

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

Přírodní látky v léčbě a prevenci včelího moru

Diplomová práce



Vedoucí práce: Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.

Autor: Komárová Tamara

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Přírodní látky v léčbě a prevenci včelího moru vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne:

.....
Komárová Tamara

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Jaroslavu Havlíkovi, PhD., který mě při zpracování práce odborně vedl a Ing. Ivu Doskočilovi za pomoc při výzkumu. Taky bych ráda poděkovala Ing. Janu Tylovi za poskytnutí larev a pomoc s nimi.

Souhrn

Model odchovu včelích larev *in vitro* je ideální pro testování vlivu přírodních látek na imunitu plodu. Byla použita jednoduchá metoda pro odchov včelích larev (*Apis mellifera*) *in vitro*. Dva dny staré larvy byly přesunuty na Petriho misky a krmeny základní stravou každý druhý den. Bylo prokázáno, že včelí larvy mohou být chovány *in vitro* bez každodenního krmení. Tento přístup snížil časové nároky na test a umožnil zvýšit počet odchovaných larev.

V rámci této práce byla studována schopnost larev čelit infekčnímu tlaku patogenního mikroorganismu *Paenibacillus larvae* po podání sanguinarinu ve dvou různých koncentracích 0,1 mg/ml a 0,01 mg/ml. Bylo zjištěno, že ve skupině larev s přidaným sanguinarinem v koncentraci 0,01 mg/ml, bylo procento larev, které přežily o 14 % vyšší než v kontrolní skupině. Ve skupině s koncentrací sanguinarinu v krmivu 0,1 mg/ml bylo procento larev, které přežily o 10,2 % vyšší než v kontrolní skupině, ale nižší než po podání antibiotik. Z důvodu vyšší směrodatné odchylky zjištěné rozdíly statisticky neprůkazné, podávání sanguinarinu ale ukazuje trend zvýšení přežití neinfikovaných larev a larev infikovaných *P. larvae*.

Klíčová slova: med, alkaloidy, včelí larvy, *Apis mellifera*, sanguinarin, odchov *in vitro*, *Paenibacillus larvae*

Summary

In vitro rearing of the bee larvae is ideal for testing the effect of natural substances on the fetal immunity. We used a simple method for rearing bee larvae (*Apis mellifera* L.) *in vitro*. Two-day-old larvae were transferred to Petri dishes and fed a basic diet every other day. It was shown that the bee larvae can be reared *in vitro* without daily feeding. This approach reduced the time required to the test and allowed to increase the number of reared larvae. As part of this work, it was studied the ability of larvae to face the pressure of a pathogen microorganism *Paenibacillus larvae* after administration of the sanguinarine in two different concentrations of 0.1 mg/ml and 0.01 mg/ml. It was found that in the group with the addition of the sanguinarine at the concentration of 0.01 mg/ml, the percentage of the survived larvae was 14 % higher than in the control group. In the group with the sanguinarine concentration in the feed of 0.1 mg/ml, the percentage of larvae that survived was 10.2 % higher than in the control group, but lower than after administration of antibiotics. Due to a higher standard deviation are the results statistically inconclusive, but there can be found a trend that shows an increase in survival of the uninfected larvae and the larvae infected with *P. larvae* microorganism after use of the sanguinarine.

Key words: honey, alkaloids, bee larvae, *Apis mellifera*, sanguinarine, *in vitro* rearing, *Paenibacillus larvae*

Obsah

1.	Úvod.....	7
2.	Cíle práce a hypotézy	8
2.1.	Role včel v hospodářství zemí EU.....	9
2.2.	Role opylovačů	9
2.3.	Produkce medu	11
2.4.	Ostatní včelí produkty	11
3.	Med a jeho nutriční vlastnosti	13
3.1.	Základní složky medu.....	13
3.2.	Antibakteriální účinky medu	17
3.3.	Toxické látky v medu	18
3.3.1.	Pesticidy	18
3.3.2.	Antibiotika	19
3.3.3.	Alkaloidy v medu.....	20
4.	Včelí mor a jiná mikrobiální onemocnění jako hrozba evropského včelařství.....	26
4.1.	Virové nákazy včel	26
4.1.1.	Virová nákaza včelího plodu	26
4.1.2.	Ostatní virové nákazy včel.....	26
4.2.	Bakteriální nákazy	27
4.2.1.	Mor včelího plodu.....	27
4.2.2.	Hniloba včelího plodu.....	28
4.2.3.	Ostatní bakteriální nákazy včel.....	28
4.3.	Invazivní nákazy.....	28
4.3.1.	Měňavková nákaza včel.....	28
4.3.2.	Nosematóza.....	29
4.3.3.	Syndrom zhroucení včelstev	29
4.3.4.	Varroa destructor	29
5.	Materiál a metody	31
6.	Výsledky	35
7.	Diskuze.....	38
8.	Závěr	42
9.	Seznam literatury	43
10.	Přílohy.....	Chyba! Záložka není definována.

