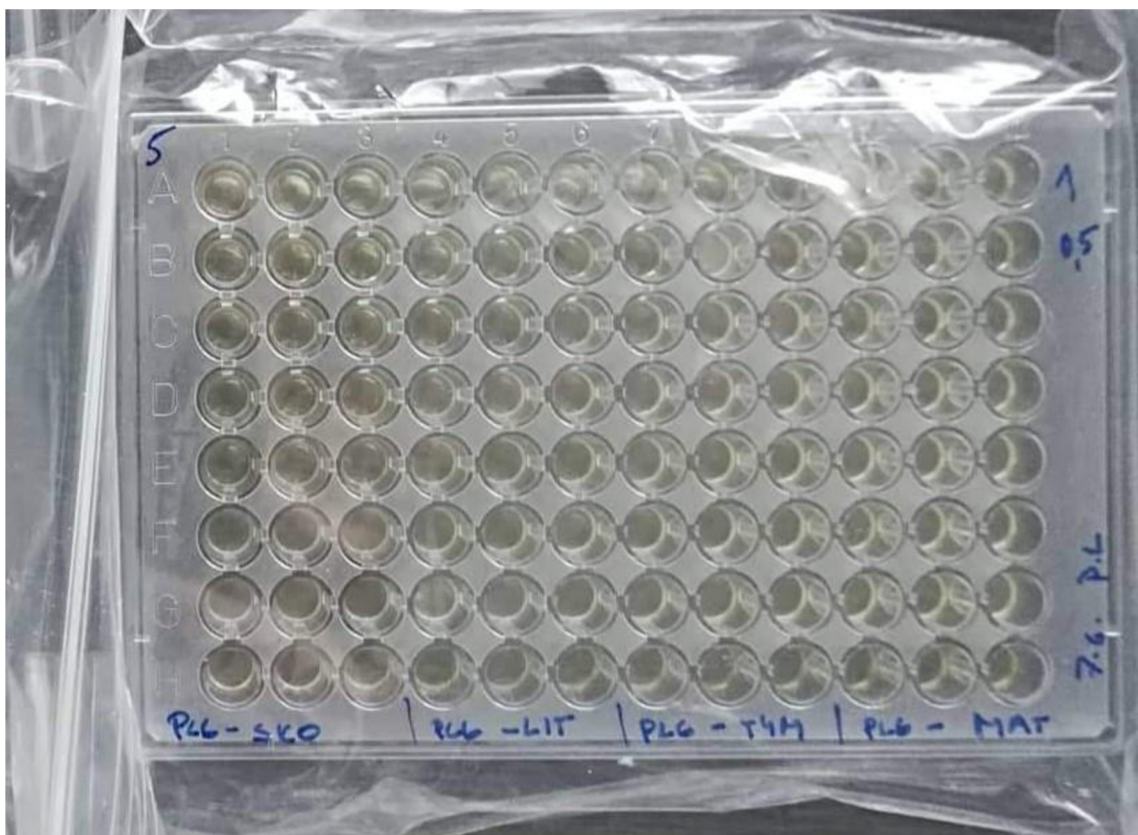
K vážení byly použity analytické váhy (Kern) s rozpětím do 120 g s přesností na 3 desetinná místa. Jako kvasinkový extrakt byl použit Yeast Extract Powder (HIMEDIA), který obsahuje extrakt z kvasinek *Saccharomyces sp.*

1. Všechny práškové směsi byly rozpouštěny v malém množství destilované vody ve skleněné laboratorní lahvi se šroubovacím uzávěrem nebo Erlenmeyerově baňce.
2. Po zapnutí analytické váhy byla zvážena plastová laboratorní lodička a byla na váze použita funkce TARE. Tedy váha samotné lodičky byla odstraněna a následně byla vážena pouze požadovaná směs bez hodnoty hmotnosti lodičky.
3. Dále byl postupně navážen a vsypán do destilované vody 1 g práškového Muller-Hinton bujónu, 1,5 g práškového kvasinkového extraktu, 0,3 g práškového K_2HPO_4 a 0,1 g práškového Na-pyruvátu.

4. Pokud se jednalo o přípravu tuhého média, byly navíc naváženy 2 g práškového agaru, které byly také přidány do směsi v destilované vodě.
5. Celá směs byla nadále dolita destilovanou vodou na 100 ml.
6. Do samostatné skleněné uzavíratelné lahve byl připraven roztok destilované vody a glukózy, tak aby výsledná koncentrace glukózy byla 10 %.
7. Směs media a roztok glukózy byly následně vysterilizovány pomocí autoklávu za teploty 121 °C po dobu 15 minut.
8. Po sterilizaci a částečném zchladnutí byl k mediu přidán roztok glukózy.
9. Pokud se jednalo o tuhé medium, bylo medium ponecháno vychladnout a následně bylo přelito 20 ml do plastové Petriho misky o průměru 90 mm.

3.3.1 Stanovení MIC

Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace byla vybrána metoda na mikrotitračních destičkách, broth microdilution method s MYPGP médiem (obr. 5). Testování každé silice i její kombinace s ostatními silicemi probíhalo ve 3 opakováních, tzn. ve 3 sloupcích mikrotitrační destičky (obr. 6).



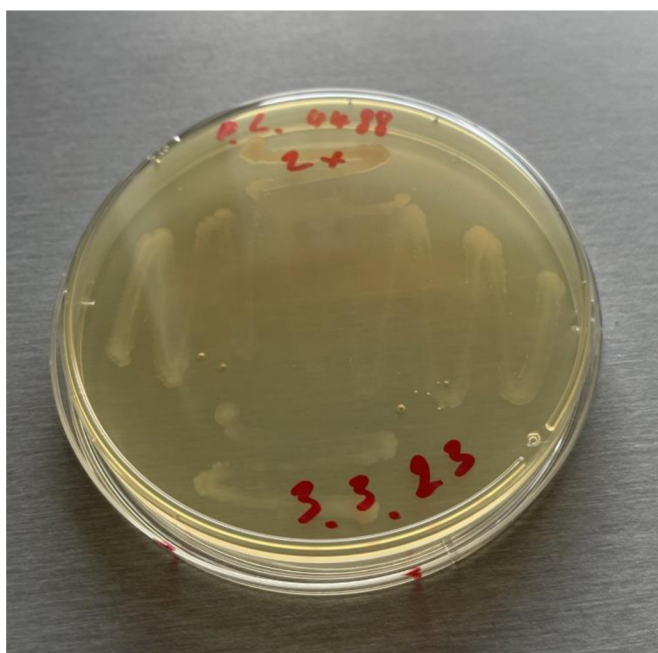
Obrázek 5 Mikrotitrační destička

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 |
| B | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 |
| C | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 |
| D | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 |
| E | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 |
| F | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 |
| G | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| H | - | - | - | - | | - | - | - | - | - | - | - |

Obrázek 6 Schématické rozložení mikrotitrační destičky

Příprava inokula

Inokulum bylo připraveno z bakteriální kultury staré 48 hodin (obr. 7). Sterilní inokulační kličkou byla nabrána bakteriální kolonie, která byla nadále rozpuštěna ve sterilní destilované vodě o výsledné denzitě 0,5 McF.



Obrázek 7 Kultura *P. larvae*

Postup na stanovení MIC

1. Ve 2 ml uzavíratelné plastové zkumavce (Eppendorfova zkumavka) bylo smícháno 20 μ l dimethylsulfoxidu (DMSO), 4 μ l rostlinné silice (nebo kombinace obou silic po 2 μ l) a 1976 μ l tekutého MYPGP media. Tímto způsobem bylo ve zkumavce dosaženo přibližné koncentrace 2048 μ l/mg.
2. Vzorek byl vložen do ultrazvukového sonikátoru, kde se homogenizoval po dobu 10 minut.
3. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 μ l tekutého MYPGP media.
4. Do první řady mikrotitrační destičky bylo aplikováno 100 μ l směsi media se silicemi a emulgátorem DMSO. Multikanálovou pipetou byla první řada promíchána a tím byla získána koncentrace 1024 μ l/mg.
5. Multikanálovou pipetou bylo přeneseno 100 μ l roztoku z první řady jamek do druhé řady jamek. Tak byla v druhé řadě destičky získána poloviční koncentrace z první řady jamek a to 512 μ l/mg.
6. Stejným způsobem bylo postupováno až do šesté řady jamek, kde koncentrace rostlinné silice klesla na 32 μ l/mg (obr.8).
7. Poslední a předposlední řada jamek sloužila jako pozitivní a negativní kontrola a nebyla v jamkách přítomna žádná koncentrace rostlinné silice.
8. Do všech jamek bylo napipetováno 10 μ l inokula, mimo poslední řadu, kde se nacházela negativní kontrola.
9. Celá destička byla změřena na spektrofotometru o vlnové délce 405 nm, tím jsme získali informace v časovém bodě 0 hodin.
10. Destička byla inkubována na 48 hodin při 37 °C. Po uplynutí této doby byla destička opět změřena na spektrofotometru a následně byla vypočítána procentuální inhibice bakterie.

| c (µl/mg) | 1 | 2 | 3 |
|-----------|---|---|---|
| 1024 | ● | ● | ● |
| 512 | ● | ● | ● |
| 256 | ● | ● | ● |
| 128 | ● | ● | ● |
| 65 | ● | ● | ● |
| 32 | ● | ● | ● |
| + | ● | ● | ● |
| - | ○ | ○ | ○ |

Obrázek 8 Schéma jamek mikrotitrační destičky

Vyhodnocení MIC

Hodnoty z časového bodu 48 hodin byly odečteny od hodnot z časového bodu 0 hodin. Jelikož MIC bylo testováno ve 3 opakováních, následně byly hodnoty rozdílů zprůměrovány. Tato průměrná hodnota byla nadále porovnávána s pozitivní a negativní kontrolou a byla vypočítána výsledná procentuální inhibice.

