

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Optimalizace metod pro stanovení antimikrobiální aktivity extraktů z řasy *Chlorella sorokiniana*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Tereza Vránová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
Rok:	2019

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

V Olomouci dne 29. 4. 2019

V první řadě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas, zájem a ochotu kdykoliv se vším poradit při zpracování teoretické a experimentální části diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Mgr. Silvii Dostálkové za cenné rady, pomoc a dohled při provádění experimentů.

Můj dík patří také Mgr. Dominice Činčárové, RNDr. Pavlu Hrouzkovi, Ph.D. a Ing. Petře Urajové, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu Akademie věd v Třeboni za poskytnutí extraktů řasy *Chlorella sorokiniana* k testování a za spolupráci při zpracovávání výsledků.

V poslední řadě bych chtěla také poděkovat celé Katedře biochemie za vstřícný a přátelský přístup během mého studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Tereza Vránová
Název práce	Optimalizace metod pro stanovení antimikrobiální aktivity extraktů z řasy <i>Chlorella sorokiniana</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Včela medonosná (*Apis mellifera*) hraje v zemědělství velmi důležitou roli. Nejen, že včely svým opylováním zvyšují produktivitu a kvalitu zemědělských plodin, ale také nám poskytují produkty hojně využívané v potravinářství (med, pyl) nebo v lékařském odvětví (včelí jed, mateří kašička, propolis, včelí vosk). Mezi nejzávažnější včelí onemocnění bakteriálního původu patří mor včelího plodu. Za toto onemocnění je zodpovědná bakterie *Paenibacillus larvae*, která vytváří velmi odolné spory a ty jsou pro mladé včelí larvy vysoce infekční. Pomocí ERIC primerů lze rozlišit čtyři genotypy bakterie *P. larvae*, které se liší nejen svým vzhledem kolonií, ale také četností výskytu, místem výskytu i virulencí. V teoretické části práce jsou popsány bakteriální včelí nákazy, proces sporulace bakterií a přírodní antimikrobiální látky včetně metod testování jejich antimikrobiálního účinku. Praktická část je poté zaměřena na testování antimikrobiálního účinku acetonových extraktů řasy *Chlorella sorokiniana* proti bakterii *P. larvae* genotypu ERIC I a ERIC II. Byla optimalizována metoda měření růstových křivek pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) acetonových extraktů a byla stanovována životnost bakterií s využitím měření fluorescence a barviva resazurinu. Ze získaných hodnot byla stanovena relativní životnost buněk při MIC daného extraktu. Bylo otestováno 9 frakcí extraktů řasy separované pomocí RP-HPLC. Nejlepší účinky vykazoval extrakt frakce číslo 7, jehož MIC proti oběma genotypům *P. larvae* byla $6,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Naopak bez účinku byl extrakt frakce číslo 16. Nakonec bylo optimalizováno množství přidávaného FDA k suspenzi živých buněk, množství PI k suspenzi mrtvých buněk a stanovena délka inkubace. Pro stanovení počtu živých a mrtvých buněk v suspenzi bakterií po přidání

potenciální antimikrobiální látky pomocí fluorescenčního mikroskopu bude třeba metodu dále optimalizovat.

Klíčová slova	včela medonosná, antimikrobiální aktivita, <i>Chlorella sorokiniana</i> , acetonový extrakt, minimální inhibiční koncentrace, <i>Paenibacillus larvae</i>
Počet stran	80
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Tereza Vránová
Title	Optimization of methods for testing antimicrobial activity of extracts from algae <i>Chlorella sorokiniana</i>
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Jiří Danihlák, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

Honey bees (*Apis mellifera*) play a very important role in agriculture. They not only increase the productivity and quality of crops with their pollination, but they also provide us with products widely used in the food industry (honey, pollen) or in the pharmaceutical sector (bee venom, royal jelly, propolis, beeswax). American foulbrood is one of the most serious bacterial bee diseases. The disease is caused by the bacterium *Paenibacillus larvae*, which produces very resistant spores and these are highly infectious for young bee larvae. ERIC primers are used to distinguish four genotypes of *P. larvae*, which differ not only in their colony appearance but also in their frequency, location and virulence. The theoretical part of the thesis consists of description bacterial bee diseases, process of sporulation in bacteria and natural antimicrobial substances including methods of testing their antimicrobial effect. The practical part is focused on testing the antimicrobial effect of acetone extracts of algae *Chlorella sorokiniana* against the bacterium *P. larvae* of the ERIC I and ERIC II genotypes. The growth curves measuring method for determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of acetone extracts was optimized and the viability of bacteria was determined using fluorescence measurements and resazurin dye. From the obtained values the relative viability of the cells at the MIC of the given extract was determined. Altogether 9 fractions of algae extract separated by RP-HPLC were tested. Fraction number 7, which MIC against both *P. larvae* genotypes was $6.3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, showed the best effects. On the contrary, no effect was extract of fraction number 16. Finally, the amount of FDA added to the living cell suspension, the amount of PI added to dead cell suspension and incubation length were optimized. To

determine the number of viable and dead cells in a bacterial suspension after the addition of a potential antimicrobial agent using a fluorescence microscope, the method will need to be further optimized.

Keywords	honeybee, antimicrobial activity, <i>Chlorella sorokiniana</i> , acetone extract, minimum inhibitory concentration <i>Paenibacillus larvae</i>
Number of pages	80
Number of appendices	1
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Mikrobiální nákazy včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>)	2
2.1.1 Mor včelího plodu	2
2.1.1.1 Historie <i>Paenibacillus larvae</i>	2
2.1.1.2 Klasifikace <i>Paenibacillus larvae</i>	3
2.1.1.3 Průběh nákazy	3
2.1.1.4 Přenos a šíření	6
2.1.2 Hniloba včelího plodu	7
2.1.2.1 Historie <i>Melissococcus plutonius</i>	7
2.1.2.2 Sekundární patogeny	8
2.1.2.3 Průběh nákazy	8
2.1.2.4 Přenos a šíření	9
2.2 Sporulace bakterií a klíčení bakteriálních spor	10
2.2.1 Sporulace bakterie <i>Bacillus subtilis</i>	11
2.2.2 Struktura zralé spory	12
2.2.3 Germinace bakteriálních spor	12
2.3 Přírodní antimikrobiální látky	14
2.3.1 Fenoly a polyfenoly	14
2.3.2 Terpenoidy a esenciální oleje	15
2.3.3 Alkaloidy	16
2.3.4 Propolis	16
2.3.5 Mateří kašička	17
2.3.6 Med	18
2.4 Řasa <i>Chlorella</i> spp.	20
2.4.1 Taxonomické zařazení	20
2.4.2 Tvar a struktura buňky	21
2.4.3 Pozitivní účinky řasy <i>Chlorella</i> spp.	23
2.4.3.1 Základní živiny	24
2.4.3.2 Specifické bioaktivní látky	26
2.4.4 Využití řasy <i>Chlorella</i> spp. ve včelařství	28
2.5 Metody studia antimikrobiální aktivity	30
2.5.1 Difúzní metody	30
2.5.1.1 Disková difúzní metoda	30
2.5.1.2 Gradientový difúzní test (E-test)	31
2.5.1.3 Další používané difúzní metody	31

2.5.2	Diluční metody.....	32
2.5.2.1	Agarová diluční metoda	33
2.5.2.2	Diluční metoda v tekutém kultivačním médiu	33
2.5.3	Metody stanovení životaschopnosti buněk	34
2.5.3.1	Detekce celé biomasy.....	34
2.5.3.2	Kvantifikace živých buněk na základě detekce metabolické aktivity.....	35
2.5.3.2.1	Činidlo XTT	35
2.5.3.2.2	Resazurin.....	35
2.5.3.2.3	Fluorescein diacetát.....	36
2.5.3.3	Kvantifikace matrice biofilmu	36
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
3.1	Materiál	37
3.1.1	Chemikálie	37
3.1.2	Biologický materiál.....	37
3.1.3	Příprava extraktů z řasy <i>Chlorella sorokiniana</i>	38
3.1.4	Použité roztoky a média	38
3.1.5	Přístrojové vybavení	39
3.2	Metody	40
3.2.1	Zamražení bakteriálního kmene <i>P. larvae</i> do roztoku glycerolu.....	40
3.2.2	Naočkování MYPGP agaru.....	40
3.2.3	Testování antimikrobiálního účinku vodných extraktů metodou difuzních testů	41
3.2.4	Testování antimikrobiálního účinku acetonových a methanolových extraktů metodou difuzních testů	41
3.2.5	Genotypizace <i>Paenibacillus larvae</i> v systému primerů ERIC.....	41
3.2.5.1	Kultivace <i>Paenibacillus larvae</i>	41
3.2.5.2	Izolace DNA z <i>Paenibacillus larvae</i>	41
3.2.5.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA.....	42
3.2.5.4	Příprava PCR premixu	42
3.2.5.5	Podmínky PCR reakce	42
3.2.6	Detekce PCR produktů metodou gelové agarosové elektroforézy	43
3.2.7	Testování různých rozpouštědel na růst bakteriální kultury	43
3.2.8	Kultivace <i>P. larvae</i> s extraktem řasy <i>Chlorella sorokiniana</i>	44
3.2.9	Měření růstové křivky bakterie <i>P. larvae</i> s extraktem řasy <i>Chlorella sorokiniana</i>	44
3.2.9.1	Příprava mrtvých buněk	45
3.2.10	Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) pomocí resazurinu.....	45

3.2.11 Stanovení životnosti buněk s využitím fluorescein diacetátu (FDA) a propidium jodidu (PI).....	46
3.2.11.1 Příprava bakteriální suspenze.....	46
3.2.11.2 Stanovení životnosti bakterií na mikroskopickém readeru	46
3.2.11.3 Stanovení životnosti bakterií na fluorescenčním mikroskopu	46
4 Výsledky	48
4.1 Zařazení bakteriálních kmenů <i>P. larvae</i> mezi genotypy ERIC I a II.....	48
4.2 Optimalizace protokolu pro stanovení MIC extraktů řasy <i>Chlorella sorokiniana</i> ...	49
4.2.1 Testování frakcí extraktu řasy <i>Chlorella sorokiniana</i> metodou růstových křivek bakterií.....	50
4.2.2 Stanovení relativní životnosti bakterií <i>P. larvae</i> pomocí resazurinu	52
4.3 Optimalizace protokolu pro stanovení životnosti bakterií <i>P. larvae</i> pomocí fluorescein diacetátu (FDA) a propidium jodidu (PI)	54
5 DISKUZE.....	58
6 ZÁVĚR	61
7 LITERATURA.....	62
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	68
9 PŘÍLOHY	69
9.1 Difuzní testy vodných, acetonových a methanolových extraktů řasy.....	69

CÍLE PRÁCE

Součástí teoretické části bude vypracování literární rešerše zabývající se problematikou:

- mikrobiální nákazy včel
- proces sporulace bakterií a klíčení bakteriálních spor
- přírodní antimikrobiální látky
- metody pro stanovení antimikrobiální aktivity mikrobiologickými a fluorescenčními metodami

V praktické části budou provedeny experimenty se zaměřením na:

- optimalizace detekce antimikrobiální aktivity pomocí mikrobiologických a fluorescenčních metod
- zavedení metod kvantifikace živých a mrtvých buněk po aplikaci látky s potenciálním antimikrobiálním účinkem
- studium antimikrobiálních účinků extraktů řasy *Chlorella sorokiniana*

1 ÚVOD

Včela medonosná (*Apis mellifera*) patří mezi velmi důležitá hospodářská zvířata. Nejen že se podílejí na opylování zemědělských plodin, ale také nám poskytují řadu produktů využívaných v potravinářství (med, pyl) či v lékařském průmyslu (včelí jed, mateří kašička, propolis, včelí vosk). Z těchto důvodů je zdraví včel velmi důležité. Avšak existuje několik včelích onemocnění způsobené nejrůznějšími patogeny jako jsou viry, bakterie, paraziti či houby. Tato diplomová práce je zaměřena na bakteriální patogeny, především na bakterii *Paenibacillus larvae* způsobující mor včelího plodu (MVP). *P. larvae* je grampozitivní bakterie, která vytváří velmi odolné spory infekční pouze pro včelí larvy. Poté co se spory spolu s potravou dostanou do trávicího traktu larvy, začnou klíčit a velmi rychle se množit, což vede k postupnému rozkladu a úhynu larvy. Pro onemocnění MVP neexistuje žádná účinná léčba, nakažená včelstva je vždy nutné spálit spolu s veškerým včelařským vybavením. Ve státech mimo Evropskou unii je povoleno léčit MVP pomocí antibiotik, avšak řada bakterií si již dokázala vybudovat rezistenci, proto je třeba hledat alternativní způsoby léčby. Jedním z možných způsobů, jak zvýšit odolnost včel proti MVP, je používání extraktů řasy *Chlorella*, které vykazují inhibiční účinky na růst *P. larvae*.

Antimikrobiální aktivita extraktů řasy *Chlorella sorokiniana* byla již testována v bakalářské práci (Vránová, 2017), kde byla optimalizována metoda difuzních testů a metoda ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) u vodných extraktů pomocí roztoku resazurinu. Na tuto bakalářskou práci navazuje i má diplomová práce, kde byla optimalizována metoda růstových křivek bakterií pro stanovení MIC acetonových extraktů řasy a pomocí fluorescenčního barviva resazurin byla stanovena relativní životnost buněk. Nakonec byla sledována životnost bakterií na fluorescenčním mikroskopu po přidání fluorescein diacetátu (FDA) a propidium jodidu (PI).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Mikrobiální nákazy včely medonosné (*Apis mellifera*)

Pro úspěšnou produkci zemědělských plodin a opylení volně žijících rostlin jsou nezbytně nutní živočichové, podílející se na jejich opylování, čímž přispívají k množství a ke kvalitě sklizených plodin. Hlavní roli zde hrají hmyzí opylovatelé, zejména včely. Včela medonosná (*Apis mellifera*) patří mezi nejvýznamnější opylovatele zemědělských a zahrádkářských plodin na celém světě. Díky své přizpůsobivosti a nízkým nákladům na jejich chov, se včely řadí k nejdůležitějším produktivním hospodářským zvířatům. Velkou hrozbou pro zemědělství může být zdraví včel, neboť existuje řada patogenů, kterými mohou být včely napadeny (viry, bakterie, houby, paraziti). U včel bylo popsáno několik bakteriálních patogenů, z nichž nejdůležitější jsou *Paenibacillus larvae* a *Melissococcus plutonius* (Genersch, 2010; Funfhaus *et al.*, 2018).

2.1.1 Mor včelího plodu

Mor včelího plodu (MVP) je onemocnění mladých včelích larev způsobené bakterií *Paenibacillus larvae*. Jde o grampozitivní, aerobní bakterii tyčinkovitého tvaru o šířce 0,5 μm a délce 1,5 - 6 μm (Bassi *et al.*, 2015; Funfhaus *et al.*, 2018). Tato bakterie vytváří velmi odolné spory, které nejsou pro dospělé včely nebezpečné, avšak pro včelí larvy jsou vysoce infekční (Genersch, 2010). Důvodem je pravděpodobně menší aktivita imunitního systému v porovnání s dospělými včelami, dána nižším počtem buněk hemocytů v hemolymfě a nižší fenoloxidasovou aktivitou (Borba a Spivak, 2017). Nejnáchylnější jsou larvy staré 12 - 36 hodin (Bamrick a Rothenbuhler, 1961). Náchylnost k infekci se snižuje se zvyšujícím se larválním věkem. Larvy staré 48 hodin jsou už většinou rezistentní (Yue *et al.*, 2008).

2.1.1.1 Historie *Paenibacillus larvae*

Od počátku 20. století došlo v pojmenování tohoto bakteriálního patogenu k několika změnám. První bakterie, která byla považována za původce MVP, byla pojmenována jako *Bacillus larvae* (White, 1906). O několik let později byla izolována další bakterie, které byl přiřazen název *Bacillus pulvifaciens* (Katznelson, 1950). Později bylo zjištěno, že se tyto bakterie od jiných bakterií rodu *Bacillus* příliš odlišují a vzniká tak nový rod *Paenibacillus*. Bakterie jsou přejmenovány na *Paenibacillus larvae* a *Paenibacillus pulvifaciens* (Ash *et al.*, 1993). V roce 1996 byla objevena vysoká podobnost mezi

těmito dvěma druhy, proto byly zařazeny do jednoho druhu *Paenibacillus*, avšak do dvou poddruhů – *P. larvae larvae* a *P. larvae pulvifaciens* (Heyndrickx *et al.*, 1996). Nakonec byly *P. larvae larvae* a *P. larvae pulvifaciens* zařazeny do jednoho společného druhu *Paenibacillus larvae* (Genersch *et al.*, 2006).

2.1.1.2 Klasifikace *Paenibacillus larvae*

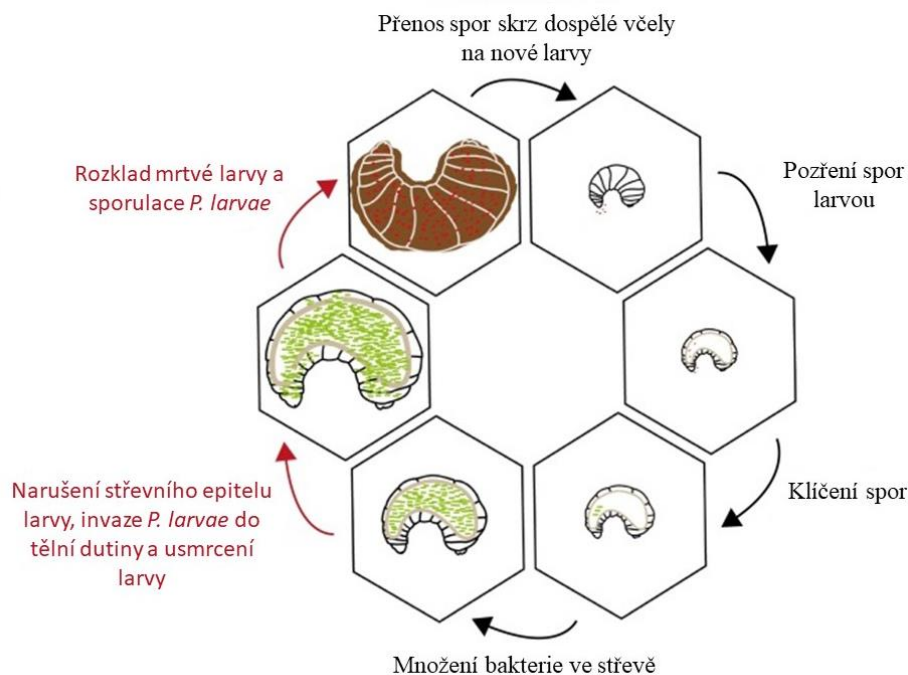
Pomocí molekulární metody polymerázová řetězová reakce (PCR) založené na rozdílech repetitivních elementů ERIC primerů (enterobacterial repetitive intergenic consensus) se zjistilo, že bakterie *P. larvae* je reprezentována čtyřmi různými genotypy, které dostaly název ERIC I, II, III a IV (Genersch *et al.*, 2006). Mezi nejstudovanější genotypy patří ERIC I a II, neboť patří mezi nejrozšířenější. Genotyp ERIC I byl nejčastěji izolován z nemocných včelstev v Evropě a Americe a je považován za „klasický“ genotyp, který způsobuje většinu epidemií MVP na světě. Zatímco ERIC II je rozšířen hlavně v Americe (Genersch, 2010). O genotypech ERIC III a IV není mnoho informací, neboť byly izolovány jen zřídka (Bassi *et al.*, 2015). Kromě lokalizace nálezu se jednotlivé genotypy mezi sebou liší také virulencí a fenotypovými vlastnostmi. Virulence u ERIC I je nejdelší, infikované včelí larvy jsou usmrceny v průběhu 12 dnů, zatímco ostatní tři genotypy dokáží včelí larvy usmrtit už 7. den jejich života. Rozdíly mezi genotypy můžeme vidět také pomocí elektronového mikroskopu. Zatímco povrch spor u ERIC I je hladký, tak u ERIC II je povrch hrbolatý připomínající strukturu mozku a u ERIC III a IV se na povrchu spor tvoří různě velké vyvýšeniny. Odlišnosti pozorujeme taky u zbarvení kolonií. U genotypu ERIC I a IV můžeme vidět bílé až šedě zbarvené kolonie, čímž se odlišují od zbylých dvou genotypů, pro které je charakteristické oranžové až červené zbarvení (Genersch *et al.*, 2006).

2.1.1.3 Průběh nákazy

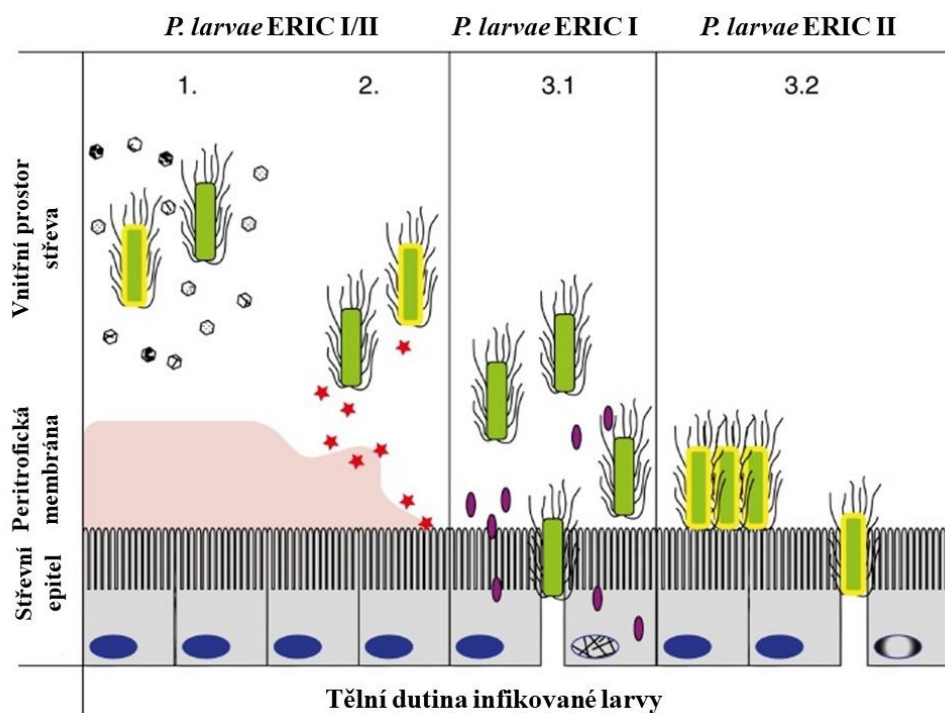
Larva se nakazí pozřením potravy, která může být již kontaminovaná spory prostřednictvím dospělých včel, které se o mladé larvy starají (Poppinga a Genersch, 2015). Krátce na to začnou spory v trávicím traktu klíčit (Obr. 1). Následuje proces masivní proliferace bakterií ve vegetativním stádiu, aniž by docházelo k narušení celistvosti střevního epitelu. Při porovnání zdravé a infikované larvy nepoznáme zatím žádný rozdíl. Během tohoto neinvazivního stádia se bakterie živý jako komenzál, tedy z potravy přijaté larvou (Yue *et al.*, 2008; Djukic *et al.*, 2014). Uvnitř střeva bakterie

vylučuje sekundární metabolity, které napomáhají potlačit přirozenou mikroflóru larvy a také vykazují cytotoxickou aktivitu (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014; Muller *et al.*, 2015). Klíčovým krokem v průběhu patogeneze, kdy dochází k přechodu z neinvazivního stádia do invazivního, je narušení peritrofoické membrány (PM), která vytváří ochranou vrstvu mezi prostorem trávicího traktu a buněk střevního epitelu. PM je tvořena především z chitinových vláken a její hlavní funkcí je chránit střevní epitel před mechanickým poškozením, toxickými látkami, a především před patogeny. Pomocí specifického proteinu PICBP49 vázající chitin, začíná bakterie postupně degradovat vyvíjející se PM (Hegedus *et al.*, 2009; Poppinga a Genersch, 2015). Bakterie tak získávají volný průchod ke střevnímu epitelu, přes který začínají paracelulárním prostorem (tj. mezi buňkami) nekontrolovatelně pronikat až do tělní dutiny (Yue *et al.*, 2008). Mechanismy průniku nejsou u všech genotypů stejné. Genotyp ERIC I využívá k proniknutí přes epitel střeva toxiny Plx1 a Plx2, zatímco u genotypu ERIC II napomáhá k průniku protein SplA exprimován v S-vrstvě bakterie (Obr. 2). Tento protein umožňuje bakterii přichycení se ke stěně střevní buňky (Poppinga a Genersch, 2015). Po proniknutí dochází k postupnému proteolytickému rozkladu celé larvy a následnému usmrcení. Působením proteáz se z uhynulé larvy dále stává nahnědlá, polotekutá a lepkavá hmota (Obr. 3). Ta postupně vysychá a stává se z ní tzv. příškvar. Při jeho vyklížení se dospělé včely kontaminují sporami, které mohou dál rozšířit (Genersch, 2010).

