

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zoologie a rybářství**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Laboratorní test biocidního účinku směsí esenciálních olejů ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) na klíště obecné (*Ixodes ricinus*)**

**Bakalářská práce**

**Anežka Stratílková  
Živočišná produkce**

**Ing. Martin Kulma, Ph.D.**

© 2021 ČZU v Praze

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Laboratorní test biocidního účinku směsí esenciálních olejů ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) na klíště obecné (*Ixodes ricinus*)" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu své práce Ing. Martinu Kulmovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost a velkou pomoc při psaní této práci a zodpovídání dotazů. Dále bych poděkovala Ing. Terezii Bubové, Ph.D. a Kateřině Imrichové za pomoc a vedení při provádění pokusů v laboratořích a za cenné rady. Velké poděkování také patří především mojí mamince, panu Hodnému a mému partnerovi za velkou podporu a pomoc.

# Laboratorní test biocidního účinku směsí esenciálních olejů ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) na klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

## Souhrn

Cílem této práce bylo zhodnocení biocidního účinku binárních směsí esenciálních olejů z *Picea abies* a *Salvia officinalis* proti samicím *Ixodes ricinus*. Výsledky byly porovnávány s biocidním účinkem zjištěným pro jednotlivě použité oleje tak, aby bylo možné posoudit aditivní či synergický efekt. Směsi esenciálních olejů byly testovány v koncentracích 0,25 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 4 %, 8 % a 12 % a v poměrech 1:1, 1:2, 2:1. Na základě provedeného laboratorního testu, při kterém byly samice klíštěte ponořeny na dvě vteřiny do vodného roztoku výše jmenovaných esenciálních olejů s 2 % Tweenu, bylo zjištěno, že všechny zkoumané směsi esenciálních olejů vykazují akaricidní účinek proti klíšťatům.

Tato studie také potvrdila, že testované binární směsi vykazují statisticky významně vyšší účinnost ve vyšších koncentracích. Z porovnání jednotlivých výsledků lze konstatovat, že směsi esenciálních olejů měly vždy vyšší účinnost než samotný olej ze smrku obecného. Na základě statistického vyhodnocení nebyl potvrzen významný vliv typu repelentu na účinnost. Synergický efekt směsí olejů tedy nebyl prokázán. Nejvyšší mortality bylo dosaženo u směsi s oleji ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 1:2, kdy  $LC_{99} = 3,64$  %.

Vzhledem k tomu, že oba esenciální oleje, které byly při testu použity, jsou dobře dostupné a smrkový olej lze navíc získat jako vedlejší produkt dřevozpracujícího průmyslu, jsou směsi těchto olejů použitelné jako ekonomická a snadno vyrobitelná alternativa pesticidů, které jsou běžně proti klíšťatům používány. Použitím těchto směsí v kombinacím s dalšími biocidy je možné docílit eradikace cílových organismů při snížení negativního vlivu působení těchto přípravků na životní prostředí a také předejít vzniku rezistence členovců na účinné látky.

**Klíčová slova:** biocidy, test biologické účinnosti, management, Ixodida

# **Evaluation of acaricidal effect of spruce (*Picea abies*) and sage (*Salvia officinalis*) essential oils against sheep tick (*Ixodes ricinus*)**

## **Summary**

This thesis aimed to evaluate the biocidal effectivity of binary mixtures of essential oils from *Picea abies* and *Salvia officinalis* against female sheep ticks (*Ixodes ricinus*). The results were compared with the effects of the essential oils used alone, in order to investigate the additive or synergistic effect. The essential oil mixtures were used in concentrations of 0.25 %, 0.5 %, 1 %, 2 %, 4 %, 8 % and 12 % and in ratios of 1:1, 1:2 and 2:1. The laboratory immersion test, consisting of dipping the female sheep ticks into aqueous solutions of the above-mentioned concentrations of essential oils and 2 % Tween for two seconds, proved the acaricidal effect for all the studied mixtures.

This experiment also revealed that higher concentrations of the oils and their binary mixtures had significantly higher efficacy. Furthermore, it was determined that all of the tested mixtures had higher acaricidal effect than *P. abies* oil. However, the differences among the oils and their binary mixtures were not significant. Therefore, the synergistic effect of the oil mixtures was not confirmed. Among the tested mixtures, the highest mortality was reached with the mixture containing oils from *P. abies* and *S. officinalis* in a ratio of 1:2, where the LC99 = 3.64 %.

Both oils used in the test are readily available, and the *P. abies* is additionally a side product of the wood-processing industry. The mixtures of these oils can thus be used as economically available and easily accessible alternatives to the currently used pesticides against sheep ticks. The combined use of the studied oils with other biocides can achieve the eradication of the target organisms while limiting the negative effect on the environment as well as avoiding the development of resistance to the active substances.

**Keywords:** biocides, test of biological activity, management, Ixodida

# Obsah

1.	Úvod.....	7
2.	Vědecká hypotéza a cíle práce .....	8
3.	Literární rešerše.....	9
3.2.	Členovci – charakteristika .....	9
3.3.	Řád Ixodida.....	9
3.4.	Výskyt klíštěte obecného .....	10
3.5.	Morfologie klíštěte obecného .....	11
3.6.	Vývojový cyklus a rozmnožování .....	14
3.7.	Onemocnění přenášené klíšťaty .....	15
3.8.	Ochrana proti parazitickým členovcům.....	16
3.9.	Biocidy.....	17
3.9.1.	Akaricidy.....	18
3.9.2.	Biopesticidy .....	18
3.10.	Esenciální oleje.....	19
3.10.1.	Synergický efekt .....	20
3.10.2.	Enkapsulace .....	20
4.	Metodika .....	22
4.1.	Lokalita pro odchyt klíšťat .....	22
4.2.	Klíšťata .....	22
4.3.	Biocidy.....	23
4.4.	Laboratorní test biocidní účinnosti .....	23
5.	Výsledky .....	25
5.1.	Statistické vyhodnocení pokusů .....	25
5.2.	Chemické složení esenciálních olejů a jejich směsí .....	28
6.	Diskuze .....	30
7.	Závěr .....	32
8.	Seznam literatury .....	33
8.1.	Elektronické zdroje.....	37
9.	Příloha 1 – Výsledky experimentálního stanovení účinnosti esenciálních olejů a jejich směsí.....	38

# 1. Úvod

Klíšťata jsou řazena mezi jedny z nejvýznamnějších a nejnámějších ektoparazitických roztočů. Nechvalně známá jsou především jako přenašeči patogenů, které následně mohou u lidí a zvířat vyvolat závažná onemocnění. V případě hospodářských zvířat chovaných na produkci mohou tato onemocnění představovat i velké ekonomické ztráty.

Přestože je v České republice zaznamenán výskyt 13 druhů klíšťat, klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je naprosto dominantním druhem, přičemž dle odhadů patří do tohoto druhu přes 90 % českých klíšťat. Klíště obecné je vektorem bakteriálních, virových i parazitárních onemocnění. Mezi nemoci přenášené klíšťaty se řadí například: klíšťová encefalitida, lymeská borelióza, babezióza, anaplazmóza a tularémie. Proto je velice důležité se před tímto roztočem chránit. Jako prevenci proti klíšťové encefalitidě lze využít očkování. Nicméně i tak je velice důležitá ochrana a prevence před napadením tímto ektoparazitem. Mezi nejběžnější způsoby v rámci těchto opatření patří používání akaricidů a repelentů.

Tato práce se zaměřuje na akaricidy, třídu biocidních přípravků. Akaricidy jsou látky nebo směsi, které jsou určeny k hubení škůdců ze skupiny roztočů. Biocidní účinek přípravku zajišťují účinné látky chemického či přírodního původu, které působí proti cílovým organismům letálně. Syntetické akaricidy představují zátěž pro životní prostředí a jejich opakovaná aplikace může vést k rezistenci. Z tohoto důvodu se na začátku 21. století stal velice žádaným výzkum v oblasti alternativních biocidů, které by byly dostupné, šetrné k životnímu prostředí a zároveň účinné proti cílovým organismům.

Za jednu z těchto alternativ jsou považovány esenciální oleje, tedy sekundární metabolity aromatických rostlin, které obsahují látky, jež jsou pro členovce toxické. Zjištění biocidního účinku esenciálních olejů, které jsou cenově dostupné, je tedy klíčem k nastavení účinného a dlouhodobě udržitelného managementu hubení škůdců.

Ve své práci jsem zkoumala účinky esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské. Obě rostliny, ze kterých testované esenciální oleje pochází, jsou v České republice velmi dobře dostupné. Smrkový olej lze navíc získat jako vedlejší produkt při zpracování dřeva. Účinnost těchto esenciálních olejů proti jiným druhům členovců byla prokázána již dříve, proto existuje reálný předpoklad, že budou funkční i proti klíšťatům. Je také známo, že účinek některých esenciálních olejů lze vylepšit různými způsoby, včetně jejich smíchání za účelem dosažení aditivního či synergického efektu. Cílem této práce bylo provést laboratorní testy biocidního účinku binárních směsí esenciálních olejů ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti klíštěti obecnému (*Ixodes ricinus*).

## **2. Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem práce je vyhodnotit biocidní účinek směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské proti samicím klíštěte obecného. Výsledky budou porovnávány s biocidním účinkem zjištěným pro jednotlivě použité oleje tak, aby bylo možné posoudit jejich synergický efekt.

Vědecká hypotéza: směs esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské má akaricidní účinek. Smícháním esenciálních olejů dosáhneme zvýšení akaricidního účinku proti samicím klíštěte obecného.



### 3. Literární rešerše

#### 3.1. Taxonomické zařazení *Ixodes ricinus*

Říše:	Animalia
Kmen:	Arthropoda
Třída:	Arachnida
Infratřída:	Acarina
Řád:	Ixodida
Podřád:	Ixodina
Čeleď:	Ixodidae
Rod:	<i>Ixode</i>
Podrod:	<i>Ixodes</i>
Druh:	<i>Ixodes ricinus</i>

(Linné, 1758)

#### 3.2. Členovci – charakteristika

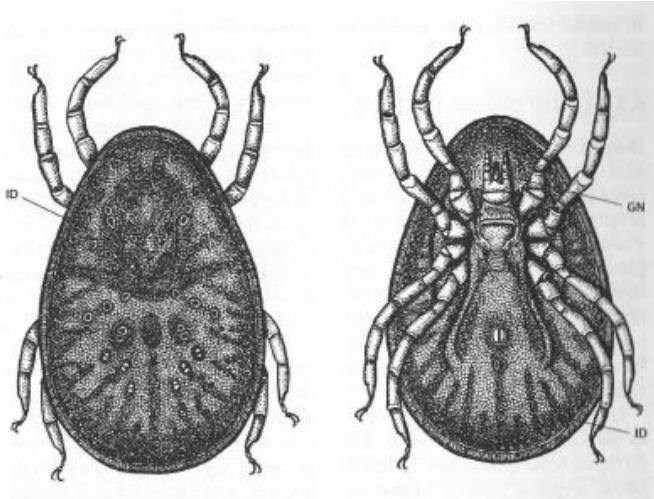
Členovci tvoří nejpočetnější skupinu živočichů na Zemi. Do této skupiny patří více než 80 % všech mnohobuněčných organismů. Část z nich přešla na cizopasný způsob života a představuje závažný problém z hlediska veterinární i humánní medicíny (Volf & Horák 2007). Z tohoto pohledu patří klíšťata mezi nejvýznamnější členovce a také krev-sající ektoparazity lidí, domestikovaných i divoce žijících zvířat. Přenášejí různá onemocnění, která mnohdy končí i smrtí nebo úhynem (Anderson & Magnarelli 2008). Z pohledu chovu hospodářských zvířat způsobuje aktivita těchto členovců výrazné ekonomické ztráty (Volf & Horák 2007).