Vypočítání frakčního inhibičního indexu

FIC se používá jako vyhodnocení interakce mezi rostlinnými silicemi a zjištění její povahy. S hodnotou FIC zjišťujeme čtyři různé interakce rostlinných silic: synergii, adici, indiferenci nebo antagonismus (Bassolé a Juliani, 2012).

$$FIC a = \frac{MIC_{(A \text{ za přítomnosti } B)}}{MIC_{(A \text{ smostatný})}}$$

$$FIC b = \frac{MIC_{(B \text{ za přítomnosti } A)}}{MIC_{(B \text{ smostatný})}}$$

$$FIC = FIC a + FIC b$$

Tabulka 5 Povahy interakcí

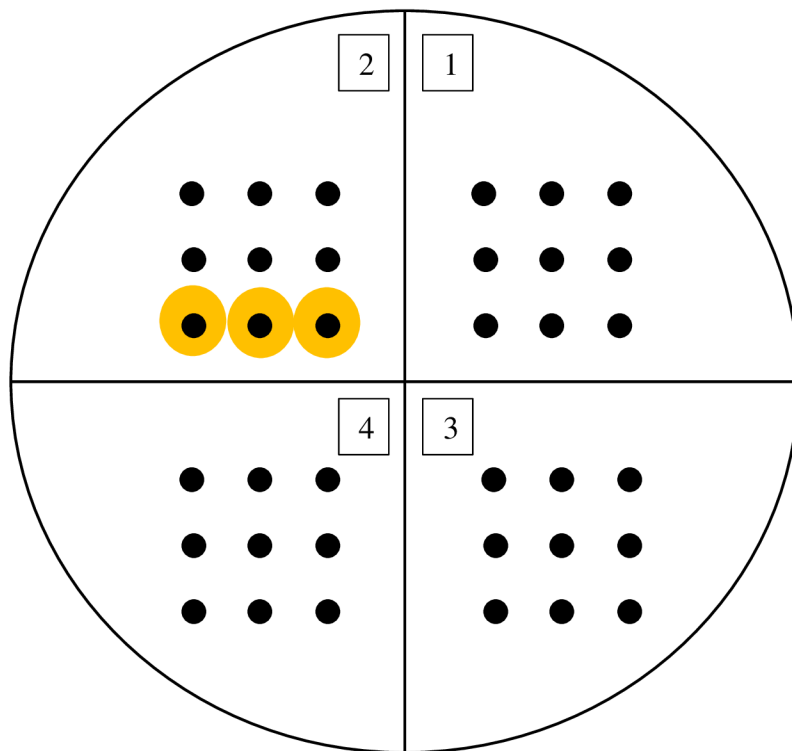
| Povaha interakce | FIC index |
|------------------|---------------------------|
| Synergie | ≤ 0.5 |
| Adice | $0.5 < \text{FIC} \leq 1$ |
| Indiference | $1 < \text{FIC} \leq 4$ |
| Antagonismus | > 4 |

3.3.2 MBC

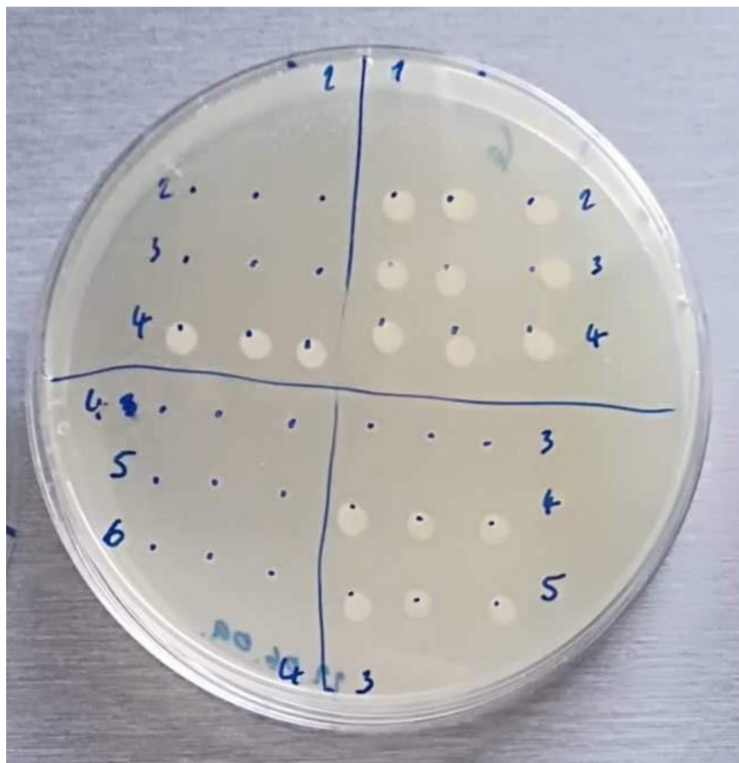
Stanovení minimální baktericidní koncentrace bylo prováděno na plastových Petriho miskách s tuhým MYPGP médiem. Pro stanovení se používaly 48 hodin inkubované mikrotitrační destičky připravené dle postupu na výzkum minimální inhibiční koncentrace.

Postup

- Po změření 48 hodin inkubovaných mikrotitračních destiček s inokulem bylo zkoumáno na spektrofotometru při které koncentraci došlo k nárůstu bakterie, a při které ne. Dle změřených hodnot byly vybrány 3 řady jamek z destičky kde došlo k přechodu z nárůstu do potlačení růstu bakterie.
- Plastovou inokulační kličkou byly stanovené koncentrace rozočkovány na tuhé MYPGP medium na Petriho miskách viz obrázek 9 a 10.
- Po 48 hodinách inkubace byl zkoumán nárůst bakterie.



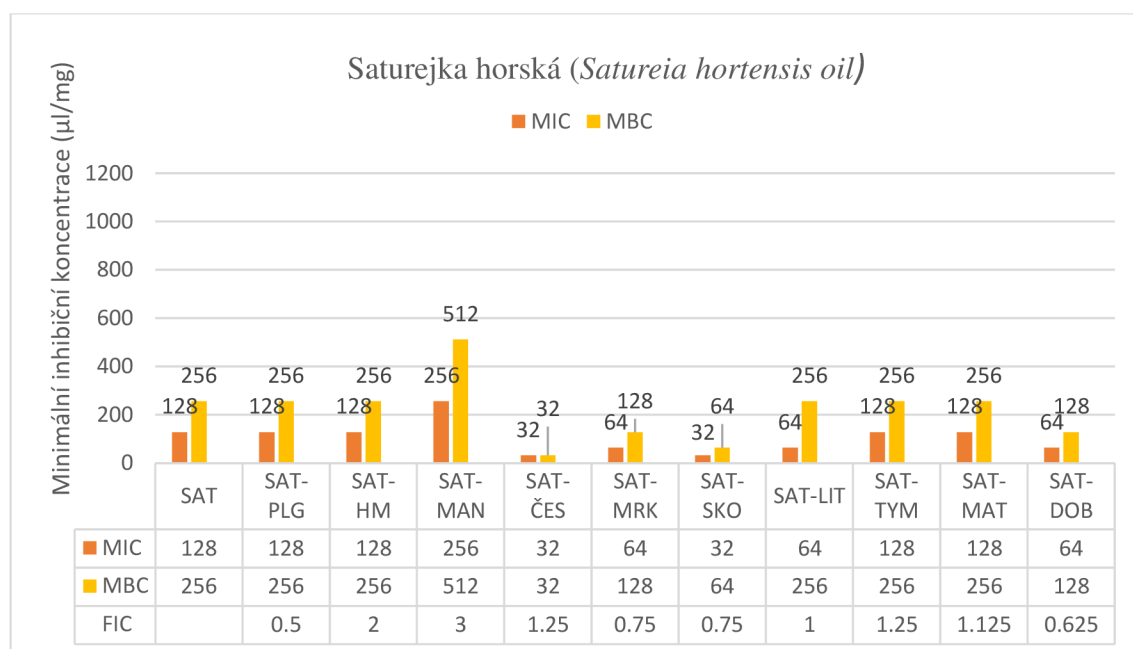
Obrázek 9 Schéma Petriho misky na stanovení MBC s nárůstem v poli č.2