U genotypů s rychlejším nástupem infekce (ERIC II, III a IV) dochází k usmrcení larvy ještě před počátkem metamorfózy, tedy před jejím zavíčkováním. Díky tomu dělnice, které se o mladé larvy starají, stihnou nemocné larvy vynést z úlu před zavíčkováním buňky. Zatímco u genotypu ERIC I dochází k usmrcení larvy až dvanáctý den života, kdy je velká pravděpodobnost, že larva bude už zavíčkovaná, dospělé včely tak budou odstraňovat již zavíčkovaný plod (Rauch *et al.*, 2009).



Obr. 1: Průběh nákazy včelí larvy bakterií *Paenibacillus larvae*. Červené tečky reprezentují bakteriální spory a zeleně jsou vegetativní stádia bakterie. Černé šípky a písmo znázorňují neinvazivní stádium bakterie, červené šípky a červené písmo invazivní. (Převzato a upraveno dle Poppinga a Genersch, 2015).



Obr. 2: Průnik *P. larvae* střevním epitelem pomocí mezibuněčných spojů. 1. Sekundární metabolity působící uvnitř střeva (šestihrany). 2. Chitin degradující protein PICBP49 (červené hvězdy). 3.1 Genotyp ERIC I vylučuje toxiny pro průnik střevním epitelem (fialové ovály). 3.2 Genotyp ERIC II se váže na střevní epitel pomocí proteinu SplA v S-vrstvě (žlutý okraj). (Převzato a upraveno dle Poppinga a Genersch, 2015).



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

2.1.1.4 Přenos a šíření

U včel se uplatňují dva způsoby přenosu a šíření patogenu – horizontální a vertikální, které pak mohou probíhat v rámci jednoho včelstva nebo mezi více včelstvy. Při horizontální cestě dochází k přenosu mezi dospělými včelami, dělnicemi a plodem nebo mezi jednotlivými včelstvy tzv. zalétáváním či loupáním. Zatímco u vertikálního způsobu přenosu se přenáší patogen pouze z matky na plod nebo při rojení mezi jednotlivými včelstvy (Fries a Camazine, 2001).

U MVP není vertikální přenos příliš účinný. Mimo úl dochází k šíření v průběhu rojení, tedy když se včelstvo rozmnožuje. Je-li v úlu hodně včel a málo místa, s velkou pravděpodobností dojde k vytvoření roje nebo více rojů včel, který si k uhnízdění začne hledat nové místo. Tyto roje jsou obvykle vedeny starou včelí královnou, která byla v původním úlu nahrazena novou. Pokud bylo původní včelstvo nakažené, může takto dojít k rozšíření nemoci do jiných oblastí. Avšak tento způsob přenosu spor vyvolá jen zřídka klinické příznaky u nově vznikajícího včelstva (Fries a Camazine, 2001; Fries *et al.*, 2006).

Daleko významnější je u MVP přenos cestou horizontální. Nejčastěji k tomu dochází při „loupání“, kdy je v přírodě pro včely nedostatek potravy (začátek jara nebo v období

konce sezóny, kdy již není dostatek potravních zdrojů). Včely napadají oslabená včelstva a snaží se jim „ukrást“ jejich medné zásoby. Tato včelstva však mohou být oslabena kvůli nemoci. „Včelky zlodějky“ přenáší kontaminovaný med do svého úlu a dochází tak k rozšíření nákazy. Tímto způsobem se nemoc může účinně rozšířit až do vzdálenosti jednoho kilometru. V úlu se pak bakterie jednoduše roznese do všech jeho částí, dostane se na včelí dělnice starající se o mladé larvy, čímž dojde k nakažení a larvy hynou (Fries a Camazine, 2001; Lindstrom *et al.*, 2008b). Uhynulé larvy a příškvary obsahující miliony spor, které se dospělé včely snaží z úlu uklidit a tím se spory šíří dál na zdravé larvy (Poppinga a Genersch, 2015).

Bakterie *P. larvae* může být přenášena i jinými parazity včel, například roztočem *Varroa destructor* (de Rycke *et al.*, 2002).

K šíření MVP může hodně pomoci i samotný včelař. Přemísťuje-li plástve mezi různými úly, u kterých nezná jejich současný zdravotní stav, používá stejné vybavení pro více včelstev, spojuje slabší včelstva se silnějšími nebo má více včelstev na jednom místě, což může mít za následek vykrádání úlů v důsledku nedostatku potravy, z velké pravděpodobnosti může docházet k přenosu nemoci (Fries a Camazine, 2001; Lindstrom *et al.*, 2008a).

2.1.2 Hniloba včelího plodu

Původcem tohoto onemocnění je grampozitivní bakterie *Melissococcus plutonius*, která napadá včelí larvy ještě před zavíčováním (4 – 5 dní staré larvy) a způsobuje jejich smrt. *M. plutonius* na rozdíl od *P. larvae* nevytváří spory a vyskytuje se buď volně, v párech, nebo tvoří řetízky o různé délce. Hniloba včelího plodu (HVP) může být kromě bakterie *M. plutonius* doprovázena také tzv. sekundárními patogeny jako jsou *Paenibacillus alvei*, *Enterococcus faecalis*, *Achromobacter euridice* a *Brevibacillus laterosporus* (Forsgren, 2010).

2.1.2.1 Historie *Melissococcus plutonius*

První bakterie, která byla považována za původce HVP, byla *Bacillus alvei* (Cheshire a Cheyne, 1885). V roce 1912 byla bakterie poprvé popsána a přejmenována na *Bacillus pluton* (White, 1912). O několik let později se dle morfologického hlediska zjistilo, že tato bakterie nepatří do rodu *Bacillus*, ale do rodu *Streptococcus* a byla přejmenována

na *Streptococcus pluton* (Bailey, 1956). K posledním změnám v názvu došlo roku 1998, kdy byla bakterie přejmenována na *Melissococcus plutonius* (Truper a de' Clari, 1998)

2.1.2.2 Sekundární patogeny

Jak už bylo zmíněno, hniloba včelího plodu bývá často doprovázena sekundárními patogeny, které mohou způsobit změnu pachu a vzhledu infikovaných larev. Jedním z nich je bakterie *Achromobacter euridice*, která se vyskytuje jak v larvách infikovaných, tak i v larvách zdravých. Zdrojem bakterie bývá často pyl, který dospělé včely sbírají jako potravu. Přítomnost této bakterie vyvolá u larvy snáz symptomy HVP, než samotná bakterie *M. plutonius*. Hojně vyskytující se bakterií v infikovaných larvách je také *Enterococcus faecalis*, která může mít silné patogenní účinky. Dalším sekundárním patogenem je *Paenibacillus alvei*. Jedná se o saprofytickou, aerobní, sporulující bakterii vyskytující se pouze u klinicky nemocných a uhynulých larev, ve kterých se dokáže rychle množit. V mrtvých larvách se může taky občas vyskytovat *Brevibacillus laterosporus* (Forsgren, 2010).

2.1.2.3 Průběh nákazy

K nakažení larvy dojde prostřednictvím kontaminované potravy. Bakterie se dostane do žaludku, kde dochází jejímu intenzivnímu množení. Původně se myslelo, že dochází k soutěžení o živiny z potravy mezi larvou a bakterií, což by vedlo k následnému vyhladovění larvy (Bailey, 1983). Avšak toto bylo v roce 2004 vyvráceno *in vitro* experimentem, kdy měly infikované larvy dostatek potravy, a přesto došlo k jejich uhynutí. Usmrcení larev musí být proto výsledkem dalších patogenních mechanismů, jako je například průnik bakterie skrze peritrofickou membránu a hostitelskou tkáň (McKee *et al.*, 2003). Po napadení larva umírá většinou čtvrtý až pátý den života, někdy i déle až po zavíčkování. Někteří jedinci mohou dokonce přežít až do stádia zakuklení. Infikovanou larvu poznáme podle zbarvení, které se z perleťově bílé postupně mění na žlutou, hnědou a v posledním stádiu rozkladu až na šedočernou (Obr. 4). U nejmladších mrtvých larev pozorujeme téměř průhlednost s prosvítající tracheální trubicí. Dochází také ke změně umístění larvy v plodové buňce. Místo klasické svinuté polohy je larva různě překroucená nebo natažená podél stěny (Forsgren, 2010; Forsgren *et al.*, 2013; Erban *et al.*, 2017).

2.1.2.4 Přenos a šíření

Hlavním přenašečem bakterií je dospělá včela, která se stará o mladé larvy. Je-li larva infikovaná, včela to pozná a snaží se jí dostat ven z úlu, čímž na sebe bakterie přeneše. Při krmení zdravých larev pak dochází k přenosu a nakažení dalších jedinců. Dalším možným způsobem je „loupení“, kdy včela nesoucí bakterie vletne pro medné zásoby do cizího úlu nebo naopak včela ze zdravého včelstva si odnese kontaminovaný med z nakaženého včelstva. Z těchto důvodů bývá často propuknutí onemocnění spojované s kolonizačními stresovými stavy, jako je nedostatek potravy nebo vody (Forsgren, 2010).

Existují také důkazy, že přenos může nastat kousnutím od parazitního roztoče *Varroa destructor* (Kanbar a Engels, 2003).



Obr. 4: Včelí larvy napadené bakterií *M. plutonius* označené červeným kroužkem (použito se svolením autorky E. Forsgren, Univerzita Uppsala, Švédsko)

2.2 Sporulace bakterií a klíčení bakteriálních spor

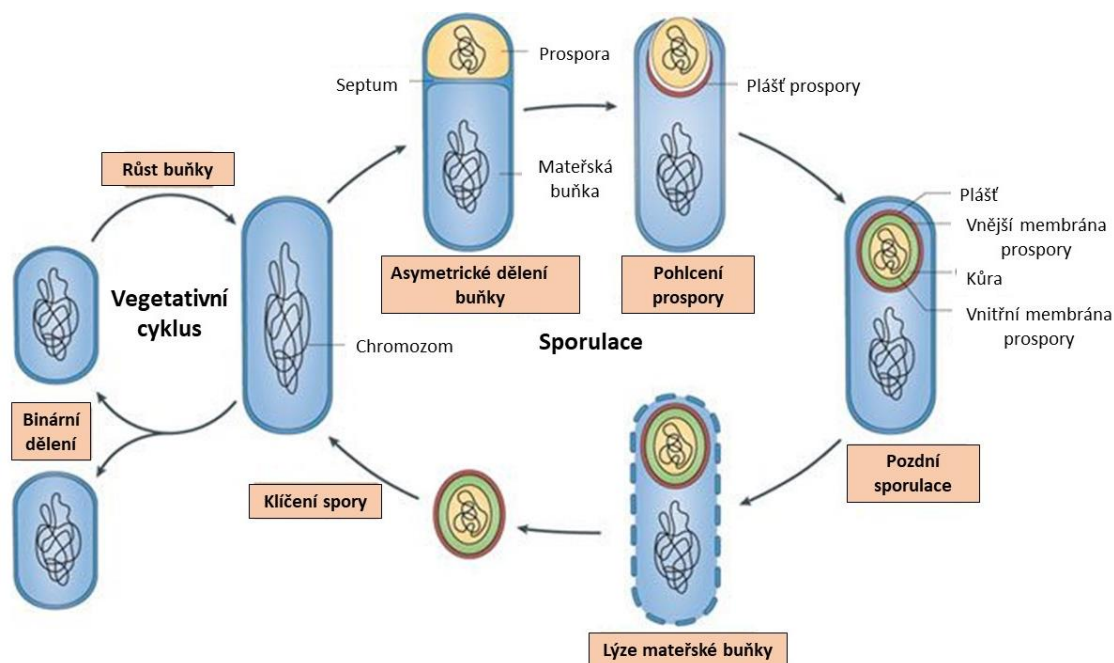
Mikroorganismy jsou schopny se přizpůsobit změnám v jejich životním prostředí. Z důvodu vyčerpání živin potřebných pro přežití se některé bakterie stávají pohyblivé a přemísťují se za zdrojem potravy. Jiné bakterie zas dokáží produkovat enzymy a využívat alternativní zdroje. Často dochází k rychlým změnám v genové exprese, čímž dochází k dočasným fenotypovým změnám buňky, které umožňují přežití. Mnohem sofistikovanější způsob, jak přežít extrémní podmínky, je tvorba endospor charakteristických především pro grampozitivní bakterie. K tomuto složitému vývojovému procesu, zvaném sporulace, dochází často při velkém nedostatku potřebných živin. Umožňuje bakterii vytvářet latentní a vysoce rezistentní buňky k zachování genetické informace v období extrémního stresu. Endospory vznikají a jsou živeny v mateřské buňce, která po čase začne lýzovat a uvolňovat spory do okolního prostředí (Cornell University; McKenney *et al.*, 2013).

Endospory (dále jen spory) jsou schopny přežít podmínky, které by bakterie normálně nepřežily. Vykazují vysokou odolnost vůči extrémním fyzikálním a chemickým vlivům jako jsou vysoké teploty, silné UV záření, vysoušení, chemická poškození či enzymatické štěpení (Cornell University). K jejich přežití bez živin a v drsných podmínkách napomáhá pravděpodobně to, že je jejich metabolismus utlumen a jsou částečně dehydratované. Jak dlouho takto spory dokáží přežít není přesně známo, avšak odhaduje se, že to může být až několik tisíc let. Byly však izolovány životaschopné spory ze vzorků sušených rostlin z roku 1640 nebo spory bakterie *Bacillus anthracis* z laboratoře Luise Pasteura staré 60 let (McKenney *et al.*, 2013).

Jsou známy dvě třídy kmenu Firmicutes, které vytváří spory evolučně zachovalým mechanismem – aerobní Bacillaceae a anaerobní Clostridia. Do těchto tříd spadají patogenní bakterie *B. anthracis* a *Clostridium difficile* a modelový organismus *Bacillus subtilis*. Během sporulace dochází k asymetrickému dělení buňky, replikuje se DNA a do obou vzniklých částí je umístěna kopie genomu buňky. Během následujících 8 až 10 hodin se z menší vzniklé části zvané prespora, vyvine zralá spora schopná chránit genom. Po uvolnění spory do okolního prostředí může takto přetrvávat, dokud se životní podmínky nezlepší nebo začne klíčit zpět do vegetativního stádia (McKenney *et al.*, 2013).

2.2.1 Sporulace bakterie *Bacillus subtilis*

Za příznivých podmínek se *B. subtilis* dělí binárním štěpením přibližně každých 30 minut, kdy vznikají dvě geneticky identické a morfologicky podobné dceřinné buňky (de Hoon *et al.*, 2010; Decker a Ramamurthi, 2017). Dojde-li však k vyčerpání živin, začne se bakterie na počátku své stacionární fáze asymetricky dělit na dvě části, větší mateřskou a menší prosporu (Obr. 5), která se později stává sporou. Jde o první krok sporulace, který je iniciován fosforylací hlavního regulátoru sporulace – transkripčního faktoru Spo0A. Fosforylovaný Spo0A reguluje další geny, které se podílí na asymetrickém rozdělení buňky a aktivaci sigma faktorů specifických pro sporulaci. V dalším kroku mateřská buňka pohlcuje prosporu procesem podobný fagocytóze a postupně dochází k utváření dvojité membrány. Ihned po pohlcení se začínají vytvářet dvě ochranné vrstvy – kůra, složená z peptidoglykanu nacházející se mezi vnitřní a vnější membránou a proteinový plášť vyskytující se na povrchu prospory. Syntéza peptidoglykanových prekurzorů a proteinů pláště probíhá v mateřské buňce. Nakonec je jádro prospory dehydratováno, dochází k lýzi mateřské buňky a uvolnění spor do okolního prostředí (McKenney *et al.*, 2013; Decker a Ramamurthi, 2017). Celý tento proces trvá přibližně 8 až 10 hodin (de Hoon *et al.*, 2010).



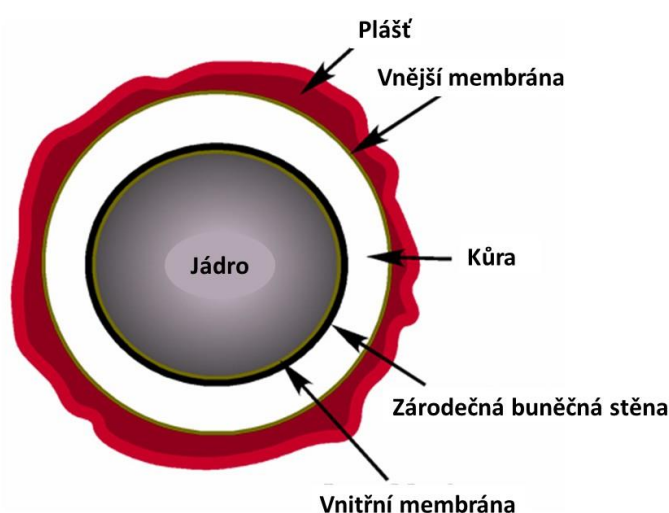
Obr. 5: Proces sporulace bakterie *Bacillus subtilis* (převzato a upraveno dle McKenney *et al.*, 2013)

2.2.2 Struktura zralé spory

Odolnost spor lze částečně vysvětlit jejich jedinečnou buněčnou strukturou. Skládá se z několika vrstev. Nejsvrchnější vrstva, zvaná plášť (Obr. 6), je tvořena hlavně proteiny a poskytuje především chemickou a enzymovou rezistenci. U některých spor (např. bakterie *B. anthracis*) se nad pláštěm vyskytuje ještě exosporium. Pod pláštěm je velmi silná vrstva peptidoglykanu – kůra, která napomáhá v odolnosti proti vysokým teplotám. Další vrstvou je zárodečná buněčná stěna, která se po vyklíčení spory stává buněčnou stěnou bakterie. Poslední nejspodnější vrstvou je vnitřní membrána, která tvoří hlavní bariéru před propustností škodlivých chemických látek do jádra spory, které obsahuje buněčnou DNA, ribozomy a velké množství kyseliny dipikolinové (až 10 % sušiny spory). Kyselina dipikolinová je syntetizována v mateřské buňce a spolu s bivalentními kationty (obvykle Ca^{2+}) je ukládána v jádře prospory, kde způsobuje jeho dehydrataci a mineralizaci. Všechny vrstvy, kromě zárodečné buněčné stěny, jsou v průběhu klíčení odstraněny (Cornell University; Errington, 2003; McKenney *et al.*, 2013).

2.2.3 Germinace bakteriálních spor

Germinace neboli klíčení spor je prvním rozhodujícím krokem při návratu zpět k vegetativnímu růstu a je vyvoláno živinami, které se někdy nazývají jako germinanty. Mezi tyto živiny obecně patří aminokyseliny, sacharidy nebo purinové nukleosidy. Existují také různé kombinace živin, které vyvolají klíčení spor, např. směs asparaginu,



Obr. 6: Struktura bakteriální endospory (převzato a upraveno dle <https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/bacterial-endospores>)

glukosy, fruktosy a K^+ iontů. Během několika vteřin spora začne klíčit a pokračuje v něm i bez přítomnosti germinantů. Dále v průběhu klíčení se z jádra spory uvolní H^+ , monovalentní kationty a Zn^{2+} . Uvolnění H^+ vede ke zvýšení pH jádra z 6,5 na 7,7 potřebné pro metabolismus spory. V dalším kroku dojde k uvolnění kyseliny dipikolinové a Ca^{2+} . Kyselina dipikolinová je nahrazena vodou, což má za následek zvýšení hydratace jádra, která způsobí určitý pokles rezistence vůči vysokým teplotám. Posledními kroky jsou hydrolýza peptidoglykanové kůry a další příjem vody do jádra. Po proteolytickém odstranění proteinů chránící genom dochází k nastartování metabolismu a buňka začíná růst (Setlow, 2003).

Jak už bylo zmíněno, tak typickými germinanty (látky iniciující klíčení spor) u kmenů *Bacillus* a *Clostridia* jsou sacharidy, nukleosidy a aminokyseliny. Avšak o spuštění klíčení spor u bakterie *P. larvae* se toho moc neví. Alvarado *et al.* (2013) testovali schopnost několika metabolitů, které by iniciovali klíčení spor a zjistil, že silné účinky vykazovali kyselina močová a L-tyrosin. Dále testovali jejich purinová analoga indol a fenol a zjistil že vykazují inhibiční účinky vůči klíčení spor. Po methylaci indolu v poloze C3, C5 nebo C7 nedošlo k žádné změně inhibičního účinku, avšak methylace v poloze N1 vedla k inaktivaci inhibice.

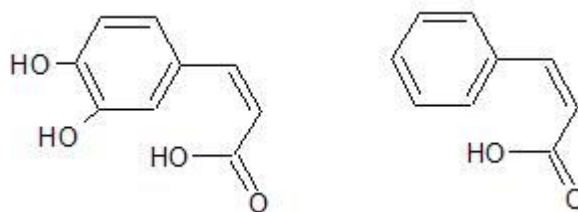
2.3 Přírodní antimikrobiální látky

Přírodní látky jsou díky svým léčivým účinkům využívány již od nepaměti. Existují například důkazy, že Neandrtálci, žijící přibližně před šedesáti tisíci lety, využívali rostlinu z rodu *Alcea*, která je dodnes v některých částech světa stále používána. Biologická aktivita přírodních látek může kromě antibakteriálních účinků zahrnovat také účinky antimykotické, antivirové či antiparazitické. Mnohé mají schopnost působit protizánětlivě nebo antioxidačně. Díky těmto poznatkům dochází k neustálému rozšiřování výzkumu a zkoumání jejich uplatnění v medicíně např. při léčbě infekčních chorob (Kalemba a Kunicka, 2003). Jedním z důvodů využívání přírodních látek s antimikrobiálními účinky je vzrůstající rezistence bakterií proti antibiotikům (Chouhan *et al.*, 2017).

Zdrojem přírodních látek jsou převážně rostliny, které mají schopnost syntetizovat aromatické látky. Tyto látky slouží většinou k ochraně před mikroorganismy, hmyzem nebo býložravci. Některé z nich také způsobují typickou vůni rostlin (terpenoidy) nebo jsou zodpovědné za jejich zbarvení (chinony, třísloviny). Velká část těchto sloučenin patří mezi fenoly nebo se jedná o jejich kyslíkaté deriváty. Rostlinné antimikrobiální látky můžeme rozdělit do několika skupin (Cowan, 1999).

2.3.1 Fenoly a polyfenoly

Jednoduché fenoly a fenolové kyseliny patří do skupiny jednodušších bioaktivních látek tvořených jedním substituovaným fenolovým kruhem. K nejběžnějším zástupcům řadíme kyselinu skořicovou a kávovou (Obr. 7), jejichž struktura je odvozena od fenylypropanu. Cowan (1999) uvádí, že umístění a počet hydroxylových skupin na fenolovém kruhu souvisí s mírou jejich toxicity vůči mikroorganismům. Se zvyšujícím se počtem hydroxylových skupin toxicita roste. Fenoly, mající v poloze C3 postranní řetězec v nižším oxidačním stupni a bez přítomnosti kyslíku, nazýváme esenciální oleje, které se vyznačují antimikrobiálními účinky (Cowan, 1999).



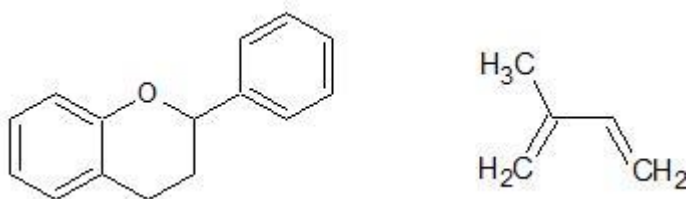
Obr. 7: Struktury kyseliny kávové a kyseliny skořicové

Chinony jsou aromatické sloučeniny se dvěma vázanými karbonylovými skupinami. Kromě toho, že jsou zdrojem stabilních volných radikálů, mají také schopnost vytvářet s nukleofilními aminokyselinami v proteinech ireverzibilní komplexy, což vede k inaktivaci proteinu a ztrátě jeho funkce. V bakteriální buňce reagují pravděpodobně s povrchovými adheziny, peptidy buněčných stěn a enzymy vázanými v membráně. Díky této schopnosti se chinony jeví jako velmi účinné látky s antimikrobiálními účinky (Cowan, 1999).