1. Úvod

Diplomová práce je věnována problematice obsahu alkaloidů a toxických látek v nektaru a medu. Jejich vlivem na zdraví a schopnost správného vývoje včelích jedinců. Podává přehled o složkách medu, o výskytu alkaloidů a toxických látek v rostlinách a posléze i v medu, a také o nemocech postihujících včelstva.

Práce je pak zaměřena na výzkum odchovu včelích larev *Apis mellifera in vitro* a testování toxicity alkaloidu sanguinarinu ve dvou různých koncentracích. Byl studován jeho vliv na přežití včelích larev a schopnosti čelit infekčnímu tlaku mikrobiálního pathogena *P. larvae*.

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je velmi důležitý organismus pro životní prostředí i člověka. Činnost a rozvoj včelstva jsou úzce spjaty s životním prostředím, na jehož změny včely výrazně reagují. Stále se měnící klimatické podmínky omezují sběr nektaru a pylu, nejlepšími místy pro získávání potravy včelami jsou břehy řek, lesní okraje, nedotčené plochy zemědělské půdy a otevřené mýtiny. Těchto biotopů stále ubývá a včelí populace je tím ohrožena. Med, stejně jako ostatní přírodní produkty, může být kontaminován rezidui pesticidů, herbicidů a hnojiv, které se ve velké míře aplikují na rostliny. Hrozbou pro včelaře jsou v posledních letech také nemoci postihující včely. Pathogenní mikroorganismy se mezi včelami rychle šíří, protože tyto žijí v koloniích, což působí na jejich rychlé úpadky. V některých zemích je povolena aplikace antibiotik proti patogenům a jejich rezidua se poté vyskytují v medu. V EU se antibiotika na postižená včelstva aplikovat nesmí, nesmí je tedy obsahovat ani med. V současné době je hodně diskutovaným problémem obsah alkaloidů v medech, zejména v souvislosti s pyrrolizidinovými alkaloidy. Alkaloidy jsou sekundární metabolity rostlin a některé skupiny mohou být pro člověka relativně neškodné, např. kofein, nikotin nebo sanguinarin. V rostlinách se ovšem vyskytují také alkaloidy, které mohou být pro člověka nebo dobytek velmi toxickými. Proto je tato práce zaměřena mimo jiné na výzkum vlivu alkaloidu sanguinarinu na odolnost včelích larev vůči včelímu patogenu *P. larvae*. Práce se snaží poodhalit možnou roli alkaloidů ve fyziologii včel.

2. Cíle práce a hypotézy

Cílem této práce je zjistit vliv sanguinarinu, alkaloidu obsaženého v nektaru některých rostlin čeleni Papaveraceae na přežití včelích larev a jejich schopnosti čelit infekčnímu tlaku mikrobiálního patogenu *P. larvae*. Domníváme se, že by alkaloid sanguinarin, pro svůj protizánětlivý účinek a antibakteriální aktivitu, mohl podporovat včelí imunitu a zvyšovat tak životaschopnost včelích larev v koloniích se sub-klinickým tlakem *P. larvae*. Práce je zároveň i shrnutím poznatků o toxických rostlinných látkách v medu.

2.1. Role včel v hospodářství zemí EU

Po celém světě existuje asi než 30 000 druhů včel. Včely známé jako včely medonosné jsou zastoupeny osmi až deseti druhy rodu *Apis*. *Apis mellifera* se skládá z dvaceti čtyř různých ras. Nejběžnější rasou, která je hojně využívána ke komerční produkci medu je *Apis mellifera ligustica*. Tato rasa je známa pro vysokou produkci medu a její mírnou povahu, proto je u včelařů tolik oblíbená.

Včely *Apis mellifera* stejně jako ostatní hmyz procházejí čtyřmi životními etapami: vajíčko, larva, kukla a dospělec. Kompletní proměna trvá mezi šestnácti až čtyřiaadvaceti dny. Larva je krmena mateří kašičkou a směsí nektaru a pylu dokud nedosáhne správné velikosti. Poté se zakuklí a uvnitř buňky, která je pokryta voskem, se vyvíjí v dospělce. Když je vyvinuta, prokousává si ven cestu z buňky. Existují tři druhy dospělých včel: včela dělnice, jejíž proměna trvá asi dvacet jedna dní, trubec, který se vyvíjí dvacet čtyři a včelí královna, vyvíjející se v největších buňkách úlu pouhých šestnáct dní.