Obrázek 10 Petriho miska na stanovení MBC

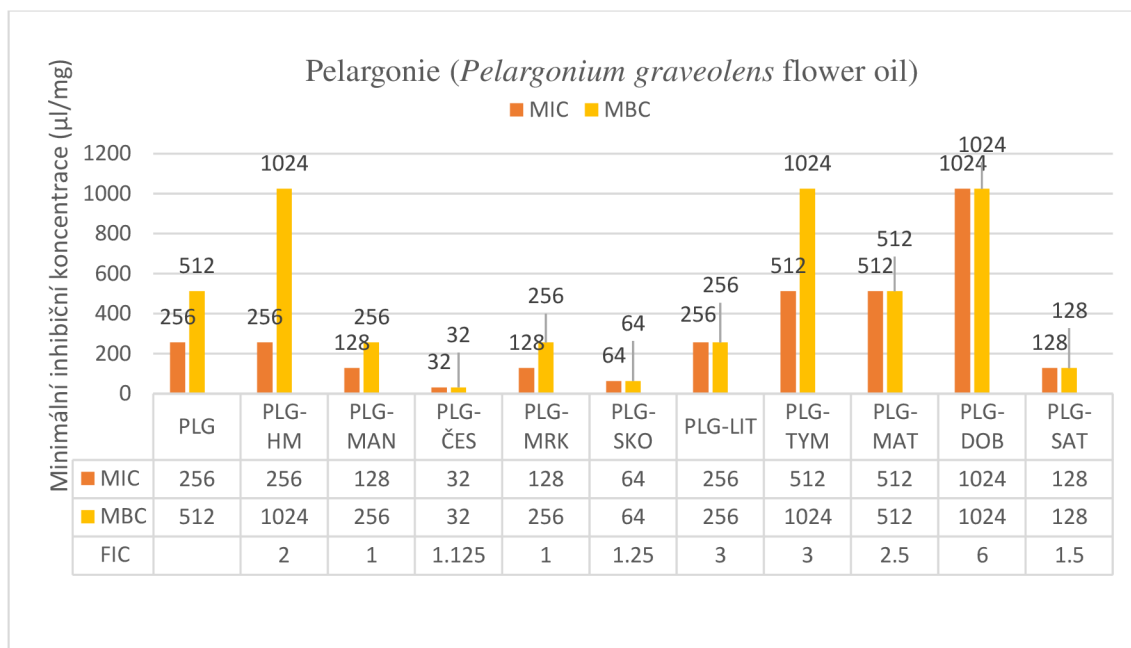
4. Výsledky

Minimální inhibiční koncentrace u rostlinné silice saturejky horské (*Satureia hortensis oil*) a ostatních rostlinných silic se pohybuje od 32 do 256 $\mu\text{l}/\text{mg}$. Samotná rostlinná silice saturejky měla hodnotu MIC 128 $\mu\text{l}/\text{mg}$. Nejnižší hodnoty MIC byly u kombinace saturejky a česneku kuchyňského nebo skořice, kde je hodnota 32 $\mu\text{l}/\text{mg}$. Podle hodnoty FIC můžeme usoudit, že se jednalo o adici u saturejky a pelargonie, mrkve, skořice a dobromyslu. U zbývajících kombinací se jednalo o indiferenci (obr. 11).



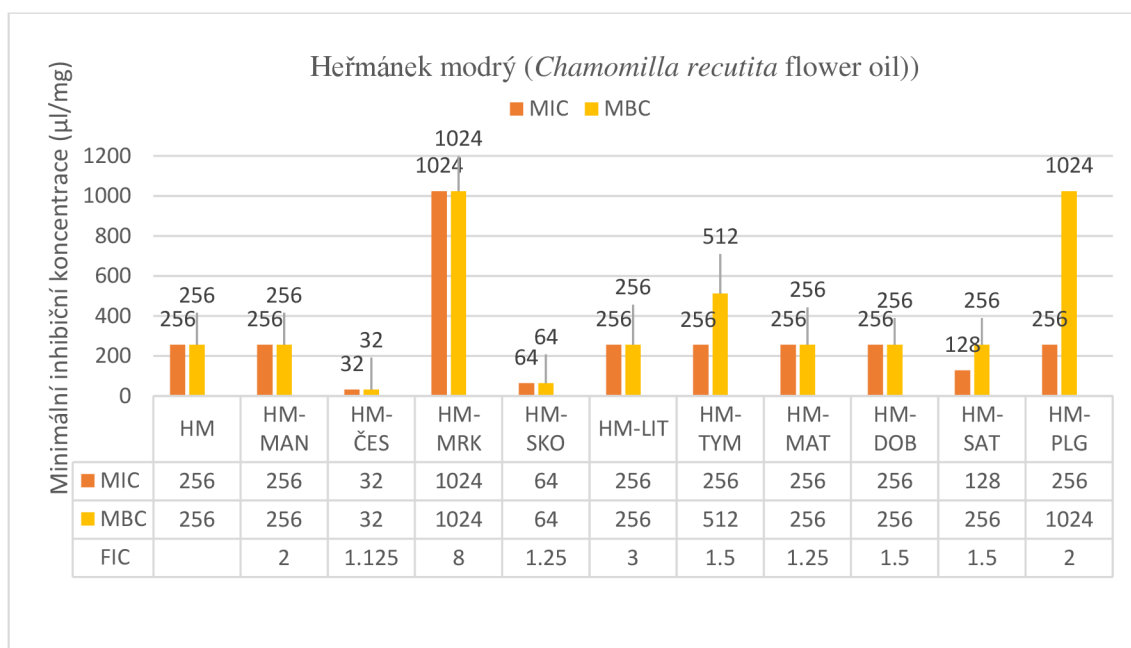
Obrázek 11 Graf hodnot rostlinné silice saturejky horské

Samostatná rostlinná silice pelargonie měla hodnoty MIC 256 $\mu\text{l}/\text{mg}$ a hodnoty MBC 512 $\mu\text{l}/\text{mg}$. Nejúčinnější kombinace s pelargonií byla kombinace pelargonie a česneku kuchyňského s hodnotou MIC 32 $\mu\text{l}/\text{mg}$. Nejúčinnější kombinace silic na hodnoty MBC byla kombinace pelargonie s česnekem, která dosahovala hodnoty 32 $\mu\text{l}/\text{mg}$ (obr. 12). Dle hodnoty indexu FIC došlo u kombinace silice pelargonie a mateřídoušky k antagonismu, u všech ostatních kombinací došlo k indiferenci mezi silicemi.



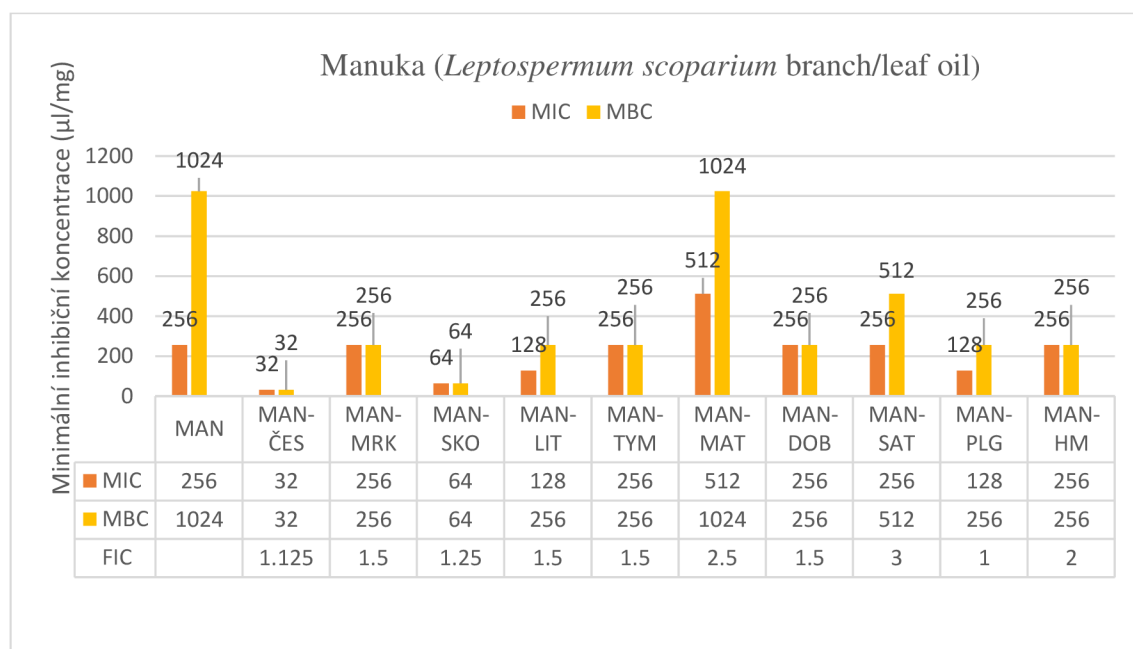
Obrázek 12 Graf hodnot rostlinné silice pelargonie

Samostatná rostlinná silice heřmánku modrého měla hodnotu MIC i hodnotu MBC 256 $\mu\text{l/mg}$. Nejnižší hodnoty MIC i MBC měla kombinace heřmánku a česneku s hodnotou 32 $\mu\text{l/mg}$. Nejvyšší hodnota MIC byla u kombinace heřmánku a mrkve seté a nejvyšší hodnota MBC byla u kombinace heřmánku a mrkve nebo pelargonie (obr. 13). U kombinace heřmánku a mrkve došlo k antagonismu silic, u ostatních kombinací docházelo k indifferenci.