Další skupinou jsou flavonoidy, které se na rozdíl od předchozích dvou skupin řadí mezi polyfenoly. Jedná se o sekundární metabolity produkované ve všech vyšších rostlinách, jejichž role je chránit rostlinu před patogeny a reagovat na různé stavy abiotického stresu (Daglia, 2012). Co se struktury týče, jde o hydroxylované fenolické sloučeniny odvozené od kyslíkatého heterocyklu flavanu (Obr. 8) tvořeného ze dvou benzenových kruhů spojených heterocyklickým pyranem. Jejich antimikrobiální aktivita je pravděpodobně dána schopností vytvářet komplexy s extracelulárními rozpustnými proteiny a složkami buněčné stěny bakterie. Mikrobiální membránu dokážou narušit také lipofilní flavonoidy (Bravo, 1998; Cowan, 1999).

2.3.2 Terpenoidy a esenciální oleje

Esenciální oleje jsou přírodní těkavé látky získané jako sekundární metabolity rostlin a vyznačují se různými biologickými účinky (antimikrobiální, protizánětlivé, antivirové, antioxidantní, odpuzovače hmyzu) (Alonso-Salces *et al.*, 2017). Hlavní složkou jsou terpeny ($C_{10}H_{16}$), jejichž základní skelet je tvořen izoprenovou jednotkou (Obr. 6). Mohou se vyskytovat jako diterpeny (C_{20}), triterpeny (C_{30}), tetraterpeny (C_{40}) či jako hemiterpeny (C_5) a seskviterpeny (C_{15}). Pokud terpeny ve své struktuře obsahují ještě jiný prvek, nejčastěji kyslík, nazývají se terpenoidy. K nejznámějším zástupcům patří kafr (monoterpen), farnesol a artemisinin (seskviterpeny) (Cowan, 1999).



Obr. 8: Struktury flavanu a isoprenu

Terpeny a terpenoidy dokáží potlačit růst bakterií, hub, virů i prvoků. Jejich mechanismus účinku není zcela známý, ale pravděpodobně je způsoben lipofilními vlastnostmi terpenů, účinností jejich funkčních skupin a jejich rozpustností ve vodě. Ve fosfolipidové membráně způsobují inhibici transportu elektronů nebo translokaci proteinů, což vede k narušení bakteriální membrány (Cowan, 1999; Dorman a Deans, 2000).

2.3.3 Alkaloidy

Alkaloidy jsou velká a strukturně velmi různorodá skupina přírodních látek mikrobiálního, rostlinného a živočišného původu. Jedná se o heterocyklické sloučeniny obsahující většinou jednu molekulu dusíku. Jsou schopné odstraňovat toxický singletový kyslík (vedlejší produkt fotosyntézy) a také působí jako fytoalexiny (chrání rostlinu před infekcí). Díky svým rozmanitým účinkům jsou hojně využívány v medicíně jako například analgetika (kodein), stimulanty centrální nervové soustavy (brucín) či jako antihypertenziva (efedrin). Jejich účinky inspirovaly vývoj několika antimikrobiálních léčiv a u některých léků tvoří alkaloidy základní strukturu (Cushnie *et al.*, 2014).

Prvním lékařsky užitečným alkaloidem izolovaným na počátku 19. století byl morfin. K důležitým zástupcům alkaloidů patří také berberin, který je potencionálně účinný proti trypanozomám a plasmodiím. Jeho mechanismus účinku je připisován schopnosti vmezeřovat se do bakteriální DNA (Cowan, 1999).

2.3.4 Propolis

K přírodním látkám mající antibakteriální účinky patří také propolis, jehož původem jsou rostlinné pryskyřice. Díky jeho mechanickým vlastnostem jej včely využívají jako stavební materiál k zadělávání trhlín v úlu, ale taky jako „dezinfekční prostředek“ kvůli jeho antibakteriálním vlastnostem. Jeho složení závisí jak na zdroji pryskyřice, tak i na geografickém původu. Mezi hlavní složky propolisu, které jsou taky zodpovědné za antimikrobiální účinky, patří flavonoidy, aromatické kyseliny, diterpeny a fenoly (Silici a Kutluca, 2005; Bilikova *et al.*, 2013). Zájem o přírodní látky v boji proti včelím patogenům velmi stoupá a náhrada pesticidů a antibiotik za včelí propolis se jeví jako dobrá alternativa. Simone *et al.*, 2009 ve své studii prokázali, že včelstva ošetřovaná propolisovým postřikem, obsahovala ve svých úlech méně bakteriálních patogenů než kontrolní úly bez ošetření. Bylo provedeno několik *in vitro* testů (difuzní testy,

stanovení minimální inhibiční koncentrace) na antibakteriální aktivitu propolisového extraktu proti *P. larvae* a ve všech experimentech docházelo k inhibici růstu *P. larvae* (Antunez *et al.*, 2008; Bastos *et al.*, 2008).

2.3.5 Mateří kašička

Mateří kašička (RJ, royal jelly) je mléčná bílá tekutina sekretovaná hltanovými a mandibulárními žlázami dělnic. Hlavní složky RJ a délka krmení určuje, zda se larvy vyvinou na krátkožijící neplodné dělnice nebo dlouhožijící matku. Délka života dělnice je přibližně 6-8 týdnů (letní generace) nebo 5-8 měsíců (zimní generace), zatímco matka, která je stále živena RJ, může žít čtyři až pět let. I když jsou včelí matka a dělnice geneticky totožné, značně se liší ve svých fenotypových, fyziologických a funkčních vlastnostech. Zatímco larvy matek jsou krmeny pouze mateří kašičkou, larvy dělnic a trubců jsou krmeny mateří kašičkou obohacenou o pyl a med. Je tedy zřejmé, že RJ má značný vliv na diferenciaci larev do subpopulací dělnic a matky (Vezeteu *et al.*, 2017; Ramanathan *et al.*, 2018). Mezi hlavní složky RJ patří sacharidy, peptidy, bílkoviny, tuky a sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, které spolu s peptidy hrají hlavní roli v boji proti patogenům. Prvními objevenými látkami s antimikrobiální aktivitou byly kyselina 10-hydroxy-2-decenová a antimikrobiální peptid defensin1 (někdy označovaný jako royalisin). Proti gramnegativním bakteriím nemá defensin1 žádný účinek (Fujiwara *et al.*, 1990), avšak proti grampozitivním bakteriím vykazoval specifickou aktivitu i při nízkých koncentracích (Fujiwara *et al.*, 1990). Dalšími identifikovanými proteiny v mateří kašičce jsou apalbuminy, konkrétně nejčastěji vyskytující se apalbumin-2 a apalbumin-2a. Antimikrobiální aktivita proti *P. larvae* byla však zjištěna jen u apalbuminu-2a (Bilikova *et al.*, 2009). Všechny tyto hlavní proteiny spadají do jedné velké rodiny označované jako MJRPs (major royal jelly proteins) a tvoří až 80 % všech proteinů mateří kašičky (Vezeteu *et al.*, 2017; Alonso-Salces *et al.*, 2017). Celkem bylo identifikováno 9 skupin proteinů označené MJRP1 – 9, které jsou kódovány devíti různými geny (Ramanathan *et al.*, 2018).

První identifikovaný a zároveň nejčastěji vyskytující se protein v RJ je MJRP1, jehož alternativní názvy mohou být apalbumin 1 nebo royalactin. Monomerní forma tohoto proteinu vyvolává fyziologické změny, které vedou k diferenciaci larvy na včelí matku, zkracuje vývojový čas a zvětšuje velikost těla a vaječnicků. Dalším velmi častým zástupcem mateří kašičky je peptid defensin1 vyznačující se specifickou antibakteriální

aktivitou proti bakterii *P. larvae* způsobující mor včelího plodu (Ramanathan *et al.*, 2018).

2.3.6 Med

Med je svoji antimikrobiální aktivitou známý už od starověku, kdy byl používán k léčbě ran a jako prevence před infekcí. S nástupem antibiotik se však od klinického využití medu upustilo. Nyní kvůli zvyšující se bakteriální rezistenci proti antibiotikům zájem o med s antimikrobiálními účinky opět stoupá (Kwakman a Zaat, 2012).

Med je tvořen z 80 % cukry, především glukosou a fruktosou, v menší míře pak sacharosou a maltosou. Vysoká koncentrace cukrů v kombinaci s nízkým obsahem vody (méně jak 18 %) vede ke vzniku osmotického stresu, který se značně podílí na antimikrobiální aktivitě medu. Mezi antimikrobiální sloučeninu medu patří také peroxid vodíku, který vzniká spolu s glukonovou kyselinou přeměnou z glukosy enzymem glukosaoxidasa (EC 1.1.3.4). Tento enzym je v medu přítomen díky včelám, u kterých se přirozeně vyskytuje v hltanových žlázách. Při tvorbě medu jej včely vylučují do květového nektaru. Roli v antimikrobiální aktivitě hraje také pH medu, které je kvůli přítomnosti organických kyselin, zejména kyseliny glukonové, poměrně kyselé (3,2 - 4,5) (Molan, 1992; Kwakman a Zaat, 2012).

K hlavním významným antimikrobiálním složkám patří také defensin1 a methylglyoxal (MGO) vyskytující se především v manukovém medu, ale v malé míře také v medu Revamil1. Tyto dva medy patří mezi hlavní medy používané v klinické praxi. Zatímco manukový med je produkován včelami sbírající nektar ze dřeviny zvané manuka (balmín košťatý, *Leptospermum scoparium*) volně rostoucí na Novém Zélandu a v Austrálii, tak zdrojem medu Revamil1 jsou rostliny manuka pěstované ve skleníkách (Kwakman a Zaat, 2012; Cornara *et al.*, 2017).

Vysoká koncentrace MGO v manukovém medu je způsobena přeměnou dihydroxyacetonu vyskytující se v nektaru květů *L. scoparium* ve vysoké koncentraci. Tato konverze vzniká neenzymatickou cestou při skladování a dozrávání medu (Kwakman a Zaat, 2012). Antimikrobiální peptid defensin1 byl prvně izolován v mateřích kašičce (Fujiwara *et al.*, 1990), avšak Kwakman *et al.* (2010) zjistili, že se vyskytuje také v medu, kde přispívá k jeho antimikrobiální aktivitě. Defensin1 je produkován hltanovými žlázami včelích dělnic a sekretován do nektaru či medovice při tvorbě medu (Kwakman *et al.*, 2010).

K neperoxidovaným sloučeninám v medu můžeme zařadit i fenoly pocházející z rostlinného nektaru. Avšak Molan (1992) zjistil, že aktivita jednotlivých fenolů izolovaných z medu je poměrně nízká, proto jejich účinek k celkové antimikrobiální aktivitě medu zůstává nejasný (Kwakman a Zaat, 2012). V Malajsii vědci objevili, že některé fenolické frakce vykazují antimikrobiální aktivitu, ale přesná struktura sloučenin zodpovědných za tuto aktivitu není známá (Aljadi a Yusoff, 2003).

2.4 Řasa *Chlorella* spp.

Řasy jsou mikroskopické fotosyntetické organismy vyskytující se v mořské i sladkovodní vodě. Jedná se o velmi rozmanitou skupinu prokaryotických a eukaryotických mikroorganismů s jednobuněčnou nebo jednoduchou mnohobuněčnou strukturou, která jim umožňuje rychlý růst i za nepříznivých podmínek. Díky své jednoduché struktuře dokážou řasy při fotosyntéze využívat energii ze slunečního záření mnohem rychleji a efektivněji než jiné rostliny (Baicha *et al.*, 2016).

Jednou z možností, jak můžeme řasy rozdělit, je na základě jejich pigmentace – zelené řasy (Chlorophyta), červené řasy (Rhodophyta) a hnědé rozsivky (Bacillariophyta). Dále máme řasy autotrofní a heterotrofní. Autotrofní řasy pro svůj růst využívají anorganické látky (CO₂, dusičnanové a fosfátové soli) a světlo. Můžeme mít fotoautotrofy jejichž zdrojem energie je sluneční záření a chemoautotrofní řasy, které získávají energii oxidací anorganických látek. Na rozdíl od autotrofních řas, heterotrofní řasy jsou nefotosyntetické a pro svůj růst potřebují externí zdroj organických látek. Existují také řasy, které mohou využívat různé zdroje energie a uhlíku. Tyto řasy mohou být fototrofní, heterotrofní nebo obojí a jako zdroj uhlíku využívají CO₂ a organické sloučeniny. Těmto řasám se říká mixotrofní (Baicha *et al.*, 2016).

2.4.1 Taxonomické zařazení

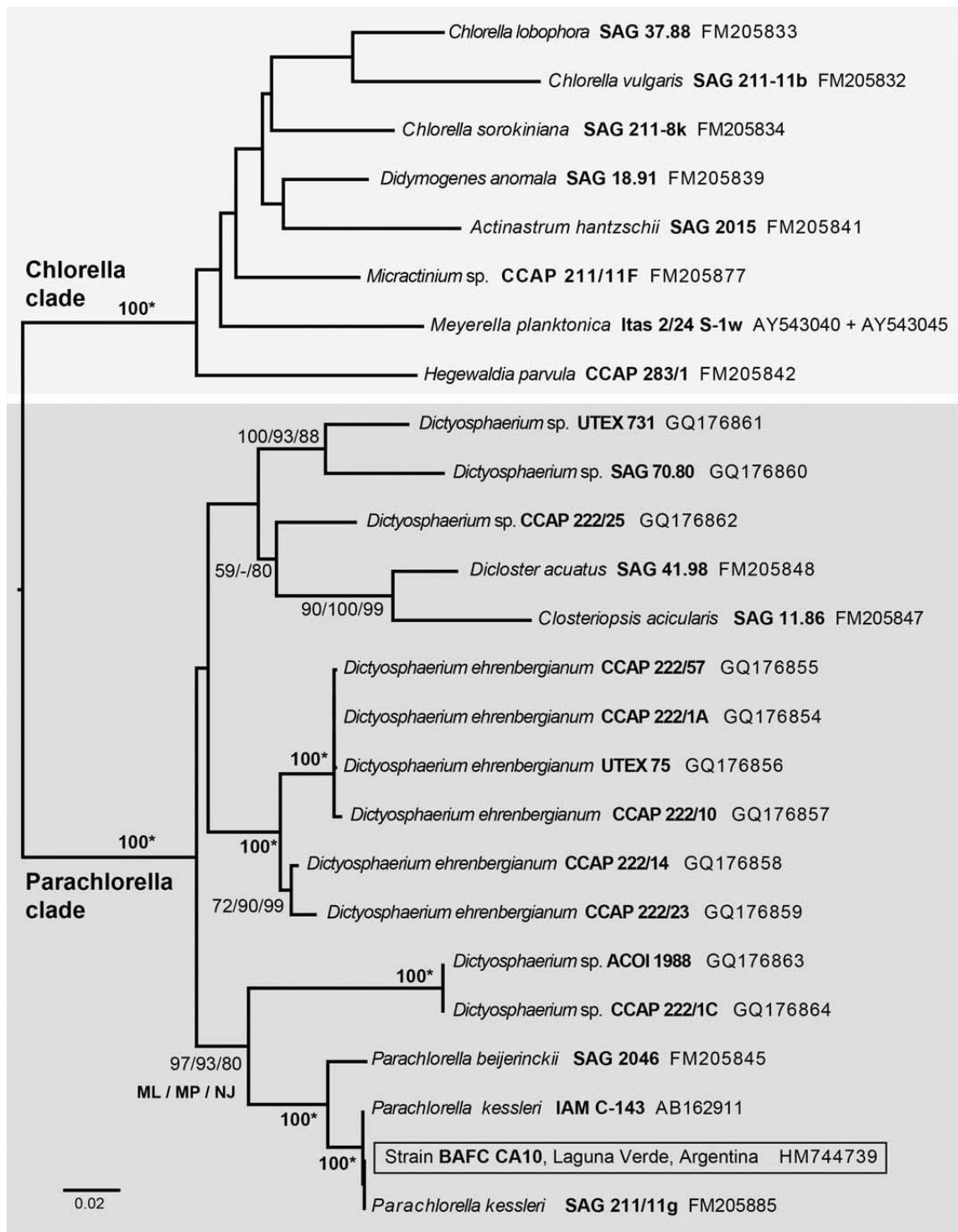
Rod *Chlorella* patří mezi nejznámější a nejstudovanější skupinu mikroskopických řas. Jedná se převážně o sladkovodní ubikvitní neboli všudypřítomnou jednobuněčnou řasu, která patří do oddělení Chlorophyta – zelené řasy, třídy Trebouxiophyceae. Některé druhy mohou být i mořské, symbiotické či suchozemské. Pomocí fyziologických a biochemických vlastností, ultrastruktury a molekulárních dat (18S rRNA) dospěli Friedl (1995) a Huss *et al.* (1999) k závěru, že se *Chlorella* v rámci Chlorophyta dělí do dvou tříd – Trebouxiophyceae a Chlorophyceae. Současně navrhli, aby se do první třídy zařadil tzv. pravý rod *Chlorella* zastoupen pouze pěti druhy - *Ch. vulgaris*, *Ch. pyrenoidosa*, *Ch. lobophora*, *Ch. sorokiniana* a *Ch. kessleri*. Základním společným znakem těchto pěti druhů je přítomnost glukosaminu jako hlavní složky buněčné stěny a dvojitý thylakoid rozdělující matrix pyrenoidu (bílkovinné tělísko obsahující aktivní enzym ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa, zkráceně RUBISCO) na dvě části. Dále do této třídy patří ještě druhy *Ch. protothecoides*, *Ch. ellipsoidea*, *Ch. krabilis*, *Ch. saccharophila* a *Ch. luteo-viridis*. Do třídy Chlorophyceae pak podle tohoto navrženého

systemu patří *Ch. zofingiensis* a *Ch. homosphaera*. Dřívější fylogenetické studie ukázaly, že morfologické znaky, typické pro rod *Chlorella*, se vyskytují i u dalších liniích v rámci třídy Trebouxiophyceae a Chlorophyceae, proto se v některých literaturách objevuje výraz „*Chlorella-like*“ (tedy něco jako *Chlorella*-podobný), který bývá v kontextu spojen s druhy, kmeny nebo právě morfologickými a jinými znaky (Neustupa *et al.*, 2009). Zástupci rodu *Chlorella*, ze třídy Trebouxiophyceae, se řadí do čeledi Chlorellaceae, která se rozděluje na dvě sesterské skupiny – *Parachlorella* (*Parachlorella*-clade) a *Chlorella sensu stricto* (*Chlorella*-clade) (Krienitz *et al.*, 2004). Toto rozdělení bylo vytvořeno za pomoci analýz založených na ultrastruktuře, zejména na syntéze buněčné stěny autospor u druhů obou skupin (Yamamoto *et al.*, 2005) a je v současné vědecké sféře přijatelné (Obr. 9).

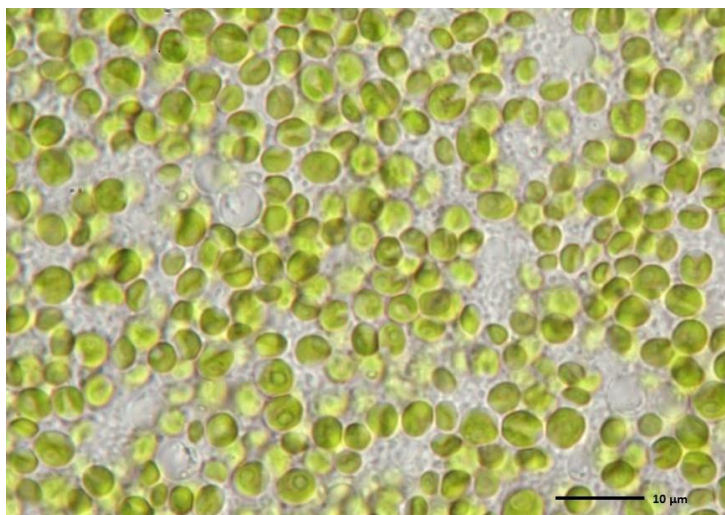
2.4.2 Tvar a struktura buňky

Buňky řas rodu *Chlorella* bývají většinou kokální, kulovitě, sférického až elipsoidního tvaru o rozměrech 5 – 10 μm (Obr. 10). V závislosti na řadě faktorů (stáří, živiny, environmentální či kultivační podmínky) se u stejného druhu může velikost i tvar jednotlivých buněk mírně lišit. Často žijí samostatně, ale mohou vytvářet i kolonie při maximálním počtu 64 buněk a většinou bez slizového obalu. Bičíky se u řas v žádné fázi buněčného cyklu netvoří (Bock *et al.*, 2011).

V každé buňce se nachází jedno velké kulovité jádro a jeden pyrenoid, který však může chybět (Bock *et al.*, 2011). Je-li pyrenoid přítomen, je uložen centrálně a v jeho okolí se vyskytuje homogenní matrix z granulárních škrobových zrn, kterou prochází dva páry thylakoidních lamel (Němcová a Kalina, 2000). Nedílnou součástí buňky je taky jedna mitochondrie a mikrotěličko nacházející se v blízkosti pyrenoidu. V místech, kde mitochondrie prochází skrze chloroplast, se vytváří trojrozměrná retikulární síť, která je pro jednobuněčné organismy z říše Plantae poměrně běžná (Atkinson *et al.*, 1972). V jednom chloroplastu, který každá buňka obsahuje, jsou uložena základní fotosyntetická barviva chlorofyl *a* a *b* a dále pak lutein, β -karoten, neoxantin a violaxantin. Na povrchu buňky se nachází buněčná stěna, která tvoří přibližně 13,6 % suché hmotnosti buňky. Tloušťka buněčné stěny závisí na rychlosti jejího růstu. Čím pomaleji roste, tím jsou stěny buňky tlustší (Němcová a Kalina, 2000). Pomocí elektronového mikroskopu můžeme buněčnou stěnu pozorovat jako dvě vrstvy, které spolu s dalšími složkami stěny vytváří kontinuální matrix (Northcote *et al.*, 1958).



Obr. 9: Nejpravděpodobnější fylogenetický strom rodu *Chlorella*. Za každým názvem druhu je název příslušného kmene a přístupové číslo do databáze GenBank. Čísla jednotlivých uzlů představují bootstrap hodnoty (stupeň podpory jednotlivých větvení vzhledem k vstupním datům) pro metody maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP) a neighbor joining (NJ). 100* znamená 100% podpoření všemi třemi metodami (převzato od Juárez *et al.*, 2011).



Obr. 10: Fotografie buněčné kultury řasy druhu *Chlorella sorokiniana* (převzato z <http://botany.natur.cuni.cz/algo/database/node/104>).

Průměrné zastoupení jednotlivých složek buněčné stěny je následující:

- proteiny (27 %)
- lipidy (9,2 %)
- α -celulóza (15,4 %)
- hemicelulóza (31 %)
- glukosamin (3,3 %)
- popelovina obsahující železo a vápník (5,2 %).

V porovnání s buněčnou stěnou u jiných rostlinných buněk je obsah proteinů poměrně vysoký a některé mohou být seskupeny ve formě glykoproteinů i s hemicelulózou. Hemicelulóza udává tvar buňky, zajišťuje její pevnost a obsahuje hlavně polysacharid galaktosu, dále pak manosu, arabinosu, xylosu a rhamnosu. Hlavními zástupci sacharidů α -celulózy jsou galaktosa, arabinosa, manosa, xylosa a v závislosti na obsahu glukosy také rhamnosa (Atkinson *et al.*, 1972).

2.4.3 Pozitivní účinky řasy *Chlorella* spp.

Díky různým fyziologickým, biochemickým a molekulárním strategiím, jsou řasy velmi odolné vůči stresu a jsou schopny produkovat řadu bioaktivních látek jako jsou organické kyseliny, sacharidy, proteiny, peptidy, aminokyseliny, enzym či antibiotika (Skulberg, 2014). Tyto látky vykazují několik pozitivních účinků na zdraví člověka i zvířat. Jedná se např. o detoxikaci, regeneraci, posílení imunitního systému nebo podporu krvevorbny. Podle některých autorů se *Chlorella* označuje jako "doplňěk energie a vitality" s terapeutickými vlastnostmi, které obecně zlepšují zdraví organismu,

zejména posilují imunitní systém a zvyšují tělesnou odolnost proti infekcím (Cebotari *et al.*, 2017). Také mohou běžnou stravu obohacovat o řadu minerálů či vitamínů, proto se často užívají jako doplňky stravy. Nejčastěji v podobě prášku, tablet, kapslí či tekutin nebo se přidávají přímo do běžných potravin a nápojů (těstoviny, chleba, sušenky, čaje, pivo, jogurty apod.) Mezi komerčně nejpoužívanější rody ze skupiny zelených řas (Chlorophyta) patří *Botryococcus*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Parietochloris* a *Scenedesmus*. S růstem celkové populace a zvyšujícím se zájmem o zdravý životní styl, jsou řasy účelově a masově kultivovány (Becker, 2004; Cardozo *et al.*, 2007).