2.2. Role opylovačů

Včela medonosná (*Apis mellifera*) žije ve včelstvech, což jsou početné kolonie. Sestávají z jedné oplozené matky a jejich potomků, což činí asi 50 000–60 000 dělnic a 300–600 trubců, mezi nimiž funguje aktivní součinnost. Včelí královna hraje díky jejímu feromonu ústřední roli ve včelstvu. Jejím úkolem je zachovat druh tím, že klade vajíčka poté, co ji trubci osemení.

Všechnu práci potřebnou k tomu, aby vše fungovalo v úlu správně, vykonávají prakticky včely dělnice. Ihned poté, co se vylíhnou, začíná pracovat. Během prvních tří dnů svého dospělého života včela dělnice čistí buňky plástu, aby zde mohla včelí matka opět naklást nová vajíčka. Ve čtvrtém dni se stávají krmičkami, jejichž úkolem je starat se o plod a šestý den kojičkami, které mají za úkol krmit včelí matku mateří kašičkou. Následně, ihned poté, co se jim aktivují voskotvorné žlázy, z nich jsou stavitelky. V osmnáctém dni se z nich stávají strážkyně česna do doby jednadvacátého dne, kdy zahájí činnost sběratelskou a stává se včelou létavkou až do té doby, než se opravuje k smrti a hyne. Včely sběratelky přinášejí do úlu nektar, medovici, pyl, propolis a vodu. K přenášení nektaru a uchovávání vody slouží včelám létavkám medný váček. Včela poletuje z květu na květ a sbírá nektar, pyl nebo obojí najednou. Nektar má rostlina uložený hluboko uvnitř květu a poskytuje včelám čisté sacharidy. Voda je důležitá pro hydrataci včelstva po celý rok. Pyl je důležitý pro rozvoj včel díky svému obsahu bílkovin. Obsahuje dusík, fosfor, aminokyseliny a vitaminy (Stone, 2005).

Rostlina, která je hmyzosubná, tvoří pyl, jež má různé hrbolky, rýhy, háčky, hřebeny a lišty, aby ulpěly na chloupkách hustého kožíšku včely. V květu včela prolézá po prašnicích nebo kolem tyčinek a její tělo se přitom popráší pylem. Poté vzlétne nad květ a pročešává si kožíšek. Jazyček má přitom vystrčený kupředu a sem tam se dotkne lžičkou jazyčku levé nebo pravé nohy a navlhčí je obsahem medného váčku. Pyl je postupně vyčesáván hřebenem a uhněten do pastovité hmoty. Při hnětení je posouván do košíčku, což je prohlubeň na vnější straně holeně, kde je přenášen do úlu. Tam shodí pylovou rousku na místě uskladnění a o její další vývoj se již nestará. Přijme novou zásobu potravy, která ji dodává energii při letu, a vyletí na další sběr. Pylové rousky jsou zbarveny podle druhu rostliny, ze které byl pyl sesbírán. Většina rousek je jednobarevná, protože včely jsou převážně florokonstatní, tzn. věrné jednomu druhu rostliny (Veselý et al., 2003).

Nektar sbírají včely do svého medného váčku a zvyšují tím svou váhu až o polovinu. Po příjezdu do úlu obsah medného váčku vyvrhnou a pro včely dělnice uvnitř úlu. Tyto včely mladušky ho zpracovávají pomocí enzymů v jejich medném váčku a poté ho vyhodí do uskladňovacích buněk, kde zraje po dobu pěti dnů. V tuto dobu vzniká med. K výrobě jednoho litru medu je potřeba nektaru z pěti miliónů rostlin (Stone, 2005).

Klimatické podmínky omezují sběr nektaru a pylu. Čmeláci jsou důležití pro sběr na Severu Evropy a včely v jižní části Evropy. Pokud se budou tyto podmínky měnit a rostliny budou planě růst v oblastech, kde by se přirozeně vyskytovat neměly, může dojít k nedostatku populace opylovačů vhodných pro tyto rostliny. Je zapotřebí toto monitorovat. Rostliny, které jsou nastaveny pro opylování včelami, mají semeno obvykle velké a barevné a květy bohaté na nektar. Patří mezi ně mnoho plodin pěstovaných k výrobě potravin, zahradnictví a průmysl. Přiměřenost opylování určitého druhu rostliny se mění podle klimatu, prostředí a hustotě opylovačů v daném místě. Nejlepšími místy pro získávání potravy včelami jsou břehy řek, lesní okraje, nedotčené plochy zemědělské půdy a otevřené mýtiny. Pokles těchto biotopů ubývá a ohrožuje tím včelí populace. Progresivní ztráta trvalých travních porostů za účelem orné půdy v letech 1900–1970 vedla ke snížení biotopů vhodných pro včely a tím přispěla k vyhynutí některých druhů čmeláků ve Velké Británii, Francii a Belgii (Corbet et al., 1992). Včely v některých zemích EU jsou negativně ovlivněny z používání pesticidů (působí jim otravy), herbicidů (ničí jejich krmivo) a hnojiv, používaných na loukách (snižují rozmanitost rostlin a tedy i krmiva pro včely) (Corbet et al., 1992).