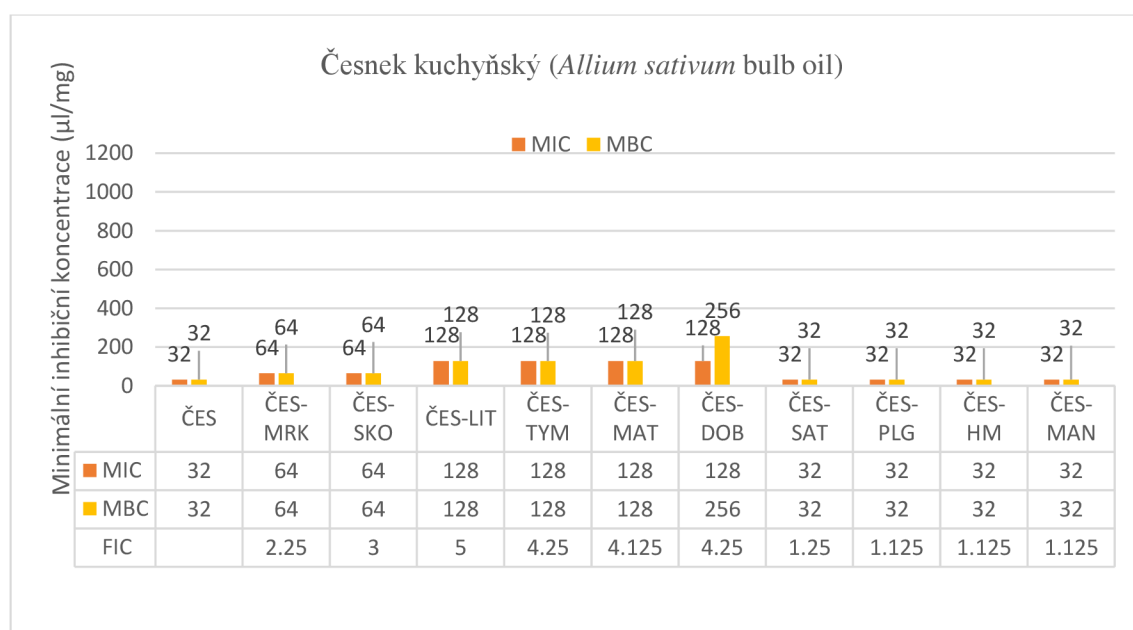
Obrázek 13 Graf hodnot rostlinné silice heřmánku modrého

Hodnota MIC samostatné rostlinné silice manuky dosahovala hodnoty 256 $\mu\text{l}/\text{mg}$ a 1024 $\mu\text{l}/\text{mg}$ u MBC. Neúčinnější kombinace manuky byla kombinace s česnekem kuchyňským s hodnotou MIC i MBC 32 $\mu\text{l}/\text{mg}$ (obr. 14). U všech kombinací silic manuky dle hodnot indexu FIC docházelo k indifferenci.



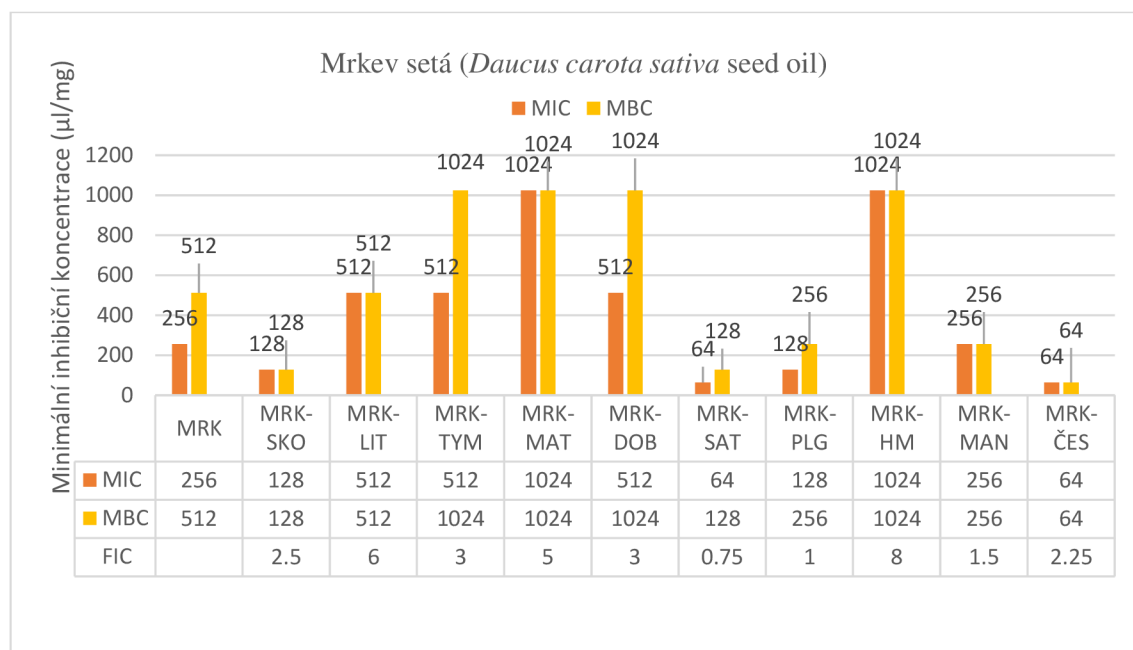
Obrázek 14 Graf hodnot rostlinné silice manuky

Samostatná rostlinná silice česneku kuchyňského a kombinace se satirejkou, pelargonií, heřmánkem i manukou měla hodnotu MIC a MBC 32 $\mu\text{l}/\text{mg}$ (obr. 14). U kombinací česneku a litsei, tymiánu a mateřídoušky došlo k antagonismu silic.



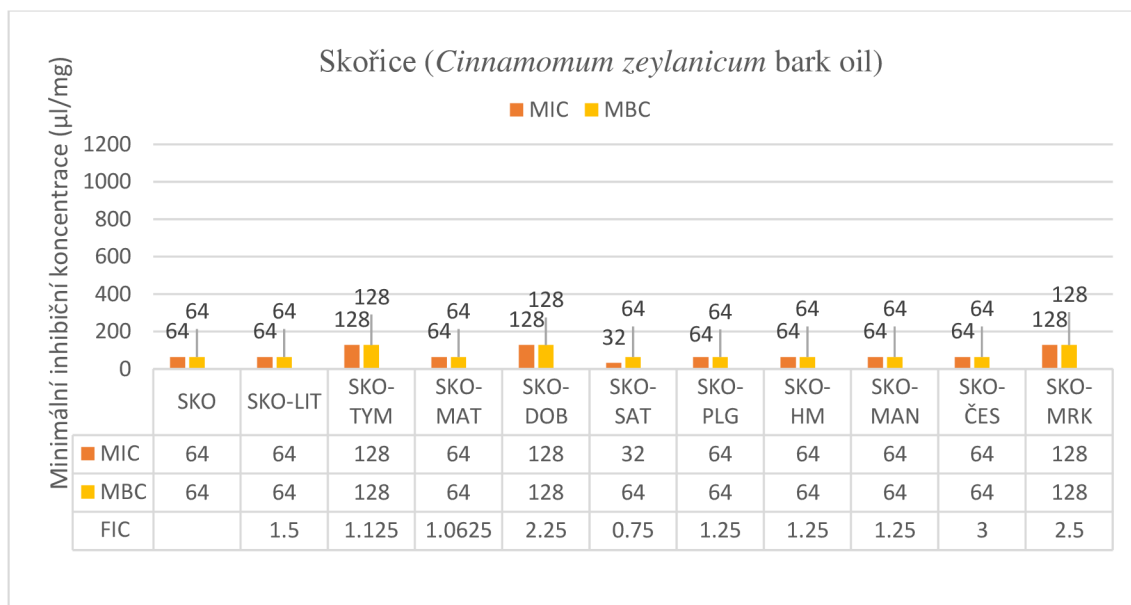
Obrázek 15 Graf hodnot rostlinné silice česneku kuchyňského

Mrkev setá jako samostatná silice měla hodnotu MIC 256 $\mu\text{l/mg}$ a hodnotu MBC 512 $\mu\text{l/mg}$. Kombinace mrkve seté s mateřídouškou měla nejnižší hodnotu MIC 32 $\mu\text{l/mg}$. Nejnižší hodnotu MBC měla kombinace mrkve a česneku (obr. 15). U kombinace mrkve a litsei, mateřídoušky a heřmánku došlo k antagonismu mezi silicemi. Mezi ostatními kombinacemi silic docházelo k indifferenci.



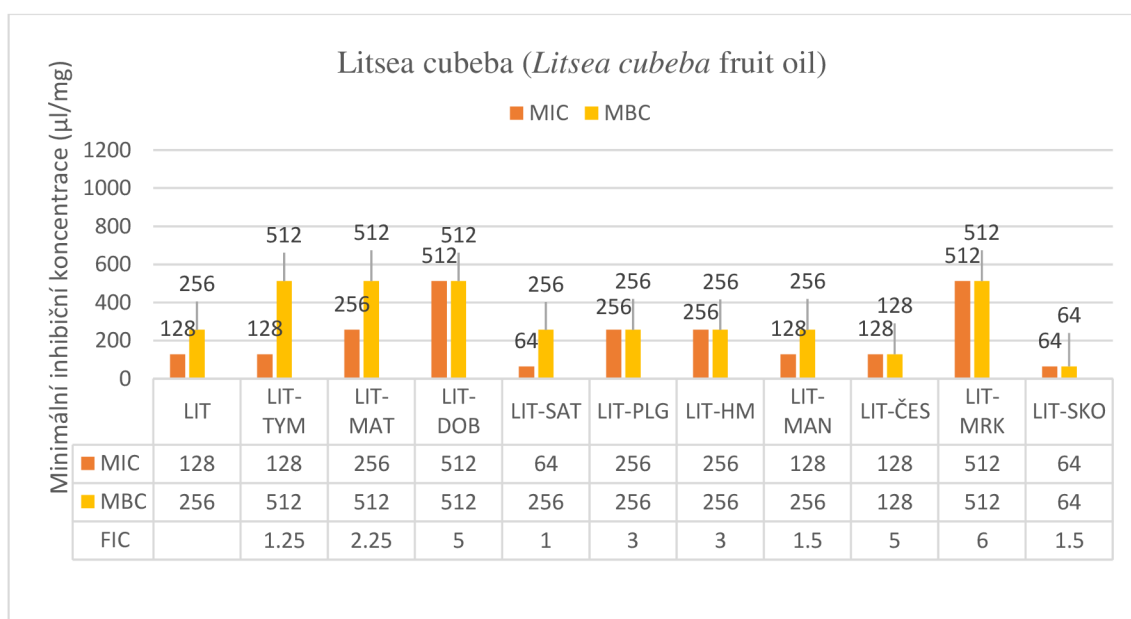
Obrázek 16 Graf hodnot rostlinné silice mrkve seté

Skořice měla hodnotu MIC a MBC 64 $\mu\text{l/mg}$, stejně jako kombinace skořice a mateřídoušky, heřmánku, manuky nebo česneku (obr 16.). Nejnižší hodnotu MIC měla kombinace skořice se satirejkou s hodnotou 32 $\mu\text{l/mg}$. Mezi silicemi dle hodnoty FIC docházelo k indifferenci, jen u kombinace skořice a satirejky došlo k adici.