2.4.3.1 Základní živiny

Jeden z hlavních důvodů, proč se začalo přemýšlet o řase *Chlorella* jako o unikátním doplňku stravy, je vysoký podíl **proteinů** v biomase (až 58 %). Jejich obsah je až třikrát větší než v hovězím a kuřecím mase a dvacetkrát větší než v rýži nebo bramborech. Tyto proteiny obsahují všechny aminokyseliny, které jsou pro člověka i zvířata esenciální (Tab. 1), proto je jejich nutriční hodnota poměrně vysoká. Díky jejich malé

Tab. 1: Procentuální zastoupení esenciálních aminokyselin u řasy *Chlorella* spp. (dle Bewicke a Potter, 1984).

Název aminokyseliny	Zkratka	% suché biomasy <i>Chlorella</i> spp.	Hlavní účinky
fenylalanin	Phe	4,03	proti únavě, depresím, bolesti, produkce kolagenu
histidin	His	1,55	esenciální v dětství
izoleucin	Ile	4	proti ochabování svalstva
leucin	Leu	6	proti bolesti, podpora hojení proti oparům, virům, produkce kolagenu a protilátek
lysin	Lys	6,09	eliminace těžkých kovů
methionin	Met	1,55	posílení imunity, produkce kolagenu pro klidný spánek, mentální zdraví - produkce serotoninu
tryptofan	Trp	1,27	
valin	Val	4,58	neurotransmitter

molekulové hmotnosti jsou proteiny z řas, v porovnání s živočišnými proteiny lépe a rychleji vstřebávány trávicím traktem. Řasy jsou také schopny produkovat proteiny až s padesátkrát větší efektivitou než jiné plodiny bohaté na proteiny (např. sója) (Lee a Rosenbaum, 1987). Při pravidelné konzumaci této řasy je zajištěna stabilní hladina cukru v krvi a organismus tak nemá sklon k hypoglykémii (Pitchford, 2003).

Další nutričně významnou složkou řas jsou **sacharidy**. Mezi důležité patří zásobní polysacharid β -1,3-glukan, který patří taky do komplexu látek známých pod zkratkou CFG (Chlorella Growth Factor, viz níže). Dokáže podporovat produkci interferonu a makrofágů, tedy složek imunitního systému, čímž dochází k pohlcování volných radikálů a organismus je tak lépe chráněn před virovými a nádorovými nemocemi. Pro své hydratační a regenerační vlastnosti bývá tento glukan součástí i kosmetických přípravků (Posten a Walter, 2012).

Lipidy a mastné kyseliny (MK) jsou další důležitou složkou řas. Mají zde funkci zásobní a také jsou to hlavní komponenty buněčných membrán. Na základě chemické struktury můžeme MK rozdělit do dvou skupin – nasycené a nenasycené. Nasycené MK jsou považovány za zdraví nebezpečné, neboť zvyšují hladinu cholesterolu a negativně působí na kardiovaskulární systém. Nenasycené MK dělíme dále na mononenasycené a polynenasycené, které mají na organismus spíše neutrální vliv, avšak konzumace trans-nenasycených MK má výrazně negativní účinek (Tvrzicka et al., 2011).

Řasy rodu *Chlorella* jsou za určitých environmentálních podmínek (světlo, teplota, pH) schopny ve svých buňkách shromažďovat poměrně velké množství polynenasycených MK (až 60 % suché hmotnosti), které jsou pro zdraví člověka velmi důležité. Nejen že přispívají ke snižování cholesterolu v krvi, ale také mají antikoagulační a antiarytmické účinky a příznivě působí na kardiovaskulární systém. Mezi nejdůležitější patří esenciální omega 3- a 6-nenasycené MK. Nejvíce zastoupené jsou u řasy *Chlorella* kyselina linolová, α -linolová, γ -linolová a palmitová (Sansawa et al., 2006; Bishop a Zubeck, 2012).

Dále *Chlorella* obsahuje přes 20 **vitamínů** a řadu **minerálů**. Celkové množství je přibližně 10 % sušiny. Nejdůležitější vitamíny a minerály jsou shrnuty v Tabulce 2. Pro srovnání jsou uvedena ještě ruducha *Porphyra* (česky řasa nori) používaná pro přípravu Sushi pokrmu.

Na detoxikaci a pro podporu správné činnosti trávicího ústrojí má značný podíl **vláknina**, která u *Chlorelly* tvoří 5 % suché biomasy a nachází se v buněčné stěně (Bishop a Zubeck, 2012).

2.4.3.2 Specifické bioaktivní látky

Jednou z hlavních složek vyšších rostlin, sinic a řas je **chlorofyl**. Jedná se o zelený pigment rostlin, který má na člověka velmi příznivé účinky. Už samotný název *Chlorella* napovídá, že tato řasa patří mezi nejbohatší zdroje chlorofylu z celé říše rostlin (Plantae). Jeho množství může často přesahovat i 7 % z celkové buněčné hmotnosti, což je až desetkrát víc než u sinice *Spirulina*. U potravin obsahující chlorofyl se jeho obsah pohybuje okolo 1 – 4 % z celkové hmotnosti (Bewicke a Potter, 1984).

Nejdůležitější funkcí chlorofylu jsou detoxikační účinky. Napomáhá vylučovat z těla těžké kovy jako jsou arsen, kadmium, měď, olovo a další látky pro tělo toxické. Dále chlorofyl zabraňuje vzniku zubního kazu, eliminuje zápach z úst a také urychluje hojení ran, neboť inhibuje růst bakterií. Působí i proti vředům a nejrůznějším zánětům (žaludku, střeva, kůže). Pozitivní vliv má i na produkci vitamínů A, E a K, kdy aktivuje enzymy nutné pro produkci těchto vitamínů. Chlorofyl by měl být zařazen také do jídelníčku těch, kteří trpí vysokým krevním tlakem, onemocněním jater, anémií nebo zácpou (Pitchford, 2003).

Karotenoidy jsou většinou žluté nebo oranžové pigmenty rozpustné v tucích, jejichž chemická struktura vychází z izoprenových jednotek. Rozdělují se na dvě základní skupiny – karoteny, které obsahují pouze uhlovodíky a xantofyly, což jsou deriváty karotenů obsahující ve své struktuře molekulu kyslíku. Nejdůležitějším zástupcem je β -karoten, který je nejen zdrojem vitamínu A, ale také patří mezi významné antioxidanty. Pohlcováním reaktivních forem kyslíku v buňkách potlačuje oxidativní stres, čímž pomáhá předcházet vzniku různých chronických chorob včetně rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění či osteoporózy. Nejlepším producentem β -karotenu je zelená řasa *Dunaliella salina*, která obsahuje až 10 % v sušině. β -karoten se dá vyrábět i synteticky, ale jeho účinnost není tak vysoká jako z přírodních zdrojů, a navíc jeho cena je poměrně vysoká (přibližně 2500 USD za jeden kilogram čistého β -karotenu). Z těchto důvodů se jeho získávání z řasové biomasy stává ještě atraktivnější (Baky a El-Baroty, 2013).

Tab. 2: Zastoupení vitamínů a minerálů u řasy *Chlorella* a ruduchy *Porphyra* (Nori) (a - Bewicke a Potter, 1984; b - MacArtain *et al.*, 2007).

	Název	Množství suché biomasy na 100 g	
		<i>Chlorella</i> spp. ^a	<i>Porphyra umbicicalis</i> ^b
Vitamíny rozpustné v tucích	β-karoten – A	180 mg	23,83 mg
	tokoferol – E	10,5 mg	1,4 mg
	kalciferol – D	0,73 mg	neuveдено
	fylochinon – K1	3,21 mg	neuveдено
Vitamíny rozpustné ve vodě	thiamin – B1	2,56 mg	0,96 mg
	riboflavin – B2	4,8 mg	3,4 mg
	niacin – B3	23,8 mg	8,95 mg
	kys. pantotenová – B5	4,68 mg	neuveдено
	pyridoxin – B6	2,4 mg	1,5 mg
	kys. listová – B9	1,3 mg	12,5 mg
	kobalamin – B12	0,42 mg	0,029 mg
	kys. L-askorbová – C	34 mg	161 mg
	biotin – H	0,39 mg	neuveдено
	Minerály	draslík	952 mg
fosfor		959 mg	720 mg
hořčík		315 mg	233,9 mg
jód		0,6 mg	0,54 mg
mangan		4,2 mg	2,53 mg
měď		0,08 mg	0,57 mg
sodík		54 mg	728,2 mg
vápník		450 mg	359 mg
zinek		71 mg	3,29 mg
	železo	167 mg	10,5 mg

Ze skupiny xantofylů je důležitý lutein, který tvoří až 50 % všech obsažených karotenoidů. Je významný zejména v prevenci okulární degenerace (poškození centrální části oční sítnice) a šedého zákalu (Bishop a Zubeck, 2012).

Chlorella růstový faktor (CGF – Chlorella growth factor) je ve vodě rozpustný komplex, který tvoří u řasy *Chlorella pyrenoidosa* přibližně 5 % celkové buněčné hmotnosti (Merchant a Andre, 2001). Je bohatý zejména na nukleové kyseliny DNA a

RNA, ale dále obsahuje taky proteiny (56,6 %), volné aminokyseliny (42,59 %), peptidy, vitamíny (1,7 %), minerály a sacharidy (4,8 % - hlavně glukosu, ale i manosu, rhamnosu, arabinosu, galaktosu, xylosu) (Bewicke a Potter, 1984; Han *et al.*, 2004).

CGF byl poprvé izolován v 50. letech doktorem Fujimaki v Tokyu, kde až následné experimenty prokázaly, že je tento komplex látek zodpovědný za rychlý růst a dělení buněk u řasy *Chlorella*. První pokusy byly prováděny na mláďatech krys, králíků, slepic a prasat, kterým byla do krmiva přidávána řasa. Rychlost růstu takto krmených mláďat byla mnohem větší (až o 45 %) v porovnání s kontrolní skupinou (Lee a Rosenbaum, 1987).

Velký význam má CGF při hojení a regeneraci lidského těla, které spočívá právě ve vysokém obsahu DNA a RNA, neboť dochází ke stimulaci dělení a růstu zdravých buněk, podpoře jejich normálních funkcí, zabraňování jejich předčasnému stárnutí a ochraně před toxickými látkami a viry. Schopností zvyšovat počet makrofágů má také pozitivní vliv na posílení imunitního systému (Merchant a Andre, 2001).

2.4.4 Využití řasy *Chlorella* spp. ve včelařství

Eremia *et al.*, 2013 prováděli experiment a zjišťovali, zda má suspenze z řasy *Chlorella vulgaris* vliv na růst a produktivitu včelstev. Včelám byl podáván buď cukerný roztok nebo suspenze řasy *Ch. vulgaris* s cukrem v poměru 1:1 anebo nebyly ničím přikrmovány. V závěru zjistili, že ve srovnání s kontrolní skupinou se u včelstev krmených suspenzí z řasy zvýšil počet zavíčkovaných plodů o 22,4 % a produkce medu o 17 % a jeví se proto jako vhodný potravinový doplněk k lepšímu rozvoji včel.

Podobné experimenty byly prováděny s řasou *Oocystis borgei* Snow, která byla včelám podávána v podobě potravinového doplňku „Borgesnow“ (obsahuje 2 % biomasy). V porovnání s kontrolními vzorky byl opět pozorován zvýšený počet zavíčkovaných plodů (o 8 %) stejně tak jejich životnost (o 1,7 %), zvýšené množství plástového pylu (o 22,6 %) a medu (38,7 %) v úlu a také bylo včelstvo odolnější vůči nemocem (o 3,5 %) (Cebotari *et al.*, 2017).

U většiny řas byla pozorována řada bioaktivních látek, které mohou vykazovat antimikrobiální účinky. V několika studiích bylo i dokázáno, že mají inhibiční účinky vůči bakteriím způsobující včelí onemocnění včetně *P. larvae*, bakterii zodpovědné za vznik moru včelího plodu. Velmi častou nemocí u dospělých včel je nose móza způsobovaná parazitickou houbou *Nosema apis* (hmyzomorka včelí) a *Nosema ceranae*.

Z šesti různých druhů řas byly izolovány sulfatované polysacharidy, které byly testovány proti mikrosporidiím houby *Nosema ceranae* a některé polysacharidy vykazovaly pozitivní účinky. Byl pozorován pokles přítomnosti parazitické houby, což se projevilo i poklesem úmrtnosti včel (Flesar *et al.*, 2010; Roussel *et al.*, 2015).

2.5 Metody studia antimikrobiální aktivity

Metody, které se nejčastěji používají pro sledování antimikrobiálních účinků přírodních látek, jsou dvě – difúzní a diluční. Difúzní metody se používají ke kvalitativnímu stanovení a jsou využívány zejména kvůli své jednoduchosti a rychlosti stanovení. Metody diluční lze kromě kvalitativního stanovení využít také ke kvantitativnímu stanovení stupně citlivosti (rezistence) a určení minimální inhibiční koncentrace (MIC) (Kalemba a Kunicka, 2003; Jorgensen a Ferraro, 2009), což je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která zpomaluje růst testovaného mikroorganismu.

Pěstování různých mikrobiálních kultur se provádí ve vhodných kultivačních médiích za specifických podmínek charakteristické pro určitý druh mikroorganismu. Růst mikroorganismů můžeme posoudit pak vizuálně nebo instrumentálně. Běžně používanou technikou, kde se měří změny optické hustoty (OD, optical density) rostoucí kultury, je turbidimetrie (Kalemba a Kunicka, 2003).

2.5.1 Difúzní metody

Metoda difúzních testů patří k nejrozšířenější metodě využívané k testování antimikrobiální aktivity. I přesto že udává pouze kvalitativní výsledky, tak se řadí mezi přesnou a spolehlivou metodu. Při testování se používají Petriho misky o průměru 5 - 12 cm (nejčastěji 9 cm), které se naplní 10 - 20 ml tekutého média a po ztuhnutí se agarová plotna naočkuje mikroorganismy. Antimikrobiální látku pak můžeme testovat aplikací buď do uměle vytvořené jamky, nebo přímo na povrch média nebo pomocí papírových disků (Kalemba a Kunicka, 2003).

2.5.1.1 Disková difúzní metoda

Nejčastějším způsobem využívaným v mnoha mikrobiologických laboratořích je použití papírových disků. Tato metoda byla poprvé popsána v roce 1940 (Heatley, 1944) a dodnes se používá pro veškerá rutinní testování mikrobiální citlivosti. Na naočkovanou agarovou plotnu se umístí papírový disk o průměru cca 6 mm obsahující testovanou inhibiční látku o požadované koncentraci. Při následné inkubaci za vhodných podmínek dochází k uvolňování antimikrobiální látky do média a vytváření různě velkých inhibičních zón kruhového tvaru v důsledku potlačení růstu testovaného mikroorganismu. Po inkubaci se změří velikost vytvořených zón kolem každého disku. Nevýhodou této metody je, že z pouhého potlačení růstu nedokážeme určit, zda má testovaná látka baktericidní (usmrcení bakterií) či bakteriostatické účinky (zpomalení růstu bakterií). Dokážeme určit pouze jestli je daná látka citlivá, středně citlivá nebo

rezistentní. Ke stanovení MIC se tato metoda také nehodí, protože nedokážeme určit, jaké množství antimikrobiální látky difundovalo do média (Nijs *et al.*, 2003; Balouiri *et al.*, 2016). Lze určit pouze přibližnou hodnotu MIC, a to jen u některých mikroorganismů a antibiotik (Nijs *et al.*, 2003). Nevýhodou je také nedostatečná mechanizace a automatizace testu. Kromě těchto nevýhod má disková difúzní metoda i řadu výhod. Jedná se totiž o metodu velmi jednoduchou (nevyžaduje žádné speciální vybavení) a finančně nenáročnou (2,50 - 5 USD za test na spotřebovaný materiál), pomocí které jsme schopni otestovat poměrně velké množství mikroorganismů a antimikrobiálních látek (Jorgensen a Ferraro, 2009; Balouiri *et al.*, 2016).

2.5.1.2 Gradientový difúzní test (E-test)

E-test je obdobou agarové difúzní metody, který kombinuje principy difúzní a diluční metody pro stanovení citlivosti. Je založen na tvorbě koncentračního gradientu antimikrobiální látky testované v kultivačním médiu a na rozdíl od diskové difúzní metody lze jej použít také ke stanovení MIC. K testování se používají tenké plastové proužky, na jejichž spodní straně je v koncentračním gradientu impregnována antimikrobiální látka a na vrchní straně je znázorněna koncentrační stupnice této látky. Proužek se umístí na agarovou plotnu naočkovanou příslušným mikroorganismem a nechá inkubovat. Během inkubace difunduje antimikrobiální látka do okolního média a ovlivňuje tak růst sledovaného mikroorganismu. Podél proužku se vytváří kontinuální koncentrační gradient a vzniká inhibiční zóna ve tvaru elipsy. Hodnota MIC se odečte v místě, kde se inhibiční zóna protíná s proužkem. Tato metoda je výhodná pouze v případě, že chceme otestovat nízký počet antimikrobiálních látek. V případě testování více látek je E-test finančně poměrně náročný. Cena za jeden E-test proužek je 2 - 3 USD. (Jorgensen a Ferraro, 2009; Balouiri *et al.*, 2016).

2.5.1.3 Další používané difúzní metody

Další často používané difúzní metody v mikrobiologických výzkumných laboratořích se využívají k testování antimikrobiálních účinků extraktů, jednotlivých frakcí nebo čistých látek, či ke zjišťování antagonismu mezi jednotlivými mikroorganismy. Mezi tyto metody se řadí agarová difúzní metoda s uměle vytvořenými jamkami v agaru („agar well diffusion method“), agarová metoda pro studium antagonického účinku mezi mikrobiálními populacemi („agar plug method“) nebo agarová metoda se zkříženými očkovacími čarami („cross streak method“) (Balouiri *et al.*, 2016).

Podobně jako u diskové difúzní metody, tak i u difúzní metody s jamkami v agaru, je nejprve povrch agaru inokulován mikrobiální suspenzí. Poté se do agaru pomocí sterilního korkového vrtáku vytvoří jamky o průměru 6 – 8 mm, do kterých se aplikuje testovaná antimikrobiální látka (20 – 100 μ l). Následuje inkubace za vhodných podmínek charakteristické pro daný mikroorganismus, při které antimikrobiální látka difunduje do okolního média a inhibuje růst testovaného mikrobiálního kmene (Balouiri *et al.*, 2016).

Další zmiňovaná metoda označovaná v originále jako „agar plug method“ se často používá ke zjišťování antagonických účinků mezi mikroorganismy. První kroky postupu jsou podobné jako u diskové difúzní metody. Agar je naočkován testovaným mikrobiálním kmenem, který během svého růstu uvolňuje molekuly difundující do agaru. Po inkubaci se sterilním korkovým vrtákem vyřízne agarový bloček, který se přenesse na agarovou plotnu naočkovanou jiným mikroorganismem. Z bločku se začnou uvolňovat mikrobiální molekuly sekretované předchozím mikroorganismem a v případě, že vykazují antimikrobiální účinek, se vytvoří inhibiční zóna (Balouiri *et al.*, 2016).

Jiná metoda používaná k rychlému určení antagonických účinků mezi mikroorganismy se nazývá „cross streak method“. Principem je očkování různých bakteriálních kmenů na agarové plotny v podobě kolmých čar. Nejprve se naočkuje jeden mikroorganismus a po uplynutí doby inkubace se kolmo čarou naočkuje druhý mikroorganismus. Po další inkubaci se pozorují případné vzniklé inhibiční zóny vzniklé vzájemnou antimikrobiální interakcí mezi jednotlivými mikroorganismy (Balouiri *et al.*, 2016).

2.5.2 Diluční metody

Diluční metody se využívají především ke kvantitativnímu stanovení antimikrobiální aktivity látek, zejména pak ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). MIC je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, při které pozorujeme inhibici bakteriálního růstu. Udává se v jednotkách $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ nebo $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Testování se provádí buď v pevném agaru (agarová diluční metoda) nebo tekutém kultivačním médiu (makrodiluční a mikrodiluční bujónová metoda) (Balouiri *et al.*, 2016).

2.5.2.1 Agarová diluční metoda

Principem agarové diluční metody je přidávání testované antimikrobiální látky do rozehrátého, tekutého agaru o příslušné koncentraci (obvykle ve dvojnásobném ředění). Po nalití agaru do Petriho misky a jeho ztuhnutí se naočkuje příslušným bakteriálním kmenem. Po předepsané inkubační době se z misky s nejnižší koncentrací antimikrobiální látky, kde nebyl pozorován žádný bakteriální růst, zaznamená koncentrace antimikrobiální látky, která odpovídá MIC (Balouiri *et al.*, 2016).

Tato metoda poskytuje ve srovnání s diskovou difúzní metodou a mikrodiluční metodou vynikající výsledky a hodí se pro stanovení MIC u obtížně kultivovaných bakterií, jako jsou anaerobní nebo bakterie rodu *Helicobacter* (Balouiri *et al.*, 2016).

2.5.2.2 Diluční metoda v tekutém kultivačním médiu

Mezi základní antimikrobiální metody používané ke stanovení citlivosti patří diluční metoda v tekutém médiu, která může být jak v makro, tak v mikro měřítku. Název „diluční“ vychází z toho, že se vždy na začátku testování připraví koncentrační řada antimikrobiální látky ve dvojnásobném ředění (např. 1, 2, 4, 8, 16, 32 mg.ml⁻¹). Makrodiluční metoda využívá ke kultivaci větších objemů ve zkumavkách, mikrodiluční metoda pak využívá menší objemy pro měření v 96-jamkové mikrotitrační destičce. Do každé zkumavky nebo jamky se přidá bakteriální suspenze upravena na výslednou hustotu 0,5 McFarland. Takto inokulované zkumavky nebo mikrotitrační destičky se inkubují společně s antimikrobiální látkou v různých koncentracích za vhodných podmínek v závislosti na daném mikroorganismu. Po inkubaci pozorujeme, zda je vzorek zakalený či ne, nebo-li zda došlo k nárůstu bakterie či k inhibici jejího růstu. Nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která zabraňuje růstu mikroorganismu, odečteme jako hodnotu MIC (Jorgensen a Ferraro, 2009; Balouiri *et al.*, 2016).

Mezi hlavní nevýhody makrodiluční metody patří zdlouhavá příprava vzorků s antimikrobiálním činidlem pro každý test, při kterých hrozí i velké riziko možných chyb. Proto se mnohem častěji používají mikrodiluční metody, kdy jsme v 96-jamkové destičce schopni otestovat 12 různých antimikrobiálních činidel v rozmezí 8 dvojnásobných ředění (Jorgensen a Ferraro, 2009).

Hodnotu MIC u dilučních metod lze stanovit buď vizuálně pouhým okem nebo instrumentálně pomocí spektrofotometru. Spektrofotometricky můžeme hodnotit míru zákalu v jednotlivých jamkách, tedy detekovat turbiditu. Takového měření využívá

metoda stanovení růstových křivek (Bilikova *et al.*, 2009). Patří mezi mikrodiluční metody, kdy se využívá 96-jamková mikrotitrační destička, do které se napipetuje dané množství kultivačního média spolu s antimikrobiální látkou naředěnou na 8 různých koncentrací dvojnásobným ředěním (Berthold *et al.*, 2013). Poté se do jamky přidá stejné množství bakteriální suspenze naředěné v tekutém médiu na určitou hodnotu optické hustoty (OD, optical density) a po dobu několika hodin je zaznamenáván bakteriální růst měřením optické hustoty při 600 nm (Madigan *et al.*, 2010).

Můžeme také využít kolorimetrických metod za použití barevných činidel jako jsou tetrazolové soli, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid (MTT) a 2,3-bis {2-methoxy-4-nitro-5-[(sulfenylamino) karbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxid} (XTT) nebo resazurin (Jorgensen a Ferraro, 2009).

2.5.3 Metody stanovení životaschopnosti buněk

Ke kvantitativnímu stanovení antimikrobiální aktivity v 96-jamkové mikrotitrační destičce, respektive ke stanovení životaschopnosti buněk, můžeme využít také několik činidel. Patří mezi ně tetrazoliová sůl XTT, dále dimethylmethylenová modř (DMMB), krystalová violet a fluorescenční barviva Syto9, resazurin a fluorescein diacetát (FDA). V posledních letech bylo popsáno několik metod, které tato činidla využívají a umožňují hodnotit buď celou biomasu (založeno na kvantifikaci celé matrice, všech živých i neživých buněk), nebo pouze živé buňky (na základě jejich metabolismu) nebo pouze samotnou matici (barvení specifických komponent matrice) (Peeters *et al.*, 2008).