Mezi nejčastější onemocnění přenášená klíšťaty se řadí: lymeská borelióza, klíšťová encefalitida, tularémie či babezióza (Anderson & Magnarelli 2008).

#### 3.3. Řád Ixodida

V řádu Ixodida jsou rozlišovány dvě velké a druhově početné skupiny: klíšťata a klíšťáci. Až na výjimky sají krev všechna vývojová stádia, a proto se představitelé tohoto řádu zařazují mezi obligatorní ektoparazity, tedy parazity zcela odkázané na parazitický způsob života (Volf & Horák 2007).

Jak lze vidět na Obrázku 1, tělní pokryv klíšťáků je kožovitý a na hřbetní straně těla se nenachází tvrdý štítek, který je typický pro klíšťata (Volf & Horák 2007). Rozdíl mezi klíšťaty („hard-ticks“) a klíšťáky („soft-ticks“) není pouze ve stavbě těla. Liší se také ve způsobu sání krve. Klíšťáci začínají sát krev, jakmile se přisají na svého hostitele. Do vzniklé rány nevypouští látku zvanou „cement“, která klíšťatům napomáhá k lepšímu přisátí se na kůži. Klíšťákům stačí k požití krve 35 – 70 minut (Anderson & Magnarelli 2008). Klíšťáci často obývají hnízda svých hostitelů a jejich krev sají pravidelně (Volf & Horák 2007). Po každém sání krve nakladou několik snůšek vajíček. U klíšťat se doba sání na hostiteli pohybuje v rozmezí několika dnů (Anderson & Magnarelli 2008).



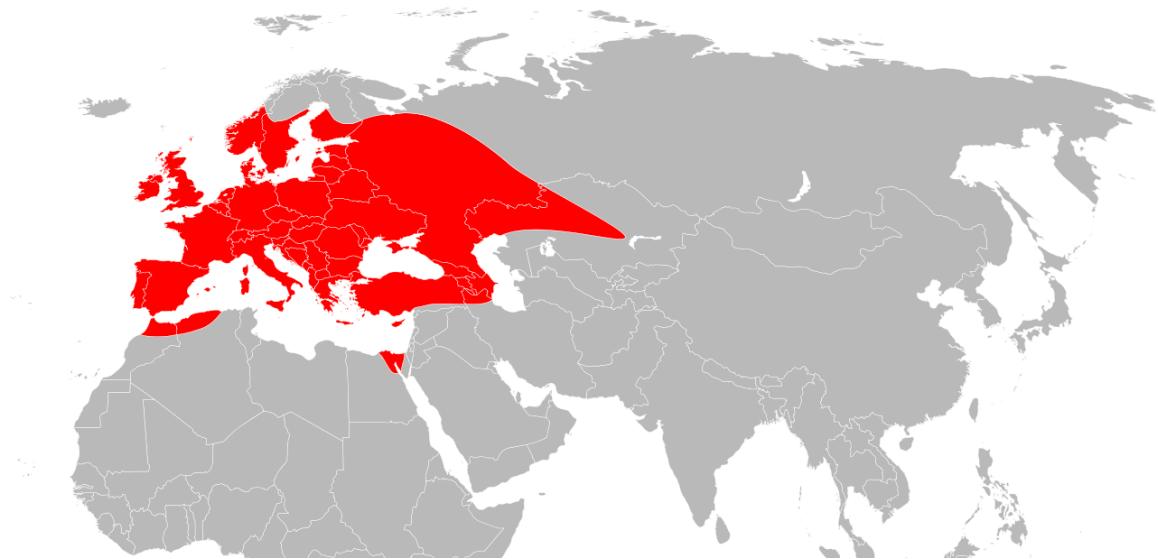
Obrázek 1: Klíšťák holubí (Rosický, 1979)

### 3.4. Výskyt klíšťete obecného

V čeledi Ixodidae je známo přibližně 650 druhů klíšťat. Larvy i nymfy sají krev hlodavců, ptáků a ještěrek, dospělé samice si vybírají jako své hostitele spíše velkou lesní zvěř, kopytníky ale i psy. Nejvýznamnějším a nejčastějším českým druhem je klíšťe obecné (*Ixodes ricinus*). Mezi další druhy, se kterými se lze na území České republiky setkat, patří například piják luční (*Dermacentor reticulatus*) a klíšť lužní (*Heamaphysalis concinna*) (Volf & Horák 2007).

Na území České republiky se klíšťata vyskytují především v nížinách i v pahorkatinách. Nejvíce se klíšťatům daří v listnatých a smíšených lesích s křovinatým podrostem. Ve vyšších nadmořských výškách se objevují méně (Volf & Horák 2007). První klíšťata lze zpozorovat na začátku jara, když se začíná oteplovat. Nejhojněji se klíšťata vyskytují od května do června, kdy jsou také nejaktivnější. Nepříznivým obdobím je léto, protože začínají být vysoké teploty a vzduch ztrácí vlhkost (Randolph & Storey 1999). V tomto období hrozí klíšťatům smrt dehydratací a také ztrácí své energetické zásoby. Larvy začínají upadat do stavu strnulosti, ukrývají se pod nízkou vegetací, ve které se udržuje vlhkost a téměř přestávají vyhledávat hostitele (Subak 2003). Samice jsou vůči ztrátě vlhkosti nejodolnější a číhají na hostitele na vegetaci až do výšky jednoho metru (Kimming et al. 2003). Sezóna klíšťat trvá přibližně 210 – 240 dní (Rosický et al. 1979).

Klišťata jsou velmi přizpůsobivá, dokáží přežít v mírných, tropických i subarktických podmínkách. (Anderson & Magnarelli 2008) Ve světě se *Ixodes ricinus* vyskytuje v oblastech Austrálie, Asie, jižní i severní Afriky (Alžírsko, Tunis). Klíšťata se vyskytují v celé střední, západní, jižní, východní, a dokonce i severní Evropě. Na severu Evropy je to Skandinávie. Na východu Evropy se vyskytují v Arménii, Gruzii, Azerbájdžánu, Turecku a severním Íránu, viz Obrázek 2. Naopak v Severní Americe nebyl do dnešní doby zjištěn výskyt tohoto druhu (Rosický et al. 1979, Ghost et al. 2017).



Obrázek 2: Výskyt klíštěte obecného v Evropě (Zdroj: [wikipedia.org/wiki/Soubor:Ixodes\\_ricinus\\_range\\_map.svg](http://wikipedia.org/wiki/Soubor:Ixodes_ricinus_range_map.svg))

### 3.5. Morfologie klíštěte obecného

Klíšťata mají několik morfologických rysů a fyziologických mechanismů, které usnadňují výběr hostitele, požití krve, přežití a reprodukci (Anderson & Magnarelli 2008).

Jak lze vidět na Obrázku 3, velikost samičky klíštěte obecného se pohybuje okolo 3,5 – 4,5 mm, po nasátí může však dosahovat okolo 1 cm. Samci jsou menší, dosahují 2,2 – 2,5 mm. Velikost hnědých nymf je okolo 1 mm a průhledné larvy klíštěte měří zhruba 0,8 mm. Další rozdíl mezi samcem a samicí je také v barvě těla. Samice je zbarvená do červena, po nasátí se barva změní na šedivou. Samci jsou zbarveni tmavě (Anderson & Magnarelli 2008). Téměř celé tělo samců je pokryto tmavým štítkem. U samic tento štítek kryje pouze třetinu až polovinu těla. Díky tomu je tělo samice po nasátí krve schopno několikanásobně zvětšit svůj objem. Samice si takto zajistí dostatečný příjem potravy (Volf & Horák 2007).



Obrázek 3: Pohlavní dimorfismus *Ixodes ricinus*  
(Zdroj: [www.scalibor.cz/Parazite/KlisteObecne](http://www.scalibor.cz/Parazite/KlisteObecne))

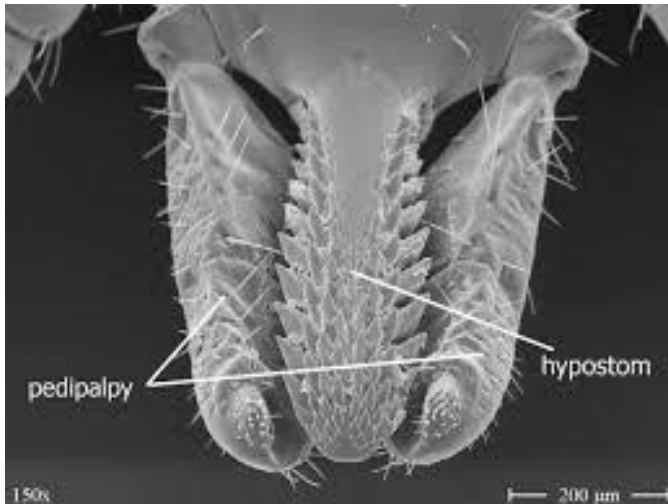


Obrázek 4: Porovnání nasáté a nenasáté samice *Ixodes ricinus*, (Zdroj: <https://abecedazahrady.dama.cz/clanek/klistata-jsou-nejaktivnejsi-prave-ted-jak-se-branit>)

Tělo klíšťat je složeno ze dvou hlavních částí: přední části - gnathosoma, zadní části - idiosoma a článkovaných kráčivých končetin (Volf & Horák 2007). Dospělí jedinci a nymfy mají osm kráčivých končetin, které se skládají ze šesti článků. Larvální stádium má pouze tři páry končetin (Anderson & Magnarelli 2008). Končetiny jsou připojeny k přední části zadečku (Sonenshine & Roe 2014).

Hlavová část je terminálně umístěna a velice dobře viditelná (Rosický et al. 1979). Na hlavové části se nachází makadla (pedipalpy) a klepítka (chelicery), které bývají u některých parazitů přeměněna na specializované útvary sloužící k sání krve hostitele (Volf & Horák 2007). Chelicery jsou opatřeny háčky a během přichycení klíštěte nařznou tkáň hostitele (Nicholson et al. 2020). Jak lze vidět na Obrázku 5, ústní ústrojí klíšťat se skládá z hypostomu (chobotku) opatřeného malými zoubky, které slouží k ukotvení v tkáni hostitele (Smrž 2015). I stavba hypostomu se mezi pohlavími opět liší. Chobotek samice pokrývá velké množství zoubků, které napomáhají při parazitování na hostiteli (Volf & Horák 2007). Pomocí chelicery, které se roztáhnou do tvaru písmene V, je chobotek ukotven v tkáni hostitele a následně slouží k příjmu potravy a k výměně tekutin mezi parazitem a hostitelem (Richter et al. 2013). Chobotek se zpětnými zoubky samici tedy slouží k průniku do pokožky hostitele, fixaci v tkáni a následnému sání krve (Votýpka et al. 2018).

Na hypostomu samce se nachází jen několik velkých zubů – samci klíštěte obecného krev nesají. Chobotek je využíván pouze při specifické formě rozmnožování: traumatické inseminaci (Volf & Horák 2007). Mezi hypostomem a chelicerami se nachází slinné žlázy (Roháčová 2006). Na hlavové části se také nacházejí palpy, které se skládají ze čtyř segmentů a kryjí křehké části ústního ústrojí (Anderson & Magnarelli 2008).