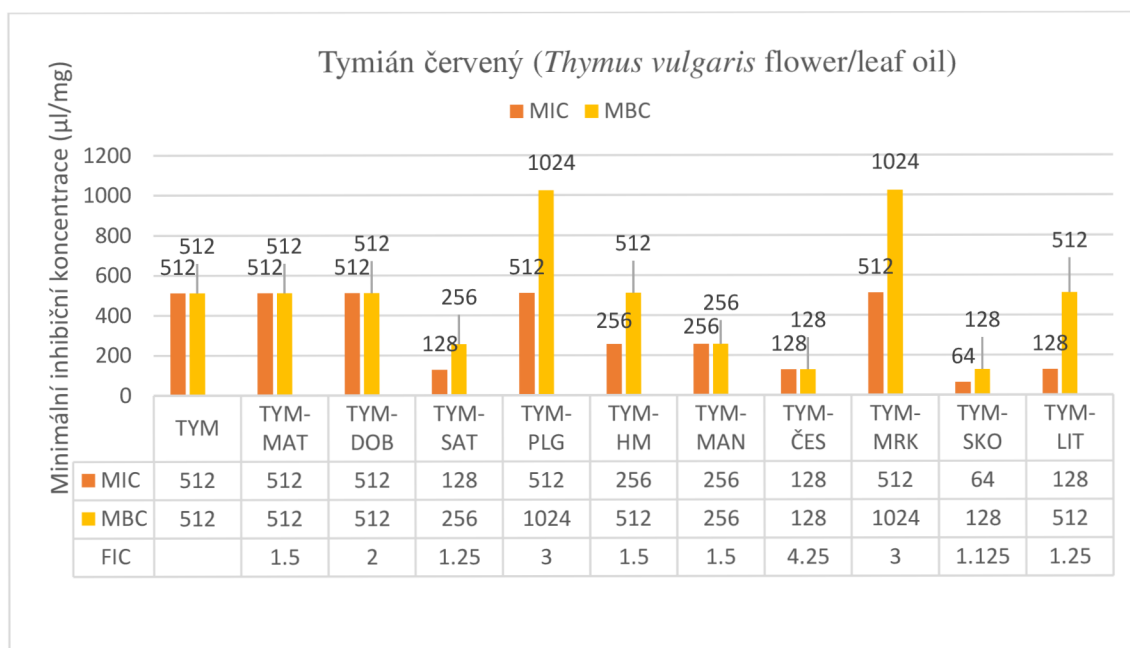
Obrázek 17 Graf hodnot rostlinné silice skořice

Litsea cubeba měla hodnotu MIC 128 $\mu\text{l/mg}$ a MBC 256 $\mu\text{l/mg}$. Nejnižší hodnota MIC byla v kombinaci s litseou a saturejkou nebo se skořicí s hodnotou 64 $\mu\text{l/mg}$. Nejnižší hodnota MBC byla v kombinaci litsei a skořice s hodnotou 64 $\mu\text{l/mg}$ (obr. 17). U kombinací litsei a dobromyslu, česneku a mrkve docházelo k antagonismu silic, u ostatních kombinací docházelo k indifferenci.



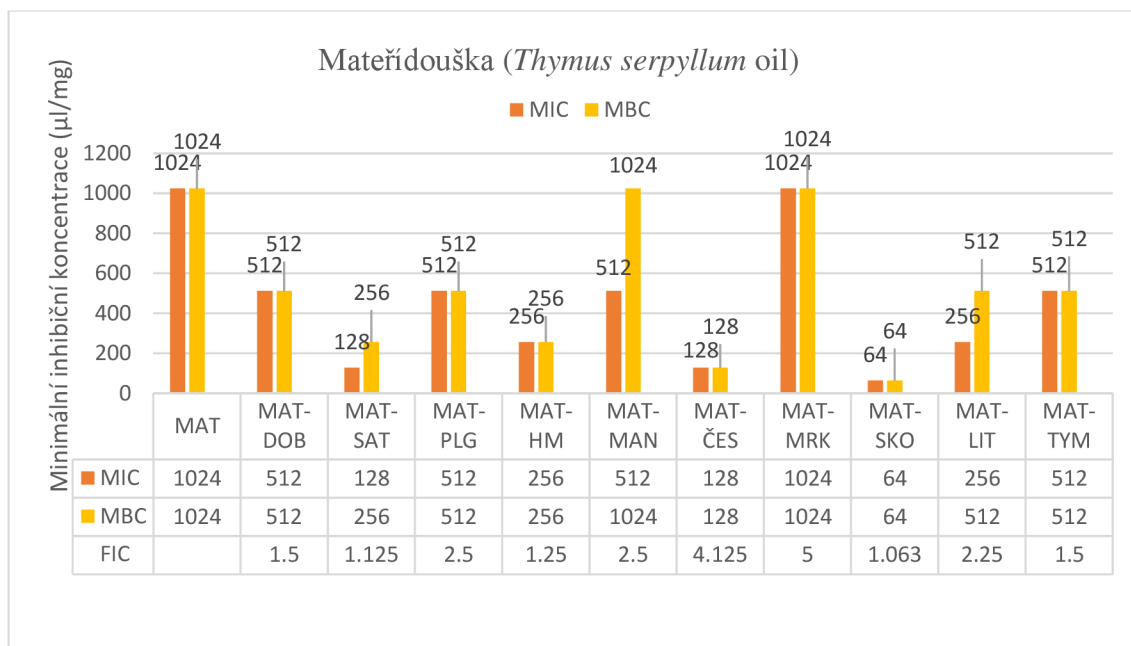
Obrázek 18 Graf hodnot rostlinné silice litsea cubeba

Samostatná rostlinná silice tymiánu červeného měla hodnotu MIC a MBC 512 $\mu\text{l}/\text{mg}$. Nejnižší hodnoty MIC měla kombinace tymiánu a skořice s hodnotou 64 $\mu\text{l}/\text{mg}$ (obr.18). U kombinace tymiánu a česneku došlo k antagonismu silic, u ostatních silic došlo k indiferenci.



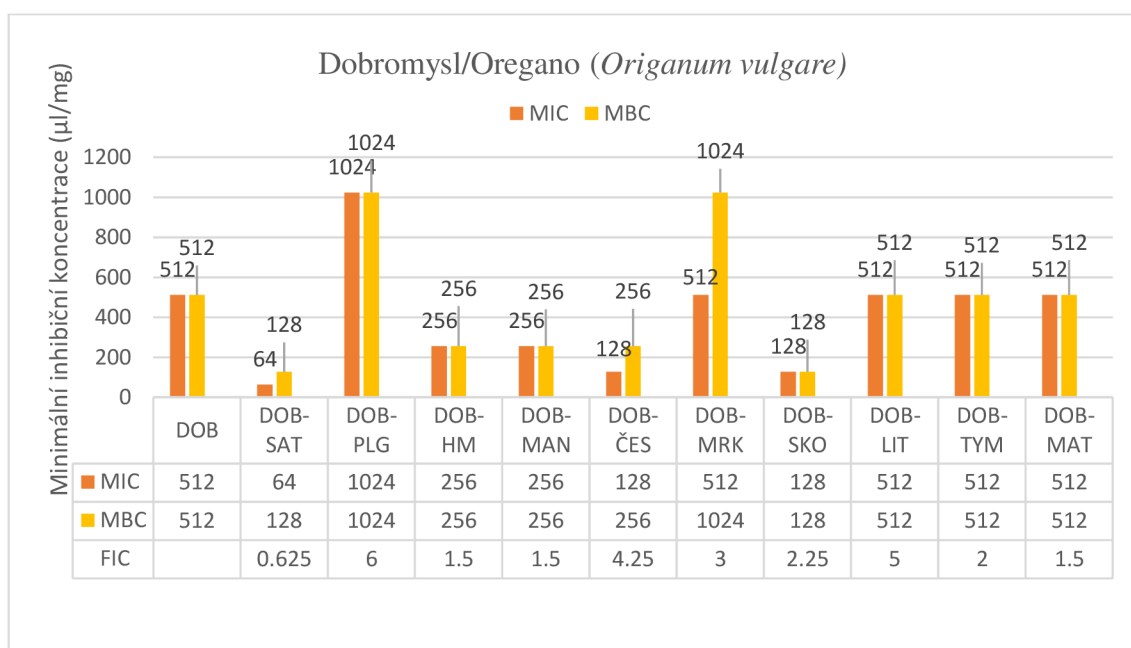
Obrázek 19 Graf hodnot rostlinné silice tymiánu červeného

Samostatná rostlinná silice mateřídoušky měla hodnotou MIC a MBC 1024 $\mu\text{l}/\text{mg}$. Nejnižší hodnotu MIC i MBC měla kombinace mateřídoušky a skořice s hodnotou 64 $\mu\text{l}/\text{mg}$ (obr. 19). U kombinací mateřídoušky a česneku nebo mrkve došlo k antagonismu.