2.3. Produkce medu

V závěru roku 2010 bylo v České republice evidováno 528 186 včelstev, což v dlouhodobém srovnání se stavu v roce 1993 znamená zhruba třetinový pokles. V devadesátých letech došlo z ekonomických, nikoli zdravotních důvodů, v České republice k hrubému snížení včelstev a počtu včelařů. To se podařilo stabilizovat díky ekonomické podpoře od státu Evropského společenství. Nejkritičtější období bylo v roce 2008, kdy bylo 461 086 včelstev. Přestože stavy včelstev narostly, neprojevalo se to na produkci medu kvůli špatným snůškovým podmínkám. V roce 2010 dosáhly výnosy medu 7 455 tun, průměrný výnos na včelstvo byl tedy 14,11 kg. Spotřeba medu na obyvatele a rok je v České republice téměř 0,7 kg. V posledních letech vzrostl počet dovážených medů ze zemí EU. V roce 2010 se Česká republika poprvé v historii stala zemí, která více medu dováží, než vyváží. Vzhledem k tomu, že to byl relativně dobrý snůškový rok, to lze připisovat většímu zájmu občanů o kvalitní produkty kupované přímo u chovatele, jak už při tzv. prodeji „ze dvora“, tak na farmářských trzích (Mze, 2011).

Do Evropské unie se ročně doveze zhruba 130 000 tun medu ze zemí, které nejsou jejími členy, a s dalšími 90 000 tunami je obchodováno v rámci zemí Evropské unie (Dübecke et al., 2010). Med je konzumován čistý nebo se používá jako přísada do potravin, v kosmetickém nebo farmaceutickém průmyslu, protože má pověst přírodního a zdravého produktu

2.4. Ostatní včelí produkty

Propolis je směsí látek pryskyřičné povahy, kterou včely sbírají na pupenech rostlin, jako je topol, bříza, olše, jilm, jehličnany a jírovec maďal. Za chladu je tvrdý, při teplotě v úlu se stává měkkým, poddajným a lepkavým (Marcucci, 1994). Barva propolisu se mění od zelenožluté až k temně hnědé podle původu a barvy. Ten má v úlu mnohostranné použití a jsou obdivuhodné jeho účinky při udržování hygienického prostředí v něm. Včely jej používají také pro tmelení celých stěn úlu i jednotlivých plošek, zazdívají jim díry a otvory na zimu. Je to tepelně izolační látka, která zároveň impregnuje dřevěné stěny úlu a chrání je proti dřevokazným houbám. Balzamují jím také vetřelce, které usmrtily v úlu a nemohou je dostat z úlu ven, aby zabránily rozkladu jejich těl (Marcucci, 1994). Propolis si pro jeho antimikrobiální vlastnosti oblíbily také farmaceutické firmy. Aplikuje se formou mastí nebo roztoků. Může zvyšovat účinek některých antibiotik. V kožním lékařství se propolis osvědčil pro jeho antimykotické, antiseptické a bakteriostatické vlastnosti, je účinný také v léčbě chronických zánětů středního ucha (Marcucci, 1994).

Včelí vosk je metabolickým produktem včely dělnice, tvořící se ve voskotvorné žláze. Stavějí z něj plásty, do nichž ukládají zásoby a odchovávají v nich plod. Člověk používá včelí vosk získaný z plástů, které již nejsou vhodné k plodování (Veselý et al., 2003). Celosvětově je včelí vosk člověkem nejvíce používán v kosmetice, kde se přidává do různých mastí a krémů. Dále také na výrobu dekorativních svící, ve farmacii, a v produkci žvýkaček (Stone, 2005).

Pylová zrna, jež včely přinášejí do úlu jako svou základní potravu v rouskách na zadním páru noh, jsou samčí pohlavní buňky rostlin. Aby neklíčil, přidávají k němu včely látku zabraňující jeho klíčení. Pyl obsahuje do 10 % lipidů, mastných kyselin a sterolů. Obsah vitaminů je v něm mnohem vyšší než u ostatních včelích produktů (Veselý et al., 2003).

Mateří kašička je krmná šťáva, kterou produkují včely dělnice ve svých hltanových žlázách. Krmí tímto produktem své larvy. Včelí matka ji dostává během larválního vývoje i po vylíhnutí a včely dělnice pouze do třetího dne, a proto se pohlavně zcela nevyvinou. (Veselý et al., 2003). Mateří kašička je látka bělavé barvy s rosolovitou konzistencí, má výrazně ostrý zápach a chuť. Také je z části rozpustná ve vodě a velmi kyselá (pH 3,4–4,5) s hustotou 1,1 g/ml (Sabatini et al., 2009).