Obrázek 5: Hypostom a ústní ústrojí klíštěte obecného (Zdroj: Mikešková 2016)

Na přední části idosomy se nachází první pár končetin-makadla (Ghost et al. 2017). U rodu *Ixodes* chybí oči. Vyzdvižené a doširoka roztažené přední páry nohou, na kterých je umístěn další velmi důležitý Hallerův orgán, umožňující klíšťatům orientaci (Volf & Horák 2007). Tento čichový orgán se smyslovými brvami napomáhá klíštěti detekovat přítomnost hostitele. Pomocí Hallerova orgánu jedinec vnímá teplo, proudění vzduchu, CO<sub>2</sub> a další chemické sloučeniny (Volf & Horák 2007). Právě tímto orgánem je klíště schopno rozeznat přítomnost repelentu či biocidu na kůži hostitele (Tripathi et al. 2009). Po nalezení vhodného hostitele a kontaktu s ním se klíšťata nepřisají ihned. Díky senzorickým orgánům na palpách vyhledají nejvhodnější místo, na které se poté přisají (Volf & Horák 2007). Na Obrázku 6 lze vidět samici klíštěte obecného, která číhá na hostitele.



Obrázek 6: Samice *Ixodes ricinus* číhající na hostitele ([stop.p13.cz/cs/zari-2019/nejvetsi-prazdninova-hrozba-kliste-obecne-ixodes-ricinus/14252/](http://stop.p13.cz/cs/zari-2019/nejvetsi-prazdninova-hrozba-kliste-obecne-ixodes-ricinus/14252/))

Pohlavní otvor se nachází v přední části břišní strany. U larev a nymf je tento otvor skrytý a uzavřený. U dospělých jedinců je otevřený (Anderson & Magnarelli 2008).

### 3.6. Vývojový cyklus a rozmnožování

Vývojový cyklus probíhá přes různá vývojová stádia: larva-nymfa-dospělec (Obrázek 7). Z vajíčka se vylíhnou šestnohé larvy, ze kterých se po nasátí stávají osminohé nymfy (Kimming 2003). Nasaté nymfy se po odpadnutí ze svého hostitele mění v pohlavně zralého dospělce (Anděra 2003). Po dostatečném požití krve několikanásobně zvětšené samice odpaďávají z hostitele a vyčkávají, až jim nasátá potrava umožní v jejich těle tvorbu vajíček, která následně nakladou (Votýpka et al. 2018). V jedné snůšce je samice schopna naklást až 5 000 vajíček (Hubálek & Rudolf 2007). Nejvhodnější místo pro snůšku je vlhká půda nebo napadané listy (Sonenshine et al. 2002). Po naklazení vajíček samice zahynou (Votýpka et al. 2018).

Přestože samci krev nesají, lze se s nimi na těle hostitele setkat. Právě zde totiž velmi často dochází ke kopulaci se samicí, neboť je tělo hostitele vhodné místo pro setkání obou jedinců. K rozmnožování samci využívají hypostom, do kterého nasají vlastní pohlavní buňky a následně ho zanoří do pohlavního otvoru samice (Volf & Horák 2007).

Celý vývojový cyklus klíštěte obecného trvá zpravidla tři roky, každé stádium potřebuje ke svému vývoji zhruba jeden rok (Volf & Horák 2007). Rozmnožování klíšťat je ovlivněno teplotou, délkou dne a také tím, jaké množství krve samice nasála. Po celý svůj život se klíšťata živí výhradně krví svých hostitelů. Krev je velice energetická strava obsahující velké množství bílkovin, právě proto umožňuje klíšťatům absolvovat celý vývojový cyklus (Votýpka et al. 2018). Sání krve je tedy nezbytné k tomu, aby klíště přežilo a úspěšně absolvovalo celý vývojový cyklus a následně k tomu, aby byly samice schopné naklást vajíčka (Anderson & Magnarelli 2008).

*Ixodes ricinus* je tedy typickým zástupcem troj-hostitelského cyklu, kdy každé vývojové stádium cizopasí na jiném hostiteli, přičemž na člověku může sát krev kterékoliv vývojové stádium (Volf & Horák 2007).

Jsou však známy i druhy klíšťat s jedno či dvou-hostitelským životním cyklem. (Volf & Horák 2007). *Boophilus calcaratus* je zástupce jedno-hostitelského cyklu – larvy, nymfy i samice sají pouze na jednom hostiteli (dobytek). V případě dvou-hostitelského cyklu odpaďnou nasaté nymfy ze svého hostitele a dospělé samice si hledají nového hostitele (Rosický & Weiser 1952). Střídání hostitelů má epizootologický a epidemiologický význam (Hubálek & Rudolf 2007).

Mezi nejvýznamnější přenašeče onemocnění patří dvou-hostitelská a troj-hostitelská klíšťata. Nebývají původcem onemocnění nijak zasažena, mohou se nadále vyvíjet a zůstat infikována (Hubálek & Rudolf 2007).



Obrázek 7: Rozdíly mezi jednotlivými vývojovými stádii *Ixodes ricinus* ([www.fnbrno.cz/klistova-encefalitida-muze-byt-smrtici-ockovani-lze-vrele-doporucit/t5449](http://www.fnbrno.cz/klistova-encefalitida-muze-byt-smrtici-ockovani-lze-vrele-doporucit/t5449))

### 3.7. Onemocnění přenášené klíšťaty

Z celkových 899 druhů klíšťat přenáší nebezpečné patogeny na člověka pouze 10 % (Matějovská 2007). Ačkoliv v tropických oblastech mohou klíšťata způsobovat škody na dobytku pouhým sáním krve, v Evropě jsou tyto ektoparazité nebezpeční především tím, že přenášejí patogeny z předešlých rezervoárových hostitelů (Votýpka et al. 2018, Anderson & Magnarelli 2008).

Do hostitele klíšťata přenášejí patogeny pomocí slin. Sliny klíštěte obecně obsahují antikoagulační a protizánětlivé látky. Tím zabrání srážení krve a vytvoření imunitní reakce v místě sání. Látky obsažené ve slinách klíštěte také potlačují činnost B a T lymfocytů. Právě tyto buňky jsou zodpovědné za produkci specifických protilátek, které vyvolávají zánětlivou reakci, v místě, kde je klíště přisáté. Tento mechanismus zajišťuje, že si hostitel přisátého klíštěte všimne jen málokdy (Votýpka et al. 2018). Ve většině případů jsou kousnutí od klíšťat bezbolestná. Po přisátí na hostitele vyloučí klíště do rány také látku, která je tvořena proteiny a následně ztvrdne. Tato látka se nazývá „cement“ a napomáhá k ukotvení v pokožce hostitele (Anderson & Magnarelli 2008).

Mezi onemocnění virového původu se řadí především klíšťová encefalitida (Rosický et al. 1979). Touto nemocí je v Evropě ročně infikováno 5 000 – 12 000 lidí (European Centre for Disease Prevention and Control Annual Report 2014). V Evropě je nejvýznamnějším vektorem této nemoci *Ixodes ricinus* (Bestehorn et al. 2018). Členovci mohou přenášet do svého hostitele patogen pomocí dvou způsobů: biologickým, nebo mechanickým přenosem. Klíště obecné přenáší do hostitele patogen mechanickým přenosem. Tento přenos je charakteristický tím, že se patogen v *Ixodes ricinus* nemnoží ani nevyvíjí, tím pádem přenašeče nijak neomezuje a neohrožuje (Volf & Horák 2007). Další klíšťaty přenášenou nemocí je lymeská borelióza, kterou bylo v Evropě v roce 2006 infikováno 65 000 lidí (Rizzoli et al. 2011).



Na hospodářských zvířatech parazitují klíšťata různých rodů (*Boophilus*, *Amblyomma*, *Hyalomma* a *Rhipicephalus*), která mohou přenášet anaplazmózu, babeziózu, theiliriózu a mnoho dalších nákaz (Volf & Horák 2007). Klíšťe obecné přenáší babeziózu také na hospodářská zvířata, především na ovce, kozy, koně a hovězí dobytek (Goddard 2000). Babezióza je známa především jako onemocnění zvířat, u lidí je její výskyt vzácný (Krause 2019). Mezi další onemocnění, která přenáší klíšťata na zvířata, patří virus skotské encefalidity ovcí, který napadá i jiná hospodářská zvířata. Projevy tohoto onemocnění jsou horečky, nechutenství, vrávoravá chůze a neurologické poruchy (Kimming 2003). Dalším onemocněním je anaplazmóza, která se vyskytuje u koní a domácích přežvýkavců. U ovcí je toto onemocnění známo jako „Tick-borne-fever“ (TBF). Mezi příznaky patří horečka, omezení výdeje mléka a potraty (Kybicová 2010).

V případě klíšťat, která jsou schopná své hostitele poškodit pouhým sáním, dochází v průběhu sání k vypouštění velmi silných toxinů ve slinách. Tyto toxiny mohou v některých případech vyvolat paralýzy. Paralýzy nejčastěji postihují mláďata hospodářských zvířat, psy a výjimečně i člověka (Volf & Horák 2007). Mohou také negativně ovlivnit mléčnou a masnou produkci a kondici zvířat (Rosický et al. 1979). Klíšťata mnohdy způsobují různé druhy dermatóz a kožních problémů (zánět, bolest a otok) (Van Wye et al. 1991). Důsledkem toho může dojít k poškození kůže zvířat a jejímu znehodnocení (Rosický et al. 1979).



Obrázek 8: *Ixodes ricinus* přisáté na člověku

(Zdroj: <http://bushcraft.cz/medicina/prvni-pomoc/zamysleni-nad-klisťaty/>)

### 3.8. Ochrana proti parazitickým členovcům

Vzhledem k již zmíněným negativním medicínským a veterinárním efektům klíšťat byla vyvinuta řada metod k jejich potlačení (Volf & Horák 2007). Z mnoha onemocnění, které klíšťata přenášejí, existuje účinná vakcína pouze na klíšťovou encefalitidu (Votýpka et al. 2018). Z tohoto důvodu je na místě se před těmito parazity chránit (DeFabbro & Nazzi 2008).

Mezi způsoby ochrany lze také zahrnout omezení návštěv lokalit, kde je pravděpodobný výskyt klíšťat. Po návštěvě lesů a míst, kde se *Ixodes ricinus* vyskytuje hojně, je doporučeno zkontrolovat a případně odstranit přisátá klíšťata (Bissinger & Roe 2010).

Mezi nejvyužívanější a nejefektivnější způsoby prevence před kousnutím od klíšťete patří používání biocidů či repelentů, které se aplikují na oděv nebo kůži (Bissinger & Apperson 2009).



Způsoby boje proti parazitickým členovcům lze obecně rozdělit na mechanické a chemické. Mechanickým bojem se rozumí například likvidace líhnišť, popřípadě likvidace přirozených hostitelů krev-sajících členovců. Chemické metody hubení, které patří mezi nejznámější a nejvyužívanější metody, zahrnují využití repelentů (odpuzují hmyz) a biocidů (usmrkují cílové organismy). Chemické látky je možno aplikovat na místa, kde se škůdci vyskytují, plošně na vegetaci, v podobě bariérových postřiků v blízkosti lidských sídlišť, hospodářských budov nebo přímo na těla hospodářských a domácích zvířat (u zvířat se obvykle používají obojky) (Volf & Horák 2007).

Účinnost syntetických přípravků je v dnešní době ohrožena. Jedním z důvodů je rychle rostoucí rezistence mezi cílovými organismy. Velký význam také hraje vliv těchto chemických přípravků na lidské zdraví a také jejich negativní dopad na životní prostředí (Benelli & Pavela 2018). Například komunální voda je považována za hlavní zdroj emisí biocidů do přejímacího prostředí. Biocidy nelze z vody za použití konvenčních technologií čištění zcela odstranit (Wang-Rong Liu et al. 2017).

Proto je v dnešní době věnována velká pozornost výzkumu přírodních pesticidů a repelentů. Mezi takové látky patří i esenciální oleje, které vykazují vysokou účinnost a mnohočetné mechanismy účinku vůči cílovým organismům. Zároveň nejsou pro spotřebitele příliš toxické (Benelli & Pavela 2018).