Obrázek 20 Graf hodnot rostlinné silice mateřídoušky

Samostatná rostlinná silice dobromysl měla hodnotu MIC i MBC 512 $\mu\text{l/mg}$. Nejnižší hodnotu MIC měla kombinace dobromyslu a skořice a nejnižší hodnotu MBC měla kombinace dobromyslu a heřmánku. U kombinace dobromyslu a saturejky došlo k adici mezi silicemi. Podle hodnot indexu FIC došlo k antagonismu u kombinace dobromyslu a pelargonie, česneku nebo litsei. U ostatních kombinací silic s dobromyslem došlo k indiferenci.



Obrázek 21 Graf hodnot rostlinné silice dobromyslu

5. Diskuse

Minimální inhibiční koncentrace je nejnižší koncentrace antimikrobiální složky vyjádřená v mg/l nebo $\mu\text{g/ml}$, která za přesně definovaných in vitro podmínkách zabrání růstu bakteriím (EUCAST, 1998). Minimální inhibiční koncentrace rostlinných silic v mé práci byla stanovena pomocí upravené bujónové diluční metody (broth microdilution method). Pro stanovení MIC byly použity 96 jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem, vyhodnocení probíhalo pomocí spektrofotometru za vlnové délky 405 nm (Flesar et al., 2010). De Graaf et al., (2015) popisuje stanovení MIC širokospektrých antibiotik na bakterii *P. larvae* pomocí agarové diluční metody (agar dilution method). Tato metoda využívá Petriho misky a tuhé mediu s příměsí antibiotické látky. Cugnata et al. (2017) použití této metody kritizuje, jelikož dochází k nepřesnosti výsledků hodnot kvůli difuzi rostlinných silic z agarového média připraveného s destilovanou vodou. Také je tato metoda časově náročnější a těžší na přípravu. Roussenová (2011) popisuje použití diskové difuzní metody na výzkum antimikrobiální aktivity esenciálních olejů. Disková difuzní metoda (disk diffusion method) využívá tuhého media na Petriho misce s inokulem a papírových disků napuštěných antimikrobiální látkou. Vyhodnocení této metody probíhá změřením inhibičních zón kolem disku (Tendencia, 2004). Brown et al. (1991) popsal alternativu dilučních metod na stanovení MIC, a to metodu gradientní. Gradientní metoda využívá Petriho misky s tuhým médiem, na kterém jsou položeny proužky s postupně klesajícími koncentracemi antimikrobiální látky, nazýváme ji jako elipsometrový test (E-test). Tuto metodu hodnotí Wiegand et al. (2008) jako rychlou a jednoduchou. Jako nevýhodu této metody označil proužky, které jsou komerčně vyráběny pouze pro určité antimikrobiální látky. Výroba speciálních proužků je značně finančně nákladná, proto by byla tato metoda pro náš screening nevhodná.

Minimální baktericidní koncentrace je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky vyjádřená v mg/l nebo $\mu\text{l/mg}$, která za přesně definovaných in vitro podmínek snížila 99,9% počet organismů v médiu obsahující definované inokulum bakterií (EUCAST, 1998). V mé práci se využívalo tuhé MYPGP medium na Petriho miskách.

V mé práci bylo pro kultivaci *P. larvae* využito MYPGP medium, které bylo definováno Dingmanem a Stahlym (1983). Kultivace probíhala při 37 °C za aerobních podmínek. Nordstrom a Fries (1995) popsal pět různých medií na kultivaci *P. larvae* za

přítomnosti 5 % CO₂ a bez jeho přítomnosti. Jedním ze zkoumaných medií bylo MYPGP medium, které v rámci celého výzkumu mělo nejlepší výsledky bez i s přítomností 5 % CO₂.

Mor včelího plodu je ze zákona zakázáno léčit antibiotiky, a tak se hledají alternativy k inhibici jeho etiologického původce. Rostlinné silice díky svým biologickým vlastnostem vykazují antimikrobiální vlastnosti (Winaska et al., 2019). Alipi et al., (1991) popisuje na in vitro pokusech účinnost rostlinných silic na včelí onemocnění včetně onemocnění moru včelího plodu. Vzhledem ke své lipofilní povaze musí být rostlinné silice rozpouštěny v organických rozpouštědlech, nebo v jejich směsích. Avšak organická rozpouštědla mohou představovat problém v inkubaci bakterií, jelikož jejich přítomnost v médiu může narušit nárůst bakterie a inhibovat tím antimikrobiální aktivitu zkoumané látky. Maximální koncentrace DMSO v kontaktu s *P larvae*, která nezpůsobuje inhibici růstu bakterie, byla stanovena na 5 % (Cugnata et al., 2017). Jako rozpouštědlo bylo v této bakalářské práci použito DMSO podle metodiky popisované Flesarem et al., (2010). Pro výzkum v této bakalářské práci bylo použito 20 µl DMSO v celkovém množství 2000 µl MYPGP media s příměsí silice. Koncentrace DMSO ve směsi MYPGP media a rostlinné silice byla 1 %.

V mé práci bylo celkově hodnoceno 11 rostlinných silic, které byly rozděleny do tří skupin v závislosti na jejich účinnosti. Nejúčinnější rostlinné silice s nejnižšími hodnotami MIC a MBC byly silice česneku kuchyňského s hodnotami 32 µg/ml a skořice s hodnotami 64 µg/ml. Mezi středně účinné rostlinné silice řadíme silice saturejky horské, pelargonie, heřmánku modrého, manuky a litsei. A mezi slabě účinné silice řadíme mrkev setou, tymián červený, mateřídoušku a dobromysl.

Delaquis et al., (2002) popisuje různé terpenoidní složky, které mohou rostlinné silice obsahovat. Tyto složky na sebe mohou navzájem působit a mohou buď snižovat nebo zvyšovat antimikrobiální účinnost. Burt (2004) popisuje čtyři různé interakce, které mohou kombinace složek vyvolávat. Jedná se o účinky synergické, aditivní, indiferentní nebo antagonické. Aditivní účinky nastávají, když součet jednotlivých účinků je rovný celkovému účinku. Pokud jedna nebo obě rostlinné silice působí při společném použití slaběji nebo s nižším antimikrobiálním efektem než při samostatném použití, jedná se o antagonismus. Pokud dvě látky působí společně a jejich společný účinek je vyšší, než součet jejich jednotlivých účinků jedná se o synergismus. Indiference je nepřítomnost

interakce mezi složkami. V mé práci nebyly pozorovány žádné synergické účinky kombinací silic. K reakci aditivní povahy došlo u kombinací silic saturejky a pelargonie, saturejky mrkve, saturejky a skořice nebo saturejky a dobromyslu. Antagonistické reakce vykazovaly kombinace pelargonie a dobromyslu nebo pelargonie a litsei, heřmánku a mrkve, česneku a dobromyslu, česneku a tymiánu, česneku a mateřídoušky, česneku a litsei nebo česneku a mrkve. Všechny ostatní reakce měly indiferentní povahu.

Kuzyšinová et al., (2014) zkoumala antimikrobiální účinky 9 rostlinných silic na bakterii *P. larvae* kmen CCM 4488. Jednalo se o stejný kmen, který je použit i v této bakalářské práci. Antimikrobiální účinnost byla zkoumána pomocí agarové diluční metody ve 24hodinové úseku. Tři mnou zkoumané silice zde byly také testovány, avšak výsledky mého výzkumu se neshodovaly s výsledky článku. Jednalo se o rostlinou silici tymiánu (*Thymus vulgaris*), dobromyslu (*Origanum vulgare*) a heřmánku (*Chamomilla recutita*). Dobromysl a tymián vykazovaly silné inhibiční účinky a heřmánek vykazoval slabé až skoro žádné inhibiční účinky. V této práci silice dobromyslu a tymiánu vykazovali inhibiční schopnosti, avšak za nejsilnější či neúčinnější je nepovažujeme. A heřmánek vykazoval nejsilnější inhibiční účinky z těchto tří silic. I když se jednalo o stejný kmen bakterie mohly rozdílné výsledky nastat vlivem rozdílné metody nebo rozdílným časem inkubace. Ansari et al. (2015) hodnotil efekt některých rostlinných silic na *P. larvae* pomocí stanovení hodnoty MIC za použití bujónové diluční metody a hodnoty MBC na Petriho miskách s tuhým médiem. Z 28 rostlinných silic se 2 shodovaly s touto bakalářskou prací. Jednalo se o rostlinné silice litsei (*Litsea cubeba*) a mrkve (*Daucus carota*). Litsea měla ve článku hodnotu MIC $85.0 \pm 7.9 \mu\text{g/ml}$ a hodnotu MBC $186.0 \pm 21.2 \mu\text{g/ml}$, mrkev měla hodnotu MIC 482.0 ± 36.5 a hodnotu MBC $612.6 \pm 52.0 \mu\text{g/ml}$. V této bakalářské práci měla litsea hodnotu MIC $128 \mu\text{g/ml}$ a hodnotu MBC $256 \mu\text{g/ml}$. Mrkev měla hodnotu MIC $256 \mu\text{g/ml}$ a hodnotu MBC $512 \mu\text{g/ml}$. Výsledky z článku se tak téměř shodují s touto prací. Fuseelli et al. (2006) zkoumal hodnoty MIC pomocí bujónové diluční metody na Mueller Hinton mediu a hodnoty MBC na MYPGP tuhém mediu na Petriho miskách. Zkoumal hodnoty dvou silic, a to tymiánu červeného (*Thymus vulgaris*) a skořice (*Cinnamomum zeylanicum*). Hodnota MIC pro tymián byla $150\text{-}250 \mu\text{g/ml}$ a hodnota MBC $200\text{-}300 \mu\text{g/ml}$, skořice měla hodnotu MIC $50\text{-}150 \mu\text{g/ml}$ a MBC $100\text{-}125 \mu\text{g/ml}$. Mnou zkoumaná hodnota MIC a MBC tymiánu byla $512 \mu\text{g/ml}$ a skořice $64 \mu\text{g/ml}$. Roussanova (2011) hodnotí

rostlinnou silici dobromyslu (*Origanum vulgare*) jako silného inhibitora *P. larvae*.
V mé práci dobromysl řadíme do skupiny silic se slabší účinností na *P. larvae*.