Včelí jed, jež vylučují včely dělnice ze své jedové žlázy na konci zadečku, slouží k obraně včelstva před vetřelci. Je to bezbarvá kapalina charakteristické vůně a kyselé chuti. Jed, který se dostane při vpichu žihadla do lidského organismu, způsobí popraskání buněčných membrán, stimuluje syntézu prostaglandinů a vyvolává v místě vpichu zánětlivý proces. Používání včelího jedu ve farmacii patří plně pod lékařskou kontrolu vzhledem k možné alergii (Veselý et al., 2003).

3. Med a jeho nutriční vlastnosti

3.1. Základní složky medu

Med je potravinou přírodního charakteru, která je vytvořená společenstvím včel z nektaru nebo medovice. Není tedy prostým roztokem cukrů, ale je obohacena o látky, které rostlina získává z vody, půdy a vzduchu. Obsahuje látky pro lidské zdraví prospěšné, mezi které patří minerály, vitaminy, řada bílkovin (např. royalisin), aminokyselin (prolin) aj. Může ovšem obsahovat i látky zdraví škodlivé. Jsou jimi pesticidy, které se v dnešní době hojně používají v zemědělství. V medu, převážně dovezeném z neevropských zemí se mohou vyskytovat rezidua antibiotik. V současné době se do pozornosti odborníků dostávají alkaloidy. Jsou to látky vznikající při přeměně aminokyselin a v rostlinné říši jsou hojně rozšířeny. Tyto mohou být zdraví prospěšné např. sanguinarin, nebo mohou organismu uškodit, např. kofein, nikotin, senecionin, jacozin, lycopsamin aj.

Tab. 1: Složení medu (data v g/100 g) (Bogdanov et al., 2008)

	Nektarový med		Medovicový med	
	průměr	min. – max.	průměr	min. – max.
Monosacharidy				
fructosa	38,2	30–45	31,8	28–40
glucosa	31,3	24–40	26,1	19–32
Disacharidy				
sacharosa	0,7	0,1–4,8	0,5	0,1–4,7
ostatní disacharidy	5,0	2–8	4,0	1–6
Trisacharidy				
melecitosa	<0,1		4,0	0,3–22,0
erlosa	0,8	0,5–6	1,0	0,1–6
ostatní trisacharidy	0,5	0,5–1	3,0	0,1–6
Nedefinované oligosacharidy	3,1		10,1	
Celkem cukry	79,7		80,5	

Minerální látky	0,2	0,1–0,5	0,9	0,6–2,0
Aminokyseliny, proteiny	0,3	0,2–0,4	0,6	0,4–0,7
Organické kyseliny	0,5	0,2–0,8	1,1	0,8–1,5
Voda	17,2	15–20	16,3	15–20
Hodnota pH	3,9	3,5–4,5	5,2	4,5–6,5

Přírodní med obsahuje především cukr a vodu. Cukr tvoří 95–99 % sušiny medu (White, 1975). Většinu těchto cukrů tvoří D-fruktosa (38,2 %) a D-glukosa (31,3 %). Jedná se o jednoduché, 6-uhlíkové cukry, které jsou v těle ihned vstřebávány. Záleží také na poměru těchto dvou cukrů. Čím více obsahuje med fruktosu, tím pomaleji dojde k jeho krystalizaci. Květové medy obsahují více glukosu, tuhnou tedy rychleji než medy medovicové, ve kterých je zastoupena více fruktosa. Dalšími cukry v medu jsou disacharidy maltosa, isomaltosa a sacharosa. Obsaženy jsou také dextriny, které spadají mezi oligosacharidy. Dextriny v medu obsahují 4–6 glukosových jednotek a řadí se mezi tzv. „achrodextriny“. V medovicovém medu můžeme najít trisacharid melecitosu, díky kterému med rychle krystalizuje a nelze vytočit. Vysloužil si proto název „Cementový – melecitosový med“. Konečný obsah vody v medu závisí na řadě faktorů životního prostředí při produkci medu. Je to především počasí a vlhkost prostředí uvnitř úlu, ale záleží také na stavu nektaru a zacházení s medem během jeho získávání a skladování (Aurongzeb a Kamran Azim, 2011). Organické kyseliny představují 0,57 % z medu (Aurongzeb a Kamran Azim, 2011). Jsou zodpovědné za jeho kyselost a do značné míry přispívají k charakteristické chuti medu (Aurongzeb a Kamran Azim, 2011; Wang a Li, 2011).