### **3.9. Biocidy**

Biocidy jsou definovány jako účinné látky, které se používají k ničení nebo potlačení škodlivých organismů (Wang-Rong Liu et al. 2017). Tyto přípravky jsou založeny na chemicky účinných látkách nebo mikroorganismech (bakteriích a virech) a jsou určeny na likvidaci škodlivých organismů (Rupeš & Ledvinka 2003). Jsou používány na ochranu průmyslových výrobků, zboží, lidí a zvířat. Biocidní přípravky často obsahují stejné účinné látky, jako přípravky, které se používají na ochranu rostlin (pesticidy – tlumí choroby rostlin, hubí plevely a živočišné škůdce). Zatímco jsou tyto přípravky aplikovány pouze v zemědělství, biocidy nachází své využití v mnoha aplikačních oblastech (Ceresena - Biocides Market Report 2017).

Podle způsobu jejich použití lze dle Wang-Rong Liu et al. (2017) biocidy rozdělit do následujících skupin:

- Dezinfekční prostředky (hygienické výrobky)
- Konzervační látky
- Ochrana před škůdci
- Ostatní biocidy (prostředky proti znečištění, výrobky na balzamování a přípravu jatečně upravených těl)

Biocidy lze dle Rupeše & Ledvinky (2003) také rozdělit do jednotlivých skupin podle toho, proti jakým druhům organismů jsou zaměřeny.

- Algicidy (hubení sladkovodních a mořských řas)
- Akaricidy (hubení roztočů a pavouků)
- Baktericidy (ničení bakterií)
- Fungicidy (ničení hub a plísní)

- Herbicidy (hubení plevelů)
- Insekticidy (hubení hmyzu)
- Rodenticidy (hubení hlodavců)
- Viricidy (ničení virů)

Biocidní přípravky obsahují pouze tolik účinných látek, aby byly toxické pouze proti cílovým organismům. Pro uživatele nesmějí být toxické a zdraví ohrožující. Musí být šetrné pro lidi, zvířata a také vůči životnímu prostředí. Z těchto důvodů musí být před používáním a uvedením na trh testovány. V České republice schvaluje používání biocidů Ministerstvo zdravotnictví (Rupeš & Ledvinka 2003).

### 3.9.1. Akaricidy

Na boj s klíšťaty se využívají akaricidní přípravky. Tyto přípravky byly aplikovány přímo na těla hospodářských zvířat. Tento způsob aplikace akaricidů se hojně využíval k ochraně zvířat určených na produkci. Mezi první látku, která byla aplikována na zvířata, patřil roztok arsenu. Tento roztok byl dlouhou dobu účinný, ale postupem času si vůči němu klíšťata vytvořila rezistenci. I z tohoto důvodu byly syntetizovány nové akaricidy. Nejčastěji využívanou skupinou látek jsou v současné době pyrethroidy (např. cyhalothrin, deltamethrin a cypermethrin). Používání akaricidních přípravků přímo na kůži zvířat již dnes není využíváno, protože se některé látky z těchto přípravků mohou následně objevit v mléce, masě nebo kůži a produkt svou přítomností znehodnotí (Dolan et al. 2017).

Mezi další způsoby použití patří obojky a štítky (nastřelují se zvířatům do uší) napuštěné účinnou látkou, která se z nich po dobu několika týdnů až měsíců uvolňuje. V tomto případě je při používání biocidních přípravků pro jeho ochranu nutné dodržovat ochranné lhůty, aby byla zachována zdravotní nezávadnost živočišných produktů (Chroust 2007).

### 3.9.2. Biopesticidy

Biopesticidy jsou ekologickou alternativou k chemickým pesticidům. Jsou velmi účinné, aniž by vážně poškozovaly ekologický řetězec, nebo zhoršily znečištění životního prostředí. Zahrnují širokou škálu mikrobiálních pesticidů, biochemikálií pocházejících z mikroorganismů a jiných přírodních zdrojů (Gupta & Dikshit 2010). Biologické pesticidy nabízejí ekologicky spolehlivé a efektivní řešení problémů se škůdci. Představují menší hrozbu pro životní prostředí a lidské zdraví, často jsou také účinné v malých dávkách a rychle se rozkládají. Nejběžněji používané biopesticidy jsou živé organismy, které jsou patogenní pro cílové škůdce. Patří mezi ně například biofungicidy (*Trichoderma*), bioherbicidy (*Phytophthora*) a bioinsekticidy (*Bacillus thuringiensis*).

Biopesticidy lze rozdělit do tří hlavních skupin (Gupta & Dikshit 2010, Chandler et al. 2011):

- Mikrobiální biopesticidy (aktivní složkou jsou mikroorganismy)
- Rostlinné biopesticidy
- Biochemické pesticidy (sekundární metabolity rostlin, které mají pesticidní účinky, např. pyrethrin)

V současné době tvoří biopesticidy pouze 2,5% podíl na celosvětovém trhu s pesticidy (Damalas & Koutroubas 2018).

### 3.10. Esenciální oleje

Esenciální oleje neboli éterické oleje či silice, jsou používány již od starověkého Říma a Řecka, postupem času se staly nedílnou součástí každodenního života. Esenciální oleje jsou sekundární metabolity rostlin charakterizované silnou vůní (Tripathi et al. 2009). Působí jako ochranné látky rostlin a uvolňují se, pokud je rostlina napadena plísní nebo hmyzem. Jsou to organické sloučeniny složené z terpenů, terpenoidů, uhlovodíků, alkoholů, aldehydů, ketonů a karboxylových kyselin. Esenciální oleje tvoří z 90 % monoterpeny (mentol, alfa, beta pinen, kafr, limonen, humulen, azulen a kyselina abscisová). Složení esenciálních olejů variabilní a je zejména závislé na klimatických podmínkách, ve kterých daná rostlina vyrostla, dále na době sklizně a na části rostliny, ze které byl esenciální olej získán (Swany et al. 2016, Benelli & Pavela 2018), na složení půdy a věku rostlin. Složení závisí také na izolační metodě, která byla pro získání esenciálního oleje zvolena (Tripathi et al. 2009). Esenciální oleje jsou získávány z různých částí rostlin: kořenů, stonků, kůry, listů, květů a semen různých druhů stromů a bylin nejčastěji pomocí destilace či extrakce (Muyima et al. 2002).

Esenciální oleje mají široké spektrum využití, z tohoto důvodu jsou využívány v nejrůznějších odvětvích. Dají se využít v domácnostech, ale i v průmyslu (Flanagan 2011). V současnosti je známo přibližně 3 000 esenciálních olejů a zhruba 300 z nich je komerčně důležitých pro farmaceutický, kosmetický a parfémový průmysl (Tripathi et al. 2009). V potravinářském průmyslu se esenciální oleje používají například k ochucení potravin, v medicíně se pak využívají především z důvodu svých antinociceptivních, antioxidačních, antivirových a antibakteriálních účinků (Flanagan 2011). Dále se také využívají při léčbě nevolnosti a zažívacích potíží a při onemocnění jater (silice z rozmarýnu, máty peprné a heřmánku, detoxikační účinek vykazuje esenciální olej z jalovce) (Barros et al. 2015). Éterické oleje také byly zkoumány pro svou repelentní, larvicidní a adulticidní aktivitu (Tripathi et al. 2009). Dále se esenciální oleje také dají využít k inhalaci, zlepšení respiračních potíží a také v aromaterapii ke zlepšení nálady.

Mezi rostliny a éterické oleje, které vykazují biocidní účinnost vůči krev-sajícím členovcům, se řadí: máta peprná, šalvěj lékařská, meduňka lékařská, smrk ztepilý, eukalyptus (blahovičník), hřebíček, citrónová tráva, skořice, bazalka pravá a levandule lékařská (Bissinger & Roe 2010, Tripathi et al. 2009). Šalvěj lékařská vylučuje esenciální oleje, které se využívají jako přírodní prostředky při léčbě žaludku, dýchacích cest, kašle, fyzické a psychické únavy. V poslední době jsou prováděny studie, zda šalvěj lékařské nepůsobí protinádorově (Alexa et al. 2018). Esenciální olej ze šalvěje lékařské také vykazuje pozoruhodné bakteriostatické a bakteriocidní účinky proti *Bacillus cerus*, *megathrium*..(Mehdizadeh et al. 2016). Esenciální olej ze smrku ztepilého je známý především pro své antibakteriální, protiplísňové antioxidační a cytotoxické účinky (Radulescu et al. 2011). Například esenciální olej ze skořicovníku cejlonského má odpuzující účinek proti komárům. Biopesticidní potenciál proti hmyzu také vykazují éterické oleje rostlin z čeledi hluchavkovité, hvězdnicovité, miříkovité, myrtovité

(Tripathi et al. 2009). Dále se mezi komerčně dostupné esenciální oleje, které vykazují biocidní účinnost proti klíštěti obecnému, řadí oregano, tymián, antalové a cedrové dřevo. Za nejúčinnější esenciální olej byl označen tymiánový. Některé studie se také věnují používání esenciálních olejů jako herbicidů. Tyto herbicidy nepřetrvávají v půdě a mají pouze nízké nebo žádné toxické účinky na savce (Alexa et al. 2018).

Vzhledem k rychlé evaporaci účinných látek esenciální oleje vykazují vysoké účinky, které však odpuzují členovce pouze krátkou dobu po aplikaci. Jejich účinnost zhruba po 80 minutách klesá na minimum (Kulma et al. 2017). Tento problém občas může vyřešit použití vyšších koncentrací esenciálních olejů (Bissinger a Apperson 2009) nebo technologickou úpravou ve fázi vývoje (enkapsulace, mikroemulze apod.) (Benelli & Pavela 2018).

### 3.10.1. Synergický efekt

Synergismus lze popsat jako účinek interakce chemických látek nebo biologických struktur, vedoucích k celkovému účinku, který je vyšší než součet jednotlivých účinků. Tohoto efektu je využíváno například ve farmakologii. Synergický efekt může v lidském organismu vyvolat i nepříznivé účinky. Například pokud lidé užívají barbiturátové léky a kombinují je s alkoholem, analgetiky nebo jinými sedativně-hypnotickými léky, tato kombinace může vést k nepříznivým účinkům na centrální nervovou soustavu (může způsobit například deprese).

Synergický efekt byl také zaznamenán u esenciálních olejů. Zde efekt představuje interakci nebo dynamickou souhru dvou či více komponentů, které vedou k zesílení výsledného efektu olejů. Tento efekt byl také zpozorován při výrobě insekticidů (Wright et al. 2007) a je využíván například v případě pyrethrinu a syntetických pyrethrinů. Jejich toxicita může být zvýšena díky přidání sloučenin, které samy o sobě nejsou insekticidy. Mezi tyto synergenty jsou řazeny: sezamin, sesamuli, piperonylbutoxid a sezam. (Zdroj: <https://www.biologyonline.com/dictionary/synergistic-effect>). Vysoký synergický efekt byl také zjištěn u kombinace kafru s borneolem, která byla toxická pro larvy afrického bavlníkového červa (*Spodoptera littoralis*). Tuto informaci lze využít při vývoji nových botanických insekticidů (Pavela 2014).

### 3.10.2. Enkapsulace

Enkapsulace je způsob zapouzdření aktivních molekul do nosného materiálu, který prospívá konečné aplikaci zapouzdřeného systému. Během tohoto procesu dochází ke stabilizaci aktivních sloučenin v systémech schopných zachovat jejich chemické, fyzikální a biologické vlastnosti. Během enkapsulace se používají dva hlavní termíny: aktivní materiál (materiál, který je potahován) a materiál pláště (nosičový). Techniky zapouzdření lze rozdělit do dvou hlavních kategorií: chemické (koacervace) a mechanické (vytlačování, chlazení).