Z výzkumu rostlinných silic lze vyvodit, že silice jsou účinnými inhibitory moru včelího plodu. Jejich použití by mohlo pomoci proti výskytu tohoto onemocnění.

6. Závěr

V teoretické části této práce byla popsána včela medonosná a její význam a ohrožení. Dále byl popsán mor včelího plodu a jeho původce bakterie *P. larvae*, rostlinné silice a jejich antimikrobiální účinky.

Jedním ze stanovených cílů této práce bylo ověření baktericidního vlivu u vybraných rostlinných silic. Tento cíl byl ověřen pomocí stanovení minimální baktericidní koncentrace. Všechny rostlinné silice vykazovaly baktericidní účinky.

Dalším cílem této bakalářské práce bylo stanovení minimální inhibiční a baktericidní koncentrace u vybraných rostlinných silic. Část tohoto cíle, a to minimální inhibiční koncentrace byla stanovena pomocí diluční bujonové metody na 96 jamkových mikrotitračních destičkách a minimální baktericidní koncentrace byla stanovena na Petriho miskách s tuhým MYPGP médiem. Nejnižších hodnot minimální inhibiční koncentrace dosahovaly rostlinné silice česneku kuchyňského a skořice. Hodnoty MBC byly u těchto rostlinných silic obdobné jako u hodnoty MIC. Mezi nejméně účinné z vybraných rostlinných silic řadíme rostlinou silici mrkev setou s nejvyššími hodnotami inhibiční a baktericidní koncentrace. Cíle tedy byly v této bakalářské práci splněny a ověřeny.

Byly stanoveny dvě hypotézy. U první hypotézy se porovnávala inhibiční koncentrace samotné rostlinné silice a průměrná hodnota všech kombinací s danou silicí. První hypotéza byla vyvrácená u saturejky, manuky, tymiánu, mateřídoušky a dobromyslu, kde byla inhibiční koncentrace kombinací silic nižší než u silice samotné. U silice pelargonie, heřmánku, česneku, mrkve, skořice a litsei byla vyšší inhibiční koncentrace než u silic samotných. Tím byla hypotéza u daných silic hypotéza potvrzena.

U druhé hypotézy byly hledány interakce mezi kombinacemi rostlinných silic, přesněji jestli došlo k synergii či adici. Tato hypotéza byla vyhodnocena pomocí indexu frakční inhibiční koncentrace. Ani jedna kombinace rostlinných silic nevykazovala synergické účinky mezi silicemi. A pouze u šesti kombinací silic jsme pozorovali aditivní účinky mezi silicemi. Ostatní kombinace byly buď indiferentní nebo vykazovaly antagonismus mezi silicemi.

7. Seznam literatury

- ALIPPI, A M ; LOPEZ, A C; AGUILAR, O M., 2002 Differentiation of *Paenibacillus* larvae subsp. larvae, the cause of American foulbrood of honey bees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 68(7): 3655-3660. doi:10.1128/AEM.68.7.3655-3660.2002
- AMIRI, E., RUEPPELL, O., TARPY, D.R., ed., 2021. Honey Bee Viral Diseases. In FAUX, C.M., KANE, T.R. *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*. ISBN 978-1-119-58337-0.
- ANSARI, M.J., AL-GHAMDI, A., USMANI, S., AL-WAILI, N., NURU, A., SHARMA, D., KHAN, K.A., KAUR, M. AND OMER, M., 2016. In vitro evaluation of the effects of some plant essential oils on *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1),49-55. doi:10.1080/13102818.2015.1086690
- ANTUNEZ, K; PICCINI, C; CASTRO-SOWINSKI, S; ROSADO, A S; SELDIN, L; ZUNINO, P (2007) Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus* larvae isolates. *Veterinary Microbiology* 124: 178-183. doi:10.1016/j.vetmic.2007.04.012
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M., 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*. 46(2), 446-475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106.
- BASSOLÉ, I.H.N., JULIANI, H.R., 2012. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*. 17(4), 3989-4006. doi:10.3390/molecules17043989 ISSN 1420-3049.
- BAILEY, L., FERNANDO, E.F., STANLEY, B.H., 1973. *Streptococcus faecalis*, *Bacillus alvei*, and sacbrood virus in European foulbrood of honey bee. *J. Invertebr. Pathol.* 22, 450– 453. doi: 10.1016/0022-2011(73)90176-6
- BEIMS, H., BUNK, B., ERLER, S., MOHR, K.I., SPRÖER, C., PRADELLA, S., GÜNTHER, G., ROHDE, M., VON DER OHE, W. AND STEINERT, M., 2020. Discovery of *Paenibacillus* larvae ERIC V: Phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(2), 151394. doi: 10.1016/j.ijmm.2020.151394
- Brown, D.F. and Brown, L., 1991. Evaluation of the E test, a novel method of quantifying antimicrobial activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27(2), 185-190. doi:10.1093/jac/27.2.185

- BURT, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- CHEN, Y.P. AND SIEDE, R., 2007. Honey bee viruses. *Advances in virus research*, 70, 33-80 doi:10.1016/S0065-3527(07)70002-7
- CHEN, Y.J., EVANS, J.D., ed., 2021. Honey Bee Fungal Diseases. In: KANE, T.R., FAUX, C.M. *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*. John Wiley, s. 295-305. ISBN 978-1-119-58337-0.
- CRAMP, D., 2014. *Včelařství: obrazový průvodce: od pořízení včelstev po medobraní: více než 400 návodných fotografií*. 2. vyd. Čestlice: Rebo. ISBN 978-80-255-0831-2.
- CUGNATA, N.M., GUASPARI, E., PELLEGRINI, M.C., FUSELLI, S.R., ALONSO-SALCES, R.M., 2017. Optimal Concentration of Organic Solvents to be Used in the Broth Microdilution Method to Determine the Antimicrobial Activity of Natural Products Against *Paenibacillus* Larvae. *Journal of Apicultural Science*. 61(1), 37–53.: doi:10.1515/jas-2017-0004.
- DE GROOT, A.C. AND SCHMIDT, E., 2016. Essential oils, part III: chemical composition. *Dermatitis*, 27(4),161-169. doi:10.1097/DER.000000000000193
- DE GRAAF, D C., DE VOS, P; HEYNDRIKX, M; VAN TRAPPEN, S; PEIREN, N; JACOBS, F J., 2006) Identification of *Paenibacillus* larvae to the subspecies level: an obstacle for AFB diagnosis. *Journal of Invertebrate Pathology* 91(2): 115-123. doi: 10.1016/j.jip.2005.10.010
- DE GRAAF, D.C., ALIPPI, A.M., ANTÚNEZ, K., ARONSTEIN, K.A., BUDGE, G., DE KOKER, D., DE SMET, L., DINGMAN, D.W., EVANS, J.D., FOSTER, L.J. AND FÜNFHAUS, A., 2013. Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-28. doi:10.3896/IBRA.1.52.1.11
- DELAQUIS, P.J., STANICH, K., GIRARD, B. AND MAZZA, G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International journal of food microbiology*, 74(1-2), 101-109. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00734-6
- DINGMAN, D W; STAHLY, D P., 1983, Medium promoting sporulation of *Bacillus* larvae and metabolism of medium components. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 860–869. doi:10.1128/aem.46.4.860-869.1983
- DJORDJEVIC, S; HO-SHON, M; HORNITZKY, M. A. Z., 1994, DNA restriction endonuclease profiles and typing of geographically diverse isolates of *Bacillus*

- larvae. *Journal of Apicultural Research* 33(2): 95-103. doi: 10.1080/00218839.1994.11100856
- EBELING, J., KNISPEL, H., HERTLEIN, G., FÜNFHAUS, A. AND GENERSCH, E., 2016. Biology of *Paenibacillus* larvae, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(17), 7387-7395. doi: 10.1007/s00253-016-7716-0
- FAUX, C.M., 2021. Honey Bee Anatomy. In: KANE, T.R., FAUX, C.M. *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*. 33-40. ISBN 9781119583417.
- FLESAR, J. et al., 2010. In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus* larvae and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Veterinary Microbiology*. 2010(145), 129–133. doi:10.1016/j.vetmic.2010.03.018.
- FORSGREN, E; STEVANOVIC, J; FRIES, I., 2008, Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus* larvae genotypes. *Veterinary Microbiology* 129: 342-349. doi:10.1016/j.vetmic.2007.12.001
- FÜNFHAUS, A., POPPINGA, L. AND GENERSCH, E., 2013. Identification and characterization of two novel toxins expressed by the lethal honey bee pathogen *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood. *Environmental Microbiology*, 15(11), 2951-2965. doi: 10.1111/1462-2920.12229
- FUSELLI, S.R., SB, G.D.L.R., GENDE, L.B., EGUARAS, M.J. AND FRITZ, R., 2006. Inhibition of *Paenibacillus* larvae employing a mixture of essential oils and thymol. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(2), 89-92.
- GARCIA-GONZALEZ, E. AND GENERSCH, E., 2013. Honey bee larval peritrophic matrix degradation during infection with *Paenibacillus* larvae, the aetiological agent of American foulbrood of honey bees, is a key step in pathogenesis. *Environmental Microbiology*, 15(11), 2894-2901. doi:10.1111/1462-2920.12167
- GENERSCH, E., 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus* larvae. *Institute for Bee Research*, 32. 103, 10-19. doi:10.1016/j.jip.2009.06.015
- GENERSCH, E., FORSGREN, E., PENTIKÄINEN, J., ASHIRALIEVA, A., RAUCH, S., KILWINSKI, J. AND FRIES, I., 2006. Reclassification of *Paenibacillus* larvae subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus* larvae subsp. *larvae* as *Paenibacillus* larvae without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(3).501-511. doi:10.1099/ijs.0.63928-0