V medu se nachází také vitamin C (2,2–2,5 mg/100 g), thiamin (0,01 mg/100 g), riboflavin (0,01–0,02 mg/100 g), kyselina panthotenová (0,11 mg/100 g), vitamin K (ca. 0,025 mg/100 g) a niacin (0,10–0,20 mg/100 g), cholin (0,3–25 mg/kg), který je nezbytný pro kardiovaskulární a mozkové funkce, a acetylcholin (0,6–5 mg/kg), fungujícího jako neurotransmitter (Bogdanov et al., 2008).

Med obsahuje řadu bílkovin a volných aminokyselin (Aurongzeb a Kamran Azim, 2011). Z celkového množství látek v medu zaujímají bílkoviny přibližně 0,5 % (Won et al., 2008). V medu se nacházejí bílkoviny o různé molekulové hmotnosti v závislosti na druhu včel, které ho vytváří (Won et al, 2008). Většina enzymů je do medu přidána včelami během zrání medu (White, 1975). Bílkoviny obsažené v medu pochází z nektaru, pylu a včely.

Stanovení podílu rostlinných bílkovin a živočišných bílkovin ze včely může být významné pro stanovení indexu kvality medu (Nazarian et al., 2010). Přítomnost řady proteinů je indikátorem zeměpisného a rostlinného původu medu (Nazarian et al., 2010). V poslední době se k určení zeměpisného původu medu používá hmotnostní spektrometrie (Wang et al., 2009). Bílkoviny, které do medu přidává včela, mají mnohem vyšší molekulovou hmotnost než bílkoviny rostlinného původu (Aurongzeb a Kamran Azim, 2011). Nedávno byl v medu identifikován včelí imunopeptid Defensin-1 (Kwakman et al., 2010). Tento peptid, který je známý také jako royalisin byl dříve identifikován v hemolymfě včel, v jejich hlavě, hltanové žláze a mateří kašičce. Má potenciál využití k léčbě infekcí a vývoji nových léků proti bakteriím odolným na antibiotika (Aurongzeb a Kamran Azim, 2011), je účinný proti Gram-pozitivním bakteriím *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a *P. larvae*. Z výzkumu, který provedla Bachanová et al. (2001), vyplývá, že royalisin je peptid, který působí proti *P. larvae*. Účinnost proti *P. larvae* byla zaznamenána pouze v antibakteriální skupině obsahující větší množství peptidů (Bachanová et al., 2001). Další studie prováděna na Slovensku Bilíkovou et al., uvádí, že peptid izolovaný dvojí dialýzou mateří kašičky, který obsahoval royalisin jako dominantní prvek, inhiboval růst *P. larvae* (Bilíková et al., 2001).

Vědci spojují antibakteriální účinky medu s obsahem peptidů, glykopeptidů a bílkovin v něm obsažených (Aurongzeb a Kamran Azim, 2011). Hlavními enzymy jsou invertasa, amylasa a glukosooxidasa. Tyto enzymy mají původ v hypofaryngeálních žlázách včel dělnic. Mimo výše zmíněných se v medu objevují enzymy pocházející z rostlin, jako jsou katalasy, kyselá fosfatasa, amylasa aj. (Gheldof et al., 2002). Invertasa štěpí sacharosu na glukosu a fruktosu a katalyzuje tvorbu oligosacharidů. Hlavní invertasou je glukosooxidasa. Pod pojmem diastasa se rozumí soubor enzymů štěpících škrob z obou jeho konců za vzniku produktů o různé molekulární hmotnosti. Je to enzym, který dokládá tzv. čerstvost medu. Díky jeho citlivosti na teplo se dá v medu změřit tzv. hodnota Schadeho jednotek, které by podle norem EU měly odpovídat minimálně osm stupňům (Muli et al., 2007). Jestliže je hodnota nižší, med byl nesprávně zahříván, nebo nevhodně a dlouhodobě skladován. Diastasa je směs enzymů, složená z α -amylasy, která pochází přímo od včel, kde je tvořena hltanovými žlázami a β -amylasy, která je rostlinného původu a nachází se v pylových zrnech. Glukosooxidasa se podílí na tvorbě kyseliny glukonové z glukosy a přičemž vzniká peroxid vodíku, který je aktivní principem inhibinu (antibakteriálního činitele medu). Glukosooxidasa je téměř neaktivní v hustém normálním medu, nicméně, stává se aktivní, např. i při kožní aplikaci na ránu s hnisavým exsudátem (White et al. 1963). Používá se toho např. v tradiční