Metoda enkapsulace nachází své využití v mnoha odvětví:

- Biologie – zapouzdření živé tkáně, hormonů, enzymů, protilátek
- Potravinářský průmysl
- Farmaceutický průmysl
- Zemědělství – enkapsulace pesticidů a hnojiv

Metoda enkapsulace je často využíváno u cenných sloučenin, které jsou získávány z rostlin a bylin, především u esenciálních olejů. Tyto látky jsou využívány například při léčbě různých onemocnění, nebo jako alternativní náhrada k syntetickým konzervačním a aromatickým látkám. Tyto bioaktivní sloučeniny však podléhají rychlé degradaci působením podmínek prostředí, zejména tepla a vlhkosti. Enkapsulace je vhodným způsobem pro zvýšení stability těchto látek (Candler & Hagelin 2015).

Mikroenkapsulace podporuje stabilitu sloučeniny tím, že ji poskytne fyzickou bariéru, díky které zabrání působení faktorů prostředí na zapouzdřenou molekulu. Pro zapouzdření hydrofobní sloučeniny, éterických olejů, nebo monoterpenů, jsou využívány například buněčné stěny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které podporují stabilizaci aktivní sloučeniny a poskytují fyzickou ochranu před oxidací. Tento druh enkapsulace byl proveden například u karvakrolu, což je těkavý monoterpen, který se nachází v některých esenciálních olejích a má prokázaný akaricidní účinek proti klíšťatům *Ixodes scapularis*, *Amblyomma americanum*, *Rhipicephalus sanguineus* a *Rhipicephalus microplus* (klíště, které ohrožuje zdraví skotu především v tropických a subtropických oblastech) (Lima et al. 2017). Díky tomuto zapouzdření byla akaricidní aktivita karvakrolu 2,5krát vyšší, neboť kvasinky podporovaly jeho ochranu a prodlužovaly akaricidní účinnost (Lima et al. 2017).

## 4. Metodika

### 4.1. Lokalita pro odchyt klíšťat

Klíšťata na testování byla sbírána v Kunraticko-michelském lese v Praze, v blízkosti Kunratického potoka (GPS: 50,02N, 14,47E). Sběr klíšťat byl prováděn od dubna do září roku 2020.



Obrázek 9: Vhodná lokalita pro sběr klíšťat, Kunraticko-michelský les (foto: Autorka práce)

### 4.2. Klíšťata

Sběr se nejčastěji konal mezi 6 – 9 hodinou ránní nebo mezi 18 – 20 hodinou večer v závislosti na počasí a teplotách během dne. Na sběr byla využita bílá vlajka o rozměrech 1×1 m, navlečená na dřevěné tyči. Vlajka je vyrobena z fleecového materiálu, na který se klíšťata dobře zachytávají. Bílá barva vlajky napomáhá snadnému rozeznání nachytných klíšťat. Tento způsob sběru se nazývá „vlajkování“. Při tomto způsobu se vlajkou na dřevěné tyči přejíždí po vegetaci, na které se pravděpodobně vyskytují klíšťata.

Klíšťata, která se zachytila na vlajku, byla následně odebrána entomologickou pinzetou a uložena do plastových zkumavek o objemu 15 ml nebo 20 ml s plastovým víčkem. Na víčku této zkumavky bylo okolo šesti malých otvorů, které zajišťovaly přívod vzduchu. Pod víčko byla vložena jemná síťová látka proti hmyzu s rozměry 7 × 7 cm zamezující úniku klíšťat. Během převozu klíšťat do laboratoře bylo do zkumavky přidáno stéblo trávy, aby byla zajištěna dostatečná vlhkost ve zkumavce a předešlo se mortalitě klíšťat následkem vysychání (Obrázek 10). Po převozu do laboratoře byla stébla ze zkumavek odstraněna a zkumavky s klíšťaty byly umístěny do exsikátoru. Exsikátor je dvoudílná tlustostěnná nádoba o průměru 30 cm. Ve spodní části nádoby se nachází perforovaná deska z plastu, pod kterou se vloží Petriho miska s vlhkou vatou, čímž dojde k zajištění potřebné vlhkosti (> 95 %). Zde byla klíšťata uložena až do začátku testování (cca 24 hodin). Exsikátor byl uložen v laboratoři při teplotě 26 ± 1°C, bez speciálního světelného režimu.



Obrázek 10: Nymfy a samice klíštěte obecného připravené na transport do laboratoře (foto: Autorka práce)

### 4.3. Biocidy

Při testování byly používány směsi esenciálních olejů smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) zakoupené od firmy Epam, Praha. Tyto oleje byly testovány v následující koncentrační řadě: 8 %, 4 %, 2 %, 1 %, 0,5 % a 0,25 %. Esenciální oleje také byly používány v těchto poměrech: 1:2 (smrk ztepilý: šalvěji lékařská), 2:1 (smrk ztepilý: šalvěji lékařská) a 1:1 (smrk ztepilý: šalvěj lékařská).

### 4.4. Laboratorní test biocidní účinnosti

#### Příprava

Aby se s klíšťaty během testování lépe manipulovalo a zabránilo se jejich úniku ze zkumavek, byly samice nejdéle hodinu před zahájením pokusu přemístěny do mikrozkušavek typu Falcon 50 ml po 10 klíšťatech. Ve zkumavkách byl připraven vlhký kus vaty, aby zde byla dostatečně vysoká vlhkost. Dále bylo připraveno deset ml vodného roztoku esenciálních olejů smíchaných v poměru 1:1, 1:2 a 2:1 (viz výše) v příslušné koncentraci vždy s 2 % Tweenu 20 (Sigma Aldrich, Praha). Poté byly připraveny kádinky. Jedna kádinka obsahovala testovanou směs éterických olejů a další dvě kádinky destilovanou vodu.

#### Průběh

Máčení samic se provádí dle následujícího postupu. Předem připravené samice byly uchopeny entomologickou pinzetou za zadní část těla a na dvě vteřiny ponořeny do kádinky (V = 50 ml) vodného roztoku esenciálního oleje. Následně byly samice ponechány zhruba 30 sekund na buničině, tak aby došlo k jejich oschnutí. Každý pokus byl proveden na deseti samicích a prováděl se ve třech opakováních. Pro každou binární směs tak bylo celkem provedeno 18 testování. Na provedené testy bylo použito dohromady 540 samic klíštěte obecného. V kontrolní skupině byl test proveden identickým způsobem bez použití olejů (samice byly máčeny ve směsi destilované vody a Tweenu 20).





Obrázek 11: Samice připravené na otestování (foto: Autorka práce)

### **Ukončení**

Následně byly samice umístěny do 5 ml plastových zkumavek, které byly označeny a umístěny zpět do exsikátoru. Zde byla 24 hodin po ukončení pokusu zaznamenána mortalita samic. Za mrtvé byly považovány pouze ty samice, které nejevily žádné známky života a nereagovaly na stimuly v podobě dechu experimentátora. Po ukončení testu byla přeživší klíšťata usmrcena mrazem při  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Statistické vyhodnocení pokusu**

Biocidní účinnost testovaných směsí byla vyjádřena pomocí letálních koncentrací LC50, LC90, LC95 a LC99 za využití statistického software Rstudio (Rstudio, Boston). Porovnání účinnosti pak bylo provedeno analýzou rozptylu ANOVA a Schéffeho post hoc testem ( $\alpha = 0,05$ ) v programu Statistica12 (StatSoft CR, Praha).



## 5. Výsledky

Obě testované binární směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) vykazovaly vůči samicím klíštěte obecného biocidní účinnost, která byla signifikantně ovlivněna jejich koncentrací. U roztoků esenciálních olejů se zvýšila účinnost zvýšením koncentrace. Esenciální oleje vykazovaly v 8% koncentraci vždy 100% mortalitu samic. Výsledky také ukázaly, že směsi esenciálních olejů vykazují vyšší účinnost než samotný olej ze smrku, ale nižší než samostatně testovaný šalvějový olej. Z pohledu smrkového esenciálního oleje se tedy projevil jistý statisticky nevýznamný aditivní účinek. Jednotlivé výsledky jsou uvedeny v příloze 1 (kapitola 9).

Tabulka 1: Koncentrace, účinnosti (E) a směrodatné odchylky (SD) u jednotlivých esenciálních olejů (EO) ze smrku ztepilého (S) a šalvěje lékařské (Š) a jednotlivých směsí těchto esenciálních olejů v daných koncentracích a poměrech. Výsledky testů účinnosti jednotlivých esenciálních olejů testovaných stejným způsobem jsou převzaty od Jakuba Folkeho.

Koncentrace (%)	EO-S	EO-Š	Směs S:Š, 1:1	Směs S:Š, 1:2	Směs S:Š, 2:1
	E±SD	E±SD	E±SD	E±SD	E±SD
8	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00
4	94,44±0,05	96,77±0,06	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,06
2	84,38±0,04	90,00±0,10	80,00±0,08	87,10±0,11	90,00±0,10
1	60,00±0,08	80,00±0,07	63,33±0,06	56,67±0,12	76,67±0,12
0,5	50,00±0,10	66,67±0,12	56,25±0,05	66,67±0,12	53,33±0,15
0,25	33,33±0,15	26,67±0,21	40,00±0,10	43,33±0,12	36,67±0,15

Tabulka 2: Letální dávka u jednotlivých esenciálních olejů a jejich směsí.

LC	Smrk ztepilý (%)	Šalvěj lékařská (%)	S:Š 1:1 (%)	S:Š 1:2 (%)	S:Š 2:1 (%)
LC50	0,64	0,37	0,50	0,42	0,41
LC90	2,81	1,97	2,46	1,96	2,11
LC95	3,54	2,52	3,13	2,48	2,69
LC99	5,17	3,72	4,60	3,64	3,96

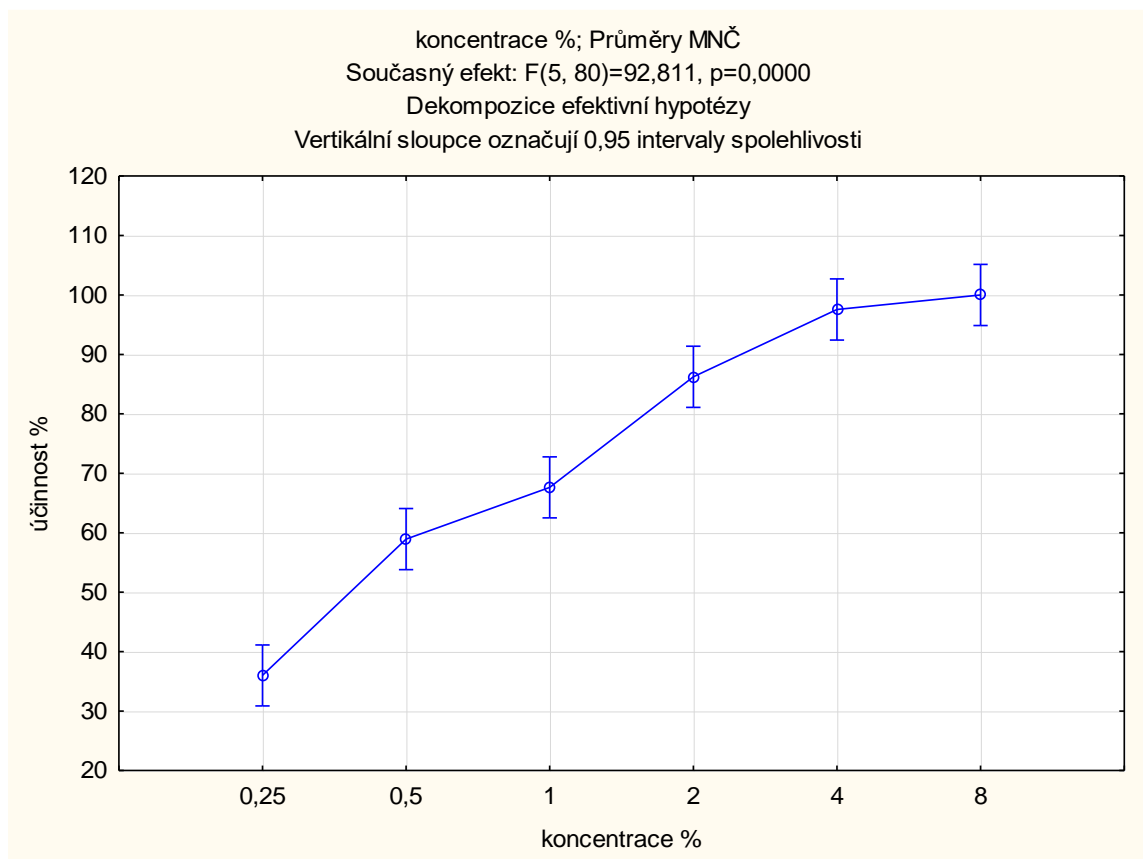
Tabulka 2 ukazuje, že nejvyšší i nejnižší biocidní účinek vyjádřen pomocí letální koncentrace byl zjištěn u referenčních vzorků, tedy u esenciálního oleje ze šalvěje lékařské (LC95 = 2,52 %) a smrku ztepilého (LC95 = 3,54 %). Zvýšení podílu šalvějového esenciálního oleje způsobilo zvýšení akaricidní účinnosti (LC95<sub>SŠ1:1</sub> = 3,13 %, LC95<sub>SŠ1:2</sub> = 2,48 % a LC95<sub>SŠ2:1</sub> = 3,96 %). Z hlediska smrkového oleje tedy lze mluvit o určitém aditivním efektu.