2.5.3.1 Detekce celé biomasy

K detekci celé biomasy můžeme použít krystalovou violet, která se váže na negativně nabitě povrchové molekuly a polysacharidy v extracelulární matici. Avšak protože se toto barvivo váže jak na živé, tak na mrtvé buňky, nehodí se k určování aktivity antimikrobiálních látek, ale pouze k určení nárůstu celkové biomasy. Jiné barvivo, které můžeme použít, je zelené fluorescenční barvivo Syto9 (excitace 485 nm, emise 498 nm). Toto barvivo sice prochází přes buněčnou membránu živých i mrtvých buněk, kde se váže do DNA, ale je-li kombinováno s propidium jodidem, můžeme jej použít k rozlišení živých a mrtvých buněk. V této kombinaci se prodává pod komerčním názvem LIVE/DEAD™ *BacLight*™ (Stocks, 2004; Peeters *et al.*, 2008.). Propidium jodid je červené fluorescenční barvivo, které se taky váže do DNA, ale prochází pouze

přes porušenou bakteriální membránu mrtvých buněk, což nám umožňuje rozlišit živé buňky (obarvené zeleně barvivem Syto9) od mrtvých buněk. Tato technika může být velmi rychlá, protože není nutná žádná zdlouhavá inkubace a v závislosti na konkrétním případě lze výsledky získat za použití fluorescenčního mikroskopu, fluorometru nebo průtokového cytometru už během hodiny (Boulos *et al.*, 1999).

2.5.3.2 Kvantifikace živých buněk na základě detekce metabolické aktivity

Dalším možným způsobem, jak rozlišit živé a mrtvé buňky, je použití činidel založených na kalorimetrické detekci metabolické aktivity životaschopných buněk (Peeters *et al.*, 2008).

2.5.3.2.1 Činidlo XTT

XTT je tetrazoliová sůl s chemickým názvem 2,3-bis {2-methoxy-4-nitro-5-[(sulfenylamino) karbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxid}. Principem této metody je redukce barviva XTT na ve vodě rozpustný formazan, který vzniká díky přítomnosti mitochondriálních dehydrogenas a enzymů dýchacího řetězce v cytoplazmatické membráně (McCluskey *et al.*, 2005; Peeters *et al.*, 2008). Absorbance supernatantu při vlnové délce 486 nm je poté přímo úměrná počtu metabolicky aktivních mikrobiálních buněk. Metoda je využívána pro kvantifikaci životaschopných buněk v planktonických, bakteriálních a kvasinkových kulturách (Peeters *et al.*, 2008).

2.5.3.2.2 Resazurin

Resazurin, též známý jako alamarova modř (Alamar Blue), je další činidlo používané ke kvantifikaci životaschopných buněk založené na jejich metabolické aktivitě. Jde o modrou sloučeninu, která je v živých buňkách redukována na růžový resorufin a ten můžeme díky fluorescenčnímu signálu detekovat (excitace 560 nm, emise 590 nm). V porovnání s XTT je resazurin levnější a méně toxický (Peeters *et al.*, 2008). Je-li však resazurin inkubován s mikrobiální suspenzí příliš dlouho (až několik dnů), může docházet k další redukci resorufinu na bezbarvý a nefluorescenční produkt hydroresorufin, což může vést ke zkreslení výsledků. Také se ukázalo, že při delší době inkubace se objevují známky toxicity, neboť životaschopnost bakterií kultivovaných 8 dnů s 20% resazurinem významně klesla v porovnání s bakteriemi kultivovanými 8 dnů bez resazurinu (Pace a Burg, 2015).

2.5.3.2.3 Fluorescein diacetát

Přítomností nespecifických intracelulárních a extracelulárních esteráz jsou živé buňky schopny převádět bezbarvý nefluorescenční fluorescein diacetát (FDA) na zelený fluorescein, který můžeme díky fluorescenčnímu signálu detekovat (excitace 494 nm, emise 518 nm) (Clarke *et al.*, 2001; Peeters *et al.*, 2008).

Existují dva potenciální problémy, které se při použití FDA mohou objevit. Jedním z nich je hydrolyza FDA bez přítomnosti živých buněk. Některá média obsahují totiž složky, které podporují přeměnu FDA na fluorescein. Mezi tyto složky patří trypton, pepton a kvasinkový extrakt, ale také Tris-HCl a fosforečnan sodný. Opačným problémem je, že zas může docházet k utlumení fluorescence způsobené testovacím vzorkem (Clarke *et al.*, 2001).

2.5.3.3 Kvantifikace matrice biofilmu

Ke kvantifikaci samotné matrice biofilmu se používá barvivo 1,9-dimethylmethylenová modř (DMMB), které se váže na sulfátové skupiny polysacharidů a vytváří s nimi nerozpustný komplex. Sulfatované polysacharidy (např. glykosaminoglykany) patří k hlavním složkám buněčného prostředí (Barbosa *et al.*, 2003). Stanovování se provádí spektrofotometricky po přidání dekomplexačního činidla. Naměřená hodnota absorbance při vlnové délce 620 nm odpovídá množství sulfatovaných polysacharidů v matrici biofilmu (Peeters *et al.*, 2008).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Aceton (Lach-Ner, ČR), Agar (Carl Roth, Německo), Deoxyribonukleosid-trifosfátová směs (Roche, USA), Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát (Lach-Ner, ČR), Dimethylsulfoxid (Lach-Ner, ČR), DNA standard 2-Log-Ladder (0,1 – 10,0 kb) (BioLabs, USA), Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, USA), FastStart Taq DNA polymerasa (Roche, USA), Fluorescein diacetát (Fluka, Čína), Glukosa (Sigma-Aldrich, USA), Glycerol 80% (Lach-Ner, ČR), Hydrogenfosforečnan draselný (Penta, ČR), Hydrogenfosforečnan sodný (Lach-Ner, ČR), Chlorid hořečnatý (Roche, USA), Chlorid sodný (Carl Roth, Německo), Imerzní olej (Sigma-Aldrich, USA), InstaGene Matrix (BioRad, USA), Isopropanol 70% (Lach-Ner, ČR), Kvasničný extrakt (Carl Roth, Německo), Kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma-Aldrich, USA), Kyselina nalidixová (Sigma-Aldrich, Itálie), Kyselina octová (Lach-Ner, ČR), Methanol (Lach-Ner, ČR), Mueller Hinton broth (Carl Roth, Německo), PCR pufr (Roche, USA), PCR voda (Sigma-Aldrich, USA), Primery (Sigma-Aldrich, USA), Propidium jodid (Sigma-Aldrich, USA), Pyruvát sodný (Sigma-Adrich, Japonsko), Resazurin sodná sůl (Sigma-Aldrich, USA), SeaKem LE Agarosa (Lonza, USA), Tetracyklin-hydrochlorid (Fluka, Čína), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.2 Biologický materiál

Pro otestování antimikrobiální aktivity některých vodných, acetonových a methanolových extraktů řasy *Chlorella sorokiniana* metodou difuzních testů bylo použito celkem 7 bakteriálních kmenů, které byly získány ze sbírky referenčních kmenů České sbírky mikroorganismů Masarykovy Univerzity v Brně:

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

K testování antimikrobiálního účinku extraktů řasy *Chlorella sorokiniana*, které byly získány jako jednotlivé frakce odebírané z vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC), byly použity dva bakteriální kmeny. *Paenibacillus larvae* CCM 4484 (genotyp ERIC I) získaný ze sbírky referenčních kmenů České sbírky mikroorganismů Masarykovy Univerzity v Brně a terénní kmen *Paenibacillus larvae* VM 6135 (genotyp ERIC II).

Bakteriální kmeny byly uchovávány buď v plastové falkoně na vatové tyčince při -80 °C nebo v podobě bakteriální suspenze v glycerolu při -80 °C (viz 3.2.1).

3.1.3 Příprava extraktů z řasy *Chlorella sorokiniana*

Vodné, acetonové a methanolové extrakty, jejichž antimikrobiální účinek byl testován pomocí difuzních testů, byly poskytnuty ve formě sušiny Ing. Petrou Urajovou, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu Akademie věd v Třeboni. Následně byly připraveny extrakty rozpuštěním sušiny ve sterilní vodě, acetonu nebo methanolu na koncentraci 10 mg.ml⁻¹. Extrakty byly z řasy autotrofní (CA), heterotrofní (CHM) a autotrofní degradované (CAD). Autotrofní řasa byla pěstována venku na světle, heterotrofní řasa byla pěstována v tanku ve tmě a jako médium byla použita glukosa. Autotrofní degradovaná řasa byla pěstována také venku na světle, kde byla ponechána i po sklizni.

K testování antimikrobiálních účinků metodou růstových křivek byly použity extrakty z autotrofní řasy (CA), které byly poskytnuty ve formě sušiny studentkou doktorského studia Mgr. Dominikou Činčárovou z Mikrobiologického ústavu Akademie věd v Třeboni. Extrakty byly očíslovány čísla 1 – 33 a tato čísla odpovídala jednotlivým frakcím odebíraných v časovém rozmezí 5 – 43 minut z RP-HPLC (methanolový gradient, kolona eclipse C18). Prvních 5 frakcí bylo odebíráno po 2 min, zbylé frakce každou minutu. Získané extrakty byly rozpuštěny v 80% acetonu na koncentraci 10 mg.ml⁻¹ nebo 1 mg.ml⁻¹. Pro měření růstových křivek a stanovení MIC bylo vybráno 11 extraktů, které při difuzních testech vykazovaly inhibiční účinky v růstu bakterie *P. larvae* u genotypu ERIC I i ERIC II (testováno Mgr. Dominikou Činčárovou na KBC PřF UPOL).

3.1.4 Použité roztoky a média

- Fluorescein diacetát (pracovní roztok): 100× ředěný zásobní roztok ve fyziologickém roztoku (0,05 mg.ml⁻¹)
- Fluorescein diacetát (zásobní roztok): 5 mg.ml⁻¹ v acetonu

- Fyziologický roztok pufovaný fosfátem (PBS): 10,9 g.l⁻¹ Na₂HPO₄; 3,2 g.l⁻¹ NaH₂PO₄; 90 g.l⁻¹ NaCl (pH = 7,4)
- Fyziologický roztok: 0,9% NaCl s 1% glukosou
- MYPGP agar: 10 g.l⁻¹ Mueller Hinton broth, 15 g.l⁻¹ kvasničný extrakt, 3 g.l⁻¹ K₂HPO₄, 1g.l⁻¹ pyruvát sodný, 20 g.l⁻¹ agar (pevné médium)
- MYPGP agar: 10 g.l⁻¹ Mueller Hinton broth, 15 g.l⁻¹ kvasničný extrakt, 3 g.l⁻¹ K₂HPO₄, 1g.l⁻¹ pyruvát sodný (tekuté médium)
- Propidium jodid (pracovní roztok): 200× ředěný zásobní roztok ve fyziologickém roztoku (0,05 mg.ml⁻¹)
- Propidium jodid (zásobní roztok): 10 mg.ml⁻¹ v PBS
- Resazurin: 0,015% (w/v) vodný roztok
- Resazurin: 0,03% (w/v) vodný roztok
- TAE (Tris-acetát-EDTA) pufr (500 ml): 121 g Tris; 28,55 ml ledové kyseliny octové; 50 ml 0,5M EDTA

Do připravovaného pevného média bylo po autoklávování přidáno 8 ml 10% glukosy a 8 ml kyseliny nalidixové na celkový objem 400 ml. V případě pevného média připravovaného pro kultivaci bakterií *P. larvae*, sloužící ke genotypyzaci v systému primerů ERIC, nebylo do média nic přidáváno. Do každého tekutého média určeného pro měření růstových křivek byl po autoklávování přidán 1 ml (8 ml) 10% glukosy na celkový objem 50 ml (400 ml).

TAE pufr byl před použitím 50× zředěn.

3.1.5 Přístrojové vybavení

Analytické váhy (Denver Instrument, Německo)

Autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Densitometr DEN-1 (Biosan, Lotyšsko)

Digitální fotoaparát (SONY, Japonsko)

Digitální předvážky (Radwag®, ČR)

Elektroforetický systém MBE-150 (Major Science, USA)

Elektromagnetická míchačka Intelli Stirrer (Biosan, Lotyšsko)

Flowbox Bioban (Steril, Itálie)

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

Fluorescenční zařízení U-RFL-T (Olympus, Japonsko)
Chlazená centrifuga 5418 R (Eppendorf, Německo)
Inkubátor Q-CELL (Verkon, ČR)
Inkubovaná třepačka PST-100HL (Biosan, Lotyšsko)
Minicentrifuga MCF 2360 (Vitrum, Česká republika)
Multifunkční Reader Synergy H1 (BioTek, USA)
Mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek, USA)
Mikroskopický reader Cytation 5 (BioTek, USA)
Optický mikroskop BX50 (Olympus, Japonsko)
PCR termocykler (Eppendorf, Německo)
Spektrofotometr Lightwave II (Biochrom, VB)
Ultrazvuková lázeň K5 (Kraintek, ČR)
Vortex V-1 (BioSan, Lotyšsko)

3.2 Metody

3.2.1 Zamražení bakteriálního kmene *P. larvae* do roztoku glycerolu

Pomocí vatové tyčinky byla z MYPGP agaru odebrána narostlá bakteriální kultura, která byla rozsuspendována v 1 ml fyziologického roztoku. Po následné centrifugaci (10 min, $8000 \times g$) byl pelet rozsuspendován v 300 μ l roztoku 80% glycerolu a tekutého MYPGP média v poměru 1:1. Suspenze byla přepipetována do mikrozkušavek po 50 μ l a uchovávána při -80 °C.

3.2.2 Naočkování MYPGP agaru

MYPGP agar byl naočkován bakteriální suspenzí připravenou rozsuspendováním zmrazeného bakteriálního kmene *P. larvae* ve fyziologickém roztoku na hustotu o hodnotě 0,5 McFarland (Votava *et al.*, 2010) nebo aplikací bakteriální kultury zamražené v glycerolu (viz 3.2.1). Bakteriální suspenze ve fyziologickém roztoku byla rozetřena pomocí vatové tyčinky na MYPGP agar ve třech různých směrech (pod úhlem cca 60°) v Petriho misce. Bakteriální suspenze z glycerolu byla aplikována v objemu 10 μ l na MYPGP agar a následně rozetřena ve třech různých směrech (pod úhlem cca 60°) pomocí vatové tyčinky. Misky byly inkubovány 2 – 3 dny při 37 °C. Pomocí

křížového roztěru byly bakteriální kultury po 3 dnech přeočkovávány na čerstvý MYPGP agar (Votava *et al.*, 2010).

3.2.3 Testování antimikrobiálního účinku vodných extraktů metodou difuzních testů

Narostlé bakteriální kolonie, odebrané pomocí vatové tyčinky, byly rozsuspendovány ve sterilní vodě na hustotu 0,5 McFarland a následně byla suspenze vatovou tyčinkou rozetřena na MYPGP agar v Petriho misce ve třech různých směrech. Po zaschnutí bakteriální suspenze bylo na médium aplikováno 10 µl vodného extraktu řasy *Chlorella sorokiniana* o koncentraci 10 mg.ml⁻¹. Misky byly inkubovány dnem vzhůru 48 h při 37 °C a poté byly změřeny velikosti inhibičních zón. Testování bylo prováděno v triplikátech a pro každý kmen dvakrát.

3.2.4 Testování antimikrobiálního účinku acetonových a methanolových extraktů metodou difuzních testů

Pomocí vatové tyčinky byla odebrána bakteriální kultura, která byla rozsuspendována ve sterilní vodě na hustotu 0,5 McFarland. Takto připravená suspenze (2 ml) byla přidána do rozpuštěného MYPGP média (50 ml), které bylo nalito do Petriho misky. Po ztuhnutí bylo na povrch média aplikováno 10 µl acetonového nebo methanolového extraktu řasy *Chlorella sorokiniana*. Misky byly inkubovány dnem vzhůru 48 h při 37 °C a poté byly změřeny velikosti inhibičních zón. Testování bylo prováděno v triplikátech a pro každý kmen dvakrát.

3.2.5 Genotypizace *Paenibacillus larvae* v systému primerů ERIC

Pro ověření genotypů ERIC I a ERIC II u testovaných bakterií *P. larvae* metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) byly použity primery ERIC1R a ERIC2 (Genersch *et al.*, 2006). Sekvence těchto primerů je uvedena v Tabulce 3.

3.2.5.1 Kultivace *Paenibacillus larvae*

Narostlé bakterie *P. larvae* (viz 3.2.2) byly přeočkovány na misku s MYPGP médiem bez přídavku 10% glukosy a kyseliny nalidixové. Misky byly poté inkubovány přibližně 24 h při 37 °C a nová narostlá kultura byla následně použita pro izolaci DNA.

3.2.5.2 Izolace DNA z *Paenibacillus larvae*

Odebrané bakteriální kolonie byly rozsuspendovány v 1 ml sterilní destilované vody a následně centrifugovány (1 min, 10 000 × g). Poté bylo odebráno 800 µl supernatantu a ke zbylému peletu bylo přidáno 200 µl lyzačního pufru InstaGene Matrix. Vzorky byly

krátce vortexovány a poté následovala inkubace 30 min při 56 °C za stálého míchání vzorku (1400 rpm). Dále opět promíchání na vortexu (cca 10 s), inkubace 8 min při 100 °C a 1400 rpm a další vortexování 10 s. Vzniklé lyzáty byly centrifugovány (3 min, 12 000 × g) a poté byl z každého vzorku odebrán supernatant. U všech supernatantů, obsahujících vyizolovanou DNA, byla změřena koncentrace (viz 3.2.5.3) a následně byly vzorky naředěny na koncentraci 30 ng. µl⁻¹. Takto naředěné vzorky byly inkubovány 15 min při 65 °C, 1400 rpm a poté byly využity jako templáty pro PCR reakci.

3.2.5.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Měření koncentrace DNA ve vzorku bylo prováděno na multifunkčním readeru Synergy H1. V duplikátech byly nanášeny vzorky DNA a jako slepý vzorek destilovaná voda (2 µl) na speciální destičku Take3. Byla změřena absorbance vzorku (poměr A₂₆₀/A₂₈₀) a pomocí softwaru BioTek Gene 5 vypočtena koncentrace DNA.

3.2.5.4 Příprava PCR premixu

Z jednotlivých komponent (Tab. 4) byla do mikrozkušavek připravena reakční směs pro PCR neboli premix. Tento premix byl poté pipetován spolu s naředěnou DNA do mikrozkušavek do celkového objemu 25 µl (20 µl premix + 5 µl DNA). Jako negativní kontrola byla použita PCR voda přidávána do premixu místo DNA.

3.2.5.5 Podmínky PCR reakce

Po krátkém promíchání a centrifugování byly vzorky umístěny do termocykleru, kde proběhla PCR reakce na rozlišení genotypů ERIC (Tab. 5). Kroky 2 – 4 byly opakovány 50× (Bassi *et al.*, 2015). Po skončení PCR reakce byly vzorky chlazeny na teplotu 4 °C.

Tab. 3: Sekvence ERIC primerů používaných při PCR pro rozlišení genotypů ERIC

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

Tab. 4: Složení premixu pro rozlišení genotypů ERIC

Složka	Objem (μ l) na jednu reakci
10xPCR pufr bez MgCl ₂	2,50
25mM MgCl ₂	2,50
dNTPs	0,63
ERIC1R primer (10 μ mol.l ⁻¹)	2,50
ERIC2 primer (10 μ mol.l ⁻¹)	2,50
PCR voda	8,87
DNA polymerasa	0,50

Tab. 5: Program PCR reakce pro rozlišení genotypů ERIC

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)
Počátek denaturace	95	5:00
Denaturace	95	1:00
Připojení primerů	53	1:00
Syntéza DNA	72	3:00
Poslední cyklus	72	5:00
Chlazení	4	∞

3.2.6 Detekce PCR produktů metodou gelové agarosové elektroforézy

Nejprve bylo připraveno 100 ml 0,8% (w/v) agarosového gelu v 1× TAE pufru. Pro vizualizaci PCR produktů bylo do rozpuštěného, zchladnutého gelu přidáno 100 μ l 0,07% ethidium bromidu, poté byl gel nalit do elektroforetické vaničky a byl vložen hřebínek. Elektroforéza probíhala s 1× TAE pufrem. Vzorky DNA (10 μ l) a marker 2-Log-Ladder (BioLabs) (4 μ l), sloužící jako standard velikosti produktů (0,1 – 10,0 kb), byly nanášeny do jamek v gelu. Elektroforéza probíhala 1 hodinu při konstantním napětí 80 V. Po ukončení separace byl gel vyhodnocen pomocí Gel Doc EZ Imager systému.

3.2.7 Testování různých rozpouštědel na růst bakteriální kultury

Pro zjištění toxicity organických rozpouštědel použitých pro rozpouštění extraktů z řasy, byly bakteriální buňky *P. larvae* testovány s vybranými rozpouštědly pomocí metody měření růstových křivek bakterií. K měření růstových křivek bakterií byla použita 96-jamková mikrotitrační destička. Celkem byla vybrána 3 různá rozpouštědla – aceton, methanol a dimethylsulfoxid (DMSO). Ze zásobního roztoku byly připraveny 4%, 8%, 16%, 20%, 24%, 28%, 32% a 36% pracovní roztoky rozpouštědel, které byly přidávány k 75 μ l bakteriální suspenze na celkový objem 150 μ l. Jako kontrolní vzorky bylo použito 75 μ l bakteriální suspenze + 75 μ l MYPGP média a 75 μ l bakteriální suspenze + 75 μ l TTC (200 μ mol.l⁻¹). Měření každého vzorku bylo prováděno v šesti

opakováních a měření každé kontroly ve čtyřech opakováních. Připravená mikrotitrační destička byla vložena do multifunkčního readeru Synergy H1, kde byla měřena optická hustota při vlnové délce 600 nm a teplotě 37 °C. Hodnoty absorbance byly zaznamenávány každých 15 min po dobu 16 hodin. Ze získaných hodnot byly v programu Excel sestaveny růstové křivky a bylo stanoveno nejvhodnější rozpouštědlo pro testování a jeho koncentrace.

3.2.8 Kultivace *P. larvae* s extraktem řasy *Chlorella sorokiniana*

Prvotní testy antimikrobiálního účinku extraktů z řasy *Chlorella sorokiniana* na růst bakterie *P. larvae* byly provedeny kultivací bakterií v tekutém médiu s jednotlivými extrakty. V tekutém MYPGP médiu byla připravena bakteriální suspenze *P. larvae* ($OD_{600} = 0,1$). V 1 ml 4% acetonu bylo pomocí ultrazvukové lázně rozpuštěno 10 mg řasy v podobě sušiny. Z tohoto extraktu byla poté připravena koncentrační řada v tekutém MYPGP médiu, kdy finální koncentrace v jamce odpovídala 5 - 0,625 mg.ml⁻¹. Do 12-jamkové destičky bylo napipetováno 500 µl extraktu a 500 µl bakteriální suspenze. Současně byly měřeny 4 kontrolní vzorky (viz Tab. 6), kdy celkový objem v jamce odpovídal 1 ml. Mrtvé buňky u negativní kontroly byly připraveny usmrcením pomocí 70% isopropanolu (viz 3.2.9.1). Destička byla inkubována při 37 °C po dobu 16 hodin.

3.2.9 Měření růstové křivky bakterie *P. larvae* s extraktem řasy *Chlorella sorokiniana*

Pro sledování časového průběhu antimikrobiálního účinku extraktů a zjištění MIC testovaných extraktů byla použita metoda měření růstových křivek bakterií. Nejprve byla připravena bakteriální suspenze rozsuspendováním bakteriální kultury *P. larvae* v tekutém MYPGP médiu na $OD_{600} = 0,1$. Měření bylo prováděno v 96-jamkové mikrotitrační destičce. Do každé jamky bylo napipetováno 140 µl bakteriální suspenze, ke které bylo přidáno 10 µl extraktu řasy *Chlorella sorokiniana*. Extrakty byly pomocí tekutého kultivačního MYPGP média naředěny na 8 různých koncentrací o hodnotách 50 – 0,4 µg.ml⁻¹ příp. 500 – 4 µg.ml⁻¹ v závislosti na tom, zda byl původní extrakt připraven na koncentraci 1 mg.ml⁻¹ nebo 10 mg.ml⁻¹.

V rámci jednoho měření byly měřeny také 4 kontrolní vzorky. Pozitivní kontrola (150 µl bakteriální suspenze), negativní kontrola (150 µl mrtvých buněk), kontrola rozpouštědla (144 µl bakteriální suspenze + 6 µl 100% acetonu) a kontrola antibiotika (149 µl bakteriální suspenze + 1 µl tetracyklinu o koncentraci 10 mmol.l⁻¹).