medicině při hojení ran, umožňuje to pomalé uvolňování peroxidu vodíku na úrovni, která je anti-mikrobiální, ale není škodlivá pro tkáň (Aurongzeb a Kamran Azim, 2011). Peroxid vodíku v medu, produkovaný glukosooxidasou, hraje důležitou roli při léčbě zánětů (Aurongzeb a Kamran Azim, 2011). Koncentrace peroxidu vodíku v medu se pohybuje kolem 1 mM, což je 1000 krát méně než 3 % roztok peroxidu vodíku, který je běžně používán k dezinfekci (Molan, 1992). V této koncentraci se peroxid vodíku chová jako intracelulární a intercelulární přenašeč schopný podporovat zvýšenou expresi genů souvisejících s hojením ran (Aurongzeb a Kamran Azim, 2011). Předpokládanou přirozenou funkcí peroxidu vodíku je konzervace nezralého medu, ve kterém ještě není tak vysoká koncentrace cukru, před mikroorganismy působícími kvašením (Kwakman a Zaat, 2012).

Hlavními aminokyselinami, které byly v medu nalezeny je prolin, fenylalanin, tyrosin, lysin, arginin, kyselina glutamová, histidin a valin (Hermosín et al., 2003). Nejvíce je v medu zastoupena aminokyselina prolin, kterou do medu přidávají dělnice ze svých hltanových žláz v průběhu jeho tvorby. Prolin by měl být v medu obsažen z více, jak 66 % (obvykle 80–90 %) z celkového počtu aminokyselin s obsahem 200 mg/kg (Hermosín et al., 2003). Ke snížení prolínu v produktu vede zahřívání medu, jeho ředění sirupy či nižší kondice včelstva. Z těchto důvodů můžeme obsah prolínu používat k indikaci falšování medu. Podíl ostatních aminokyselin v medu závisí na původu medu, zda je nektarový nebo medovicový. Hlavním zdrojem aminokyselin v medu je pyl rostlin, proto by obsah jednotlivých aminokyselin v něm mohl posloužit jako identifikátor botanického původu tohoto produktu. Mezi látky bílkovinné povahy, vyskytující se v medu patří také hormony acetylcholin, noradrenalin, adrenalin, dopamin a hormonální látky z mateří kašičky.

Množství minerálních látek v medu je malé a přínos pro doporučené denní dávky různých stopových látek je proto marginální. Je prokázáno, že různé druhy medů obsahují různé množství minerálních látek a stopových prvků. V medu najdeme vápník (3–31 mg/100 g), sodík (1,6–17 mg/100 g), draslík (40–3500 mg/100 g), hořčík 0,7–13 mg/100 g), fosfor (2–15 mg/100 g), zinek (0,05–2 mg/100 g), měď (0,02–0,6 mg/100 g), železo (0,03–4 mg/100 g), mangan (0,02–2 mg/100 g), chrom (0,01–0,3 mg/100 g), selen (0,002–0,01 mg/100 g) (Bogdanov et al., 2008).

Na trhu je k dispozici široká škála medů z různých zemí s různými chuťovými látkami a barvivy v závislosti na jejich botanickém původu (Bogdanov et al., 2008). Vůně medu je závislá na druhu přítomných kyselin a aminokyselin. V rozsáhlých výzkumech na aromatické

složky medu v minulých letech bylo identifikováno více než 500 různých těkavých látek v různých typech medu (Bogdanov et al., 2008). Polyfenoly jsou další významné látky obsažené medu a podle typu medu se liší obsahem v rozmezí 56–500 mg/kg. Jedná se především o flavonoidy (např. quercetin, luteolin, kaempferol, apigenin, chrysin a galangin) s obsahem 60–460 µg/100 g medu, fenolové kyseliny a jejich deriváty (Bogdanov et al., 2008).