### 5.1. Statistické vyhodnocení pokusů

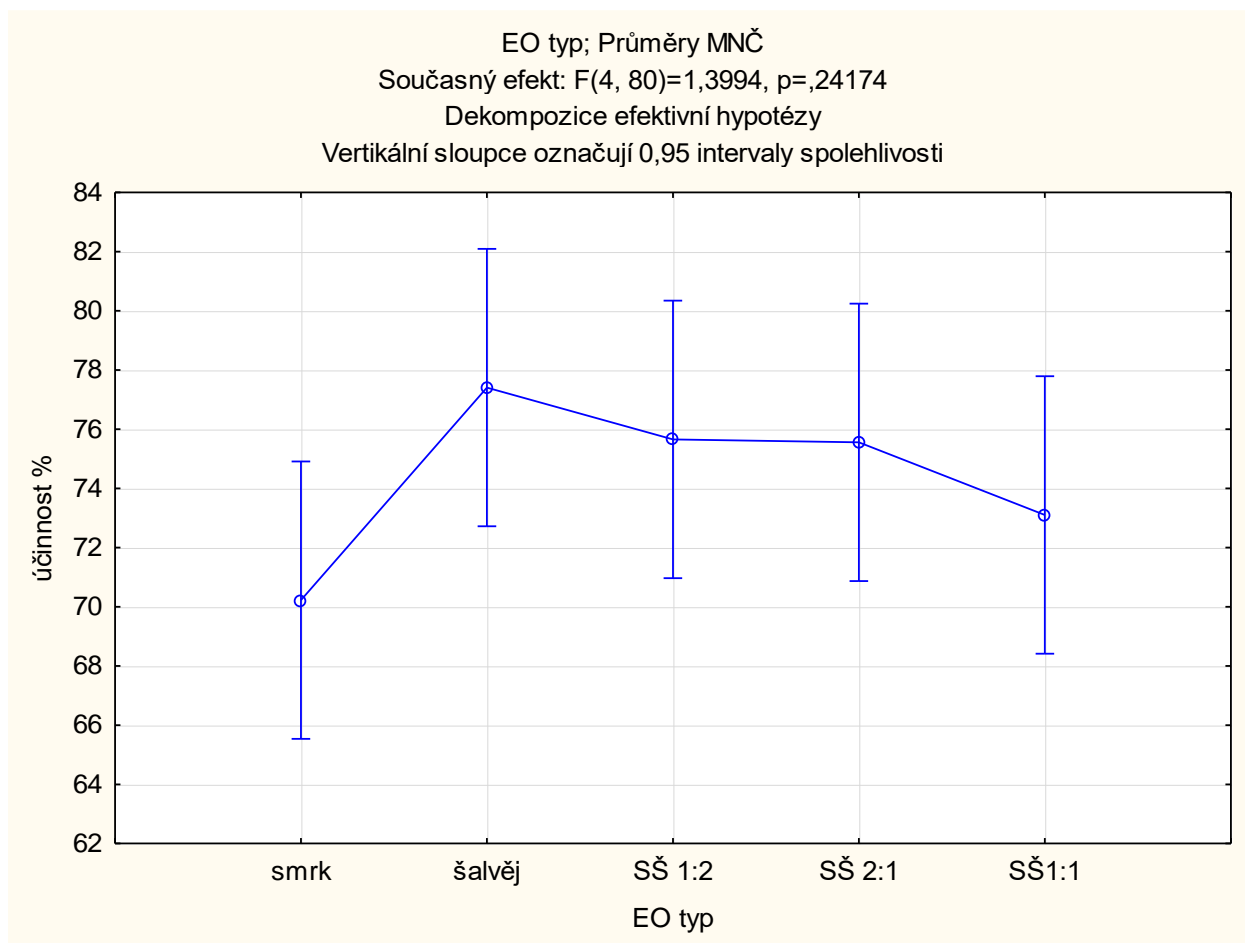
Z Grafu 1 je patrné, že s rostoucí koncentrací se zvyšuje i účinnost testovaných esenciálních olejů. Koncentrace má tedy vliv na účinnost esenciálních olejů. Statisticky významný rozdíl

pro tento jev byl potvrzen v Tabulce 24. Na základě Scheffeho post hoc testu bylo prokázáno, že mezi koncentracemi 0,5 % a 1 % ( $p = 0,35$ ), 2 % a 4 % ( $p = 0,09$ ) a 4 % a 8 % ( $p = 0,99$ ) není významný statistický rozdíl. Účinnost všech ostatních koncentrací se mezi sebou liší ( $p < 0,05$ ) viz Tabulka 25. Naopak biologická účinnost použitých esenciálních olejů a jejich binárních směsí se mezi jednotlivými typy nelišila (Graf 2, Tabulka 24 a 26).

Graf 1: Grafické znázornění vlivu koncentrace na účinnost testovaných esenciálních olejů a jejich binárních směsí.



Graf 2: Grafické znázornění vlivu typů testovaných esenciálních olejů (EO) a jejich binárních směsí na akaricidní účinnost.



Tabulka 3: Vliv koncentrace a typu esenciálních olejů ze smrku ztepilého (*Picea abies*), šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) a jejich binárních směsí na akaricidní účinnost (ANOVA).

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro účinnost %. Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Absolutní člen	498044,0	1	498044,0	4984,395	0,000000
koncentrace %	46368,8	5	9273,8	92,811	0,000000
EO typ	559,3	4	139,8	1,399	0,241740
Chyba	7993,7	80	99,9		

Tabulka 4: Vliv koncentrace esenciálních olejů ze smrku ztepilého (*Picea abies*), šalvěže lékařské (*Salvia officinalis*) a jejich binárních směsí na akaricidní účinnost (Scheffeho post hoc test).

Scheffeho test; proměnná účinnost %. Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 99,921, sv = 80,000						
koncentrace %	{1} 36,000	{2} 58,926	{3} 67,630	{4} 86,226	{5} 97,556	{6} 100,00
0,25		0,000004	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
0,5	0,000004		0,347625	0,000000	0,000000	0,000000
1	0,000000	0,347625		0,000355	0,000000	0,000000
2	0,000000	0,000000	0,000355		0,098929	0,020339
4	0,000000	0,000000	0,000000	0,098929		0,993665
8	0,000000	0,000000	0,000000	0,020339	0,993665	

Tabulka 5: Vliv typu esenciálních olejů ze smrku ztepilého (*Picea abies*), šalvěže lékařské (*Salvia officinalis*) a jejich binárních směsí na akaricidní účinnost (Scheffeho post hoc test).

Scheffeho test; proměnná účinnost % Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 99,921, sv = 80,000					
EO typ	{1} 70,225	{2} 77,408	{3} 75,657	{4} 75,556	{5} 73,103
Smrk		0,333992	0,618594	0,635618	0,944767
šalvěj	0,333992		0,991120	0,989010	0,795765
SŠ 1:2	0,618594	0,991120		1,000000	0,963911
SŠ 2:1	0,635618	0,989010	1,000000		0,968818
SŠ1:1	0,944767	0,795765	0,963911	0,968818	

## 5.2. Chemické složení esenciálních olejů a jejich směsí

Chemické složení testovaných binárních sloučenin je uvedeno v Tabulce 6. Ve smrkovém oleji je nejvíce zastoupen bornyl acetát (33 %) a v šalvějovém esenciálním oleji se jedná o bergamol (54,5 %) a linalool (25,5 %).

Tabulka 6: Chemické složení esenciálních olejů ze smrku ztepilého (S) a šalvěje lékařské (Š) a jejich směsí v daných poměrech – výsledky analýzy kapalinovou chromatografií. (Rt = retenční čas). Naměřené hodnoty poskytl v rámci spolupráce na projektu Mgr. Václav Ševčík. Složení binárních směsí bylo dopočítáno podle poměru jednotlivých esencí.

Rt (min)	Sloučenina	<i>Smrk ztepilý</i> (%)	<i>Šalvěj lékařská</i> (%)	S:Š 1:1 (%)	S:Š, 1:2 (%)	S:Š, 2:1 (%)
6,02	Tricyklen	0,40		0,20	0,10	0,30
6,53	$\alpha$ -pinen	23,50		11,75	7,80	15,70
6,94	Kamfen	5,10		2,55	1,70	3,40
7,74	<i>o</i> -Cymen	0,70		0,35	0,20	0,50
7,97	$\beta$ -pinen	2,50		1,25	0,80	1,70
8,64	Myrcen		0,30	0,15	0,20	0,10
9,34	3-Caren	4,70		2,35	1,60	3,10
9,91	<i>m</i> -Cymen	2,20		1,10	0,70	1,50
10,1	D-limonen	2,50	0,60	1,60	1,20	1,90
12,94	$\alpha$ -pinenoxid	0,30		0,15	0,10	0,20
13,46	Linalool		25,50	12,75	17,00	8,50
13,75	Verbenol	0,20		0,10	0,10	0,10
15,05	Kafr	8,50		4,25	2,80	5,70
15,12	Isopulegol		0,40	0,20	0,30	0,10
16,08	Borneol	4,50		2,25	1,50	3,00
16,97	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1,00		0,50	0,30	0,70
17,21	Terpineol	1,10	3,70	2,40	2,80	2,00
17,9	Verbenone	0,60		0,30	0,20	0,40
18,59	Carveol	0,30		0,15	0,10	0,20
18,74	Bornyl-formát	0,70		0,35	0,20	0,50
19,44	Citronellol		3,80	1,90	2,50	1,30
20,51	Bergamol		54,50	27,25	36,30	18,20
20,96	Geranial		0,20	0,10	0,10	0,10
21,16	Citronellyl-formát		0,20	0,10	0,10	0,10
21,64	Bornyl-acetát	33,10		16,55	11,00	22,10
24,94	Neryl-acetát	0,20	1,30	0,80	0,90	0,60
25,13	$\alpha$ -Kopeen		0,60	0,30	0,40	0,20
25,46	$\beta$ -Bourbonen		0,20	0,10	0,10	0,10
25,76	Geranyl-acetát		2,20	1,10	0,70	1,50
26,19	Junipene	0,50		0,25	0,20	0,30
26,53	Methyleugenol	0,30		0,15	0,10	0,20
26,88	Karyofenyl		1,40	0,70	0,90	0,50
29,34	$\beta$ -Cubebene		0,20	0,10	0,10	0,10
30,23	$\alpha$ -muurolen	0,40		0,20	0,10	0,30
33,22	Karyofylenoxid	1,00	1,10	1,10	1,10	1,00
33,09	Spathulenol		0,40	0,20	0,30	0,10
53,85	Sclareol		0,40	0,20	0,30	0,10
	Celkem identifikované sloučeniny	94,30	97,00	95,70	95,40	95,90
	Součet neidentifikovatelných slouč.	5,70	3,00	4,40	4,60	4,10

## 6. Diskuze

V rámci této práce byl akaricidní účinek směsí éterických olejů testován na samicích klíštěte obecného, ponořených na dvě vteřiny do kádinky, ve které byl předem připravený roztok s danou směsí esenciálních olejů v dané koncentraci. Za 24 hodin po provedení pokusu byly testované samice spočítány a ty, které nevykazovaly známky života, byly označeny za mrtvé. Na základě těchto podkladů byla spočítána mortalita samic a účinnost vybraných esenciálních olejů. Jak lze vidět z výsledků, všechny binární směsi i éterické oleje vykazovaly biocidní účinnost.