Tab. 6: Složení jednotlivých kontrolních vzorků

Kontrolní vzorek	Obsah v jamce		
pozitivní kontrola	bakteriální suspenze (500 μ l)	+	4% aceton (500 μ l)
negativní kontrola	mrtvé buňky (500 μ l)	+	4% aceton (500 μ l)
kontrola média	MYPGP médium (500 μ l)	+	4% aceton (500 μ l)
kontrola antibiotika	bakteriální suspenze (990 μ l)	+	TTC (10 μ l; 100 μ mol.l ⁻¹)

Každý vzorek extraktu a kontrolní vzorek byl aplikován v triplicátu. Takto připravená mikrotitrační deska byla vložena do spektrofotometrického readeru Synergy HT, kde byla měřena optická hustota při vlnové délce 600 nm a teplotě 37 °C. Hodnoty absorbance byly zaznamenávány každých 15 min po dobu 16 hodin. Ze získaných hodnot byly v programu Microsoft Office Excel sestaveny růstové křivky, ze kterých byly odečteny hodnoty MIC.

3.2.9.1 Příprava mrtvých buněk

Mrtvé buňky byly připraveny z bakteriální suspenze ($OD_{600} = 0,1$) odebráním 1 ml. Po následné centrifugaci (10 min, 11 000 \times g) byl k peletu přidán 1 ml 70% isopropanolu. Inkubací na ledu po dobu 60 min došlo k usmrcení bakterií. Isopropanol byl poté odstraněn a k peletu buněk bylo přidáno tekuté MYPGP médium.

3.2.10 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) pomocí resazurinu

Po inkubaci (viz 3.2.8) bylo z každé jamky odebráno do 1,5 ml mikrozkušavky 500 μ l suspenze, ke které bylo přidáno 55 μ l resazurinu o koncentraci 0,3 mg.ml⁻¹. Zkušavky byly 40 min inkubovány ve tmě při 37 °C. Poté byly zkušavky centrifugovány (10 min, 14 000 \times g) a v duplikátu pak bylo z každé zkušavky odebráno 200 μ l supernatantu do černé 96-jamkové mikrotitrační destičky. Destička byla vložena do multifunkčního readeru Synergy H1 a byla změřena fluorescence (excitace 560 nm, emise 590 nm).

Po 16 hodinové inkubaci (viz 3.2.9) bylo do každé jamky 96-jamkové mikrotitrační destičky napipetováno 16 μ l fluorescenčního barviva resazurin o koncentraci 0,15 mg.ml⁻¹. Destička byla za stálého míchání inkubována 40 min ve tmě při 37 °C. Již po inkubaci se dala odečíst minimální inhibiční koncentrace (MIC). V přítomnosti živých buněk je původně modrý resazurin redukován na růžový resorufin (Mariscal et al., 2009). Následně byl veškerý obsah z každé jamky přepipetován do mikrozkušavek, které byly centrifugovány (10 min, 14 000 \times g). Poté bylo 100 μ l supernatantu přeneseno do černé 96-jamkové mikrotitrační destičky a následně byly změřeny

hodnoty fluorescence (excitace 560 nm, emise 590 nm) pomocí multifunkčního readeru Synergy H1. Z naměřených hodnot byla stanovena relativní životnost buněk porovnáním intenzity signálu živých buněk.

3.2.11 Stanovení životnosti buněk s využitím fluorescein diacetátu (FDA) a propidium jodidu (PI)

FDA je bezbarvé nefluoreskující činidlo, které proniká přes membránu živých buněk a působením nescifických esteráz je zde přeměněn na zeleně fluoreskující fluorescein (excitace 494 nm, emise 518 nm) (Peeters *et al.*, 2008). Naopak PI je červené fluoreskující barvivo, které prochází pouze přes porušenou membránu mrtvých buněk a interkaluje se do jejich DNA (excitace 488 nm, emise 640 nm) (Stocks, 2004).

3.2.11.1 Příprava bakteriální suspenze

Z narostlé bakteriální kultury *P. larvae* (staré max. 2 dny) byla připravena bakteriální suspenze rozsuspendováním ve fyziologickém roztoku, médiu nebo sterilní vodě. Tato suspenze byla naředěna na různé $OD_{600} = 0,1; 0,2; 0,3$ nebo $0,5$. Z nachystané bakteriální suspenze byly připraveny mrtvé buňky (viz. 3.2.9.1). V případě, že byla suspenze připravována ve fyziologickém roztoku/vodě, byl v posledním kroku k peletu mrtvých buněk přidán fyziologický roztok/voda.

3.2.11.2 Stanovení životnosti bakterií na mikroskopickém readeru

Ke 100 μl bakteriální suspenze bylo přidáno 5 μl , 10 μl nebo 15 μl pracovního roztoku FDA ($50\times$ ředěný zásobní roztok o koncentraci $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Po 20-30 min inkubace ve tmě bylo 20 μl suspenze odebráno do 96-jamkové mikrotitrační destičky. Následně byla suspenze pozorována na mikroskopickém readeru Cytation 5 při celkovém zvětšení $600\times$.

3.2.11.3 Stanovení životnosti bakterií na fluorescenčním mikroskopu

Ke 100 μl bakteriální suspenze bylo přidáno 1 μl , 2 μl , 5 μl , 10 μl , 100 μl nebo 200 μl pracovního roztoku FDA ($100\times$ ředěný zásobní roztok) pro pozorování živých buněk. Buňky byly inkubovány 30 nebo 50 min ve tmě a poté bylo ze suspenze odebráno 20 μl na podložní sklíčko. Po přiložení krycího sklíčka byla bakteriální suspenze pozorována pod imerzním objektivem (zvětšení $60\times$) v optickém a fluorescenčním módu mikroskopu.

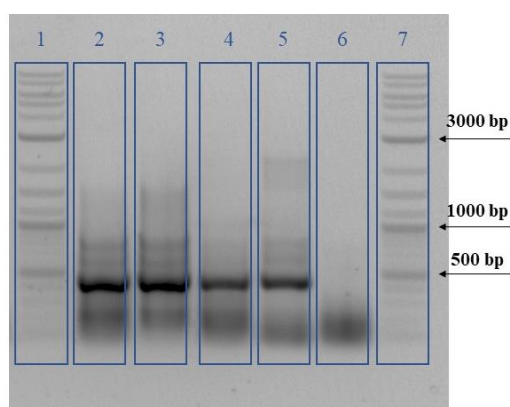
Ke 100 μl bakteriální suspenze usmrcených buněk bylo přidáno 1 μl , 2 μl , 10 μl nebo 100 μl pracovního roztoku PI ($200\times$ ředěný zásobní roztok o koncentraci

10 mg.ml⁻¹). Buňky byly inkubovány 30 nebo 50 min ve tmě a poté bylo ze suspenze odebráno 20 μl na podložní sklíčko. Po přiložení krycího sklíčka byla bakteriální suspenze pozorována pod imerzním objektivem (zvětšení 60×) v optickém a fluorescenčním módu mikroskopu.

4 Výsledky

4.1 Zařazení bakteriálních kmenů *P. larvae* mezi genotypy ERIC I a II

Pro zařazení dvou testovaných bakteriálních kmenů mezi genotypy ERIC I nebo ERIC II byly použity primery navržené Versalovic *et al.* (1994). Separace PCR produktů byla provedena v 0,8% agarosovém gelu, kde byly pozorovány typické bandy pro daný genotyp. Genersch *et al.* (2006) uvádějí, že pro oba genotypy je charakteristický produkt o velikosti 970 páru bazí (bp, base pair). K rozlišení mezi genotypy pak slouží produkt o velikosti 1200 bp charakteristický pro genotyp ERIC I a produkt o velikosti 2800 bp charakteristický naopak pro genotyp ERIC II. K testování byla použita izolovaná DNA *P. larvae* genotypu ERIC I a ERIC II uchovávaná půl roku při -20 °C a nová izolovaná DNA *P. larvae* CCM 4484 a *P. larvae* VM 6135. Jak můžeme vidět na Obr. 11, tak u staré izolované DNA genotypu ERIC I vznikl produkt o velikosti 970 bp, ale nevznikal už produkt o velikosti 1200 bp. U genotypu ERIC II nebyl produkt o velikosti 2800 bp také pozorován. Kvůli delšímu uskladnění došlo pravděpodobně k degradaci DNA. U čerstvě izolované DNA bakterie *P. larvae* CCM 4484 vznikl produkt o velikosti 970 bp, ale nebyl zde produkt o velikosti 1200 bp. Jelikož zde nevznikal žádný produkt o velikosti 2800 bp, můžeme tento bakteriální kmen zařadit mezi genotyp ERIC I. U *P. larvae* VM 6135 můžeme pozorovat také produkt o velikosti 970 bp a kromě toho zde vznikl i produkt velký 2800 bp, jedná se tedy o genotyp ERIC II.

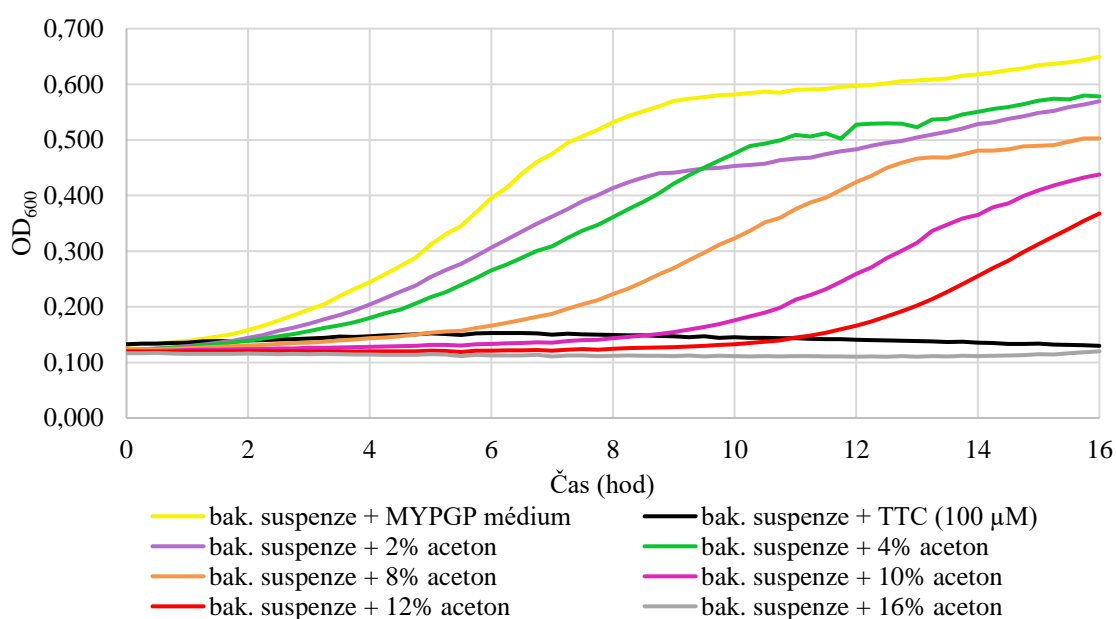


Obr. 11: Rozlišení genotypů ERIC I a ERIC II u bakteriálních kmenů *P. larvae*. 1: marker, 2: stará izolovaná DNA genotypu ERIC I, 3: nová izolovaná DNA *P. larvae* CCM 4484, 4: stará izolovaná DNA genotypu ERIC II, 5: nová izolovaná DNA *P. larvae* VM 6135, 6: marker.

4.2 Optimalizace protokolu pro stanovení MIC extraktů řasy *Chlorella sorokiniana*

Nejprve bylo třeba vybrat vhodné rozpouštědlo, které nebude pro buňky *P. larvae* toxické a bude v něm sušina řasy dobře rozpustná. Byla vybrána tři rozpouštědla – aceton, methanol a DMSO. Testování bylo prováděno metodou růstových křivek bakterií. V případě methanolu a DMSO nebyl pozorován žádný bakteriální nárůst. K usmrcení bakterií docházelo již za použití 4% methanolu nebo DMSO. Pro své nejlepší výsledky byl proto vybrán aceton, konkrétně 8% aceton (v jamce 4%), kde byl zřetelně vidět nárůst bakterií (Obr. 12). V 8% acetonu však nedocházelo k dokonalému rozpuštění řasy, proto k přípravě extraktu musel být použit 80% aceton. Následným ředěním v MYPGP médiu a přípravy koncentrační řady extraktů byla finální koncentrace acetonu v jamce snížena na 4%.

První testování bylo prováděno ve 12-jamkové destičce, kdy k 500 μ l bakteriální suspenze *P. larvae* bylo přidáváno 500 μ l acetonového extraktu řasy *Chlorella sorokiniana* a tato destička byla poté za stálého třepání inkubována do následujícího dne, kdy byl přidán resazurin ($0,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). U použitých kontrol (viz Tab. 6) docházelo často ke kontaminacím, proto v následujících měření byly používány pouze špičky s filtrem a pro přípravu bakteriální suspenze *P. larvae* bylo použito vždy alikvotu autoklávovaného MYPGP média, do kterého byla přidávána 10% glukosa.



Obr. 12: Růstová křivka bakterie *P. larvae* v MYPGP médiu po přidavku acetonu o různých koncentracích. Uvedená % acetonu udávají celkovou koncentraci acetonu v jamce.

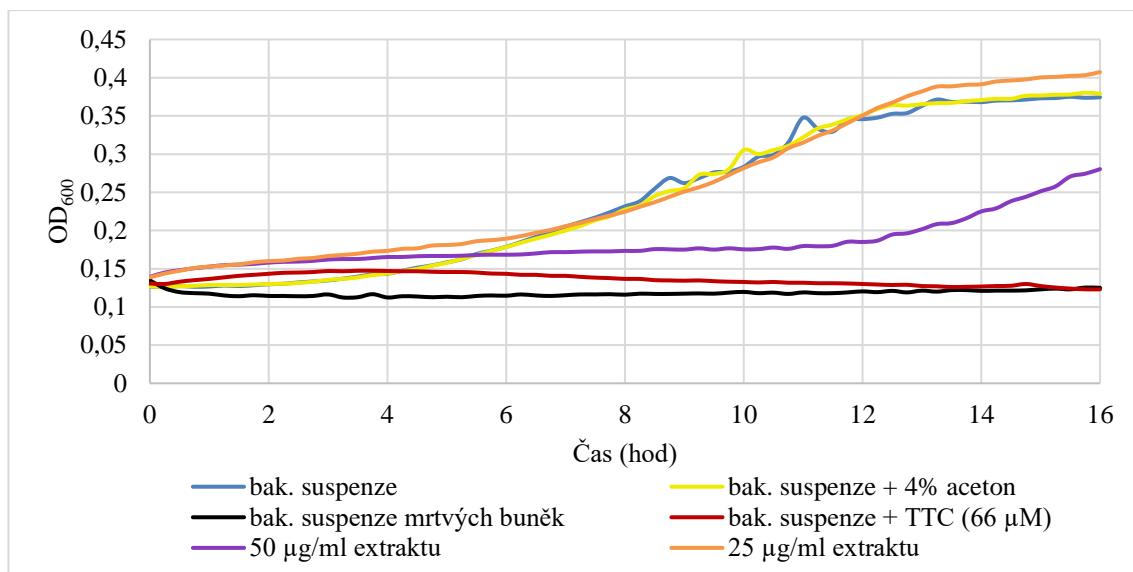
Také byla testována toxicita resazurinu na buňky. K suspenzi buněk byl přidán zásobní roztok resazurinu o koncentraci $0,3 \text{ mg.ml}^{-1}$, dále $2\times$ a $10\times$ ředěný. Měření bylo prováděno v duplikátu v 96-jamkové mikrotitrační destičce za použití multifunkčního readeru Synergy H1. Po změření fluorescence bylo patrné, že v suspenzi, kde byl přidán $2\times$ nebo $10\times$ ředěný resazurin, bylo více živých buněk než v suspenzi se zásobním roztokem resazurinu. Změřené hodnoty u suspenze s $2\times$ a $10\times$ ředěným resazurinem se příliš nelišily, proto byl kvůli lepší barevné vizualizaci pro další měření použit $2\times$ ředěný resazurin ($0,15 \text{ mg.ml}^{-1}$).

Kvůli příliš malým objemům acetonových extraktů řasy *Chlorella sorokiniana* byla MIC stanovována v 96-jamkové mikrotitrační destičce metodou růstových křivek a následně fluorescenčně za použití resazurinu o koncentraci $0,15 \text{ mg.ml}^{-1}$.

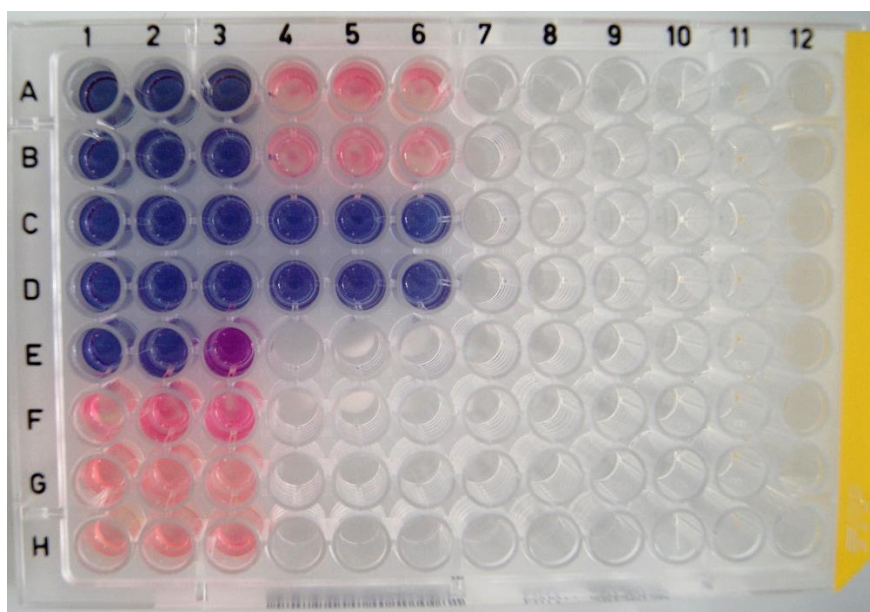
4.2.1 Testování frakcí extraktu řasy *Chlorella sorokiniana* metodou růstových křivek bakterií

Antimikrobiální aktivita frakcí získaných z RP-HPLC separace extraktu řasy (viz 3.1.3) byla testována měřením růstových křivek proti oběma genotypům. Pouze u extraktu frakce číslo 16 nebyl pozorován žádný inhibiční účinek na bakterii *P. larvae* genotypu ERIC I, a to ani při nejvyšší testované koncentraci $50 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ (Obr. 13). Avšak při testování difuzními testy se malá inhibiční zóna vytvořila, je proto možné, že antimikrobiální účinky tento extrakt vykazuje až při vyšší koncentraci. Nejlepší účinky vykazoval extrakt frakce číslo 7, jehož MIC u obou genotypů byla $6,3 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$. Poměrně nízké MIC byly pozorovány také u extraktů frakce číslo 8, 9 a 10. Naopak nejméně účinné extrakty vůči genotypům ERIC I i ERIC II byly frakce číslo 6, 14, 16 a 17. Jejich MIC byla $25 - 50 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$. Hodnoty MIC testovaných extraktů proti *P. larvae* genotypu ERIC I jsou shrnuty v Tabulce 7 a hodnoty MIC získané z testování extraktů proti *P. larvae* genotypu ERIC II jsou v Tabulce 8.

Hodnoty MIC byly ověřeny také vizuálně po přidání roztoku resazurinu ($0,15 \text{ mg.ml}^{-1}$), který je v přítomnosti mrtvých buněk modrý, avšak v přítomnosti živých buněk je redukován na růžový resorufin (Mariscal et al., 2009). V posledním řádku, kde měl resazurin modré zbarvení, byla odečtena hodnota MIC. Na Obr. 14 vidíme výsledek z testování antimikrobiálního účinku extraktu frakce číslo 5 proti *P. larvae* genotypu ERIC II. MIC byla stanovena v řádku E, kde koncentrace extraktu odpovídá $31 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$.

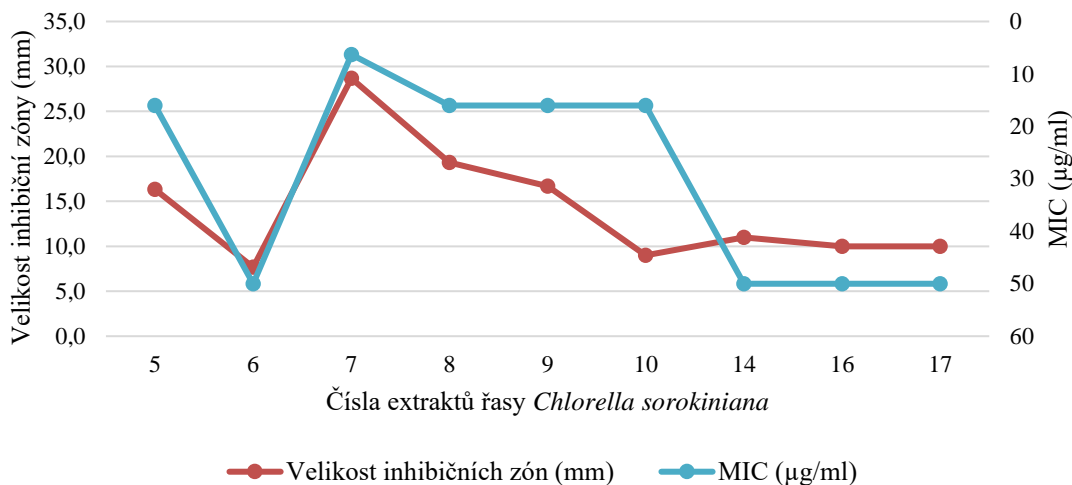


Obr. 13: Růstová křivka *P. larvae* genotypu ERIC I po přidavku acetonového extraktu frakce číslo 16 řasy *Chlorella sorokiniana*.

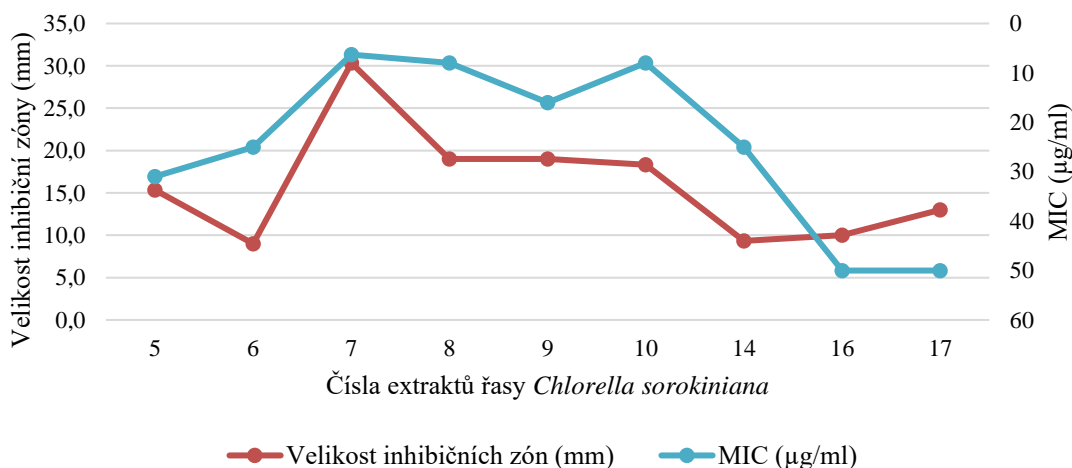


Obr. 14: Stanovení MIC extraktu frakce číslo 5 s *P. larvae* genotypu ERIC II. Koncentrace extraktu v řadách: A – 500 µg.ml⁻¹; B – 250 µg.ml⁻¹; C – 125 µg.ml⁻¹; D – 63 µg.ml⁻¹; E – 31 µg.ml⁻¹; F – 16 µg.ml⁻¹; G – 8 µg.ml⁻¹; H – 4 µg.ml⁻¹. 4 – 6A: suspenze živých buněk; 4 – 6B: suspenze živých buněk + 4% aceton; 4 – 6C: suspenze mrtvých buněk usmrcených 70% isopropanolem; 4 – 6D: suspenze buněk + TTC (66 µmol.l⁻¹).

Ze získaných hodnot MIC a velikostí inhibičních zón u 9 testovaných extraktů řasy *Chlorella sorokiniana* byl vytvořen pro oba genotypy *P. larvae* graf (Obr. 15 a Obr. 16), na kterém můžeme vidět, že čím větší inhibiční zónu extrakt vytvářel, tím nižší byla jeho MIC a extrakt tak vykazoval lepší antimikrobiální účinky.