- GILLIAM, M., 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS microbiology letters*, 155(1), 1-10. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12678.x
- HANSEN, H. AND BRØDSGAARD, C.J., 1999. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee world*, 80(1), 5-23. doi: 10.1080/0005772X.1999.11099415
- HELLEMANS, J; MORTIER, G; DE PAEPE, A; SPELEMAN, F; VANDESOMPELE, J., 2007 qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19
- HEYNDRICKX, M., VANDEMEULEBROECKE, K., HOSTE, B., JANSSEN, P., KERSTERS, K., DE VOS, P., LOGAN, N.A., ALI, N., BERKELEY, R.C.W., 1996. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White, 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 270-279 doi:10.1099/00207713-46-1-270
- KOWALSKA-KROCHMAL, B. a DUDEK-WICHER, R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens* 2021, 10(2), 165. ISSN 2076-0817. doi:10.3390/pathogens1002016
- KUZYŠINOVÁ, K. et al., 2014. Testing of inhibition activity of essential oils against *Paenibacillus larvae* – the causative agent of American foulbrood. *Acta Veterinaria Brno.* 83(1), 9-12. doi:10.2754/avb201483010009.
- KWONG, W.K. AND MORAN, N.A., 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nature reviews microbiology*, 14(6), 374-384. doi: 10.1038/nrmicro.2016.43
- Mapové výstupy ohnisek nákaz včel a ochranných pásem*, [online]. Státní veterinární správa. 16.1.2023 [cit. 2023-1-16]. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/mapove-vystupy-ohnisek-nebezpecnych-nakaz-a-ochrannych-pasem/>
- MILBRATH, M., 2021. Honey Bee Bacterial Diseases. In: KANE, T.R., FAUX, C.M. *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner.* 277-293. ISBN 978-1-119-58337-0.
- NAZZARO, F., FRATIANNI, F., DE MARTINO, L., COPPOLA, R. AND DE FEO, V., 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474, doi: 10.3390/ph6121451
- POHL, Friedrich. *Nemoci včel: pro zdravé včely a včelstva*. Překlad Josef HOLEJŠOVSKÝ.: Víkend, 2022. 238 stran. ISBN 978-80-7433-349-1.

- POPPINGA, L. AND GENERSCH, E., 2015. Molecular pathogenesis of American Foulbrood: how *Paenibacillus* larvae kills honey bee larvae. *Current opinion in insect science*, 10, 29-36 doi:10.1016/j.cois.2015.04.013
- PENNSYLVANIA STATE UNIVERSITY EXTENSION, 2017, A Quick Reference Guide to Honey Bee Parasites, Pests, Predators, and Diseases.[online] Dostupné z: <https://www.extension.psu.edu/a-quick-reference-guide-to-honeybee-parasites-pests-predators-and-diseases>
- RIBIÈRE, M., BALL, B., & AUBERT, M., 2008, Natural history and geographical distribution of honey bee viruses. *Virology and the honey bee*, 15-84.
- SAMMATARO, D., GERSON, U. AND NEEDHAM, G., 2000. Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. *Annual review of entomology*, 45(1), 519-548. doi:10.1146/annurev.ento.45.1.519
- TENDENCIA, E., 2004. Disk diffusion method. In Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment (13-29). *Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center* ISBN 9718511741
- TITĚRA, D., 2017. *Včely zdravé a nemocné*. Praha: Nakladatelství Brázda. ISBN 978-80-209-0420-1.
- TITĚRA, D., KAMLER, M., ERBAN, T., HUBERT, J., 2009, *MOR VČELÍHO PLODU: Diagnostika, prevence a tlumení*. Výzkumný ústav včelařský, s. r. o., ISBN 978-80-87196-39-7.
- VANDESOMPELE, J; DE PRETER, K; PATTYN, F; POPPE, B; VAN ROY, N; DE PAEPE, A; SPELEMAN, F., 2002, Accurate normalization of realtime quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3(7): 0034.1. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Výskyt hniloby včelího plodu v jednotlivých okresech ČR v roce 2021*, [online]. Státní veterinární správa. 2021 [cit. 2023-1-11]. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/vcely-hniloba-vceliho-plodu/>
- WHITE, G.F., 1917. *Sacbrood* (No. 431). US Department of Agriculture.
- WIEGAND, I., HILPERT, K., HANCOCK, R.E.W., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocol*. 3(2), 163–175. doi:10.1038/nprot.2007.521.
- WIŃSKA, K., MAĆZKA, W., ŁYCZKO, J., GRABARCZYK, M., CZUBASZEK, A. AND SZUMNY, A., 2019. Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative?. *Molecules*, 24(11), 2130. doi: 10.3390/molecules24112130

WU, X Y; CHIN, J; GHALAYINI, A; HORNITZKY, M A Z., 2005, Pulsedfield gel electrophoresis typing and oxytetracycline sensitivity of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* isolates of Australian origin and those recovered from honey imported from Argentina. *Journal of Apicultural Research* 44: 87-92. doi:10.1080/00218839.2005.11101155

Zákon o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon), 1999. In: ročník 1999, číslo 166.

8. Seznam tabulek

| | |
|--|----|
| Tabulka 1 Přehled virových onemocnění včely medonosné | 11 |
| Tabulka 2 Přehled onemocnění včely medonosné způsobené houbami | 14 |
| Tabulka 3 Přehled parazitů včely medonosné | 15 |
| Tabulka 4 Seznam vybraných rostlinných silic a jejich zkratky | 27 |
| Tabulka 5 Povahy interakcí | 34 |

9. Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obrázek 1 Mapa výskytu hniloby včelího plodu v roce 2021 | 13 |
| Obrázek 2 Mnohovstevné obaly spory <i>P. larvae</i> | 18 |
| Obrázek 3 Mapové výstupy ohnisek nákaz včel ke dni 16.1.2023 | 19 |
| Obrázek 4 Mapové výstupy ochranných pásem ke dni 16.1.2023 | 20 |
| Obrázek 5 Mikrotitrační destička | 30 |
| Obrázek 6 Schématické rozložení mikrotitrační destičky | 31 |
| Obrázek 7 Kultura <i>P. larvae</i> | 31 |
| Obrázek 8 Schéma jamek mikrotitrační destičky | 33 |
| Obrázek 9 Schéma Petriho misky na stanovení MBC s nárůstem v poli č.2..... | 35 |
| Obrázek 10 Petriho miska na stanovení MBC | 35 |
| Obrázek 11 Graf hodnot rostlinné silice saturejky horské..... | 36 |
| Obrázek 12 Graf hodnot rostlinné silice pelargonie | 37 |
| Obrázek 13 Graf hodnot rostlinné silice heřmánku modrého..... | 37 |
| Obrázek 14 Graf hodnot rostlinné silice manuky | 38 |
| Obrázek 15 Graf hodnot rostlinné silice česneku kuchyňského | 38 |
| Obrázek 16 Graf hodnot rostlinné silice mrkve seté..... | 39 |
| Obrázek 17 Graf hodnot rostlinné silice skořice | 40 |
| Obrázek 18 Graf hodnot rostlinné silice litsea cubeba | 40 |
| Obrázek 19 Graf hodnot rostlinné silice tymiánu červeného | 41 |
| Obrázek 20 Graf hodnot rostlinné silice mateřídoušky | 42 |
| Obrázek 21 Graf hodnot rostlinné silice dobromyslu | 42 |

10. Seznam použitých zkratek

| | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| ABPV | virus akutní paralýzy včel |
| ATP | adenosintrifosfát |
| BQCV | virus černání matečnicků |
| CBPV | virus chronické paralýzy včel |
| CCM | Czech collection of microorganisms |
| ČES | česnek kuchyňský |
| ČR | Česká republika |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| DOB | dobromysl |
| DWV | virus deformovaných křídel |
| FIC | frakční inhibiční koncentrace |
| HM | heřmánek modrý |
| K ₂ HPO ₄ | hydrogenfosforečnan didraselný |
| KBV | Kashmir bee virus |
| LIT | litsea cubeba |
| LT | latentní čas |
| MAN | manuka |
| MAT | mateřídouška |
| MBC | minimální baktericidní koncentrace |
| McF | McFarland |
| MIC | minimální inhibiční koncentrace |

| | |
|---------|--|
| MRK | mrkev setá |
| NT | normalizační faktor |
| OTC | oxytetracyklin-hydrochlorid |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| PLG | pelargonie |
| qRT-PCR | polymerázová řetězová reakce s reverzní transkriptázou |
| repPCR | polymerázová řetězová reakce s repetitivními prvky |
| SAT | saturejka horská |
| SBV | virus pytlíčkovitosti včelího plodu |
| SKO | skořice |
| TYM | tymián červený |