V chemickém rozboru jednotlivých složek daných esenciálních olejů jsou sloučeniny, které výše uvedené biocidní účinky vysvětlují. Jedná se především o monoterpeny, jejichž akaricidní účinnost známa (Pavela 2014). Esenciální olej ze salvadory perské také vykazoval akaricidní účinky vůči nymfám. Jeho účinnost byla nižší než účinnost rozmarýnového oleje (Elmhalli et al 2019).

Další studie, kterou prováděl Mengmeng et al. (2018), testovala akaricidní účinky *Ariaema anurans* a prokázala, že i tento esenciální olej má vůči klíšťatům akaricidní účinky. Tento olej je bohatý na okysličené terpeny a fenylypropanoidy. Chemické složení tohoto oleje je: asaron (11,08 %), kubenol (8,43 %), guaiol (4,73 %), eugenol (3,46 %), linalool (3,41 %) a  $\alpha$ -bisabolol (3,29 %). Opět se zde objevuje linalool, který byl hojně zastoupen i v testovaném šalvějovém esenciálním oleji. Tento esenciální olej se používá na ochranu přežvýkavců před klíšťaty (*R. microplus*) v rozvojových zemích. Účinnost toho akaricidního přípravku se odvíjí především od objemu a koncentrace aplikované dávky. Tento pokus se prováděl se samicemi klíšťat, které byly zváženy, rozdělené do skupin po deseti jednotlivcích dle podobné hmotnosti. Následně byly samice z jednotlivých skupin na pět minut ponořeny do kádinky, která obsahovala roztok esenciálního oleje o různých koncentracích. Poté byly přesunuty do Petriho misek a umístěny do inkubátoru, ve kterém byla teplota  $\pm 28$  °C a relativní vlhkost nad 80 %. Mezitím byla kontrolní skupina klíšťat ošetřena stejným způsobem pouze v roztoku 2 % Tweenu a následně byla umístěna na 15 dnů do inkubátoru. Po uplynutí této doby byla zaznamenána mortalita samic klíšťat a snížená míra líhnutí vajíček, která samice nakladla během pokusu.

Další studie, kterou prováděl Araújo et al. (2018), byla zaměřena na synergický efekt. Byly kombinovány esenciální oleje z thymolu (vyskytuje se například v mateřídoušce vějířité nebo úzkolisté a tymiánu), karvakrolu (lze najít například v dobromysli obecné a bergamolu) a eugenolu (tento esenciální olej se vyskytuje například v hřebíčku, muškátovém ořechu a bobkovém listu). Kombinací těchto tří esenciálních olejů bylo dosaženo synergického efektu a zvýšila se jeho biocidní aktivita vůči larvám klíšťat *R. microplus* a *R. sanguineus*. Test byl prováděn následující metodou: skupina 100 larev byla umístěna do středu listu filtračního papíru. Na okraj každého filtračního papíru bylo nanášeno určité množství roztoku s danými esenciálními oleji. Následně byly tyto vzorky umístěny do komory o teplotě 27 °C po dobu 24 hodin. Následně byly spočítány mrtvé a živé larvy. Úmrtnost klíšťat byla vypočítána dle vzorce:  $(\text{počet mrtvých larev} / \text{celkový počet larev}) \times 100$ .

Dle Slamana et al. (2014) lze použít esenciální oleje ze šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) a z rozmarýnu (*Salvia rosmarinus*) jako alternativní k syntetickým pesticidům vůči svlušce

chmelové (*Tetranychus urticae*), která je označována za škůdce především na ovoci, zelenině a okrasných rostlinách. Ke stanovení akaricidních účinků těchto esenciálních olejů byla použita disková metoda (standardní metoda pro stanovení citlivosti kmene k antibiotiku, výsledek je citlivý nebo rezistentní, podle toho, je-li průměr inhibiční zóny kolem disku na tuhé půdě alespoň stejný, nebo naopak menší než stanovená hranice, metoda je kvalitativní).

Tento pokus se prováděl na vajíčkách, nymfách a dospělých tohoto škůdce. Esenciální oleje byly testovány v následujících koncentracích: 1 %, 3 %, 6 % a 12 %. Pro každou koncentraci se pokus opakoval čtyřikrát a na každé opakování bylo použito 15 jedinců. Po jednom, třech a šesti dnech byli spočítáni mrtví jedinci. Nejvyšší úmrtnost byla prokázána při koncentraci 12 %. Tuto směs lze tedy považovat za alternativní pesticidy na hubení škůdců.

Testované směsi esenciálních olejů lze tedy počítat mezi látky s potenciálem nahradit či vhodně doplnit konvenčně používané biocidy. Jak ale plyne z výše uvedených odstavců, metodiky používané pro testování biologické účinnosti se mezi jednotlivými autory liší, je proto obtížné dosažené výsledky objektivně porovnat. Při dalším řešení problematiky biologické účinnosti biopesticidů lze proto doporučit nejen ověření zjištěných efektů v praxi, ale i sjednocení laboratorního testování.

## 7. Závěr

Na základě dosažených výsledků lze konstatovat, že esenciální oleje ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) vykazují akaricidní účinek proti samicím klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*). Zároveň se nepotvrdilo, že smícháním těchto dvou silic v daných poměrech lze dosáhnout synergického efektu, biocidní účinek se po smíchání olejů nezvýšil.

Z porovnání výsledných letálních koncentrací binárních směsí esenciálních olejů v daných poměrech lze vyvozovat, že nejvyšších celkových mortalit bylo dosahováno v pokusech s oleji ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 1:2, následováno koncentrací 1:1 a 2:1. Přidáním šalvějového oleje k oleji smrkovému došlo ke zvýšení účinnosti.

Vzhledem k tomu, že oba esenciální oleje, které byly pro výrobu testovaných binárních směsí použity jsou dobře dostupné a smrkový olej lze navíc získat jako vedlejší produkt dřevozpracujícího průmyslu, je možno tyto směsi použít jako efektivní, relativně levnou a snadno vyrobitelnou alternativu běžných pesticidů. Použitím těchto směsí v kombinacích s dalšími biocidy je možné docílit eradikace cílových organismů při snížení negativního vlivu působení těchto přípravků na životní prostředí a také předejít vzniku rezistence klíšťat na účinné látky.



## 8. Seznam literatury

- Alexa E, Sumalan RM, Danciu C, Obistoiu D, Negrea M, Poiana MA, Rus C, Radulov I, Pop G, Dehelean C. 2018. Synergistic Antifungal, Allelopathic and Anti-Proliferative Potential of *Salvia officinalis* L., and *Thymus vulgaris* L. Essential Oils. *Molecules* **23**:185-200.
- Anděra M. 2003. Fauna. 1. vyd. Praha: Libri.
- Araújo LX, Novato TP, Zeringota V, Maturano M, Melo D, da Silva BC, Daemon E, de Carvalho MG, Monteiro MO. 2016. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Medical and Veterinary Entomology* **30**:377-382.
- Benelli G, Pavela R. 2018. Beyond mosquitoes—Essential oil toxicity and repellency against bloodsucking insects. *Industrial Crops and Products* **117**:382-392.
- Bestehorn M, Weigold S, Kern WV, Chitimia-Dobler L, Mackenstedt U, Dobler G, Borde PJ. 2018. Phylogenetics of tick-borne encephalitis virus in endemic foci in the upper Rhine region in France and Germany. *Plos One* **13**:e0204790- e0204800.
- Bissinger BW, Apperson CS, Sonenshine DE, Watson DW, Roe RM. 2009. Efficacy of the new repellent BioUD against three species of ixodid ticks. *Experimental and Applied Acarology* **48**:239-50.
- Bissinger BW, Roe RM. 2010. Tick repellents: past, present, and future. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **96**:63–79.
- Chandler D, Bailey AS, Tatchel GM, Davidson G, Greaves J, Gran WP. 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **366**:1987–1998.
- Chroust K, Pavlová M, Prokop Z, Mendel J, Božková K, Kubát Z, Yajíčková V, Damborský J. 2007. Quantitative Structure-Activity Relationships for Toxicity and Genotoxicity of Halogenated Aliphatic Compounds: Wing Spot Test of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere* **67**:152-159.
- da Silva Lima A, Pereira Maciel A, de Jesus Silva Mendonça C, Martins Costa Junior L. 2017. Use of encapsulated carvacrol with yeast cell walls to control resistant strains of *Rhipicephalus microplus* (Acari: *Ixodidae*). *Industrial Crops and Products* **108**:190-194.
- Damalas CA, Koutroubas SD. 2018. Current Status and Recent Developments in Biopesticide Use. *Agriculture* **8**:13-19.
- de Sousa Barros A, de Moraes SM, Travassos Ferreira PA, Pinto Vieira IG, Craveiro AA, dos Santos Fontenelle RO, de Menezes JESA, da Silva FWF, de Sousa HA. 2015. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Industrial Crops and Products* **76**:557-564.
- del Fabbro S, Nazzi F. 2008. Repellent effect of sweet basil compounds on *Ixodes ricinus* ticks. *Experimental and Applied Acarology* **45**:219–228.