Obr. 15: Biologická aktivita 9 testovaných extraktů řasy *Chlorella sorokiniana* proti *P. larvae* genotypu ERIC I. Číslo extraktů odpovídají pořadí jednotlivých frakcí sbíraných z RP-HPLC. Velikosti inhibičních zón byly získány ze spolupráce s Mgr. Dominikou Činčárovou z Mikrobiologického ústavu Akademie věd v Třeboni.

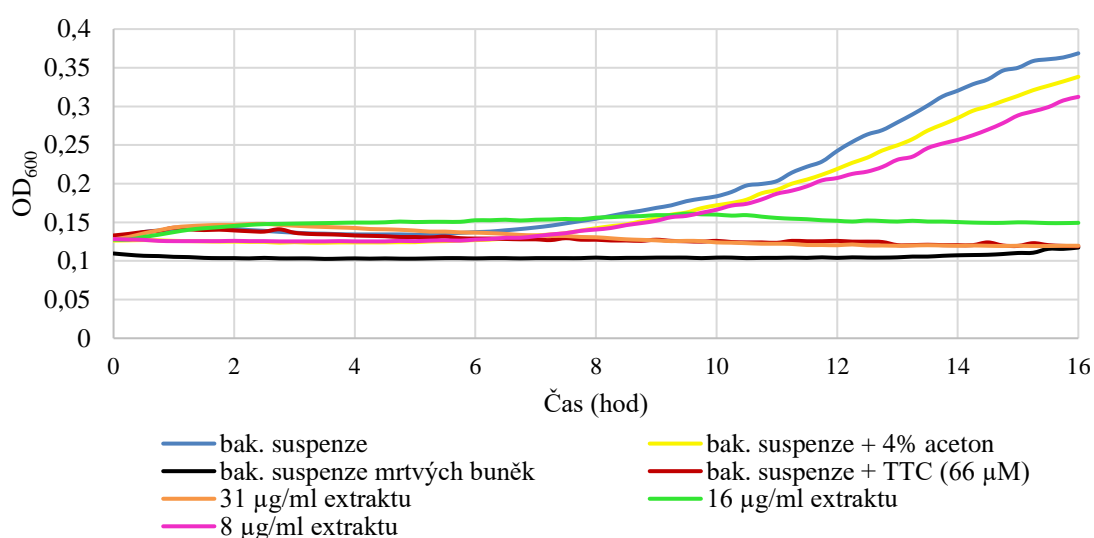


Obr. 16: Biologická aktivita 9 testovaných extraktů řasy *Chlorella sorokiniana* proti *P. larvae* genotypu ERIC II. Číslo extraktů odpovídají pořadí jednotlivých frakcí sbíraných z RP-HPLC. Velikosti inhibičních zón byly získány ze spolupráce s Mgr. Dominikou Činčárovou z Mikrobiologického ústavu Akademie věd v Třeboni.

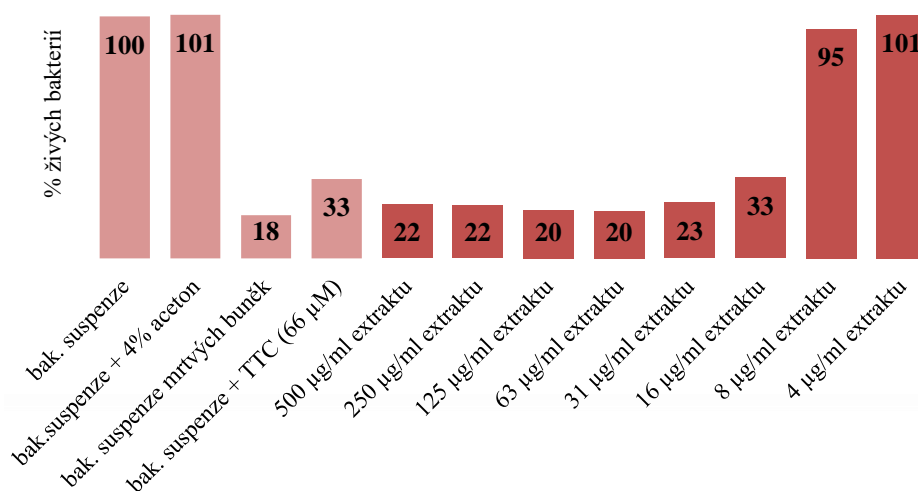
4.2.2 Stanovení relativní životnosti bakterií *P. larvae* pomocí resazurinu

Po sestavení růstových křivek bakterií byl k bakteriální suspenzi s testovaným extraktem řasy přidán roztok resazurinu ($0,15 \text{ mg.ml}^{-1}$) a následně byla změřena fluorescence. Ze získaných hodnot byla spočtena relativní životnost bakterie *P. larvae* v přítomnosti jednotlivých extraktů o různých koncentracích. Jako 100% životnost bakterií byla brána pozitivní kontrola, která obsahovala pouze živou bakteriální

suspenzi připravenou v MYPGP médiu. Na Obr. 17 je znázorněna růstová křivka *P. larvae* genotypu ERIC I po přidavku acetonového extraktu frakce číslo 5. Při koncentraci extraktu $16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nebyl bakteriální růst pozorován, avšak při koncentraci $8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl účinek extraktu příliš slabý, aby byl bakteriální růst potlačen. Koncentrace $16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je tedy MIC tohoto extraktu. Na Obr. 18 pak vidíme, že při této koncentraci suspenze obsahovala 33 % živých buněk. Při nižších koncentracích extraktu byla životnost bakterií téměř 100%. Všechny spočítané hodnoty životnosti bakterií při příslušné MIC extraktu pro genotyp ERIC I a ERIC II jsou shrnuty v Tabulce 7 a v Tabulce 8.



Obr. 17: Růstová křivka *P. larvae* genotypu ERIC I po přidavku acetonového extraktu číslo 5.



Obr. 18: Graf relativní životnosti bakterie *P. larvae* genotypu ERIC I po přidavku extraktu frakce číslo 5 o různých koncentracích.

Tab. 7: Velikost inhibičních zón a MIC u jednotlivých frakcí extraktů řasy *Chlorella sorokiniana* vůči bakterii *P. larvae* genotypu ERIC I.

Číslo frakce (extraktu)	*Velikost inhibičních zón (mm)	MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Životnost (%)
5	16,3	16	33
6	7,7	50	23
7	28,7	6,3	23
8	19,3	16	36
9	16,7	16	25
10	9	16	21
14	11	50	21
16	10	> 50	101
17	10	50	34

*spolupráce s Mgr. Dominikou Činčárovou z Mikrobiologického ústavu Akademie věd v Třeboni

Tab. 8: Velikost inhibičních zón a MIC u jednotlivých frakcí extraktů řasy *Chlorella sorokiniana* vůči bakterii *P. larvae* genotypu ERIC II.

Číslo frakce (extraktu)	*Velikost inhibičních zón (mm)	MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Životnost (%)
5	15,3	31	12
6	9	25	42
7	30,3	6,3	33
8	19	8	30
9	19	16	18
10	18,3	8	28
14	9,3	25	44
16	10	50	43
17	13	50	11

* spolupráce s Mgr. Dominikou Činčárovou z Mikrobiologického ústavu Akademie věd v Třeboni

4.3 Optimalizace protokolu pro stanovení životnosti bakterií *P. larvae* pomocí fluorescein diacetátu (FDA) a propidium jodidu (PI)

Pokusy byly prováděny na mikroskopickém readeru Cytation 5 v 96-jamkové mikrotitrační destičce, kdy bylo ke 100 μl bakteriální suspenze ($\text{OD}_{600} = 0,1$), připravené ve fyziologickém roztoku, přidáno 10 μl nebo 15 μl pracovního roztoku FDA ($50\times$ ředěný zásobní roztok o koncentraci $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Po 20 – 30 min inkubaci ve tmě bylo 20 μl přeneseno do jamky mikrotitrační destičky a pozorováno při zvětšení $600\times$. Kvůli příliš vysokému pozadí nebyly žádné bakterie pozorovány, proto v následujícím měření byl použit $100\times$ ředěný zásobní roztok FDA. Po přidání 5 μl , 10 μl nebo 15 μl takto naředěného roztoku FDA ke 100 μl bakteriální suspenze a inkubace 20 – 30 min ve tmě nebyly bakterie na readeru opět pozorovány, proto další měření bylo prováděno na fluorescenčním mikroskopu.

Zprvu byla připravována bakteriální suspenze (100 μl) ve fyz. roztoku, ke které bylo přidáno 1 μl , 2 μl , 100 μl nebo 200 μl pracovního roztoku FDA ($100\times$ ředěný zásobní

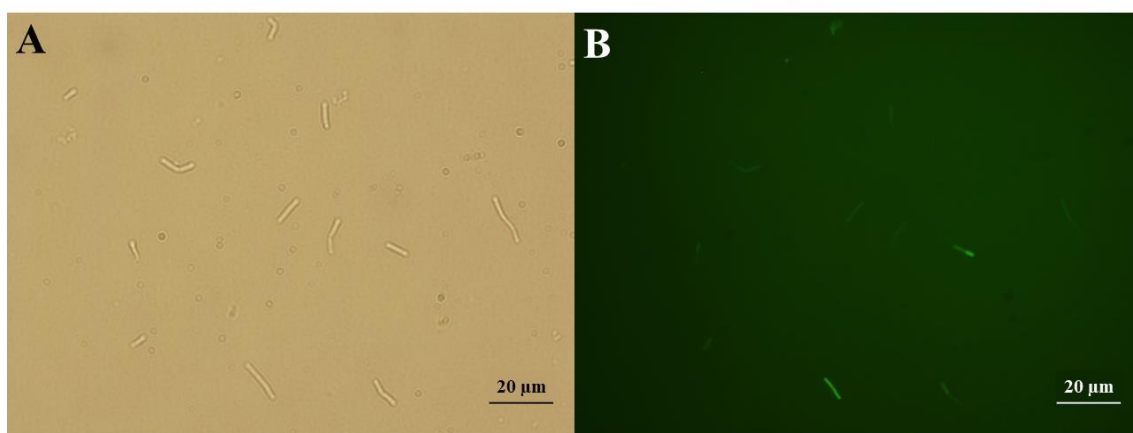
roztok FDA). Jako ideální doba inkubace bylo zvoleno 30 – 50 min ve tmě, poté byla suspenze aplikována v objemu 20 μl na podložní sklíčko a po přikrytí krycím sklíčkem byly bakteriální buňky pozorovány pod imerzním objektivem (celkové zvětšení 600 \times) ve světelném a fluorescenčním módu mikroskopu. Po přidání FDA o objemu 1 μl a 2 μl nebyly zeleně svítící bakterie pozorovány, avšak přidal-li se stejný či dvojnásobný objem FDA jako bylo suspenze, bakterie fluoreskovaly. Toto uspořádání měření však mělo problematickou opakovatelnost.

Dále pro přípravu suspenze byla testována i sterilní voda a kultivační MYPGP médium. Ve sterilní vodě k fluorescenci bakterií nedocházelo, avšak byla-li suspenze připravena v MYPGP médiu, tak po přidání stejného objemu pracovního roztoku FDA jako bylo bakteriální suspenze, docházelo k fluorescenci živých bakterií. Častým problémem bylo, že i když bylo ve světelném módu mikroskopu pozorováno poměrně dost bakterií ($\text{OD}_{600} = 0,1$), tak po zapnutí fluorescenčního módu fluoreskovala asi jen 1/3 bakterií nebo byl jejich fluoreskující signál velmi slabý (viz Obr. 19). Proto byly dále testovány bakteriální suspenze o vyšším $\text{OD}_{600} = 0,2$; 0,3 nebo 0,5. U bakteriální suspenze $\text{OD}_{600} = 0,3$ nebo 0,5 bylo pod mikroskopem pozorováno příliš mnoho bakterií, které byly i v několika vrstvách na sobě, což komplikovalo zaostření mikroskopu a pozorování ve fluorescenčním módu. Jako vhodná hustota suspenze byla zvolena $\text{OD}_{600} = 0,2$, kdy bakterie nevytvářely několik vrstev a ve fluorescenčním módu byly dobře pozorovány (Obr. 20).

Pro pozorování mrtvých buněk byl k suspenzi buněk v MYPGP médiu, ošetřených 70% isopropanolem (viz 3.2.5.1), přidáván pracovní roztok PI (200 \times ředěný zásobní roztok PI o koncentraci 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Ke 100 μl suspenze bylo nejprve přidáno po 1 μl , 2 μl nebo 10 μl pracovního roztoku PI, avšak po uplynutí doby inkubace k fluorescenci bakterií nedocházelo nebo bakterie svítily jen velmi slabě. Objem roztoku PI byl proto zvýšen na 100 μl , kdy po 30 – 50 min inkubace ve tmě byly pozorovány červeně svítící bakterie (Obr. 21). Bakteriální suspenze byla nejprve připravována na hustotu $\text{OD}_{600} = 0,1$, ale kvůli nízkému počtu pozorovaných bakterií při fluorescenci byla zvolena optická denzita $\text{OD}_{600} = 0,2$.

Aby bylo možné určit počet živých a mrtvých buněk a stanovit tak životnost bakterií po přidání potenciální látky s antimikrobiálními účinky, bylo potřeba určit optimální množství pracovního roztoku PI a FDA přidávaného k bakteriální suspenzi živých

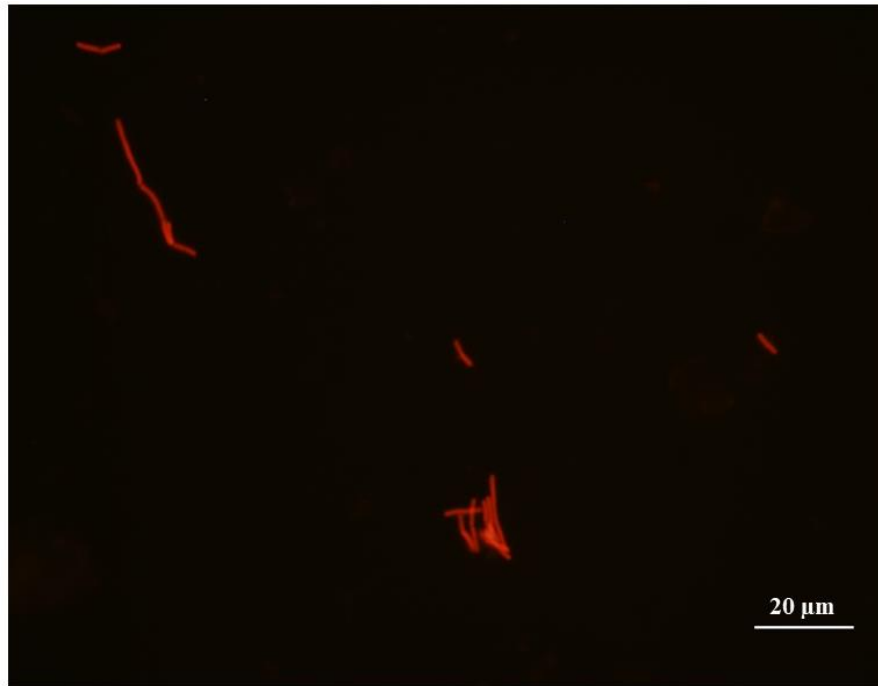
(50 μl) a mrtvých buněk (50 μl). S ohledem na již dosažené výsledky je potřeba metodiku zoptimalizovat a potlačit vliv pozadí i problematickou opakovatelnost.



Obr. 19: Porovnání počtu bakterií suspenze *P. larvae* ($\text{OD}_{600} = 0,2$) pořízeno po 30 min inkubaci při celkovém zvětšení $600\times$ ve světelném módu (A) a fluorescenčním módu (B). Ke 100 μl bakteriální suspenze bylo přidáno 100 μl pracovního roztoku FDA ($0,05 \text{ mg.ml}^{-1}$).



Obr. 20: Obrázek bakteriální suspenze *P. larvae* ($\text{OD}_{600} = 0,2$) pořízen po 50 min inkubaci mikroskopem ve fluorescenčním módu při celkovém zvětšení $600\times$. Ke 100 μl bakteriální suspenze bylo přidáno 100 μl pracovního roztoku FDA ($0,05 \text{ mg.ml}^{-1}$).



Obr. 21: Obrázek bakteriální suspenze *P. larvae* ($OD_{600} = 0,2$) mrtvých buněk pořízen po 30 min inkubaci mikroskopem ve fluorescenčním módu při celkovém zvětšení $600\times$. Ke $100\ \mu\text{l}$ bakteriální suspenze bylo přidáno $100\ \mu\text{l}$ pracovního roztoku PI ($0,05\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

5 DISKUZE

Dle protokolu Bassi *et al.* (2015) byl metodou PCR a následnou detekcí na agarosovém gelu zařazen bakteriální kmen *P. larvae* CCM 4484 mezi genotyp ERIC I a bakteriální kmen *P. larvae* VM 6135 mezi genotyp ERIC II. U obou těchto kmenů byl pozorován charakteristický produkt o velikosti 970 bp a u *P. larvae* VM 6135 navíc produkt o velikosti 2800 bp typický pro ERIC II (Genersh *et al.*, 2006). U genotypu ERIC I, vzniká také produkt o velikosti 1200 bp, avšak jak můžeme vidět u Genersh *et al.*, 2006, tak tento band je velmi slabý, pravděpodobně tohoto produktu vzniká velmi málo, a proto nebyl mnou ani detekovatelný. Bassi *et al.* (2015) zařadili celkem 117 testovaných bakteriálních kmenů k příslušnému genotypu ERIC a také nepozorovali u ERIC I produkt o velikosti 1200 bp. Kromě těchto rozdílů se oba genotypy od sebe odlišují také barvou svých kolonií. Zatímco genotyp ERIC I má spíš naředěné kolonie a průhledné, tak ERIC II průhledné kolonie nikdy nemá a jejich zbarvení je oranžové či krémově bílé. Oranžová pigmentace se většinou vyskytuje pouze u některých podkmenů *P. larvae*, zatímco krémové zbarvení je mnohem častější a bylo pozorováno i v této práci u použitého bakteriálního kmene *P. larvae* VM 6135 (Ashiralieva a Genersch, 2006; Bassi *et al.*, 2015).

K testování antimikrobiální aktivity je velmi často využívána metoda difuzních testů nebo metoda růstových křivek, pomocí které můžeme určit i MIC antimikrobiální látky. Vizuálně hodnotu MIC můžeme určit také za použití roztoku resazurinu, který je v přítomnosti mrtvých buněk modrý, avšak živými buňkami je redukován na růžový resorufin. Touto metodou byla stanovena MIC vodných extraktů řasy *Chlorella sorokiniana* v mé bakalářské práci (Vránová, 2017), avšak v porovnání s acetonovými extrakty testované v diplomové práci, nebyly vodné extrakty tolik účinné. Hodnoty MIC se pohybovaly v rozmezí 0,039 – 2,5 mg.ml⁻¹. Kvůli lepší vizualizaci byl k testování vodných extraktů používán roztok resazurinu o koncentraci 0,3 mg.ml⁻¹, avšak Pace a Burg (2015) uvádí, že při delší době inkubace může být resazurin pro buňky toxický. Pro testování antimikrobiálních účinků acetonových extraktů byl proto v diplomové práci použit resazurin o koncentraci 0,15 mg.ml⁻¹. Damiani *et al.* (2014) dokonce doporučují používat resazurin o koncentraci 0,1 mg.ml⁻¹.

Pomocí difuzních testů bylo zjištěno, že antimikrobiální účinky proti oběma genotypům *P. larvae* vykazovalo celkem 11 extraktů řasy (výsledky nejsou součástí této práce). Kvůli nedostatečnému objemu k testování u extraktu frakce číslo 18 a 19, byla

metodou růstových křivek stanovována MIC pouze u 9 extraktů. Nejlepší antimikrobiální účinky proti bakterii *P. larvae* vykazovalo prvních 5 extraktů označených jako frakce číslo 5, 7, 8, 9 a 10 (MIC = 6,3 – 31 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), což odpovídá zhruba první třetině z celkem 33 sbíraných frakcí. Jednotlivé frakce byly sbírány z HPLC s methanolvým gradientem, je tedy pravděpodobné, že látky obsažené v jednotlivých frakcích mají hydrofobní charakter. Případná navazující studie by měla navázat na tyto výsledky a identifikovat látky obsažené v jednotlivých frakcích.

Ibrahim *et al.* (2015) testovali ethanolové extrakty řasy *Chlorella vulgaris* proti grampozitivním bakteriím (*P. larvae* patří taky mezi grampozitivní). Hodnoty MIC ethanolových extraktů byly mnohem vyšší (250 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a to i přesto, že koncentrace používaných extraktů řasy *Chlorella vulgaris* byla větší (100 – 500 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) než koncentrace extraktů *Chlorella sorokiniana* (1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ příp. 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Kromě extraktů z řas vykazují antimikrobiální aktivitu také esenciální oleje (EO) získávané z přírodních látek, které jsou taktéž hydrofobními látkami. Allipi *et al.* (1994) testovali antimikrobiální aktivitu EO z citronové trávy, máty peprné, blahovičnicku kulatoplodého, tymiánu obecného či saturejky zahradní. Testování bylo prováděno proti bakterii *P. larvae* a nejlepší antimikrobiální účinky byly zjištěny u EO z citronové trávy. Antimikrobiální aktivita byla přisuzována látce zvaná citral patřící mezi terpenoidní látky, které jsou obecně známy svými antimikrobiálními vlastnostmi (Cowan, 1999).

Pro stanovení životnosti buněk se často využívá fluorescenčních barviv FDA a PI, kdy se změří hodnoty fluorescence a následně se pomocí kalibrační křivky stanoví životnost buněk po přidavku potenciální antimikrobiální látky (Godballe, 2013). Běžně užívané jsou komerční kity, jako například The LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit, jehož součástí je fluorescenční barvivo SYTO 9 pronikající do buněk, které následně svítí zeleně a PI, který proniká do buněk s poškozenou buněčnou membránou a v důsledku toho jsou pak buňky červené (Boulos, 1999). Kromě stanovení životnosti buněk z fluorescenčních hodnot lze buňky pozorovat i pomocí fluorescenčního mikroskopu. Jednou ze zásadních věcí, aby experiment fungoval, je smíchat obě fluorescenční látky o správné koncentraci a ve správném poměru. Jones a Senft (1985) si připravili pracovní roztoky FDA a PI o koncentraci 0,02 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a následně je oba přidali k bakteriální suspenzi, kdy množství přidávaného FDA bylo 2 μg a množství PI 0,6 μg . Po uplynutí doby inkubace (5 – 40 min) byly buňky

pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem. V této práci bylo k bakteriální suspenzi přidáváno po 2,5 µg FDA i PI. Množství přidávaných činidel bude třeba ještě dále optimalizovat.

Při stanovování životaschopnosti buněk za použití FDA mohou nastat dva potenciální problémy (Clarke *et al.*, 2001). Jedním z nich je hydrolýza FDA na fluorescein přítomností některých složek média (trypton, pepton, kvasničný extrakt) a to i za nepřítomnosti živých buněk, čímž získáme falešné negativní výsledky. Druhý problém, který může nastat, je naopak zeslabení fluorescenčního signálu. Clarke *et al.* (2001) testovali jednotlivá média včetně jednotlivých složek a zjistili, že u 1% tryptonu dochází až ke 40% hydrolýze FDA po 2 h inkubaci. V případě 1% kvasničného extraktu, který je přidáván do MYPGP média pro kultivaci *P. larvae*, byla pozorována 10% hydrolýza FDA. U LB (Luria–Bertani) média bylo naopak pozorováno zeslabení fluorescenčního přibližně o 65 %. Byla-li jednotlivá média naředěna, došlo k výraznému poklesu hydrolýzy FDA, příp. zesílení fluorescenčního signálu.

Řasa *Chlorella* je známá svými pozitivní účinky na lidský i zvířecí organismus, a to díky schopnostem produkovat několik bioaktivních látek jako jsou proteiny, peptidy, aminokyseliny, sacharidy a další. Tyto látky napomáhají nejen při posílení imunitního systému, čímž zvyšují odolnost proti infekcím, ale také působí při regeneraci organismu (Cebotari *et al.*, 2017). Již bylo zjištěno, že řasa *Chlorella vulgaris* má pozitivní účinek na růst a produktivitu včelstev (Eremia *et al.*, 2013), a proto je dobré ji podávat jako doplněk stravy, avšak má předchozí (Vránová, 2017) i nynější studie ukazují, že řasa *Chlorella sorokiniana* má také antimikrobiální účinky proti bakterii *P. larvae*, která způsobuje mor včelího plodu. Díky těmto výsledkům se objevuje nová možná cesta, která by mohla vést k potlačení a zamezení šíření tohoto závažného včelího onemocnění.