- Dolan MC, Schulze TL, Jordan RA, Schulze CJ, Ullmann AJ, Hojgaard AH, Williams MA, Piesman J. 2017. Evaluation of Doxycycline-Laden Oral Bait and Topical Fipronil Delivered in a Single Bait Box to Control *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) and Reduce *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Small Mammal Reservoirs and Host-Seeking Ticks. *Journal of Medical Entomology* **54**:403-410.
- Elmhalli F, Garboui SS, Borg-Karlson AK, Mozüraitis R, Baldauf SL, Grandi G. 2019. The repellency and toxicity effects of essential oils from the Libyan plants *Slavadora persica* and *Rosmarinus officinalis* against nymphs of *Ixodes ricinus*. *Experimental and Applied Acarology* **77**:585–599.
- Flanagan J. 2011. Preserving Cosmetics with Natural Preservatives and Preserving Natural Cosmetics, pages 169-179 in Dayan N, Kromidas L, editors. *Formulating, Packaging, and Marketing of Natural Cosmetic Products*. John Wiley & Sons, Inc. Publication. New Jersey.
- Ghosh H, Roy S, Sanyal A, Misra KK. 2017. Microscopic anatomy of the Haller's organ of snake ticks. *International Journal of Acarology* **43**:1-9.
- Goddard J. 2000. *Infectious Diseases and Arthropods*. 1. vyd. Totowa New Jersey, Humana Press.
- Gupta S, Dikshit A. 2009. Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control. *Journal of Biopesticides* **3**:186-188.
- Hubálek Z, Rudolf I. 2007. *Mikrobiální zoonózy a saponózy*. Brno: Přírodovědecká fakulta MU.
- Kimmig P, Hassler D, Braun R. 2003. *Klíšťata: nepatrné kousnutí s neblahými následky*. Praha: Pragma.
- Krause PJ. 2019. Human babesiosis. *International Journal of Parasitology* **49** **2**:165-174.
- Kulma, M, Bubová T, Kopecký O, Rettich F. 2017. Lavender, Eucalyptus, and Orange Essential Oils as Repellents Against *Ixodes Ricinus* Females. *Scientia Agriculturae Bohemica* **48**(2): 76-81.
- Kybicová K. 2010. *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Anaplasma phagocytophilum* in the Czech Republic. [Dizertační práce]. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a mikrobiologie. Praha.
- Matějovská T. 2007. Interakce klíště-hostitel I. Sání krve a přenos patogenů. *Živa* **6**:247–249.
- Mehdizadeh T, Hashemzadeh MS, Nazarizadeh A, Neyriz-Naghadehi M, Tat M, Ghalavand M, Dorostkar R. 2016. Chemical composition and antibacterial properties of *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* and *Trachyspermum ammi* essential oils alone and in combination with nisin. *Research Journal of Pharmacognosy* **4**:51-58.
- Mengmeng J, Qi H, Wenxia W, Jiali D, Liang Z. 2018. Chemical composition and acaricidal activity of *Arisaema anurans* essential oil and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* **261**:59-66.

- Mikešková M. 2016. Klíště obecné jako přenašeč patogenů: průběh nemocí v dětském věku. [Diplomová práce]. MU, Přírodovědecká Fakulta, Ústav botaniky a zoologie. Brno.
- Muyima NY, Zulu OG, Bhengu T, Popplewell DO. 2002. The potential application of some novel essential oils as natural cosmetic preservatives in an aqueous cream formulation. *Flavour and Fragrance Journal* **17**:258-266.
- Nicholson WL, Sonenshine DE, Noden BH, Brown RN. 2020. Ticks (*Ixodida*). Pages 603–672 in Gary R, Mullen A, Lance A, editors. *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press, USA.
- Pavela R. 2014. Acute, synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Bois. (Lep., Noctuidae) larvae. *Industrial Crops and Products* **60**:247-258.
- Radulescu V, Saviuc C, Chifuriuc C, Oprea E, Ilies DC, Marutescu L, Lazar V. 2011. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil from Shoots Spruce (*Picea abies* L.). *Revista de Chimie* **62**(1):69-74.
- Randolph SE, Storey K. 1999. Impact of Microclimate on Immature Tick-Rodent Host Interactions (Acari: *Ixodidae*): Implications for Parasite Transmission. *Journal of Medical Entomology* **36**:741–748.
- Richter D, Matuschka F, Spielman A, Mahadev L. How ticks get under your skin: insertion mechanics of the feeding apparatus of *Ixodes ricinus* ticks. *Proceedings of the Royal Society* **1773**:1-6.
- Rizzoli A, Hauffe HC, Carpi G, Vourc'h G I, Neteler M, Rosà R. 2011. Lyme borreliosis in Europe. *EuroSurveillance*. **16**:19906-19914.
- Rob N, Candler RN, Hagelin PM. 2015. Chapter 35 - Encapsulation by Film Deposition, pages 664-670 in Tilli M, Motooka T, Airaksinen VM, Franssila S, Paulasto-Kröckel M, Lindroos V, editors. *Handbook of Silicon Based MEMS Materials and Technologies* (Second Edition). William Andrew Publishing. USA.
- Roháčová H. 2005. *Lymeská borelióza*. Praha: Maxdorf.
- Rosický B, Černý V, Daniel M, Dusbábek F, Palička, P, Samšišák K. 1979. *Roztoči a klíšťa škodící zdraví člověka*. 1. vyd. Praha: Academia.
- Rosický B, Weiser J. 1952. *Škůdci lidského zdraví (Boj s hmyzem II.)*. 1. vyd. Praha: Přírodovědecké vydavatelství.
- Rupeš V, Ledvinka J. 2003. *Příručka dezinfekce a deratizace (Pracovní verze)*. 1. vyd. Praha: Sdružení DDD.
- Salman Yorulmaz S, Saritas S, Kara N, Ay R. 2014. Acaricidal and Ovicidal Effects of Sage (*Salvia officinalis* L.) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) (Lamiaceae) Extracts on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Journal of Agricultural Sciences* **20**:358-367.
- Smrž J. 2015. *Základy biologie, ekologie a systému bezobratlých živočichů*. Praha: Karolinum.

- Sonenshine D, Nicholson W, Lane R. 2002. Ticks (*Ixodida*). Pages 517–558 in Mullen G, Durden L, editors. Medical and Veterinary Entomology. Academic San Diego.
- Sonenshine DE, Roe RM. 2014. External and Internal Anatomy of Ticks. Biology of Ticks: Oxford University Press, New York.
- Subak S. 2003. Effects of Climate on Variability in Lyme Disease Incidence in the Northeastern United States. American Journal of Epidemiology **157**:531-538.
- Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. 2016. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine **16**:1-21.
- Tripathi AK, Upadhyay S, Bhuiyan M, Bhattacharya PR. 2009. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy **14**:052-063.
- Van Wye J, Hsu YP, Terr A, Moss R, Lane R. 1991. Anaphylaxis from a Tick Bite. The New England Journal of Medicine **324**:777–778.
- Votýpka J, Kolářová I, Horák a kol. 2018. O parazitech a lidech. Triton, Praha.
- Wang-Rong L, Yuan-Yuan Y, You-Sheng L, Li-Juan Z, Jian-Liang Z, Qian-Qian Z, Min Z, Jin-Na Z, Yu-Xia J, Guang-Guo Y. 2017. Biocides in wastewater treatment plants: Mass balance analysis and pollution load estimation. Journal of Hazardous Materials **329**:310-320.
- Wright BS, Bansal A, Moriarity DM, Takaku S, Setzer WN. 2007. Cytotoxic Leaf Essential Oils from Neotropical *Lauraceae*: Synergistic Effects of Essential Oil Components. Natural Product Communications **2**:1241-1244.

## 8.1. Elektronické zdroje

[https://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Ixodes\\_ricinus\\_range\\_map.svg](https://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Ixodes_ricinus_range_map.svg), z data 6.2.2021

<http://www.scalibor.cz/Parazite/KlisteObecne>, z data 6.2.2021.

<https://abecedazahrady.dama.cz/clanek/klistata-jsou-nejaktivnejsi-prave-ted-jak-se-branit>  
z data 14.3.2021.

<http://stop.p13.cz/cs/zari-2019/nejvetsi-prazdninova-hrozba-kliste-obecne-ixodes-ricinus/14252/>, z data 6.2.2021.

<https://www.fnbrno.cz/klistova-encefalitida-muze-byt-smrtici-ockovani-lze-vrele-doporucit/t5449>, z data 6.2.2021

<http://bushcraft.cz/medicina/prvni-pomoc/zamysleni-nad-klistaty/> z data 6.2.2021

<https://www.ceresana.com/en/market-studies/chemicals/biocides/ceresana-market-study-biocides.html> z data 14.3.2021

<https://www.biologyonline.com/dictionary/synergistic-effect> navštíveno 6.2.2021

## 9. Příloha 1 – výsledky experimentálního stanovení účinnosti esenciálních olejů a jejich směsí.

S-Smrk ztepilý, Š-Šalvěj lékařská, EO-esenciální olej

Tabulka 1: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrků ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 1:2, 8% koncentrace

SŠ 1:2; 8 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	0	10	100,00
2. pokus	0	10	100,00
3. pokus	0	10	100,00
celkem	0	30	100,00

Tabulka 2: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrků ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 1:2, 4% koncentrace.

SŠ 1:2, 4 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	0	10	100,00
2. pokus	0	10	100,00
3. pokus	0	10	100,00
celkem	0	30	100,00

Tabulka 3: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrků ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 1:2, 2% koncentrace

SŠ 1:2; 2 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	2	8	80,00
2. pokus	0	10	100,00
3. pokus	2	9	81,82
celkem	4	27	87,10

Tabulka 4: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrků ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 1:2, 1% koncentrace.

SŠ 1:2; 1 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	5	5	50,00
2. pokus	5	5	50,00
3. pokus	3	7	70,00
celkem	13	17	56,67

Tabulka 5: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 1:2, 0,5% koncentrace.

SŠ 1:2; 0,5 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	4	6	60,00
2. pokus	4	6	60,00
3. pokus	2	8	80,00
celkem	10	20	66,67

Tabulka 6: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 1:2, 0,25% koncentrace.

SŠ 1:2; 0,25 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	5	5	50,00
2. pokus	7	3	30,00
3. pokus	5	5	50,00
celkem	17	13	43,33

Tabulka 7: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 2:1, 8% koncentrace.

SŠ 2:1; 8 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	0	10	100,00
2. pokus	0	10	100,00
3. pokus	0	10	100,00
celkem	0	30	100,00

Tabulka 8: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 2:1, 4% koncentrace.

SŠ 2:1; 4 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	0	10	100,00
2. pokus	1	9	90,00
3. pokus	0	10	100,00
celkem	1	29	96,67

Tabulka 9: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 2:1, 2% koncentrace.

SŠ 2:1; 2 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	2	8	80,00
2. pokus	0	10	100,00
3. pokus	1	9	90,00
celkem	3	27	90,00

Tabulka 10: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 2:1, 1% koncentrace.

SŠ 2:1; 1 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
-------------	------	-------	---------------

1. pokus	3	7	70,00
2. pokus	1	9	90,00
3. pokus	3	7	70,00
celkem	7	23	76,67

Tabulka 11: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 2:1, 0,5% koncentrace.

SŠ 2:1; 0,5 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	5	5	50,00
2. pokus	6	4	40,00
3. pokus	3	7	70,00
celkem	14	16	53,33

Tabulka 12: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 2:1, 0,25% koncentrace.

SŠ 2:1; 0,25 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	6	4	40,00
2. pokus	5	5	50,00
3. pokus	8	2	20,00
celkem	19	11	36,67

Tabulka 13: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 1:1, 8% koncentrace.

SŠ 1:1; 8 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	0	10	100,00
2. pokus	0	10	100,00
3. pokus	0	10	100,00
celkem	0	30	100,00

Tabulka 14: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 1:1, 4% koncentrace.

SŠ 1:1; 4 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	0	10	100,00
2. pokus	0	10	100,00
3. pokus	0	10	100,00
celkem	0	30	100,00

Tabulka 15: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 1:1, 2% koncentrace.

SŠ 1:1; 2 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	0	10	100,00
2. pokus	0	10	100,00
3. pokus	0	10	100,00
celkem	0	30	100,00



1. pokus	3	7	70,00
2. pokus	2	9	81,82
3. pokus	2	12	85,71
celkem	7	28	80,00

Tabulka 16: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 1:1, 1% koncentrace.

SŠ 1:1; 1 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	4	6	60,00
2. pokus	4	6	60,00
3. pokus	3	7	70,00
celkem	11	19	63,33

Tabulka 17: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 1:1, 0,5% koncentrace.

SŠ 1:1; 0,5 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	5	7	58,33
2. pokus	4	6	60,00
3. pokus	5	5	50,00
celkem	14	18	56,25

Tabulka 18: Biocidní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 1:1, 0,25% koncentrace.

SŠ 1:1; 0,25 %	Živá	Mrtvá	Mortalita (%)
1. pokus	6	4	40,00
2. pokus	5	5	50,00
3. pokus	7	3	30,00
Celkem	18	12	40,00