6 ZÁVĚR

V teoretické části byla vypracována literární rešerše o bakteriálních nákazách včely medonosné (*Apis mellifera*) zaměřená na bakterii *P. larvae*, původce moru včelího plodu a bakterii *M. plutonius* způsobující hnilobu včelího plodu. Dále byla popsána sporulace bakterií a klíčení bakteriálních spor, a nakonec byly shrnuty dosavadní poznatky o metodách testování antimikrobiálních látek, o přírodních látkách s antimikrobiálními účinky a o řase *Chlorella* spp., včetně možných způsobů jejího využití ve včelařství.

Předmětem praktické části bylo pomocí mikrobiologických metod otestovat antimikrobiální účinky řasy *Chlorella sorokiniana* vůči bakterii *P. larvae* genotypu ERIC I a ERIC II. Oba genotypy byly určeny metodou PCR. Byl optimalizován protokol pro stanovení MIC acetonových extraktů za použití metody růstových křivek bakterií a pro vizuální kontrolu byla využita fluorescenční metoda s využitím resazurinu. Bylo otestováno 9 frakcí extraktů řasy separované pomocí RP-HPLC. Nejlepší účinky vykazoval extrakt frakce číslo 7, jehož MIC proti oběma genotypům *P. larvae* byla $6,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Naopak bez účinku vůči genotypu ERIC I byl extrakte frakce číslo 16.

Posledním bodem bylo pomocí fluorescenčního mikroskopu kvantifikovat počet živých a mrtvých buněk po přidání potenciální antimikrobiální látky za použití FDA a PI. Bylo optimalizováno přidávané množství FDA k suspenzi živých buněk, množství PI k suspenzi mrtvých buněk a stanovena délka inkubace, avšak po smíchání obou fluorescenčních činidel nebylo možné životnost bakterií stanovit. Metodu bude třeba dále optimalizovat.

7 LITERATURA

- Alippi A. M., Ringuelet J. A., Cerimele E. L., Re M. S., Henning, C. P. (1996): Antimicrobial activity of some essential oils against paenibacillus larvae, the Causal Agent of American Foulbrood Disease. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* **4**, 9-16.
- Aljadi A. M. a Yusoff K. M. (2003): Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. *Turkish Journal of Medical Sciences* **33**, 229-236.
- Alonso-Salces R. M., Cugnata N. M., Guaspari E., Pellegrini M. C., Aubone I., de Piano F. G., Antunez K. a Fuselli S. R. (2017): Natural strategies for the control of Paenibacillus larvae, the causative agent of American foulbrood in honey bees: a review. *Apidologie* **48**, 387-400.
- Alvarado I., Phui A., Elekonich M. M. a Abel-Santos E. (2013): Requirements for In Vitro Germination of Paenibacillus larvae Spores. *Journal of Bacteriology* **195**, 1005-1011.
- Antunez K., Harriet J., Gende L., Maggi M., Eguaras M. a Zunino P. (2008): Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. *Veterinary Microbiology* **131**, 324-331.
- Ash C., Priest F. G. a Collins M. D. (1993): Molecular-identification of ribosomal-rna group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a pcr probe test - proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **64**, 253-260.
- Ashiralieva A. a Genersch E. (2006): Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees - a review. *Apidologie* **37**, 411-420.
- Atkinson A. W., Gunning B. E. S. a John P. C. L. (1972): Sporopollenin in the cell wall of Chlorella and other algae: Ultrastructure, chemistry, and incorporation of ¹⁴C-acetate, studied in synchronous cultures. *Planta* **107**, 1-32.
- Baicha Z., Salar-Garcia M., Ortiz-Martinez V. M., Hernandez-Fernandez F., de Los Rios A. P., Labjar N., Lotfi E. a Elmahi M. (2016): A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells. *Fuel Processing Technology* **154**, 104-116.
- Bailey L. (1956): Etiology of European Foul Brood; a Disease of the Larval Honey-bee. *Nature* **178**, 1130-1130.
- Bailey L. (1983): Melissococcus-pluton, the cause of european foulbrood of honey bees (apis spp). *Journal of Applied Bacteriology* **55**, 65-69.
- Baky H. H. A. E. a El-Baroty G. S. (2013): Healthy Benefit of Microalgal Bioactive Substances. *Journal of Aquatic Science* **1**, 11-22.
- Balouiri M., Sadiki M. a Ibensouda S. K. (2016): Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **6**, 71-79.
- Bamrick J. F. a Rothenbuhler W. C. (1961): Resistance to american foulbrood in honey bees .4. relationship between larval age at inoculation and mortality in a resistant and in a susceptible line. *Journal of Insect Pathology* **3**, 381-390.
- Barbosa I., Garcia S., Barbier-Chassefiere V., Caruelle J. P., Martelly I. a Papy-Garcia D. (2003): Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology* **13**, 647-653.
- Bassi S., Formato G., Milito M., Trevisiol K., Salogni C. a Carra E. (2015): Phenotypic characterization and ERIC-PCR based genotyping of Paenibacillus larvae isolates recovered from American foulbrood outbreaks in honey bees from Italy. *Veterinary Quarterly* **35**, 27-32.
- Bastos E., Simone M., Jorge D. M., Soares A. E. E. a Spivak M. (2008): In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against Paenibacillus larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* **97**, 273-281.
- Becker E. W. (2004): Microalgae in human and animal nutrition. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. (Richmond A. ed.), Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Berthold N., Czihal P., Fritsche S., Sauer U., Schiffer G., Knappe D., Alber, G. a Hoffmann, R. (2013): Novel Apidaecin 1b Analogs with Superior Serum Stabilities for Treatment of

- Infections by Gram-Negative Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**, 402-409.
- Bewicke D. a Potter B. A. (1984): *Chlorella: The emerald food*. Berkeley, CA: Ronin Publishing.
- Bilikova K., Mirgorodskaya E., Bukovska G., Gobom J., Lehrach H. a Simuth J. (2009): Towards functional proteomics of minority component of honeybee royal jelly: The effect of post-translational modifications on the antimicrobial activity of apalbumin2. *Proteomics* **9**, 2131-2138.
- Bilikova K., Popova M., Trusheva B. a Bankova V. (2013): New anti-Paenibacillus larvae substances purified from propolis. *Apidologie* **44**, 278-285.
- Bishop W. M. a Zubeck H. M. (2012): Evaluation of Microalgae for use as Nutraceuticals and Nutritional Supplements. *Journal of Nutrition & Food Sciences* **2**, 1-6.
- Bock C., Krienitz L. a Proschold T. (2011): Taxonomic reassessment of the genus Chlorella (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea* **11**, 293-312.
- Borba R. S. a Spivak M. (2017): Propolis envelope in Apis mellifera colonies supports honey bees against the pathogen, Paenibacillus larvae. *Scientific Reports* **7**.
- Boulos L., Prevost M., Barbeau B., Coallier J. a Desjardins R. (1999): LIVE/DEAD (R) BacLight (TM): application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* **37**, 77-86.
- Bravo L. (1998): Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**, 317-333.
- Cardozo K. H. M., Guaratini T., Barros M. P., Falcao V. R., Tonon A. P., Lopes N. P., Campos S., Torres M. A., Souza A. O., Colepicolo P. a Pinto E. (2007): Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **146**, 60-78.
- Cebotari V., Buzu I., Gliga O. a Postolachi O. (2017): New nutritional supplements for bees during deficient harvesting periods. *Lucrari Stiintifice-University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iasi, Seria Zootehnie*, **67**, 73-80.
- Clarke J. M., Gillings M. R., Altavilla N. a Beattie A. J. (2001): Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. *Journal of Microbiological Methods* **46**, 261-267.
- Cornara L., Biagi M., Xiao J. B. a Burlando B. (2017): Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Frontiers in Pharmacology* **8**.
- Cornell University, Department of Microbiology: <https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/bacterial-endospores> (20. 12. 2018)
- Cowan M. M. (1999): Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**, 564-582.
- Cushnie T. P. T., Cushnie B. a Lamb A. J. (2014): Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents* **44**, 377-386.
- Daglia M. (2012): Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* **23**, 174-181.
- Damiani N., Fernandez N. J., Porrini M. P., Gende L. B., Alvarez E., Buffa F., Brascesco C., Maggi M. D., Marcangeli J. A. a Eguaras M. J. (2014): Laurel leaf extracts for honeybee pest and disease management: antimicrobial, microsporidicidal, and acaricidal activity. *Parasitology Research* **113**, 701-709.
- de Hoon M. J. L., Eichenberger P. a Vitkup D. (2010): Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network. *Current Biology* **20**, 735-745.
- de Rycke P. H., Joubert J. J., Hosseinian S. H. a Jacobs F. J. (2002): The possible role of Varroa destructor in the spreading of American foulbrood among apiaries. *Experimental and Applied Acarology* **27**, 313-318.
- Decker A. R. a Ramamurthi K. S. (2017): Cell Death Pathway That Monitors Spore Morphogenesis. *Trends in Microbiology* **25**, 637-647.

- Djukic M., Brzuszkiewicz E., Funfhaus A., Voss J., Gollnow K., Poppinga L., Liesegang H., Garcia-Gonzalez E., Genersch E. a Daniel R. (2014): How to Kill the Honey Bee Larva: Genomic Potential and Virulence Mechanisms of *Paenibacillus* larvae. *Plos One* **9**.
- Dorman H. J. D. a Deans S. G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 308-316.
- Erbán T., Ledvinka O., Kamler M., Hortová B., Nesvorná M., Tyl J., Titera D., Marković M. a Hubert J. (2017): Bacterial community associated with worker honey bees (*Apis mellifera*) affected by European foulbrood. *PeerJ* **5**.
- Eremia N., Bahcivanji M. a Zagareanu A. (2013): Study of influence of algal "*Chlorella Vulgaris*" suspension on growth and productivity of bees families. *Lucrari Stiintifice-University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iasi, Seria Zootehnie* **59**, 148-152.
- Errington J. (2003): Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology* **1**, 117-126.
- Flesar J., Havlik J., Klouček P., Rada V., Titera D., Bednar M., Stropnický M. Kokoska L. (2010): In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus* larvae and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Veterinary Microbiology* **145**, 129-133.
- Forsgren E. (2010): European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S5-S9.
- Forsgren E., Budge G. E., Charriere J. D. a Hornitzky M. A. Z. (2013): Standard methods for European foulbrood research. *Journal of Apicultural Research* **52**.
- Friedl T. (1995): Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae - a phylogenetic analysis of 18s ribosomal-RNA sequences from *dictyochloropsis-reticulata* and from members of the genus *myrmecia* (chlorophyta, trebouxiophyceae cl-nov). *Journal of Phycology* **31**, 632-639.
- Fries I. a Camazine S. (2001): Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie* **32**, 199-214.
- Fries I., Lindstrom A. a Korpela S. (2006): Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus* larvae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Veterinary Microbiology* **114**, 269-274.
- Fujiwara S., Imai, J., Fujiwara M., Yaeshima T., Kawashima T. a Kobayashi K. (1990): A potent antibacterial protein in royal jelly - purification and determination of the primary structure of royalisin. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 11333-11337.
- Funfhaus A., Ebeling J. a Genersch E. (2018): Bacterial pathogens of bees. *Current Opinion in Insect Science* **26**, 89-96.
- Garcia-Gonzalez E., Muller S., Hertlein G., Heid N., Sussmuth R. D. a Genersch E. (2014): Biological effects of paenilamicin, a secondary metabolite antibiotic produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus* larvae. *Microbiologyopen* **3**, 642-656.
- Genersch E. (2010): American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S10-S19.
- Genersch E., Forsgren E., Pentikainen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J. a Fries I. (2006): Reclassification of *Paenibacillus* larvae subsp *pulvifaciens* and *Paenibacillus* larvae subsp *larvae* as *Paenibacillus* larvae without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 501-511.
- Godballe T. (2013): *Mode of action studies on sythetic antimicrobial peptides*. Diplomová práce, Roskilde University, Dánsko.
- Han S., Zhang Z. H. a Liu, H. Q. (2004): Effects of *chlorella* growth factor on physiological fiction. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*.
- Heatley N. G. (1944): A method for the assay of penicillin. *Biochemical Journal* **38**, 61-65.
- Hegedus D., Erlandson M., Gillott C. a Toprak U. (2009): New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. *Annual Review of Entomology*.
- Heyndrickx M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Janssen P., Kersters K., Devos P., Logan N. A., Ali N. a Berkeley R. C. W. (1996): Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al* 1994, a later subjective 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 270-279.
- Huss V. A. R., Frank C., Hartmann E. C., Hirmer M., Kloboucek A., Seidel B. M., Wenzeler P. a Kessler E. (1999): Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *Journal of Phycology* **35**, 587-598.
- Cheshire F. R. a Cheyne W. W. (1885): The Pathogenic History and History under Cultivation of a new *Bacillus* (*B. alvei*), the Cause of a Disease of the Hive Bee hitherto known as Foul Brood. *Journal of Microscopy* **5**, 581-601.
- Chouhan S., Sharma K. a Guleria S. (2017): Antimicrobial Activity of Some Essential Oils - Present Status and Future Perspectives. *Medicines* **4**, 58.
- Ibrahim K., Ramli R., Rashid A., Halim A., Yusof M., Anum Y. (2015): Antimicrobial Property of Water and Ethanol Extract *Chlorella vulgaris*: A Value-Added Advantage for a New Wound Dressing Material. *International Medical Journal* **22**, 399-401.
- Jones K. H. a Senft J. A. (1985): An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate propidium iodide. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **33**, 77-79.
- Jorgensen J. H. a Ferraro M. J. (2009): Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* **49**, 1749-1755.
- Juarez A. B., Velez C. G., Iniguez A. R., Martinez D. E., Rodriguez M. C., Vigna M. S. a de Molina M. D. R. (2011): A *Parachlorella kessleri* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) strain from an extremely acidic geothermal pond in Argentina. *Phycologia* **50**, 413-421.
- Kalembe D. a Kunicka A. (2003): Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* **10**, 813-829.
- Kanbar G. a Engels W. (2003): Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites. *Parasitology Research* **90**, 349-354.
- Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze: <http://botany.natur.cuni.cz/algo/database/node/104> (27. 2. 2019).
- Katznelson H. (1950): *Bacillus pulvifaciens* (n sp), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. *Journal of Bacteriology* **59**, 153-155.
- Krienitz L., Hegewald E. H., Hepperle D., Huss V. A. R., Rohrs T. a Wolf M. (2004): Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia* **43**, 529-542.
- Kwakman P. H. S., Te Velde A. A., de Boer L., Speijer D., Vandenbroucke-Grauls C. a Zaat S. A. J. (2010): How honey kills bacteria. *Faseb Journal* **24**, 2576-2582.
- Kwakman P. H. S. a Zaat S. A. J. (2012): Antibacterial components of honey. *Iubmb Life* **64**, 48-55.
- Lee W. H. a Rosenbaum M. (1987): *Chlorella: The Sun-Powered Supernutrient and its Beneficial Properties*. Connecticut, USA: Keats Publishing Inc.
- Lindstrom A., Korpela S. a Fries I. (2008a): The distribution of *Paenibacillus* larvae spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of Invertebrate Pathology* **99**, 82-86.
- Lindstrom A., Korpela S. a Fries I. (2008b): Horizontal transmission of *Paenibacillus* larvae spores between honey bee (*Apis mellifera*) colonies through robbing. *Apidologie* **39**, 515-522.
- Macartain P., Gill C. I. R., Brooks M., Campbell R. a Rowland I. R. (2007): Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition Reviews* **65**, 535-543.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Clark D. P. a Stahl D. A. (2010): *Brock biology of microorganisms*. Pearson Education Inc., San Francisco, USA.
- Mariscal A., Lopez-Gigosos R. M., Carnero-Varo M. a Fernandez-Crehuet J. (2009): Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology* **82**, 773-783.

- McCluskey C., Quinn J. P. a McGrath J. W. (2005): An evaluation of three new-generation tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity in activated sludge microorganisms. *Microbial Ecology* **49**, 379-387.
- McKee B. A., Djordjevic S. P., Goodman R. D. a Hornitzky M. A. (2003): The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. *Apidologie* **34**, 19-27.
- McKenney P. T., Driks A. a Eichenberger P. (2013): The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 33-44.
- Merchant R. E. a Andre C. A. (2001): A review of recent clinical trials of the nutritional supplement *Chlorella pyrenoidosa* in the treatment of fibromyalgia, hypertension, and ulcerative colitis. *Alternative Therapies in Health and Medicine* **7**, 79-91.
- Molan P. C. (1992): The antibacterial activity of honey .1. the nature of the antibacterial activity. *Bee World* **73**, 5-28.
- Muller S., Garcia-Gonzalez E., Genersch E. a Sussmuth R. D. (2015): Involvement of secondary metabolites in the pathogenesis of the American foulbrood of honey bees caused by *Paenibacillus larvae*. *Natural Product Reports* **32**, 765-778.
- Němcová Y. a Kalina T. (2000): Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*, *C. sorokiniana* compared with *C. luteoviridis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Archiv fuer Hydrobiologie Supplement* **136**, 95-105.
- Neustupa J., Němcová Y., Elias M. a Skaloud P. (2009): *Kalinella bambusicola* gen. et sp nov (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid *Chlorella*-like subaerial alga from Southeast Asia. *Phycological Research* **57**, 159-169.
- Nijs A., Cartuyvels R., Mewis A., Peeters V., Rummens J. L. a Magerman K. (2003): Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 3627-3630.
- Northcote D. H., Goulding K. J. a Horne R. W. (1958): Chemical composition and structure of the cell wall of *chlorella-pyrenoidosa*. *Biochemical Journal* **70**, 391-397.
- Pace R. T. a Burg K. J. L. (2015): Toxic effects of resazurin on cell cultures. *Cytotechnology* **67**, 13-17.
- Peeters E., Nelis H. J. a Coenye T. (2008): Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods* **72**, 157-165.
- Pitchford P. (2003): *Healing With Whole Foods: Asian Traditions and Modern Nutrition*. 3rd ed. North Atlantic Books, U.S., 784 stran.
- Poppinga L. a Genersch E. (2015): Molecular pathogenesis of American Foulbrood: how *Paenibacillus larvae* kills honey bee larvae. *Current Opinion in Insect Science* **10**, 29-36.
- Posten C. a Walter C. (2012): *Microalgal Biotechnology: Integration and Economy*. (Posten C. a Walter C. eds.), Walter de Gruyter, Berlín, 319 stran.
- Ramanathan A., Nair A. J. a Sugunan V. S. (2018): A review on Royal Jelly proteins and peptides. *Journal of Functional Foods* **44**, 255-264.
- Rauch S., Ashiralieva A., Hedtke K. a Genersch E. (2009): Negative Correlation between Individual-Insect-Level Virulence and Colony-Level Virulence of *Paenibacillus larvae*, the Etiological Agent of American Foulbrood of Honeybees. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 3344-3347.
- Roussel M., Villay A., Delbac F., Michaud P., Laroche C., Roriza D., El Alaoui H. a Diogon M. (2015): Antimicrosporidian activity of sulphated polysaccharides from algae and their potential to control honeybee nosemosis. *Carbohydrate Polymers* **133**, 213-220.
- Sansawa H., Takahashi M., Tsuchikura S. a Endo H. (2006): Effect of *chlorella* and its fractions on blood pressure, cerebral stroke lesions, and life-span in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **52**, 457-466.
- Setlow P. (2003): Spore germination. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 550-556.
- Silici S. a Kutluca S. (2005): Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology* **99**, 69-73.

- Simone M., Evans J. D. a Spivak M. (2009): Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution* **63**, 3016-3022.
- Skulberg O. M. 2004: Bioactive chemicals in microalgae. In: *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* (Richmond A., ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 485-512.
- Stocks S. M. (2004): Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. *Cytometry Part A* **61A**, 189-195.
- Truper H. G. a De' Clari, L. (1998): Taxonomic note: erratum and correction of further specific epithets formed as substantives (nouns) 'in apposition'. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 615-615.
- Tvrzicka E., Kremmyda L. S., Stankova B. a Zak A. (2011): Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease - a review. part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical Papers-Olomouc* **155**, 117-130.
- Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F. J. a Lipski J. R. (1994): Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* **5**, 25-40.
- Vezeteu T. V., Bobis O., Moritz R. F. A. a Buttstedt A. (2017): Food to some, poison to others - honeybee royal jelly and its growth inhibiting effect on European Foulbrood bacteria. *Microbiologyopen* **6**.
- Votava M., Růžička F., Woznicová V., Černohorská L., Dvořáčková M., Dvořáková Heroldová M., Holá V. a Zahradníček O. (2010): *Lekárská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Neptun, Brno, Česká republika.
- Vránová T. (2017): *Antibakteriální účinky extraktů z řasy Chlorella sorokiniana vůči bakterii Paenibacillus larvae*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika.
- White G. F. (1906): *Bacteria of the apiary, with special reference to bee diseases*. U. S. Department of Agriculture, Bureau of Entomology, United States, 50 stran.
- White G. F. (1912): The cause of European foulbrood. U. S. Department of Agriculture, Bureau of Entomology, United States, 15 stran.
- Yamamoto M., Kurihara I. a Kawano S. (2005): Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, Parachlorella kessleri (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta* **221**, 766-775.
- Yue D., Nordhoff M., Wieler L. H. a Genersch E. (2008): Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and Paenibacillus larvae, the causative agent of American foulbrood of honeybees (Apis mellifera). *Environmental Microbiology* **10**, 1612-1620.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

bp	base pair (páru bází)
CA	autotrofní řasa
CAD	autotrofní degradovaná řasa
CGF	Chlorella growth factor
DMSO	dimethylsulfoxid
ERIC	enterobacterial repetitive intergenic consensus
FDA	fluorescein diacetát
HVP	hniloba včelího plodu
CHM	heterotrofní řasa
MGO	methylglyoxal
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MJRP	major royal jelly protein
MK	mastná kyselina
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid
MVP	mor včelího plodu
OD	optical density (optická hustota)
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PI	propidium jodid
PM	peritrofní membrána
RJ	royal jelly (mateří kašička)
RP-HPLC	reversed-phase high performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází)
TAE	Tris-acetát-EDTA pufr
TTC	tetracyklin
XTT	2,3-bis {2-methoxy-4-nitro-5-[(sulfenylamino) karbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxid}

9 PŘÍLOHY

9.1 Difuzní testy vodných, acetonových a methanolových extraktů řasy

Všechny extrakty o koncentraci 10 mg.ml^{-1} byly aplikovány po $10 \mu\text{l}$ na naočkované MYPGP médium v triplikátu. Pro každý bakteriální kmen bylo testování provedeno dvakrát. Jak můžeme vidět v Tabulce 9, tak acetonový extrakt CHM (heterotrofní řasa) neměl žádné antimikrobiální účinky proti *P. larvae* CCM 38 a stejně tak acetonový extrakt CAD (autotrofní degradovaná řasa) proti *P. larvae* CCM 39 a vodný extrakt CAD proti *P. larvae* CCM 4484. Celkově všechny vodné extrakty nebyly příliš účinné, buď neměly žádné antimikrobiální účinky na potlačení růstu bakterie a nevytvářely žádné inhibiční zóny, nebo jen velmi malé okolo 8 – 9 mm. Stejně tak acetonové extrakty nevykazovaly antimikrobiální účinky, kromě extraktu CHM, který potlačil růst bakteriálního kmene *P. larvae* CCM 4483 a vytvářel inhibiční zóny o velikosti 10 - 12 mm. Nejlepší účinky vykazovaly methanolové extrakty, jejichž inhibiční zóny byly větší než 20 mm. Methanolový extrakt CA (autotrofní řasa) dosáhl při testování s *P. larvae* CCM 5680 velikosti inhibiční zóny až 40 mm. Jako kontrola bylo používáno rozpouštědlo, ve kterém byl daný extrakt připraven. Rozpouštědlo bylo aplikováno po $10 \mu\text{l}$ na naočkované MYPGP médium a po uplynutí doby inkubace nebyla pozorována žádná inhibiční zóna.

Tab. 9: Velikost inhibičních zón u testovaných extraktů řasy proti kmenům *P. larvae* (n = 6).

Označení bakteriálního kmene <i>P. larvae</i>	Extrakty řasy <i>Chlorella sorokiniana</i>	Velikosti inhibičních zón (mm)
CCM 38	acetonový CHM	–
CCM 39	acetonový CAD	–
	vodný CHM	$8,7 \pm 0,47$
CCM 4483	acetonový CHM	$11,2 \pm 0,91$
	vodný CHM	$8,5 \pm 0,50$
	vodný CAD	$8,3 \pm 0,47$
CCM 4484	vodný CAD	–
CCM 4486	methanolový CHM	$14,2 \pm 1,21$
CCM 4488	methanolový CAD	$19,5 \pm 2,14$
CCM 5680	methanolový CHM	$21,8 \pm 1,46$
	methanolový CAD	$28,3 \pm 4,19$
	methanolový CA	$37,3 \pm 2,29$