3.2. Antibakteriální účinky medu

Med je dobře znám svými antibakteriálními účinky. Byl používán k léčbě infekčních ran dříve jak před 2000 lety, ještě než byly bakterie známy jako původci infekcí (Bogdanov et al., 2008). Bylo zjištěno, že inhibuje více než 60 druhů bakterií, včetně aerobů, anaerobů, Gram-pozitivních a Gram-negativních patogenů včetně *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis* a *E. Coli* (Kwakman et al., 2010). Mimo to vykazuje antimykotickou aktivitu proti některým druhům plísní *Aspergillus* sp. a *Penicillium* sp. (Brady et al., 1997). Med je antimikrobiální díky obsahu peroxidu vodíku, osmotickému účinku a vysoké kyselosti (Aurongzeb a Kamran Azim, 2011). Pathogenní mikroorganismy odolné vůči antibiotikům jsou velmi rizikové pro veřejné zdraví. Výskyt takových mikroorganismů je stále větším problémem (Aurongzeb a Kamran Azim, 2011), v humánní medicíně. V posledních letech se šíří vědecké publikace o terapeutickém využití medu ve všeobecném i chirurgickém lékařství. Cavanagh et al. (1970) úspěšně použili med v pooperační péči o pacientky po odstranění dělohy kvůli léčbě rakoviny (Cavanagh et al., 1970). Med je velmi viskózní a hygroskopický, díky čemuž nasává vodu z okolí edematózní tkáně, čistí ránu a brání tím v rozvoji infekce (Allen et al., 1991). V další klinické studii, zahrnující kojence a děti trpící gastroenteritidou, bylo prokázáno, že med podávaný spolu s rehydratační tekutinou zkracuje dobu trvání bakteriálních průjmů (Manyi-Loh et al., 2011). Med v 1 % koncentraci stimuluje monocyty v buněčné kultuře k uvolňování cytokinů, tumor nekrotizujícího faktoru (TNF)-alpha, interleukin (IL)-1 a IL-6, které aktivují imunitní odpověď (Tonks et al., 2001). Směs D-glukosy a D-fruktosy v medu tvoří silnou interakci s vodou a snižují tak vodní aktivitu potřebnou pro mikroorganismy (Osato et al., 1999). Volná voda se měří jako vodní aktivita (a_w). Hodnoty a_w pro med jsou v rozmezí 0,479–0,557 se střední hodnotou 0,521 (Cavia et al., 2004). Hodnoty pH medu se pohybují mezi 3,2–4,5, což je dostatečně nízko, aby byly inhibiční pro mnoho patogenů (Aurongzeb a Kamran Azim, 2011). Minimální hodnoty pH pro růst např. *E. Coli* je 4,3, pro *Salmonella typhi* 4,0, *Pseudomonas aeruginosa* 4,4, *Streptococcus pyogenes* 4,5. Proto je

v neředěném medu kyselost významným antibakteriálním faktorem. Antibakteriální vlastnosti medu nabízejí vysoký potenciál v léčbě bakteriálních a plísňových infekcí (Aurongzeb a Kamran Azim, 2011).

3.3. Toxické látky v medu

Stejně jako jiné přírodní potraviny, i med může být kontaminován toxickými látkami z prostředí, jako jsou např. těžké kovy, pesticidy, antibiotika aj. (Bogdanov et al., 2008). V posledních letech byl problém hlavně v kontaminaci medu rezidui antibiotik, které se používají k léčbě včelích onemocnění. V současné době se tento problém zdá být pod kontrolou, v Evropské unii nejsou antibiotika k tomuto účelu povolována, a tudíž je nesmí obsahovat ani med vyskytující se na trhu (Bogdanov et al., 2008). V medu se mohou vyskytovat alkaloidy, což jsou sekundární metabolity, které jsou běžnou součástí rostlin. V současné době se jim dostává pozornost, protože jejich obsah v medu může být pro lidský organismus toxický. Patří mezi ně např. pyrrolizidinové alkaloidy, jejichž bližší popis uvádím níže.

3.3.1. Pesticidy

Používání chemikálií k hubení hmyzu, plevelu, chorob rostlin, červů a hlodavců je v moderním zemědělství stále častější. Malé množství těchto pesticidů zůstává v potravinách a představují tak potenciální riziko pro lidské zdraví, protože jsou toxické (Blasco et al., 2003). Nejrozšířenějšími pesticidy jsou organofosfáty a karbamáty, které nahradily organochlorové pesticidy, jež je zakázáno používat v Evropě i v Americe od roku 1978. Nicméně, tyto pesticidy se stále nacházejí v půdě, která je potenciálním zdrojem do ovzduší prostřednictvím odpařování, vody, rostlin a zvířat (Blasco et al., 2003). V medu se nejčastěji vyskytuje amitraz, kumafos, cymiazol, bromopropylát, flumetrin a fluvalinát, které se ve včelařství používají v boji proti varroáze a karbendazim, což je nejběžnější fungicid používaný v zemědělství (Rial-Otero et al., 2006). Aplikuje se hlavně k ochraně řepky olejné, která je jedním z hlavních zdrojů pylu pro včelstvo. Například, Německo, Itálie a Švýcarsko mají povoleny koncentrace reziduí amitrazu, bromopropylátu, kumafosu, cymiazolu, flumetrinu a fluvalinátu, které kolísají mezi 0,01–0,1 mg/kg v Německu, mezi 5–500 mg/kg ve Švýcarsku a 10 mg/kg v Itálii. Evropská unie má upraveny koncentrace reziduí v medu pro tři pesticidy. Jsou jimi amitraz, kumafos a cymiazol, které jsou 0,2; 0,1 a 1 mg/kg (Blasco et al., 2003). Simazin a atrazin jsou velmi efektivní herbicidy, jsou pro včely netoxické, nicméně je mohou z kontaminovaného květu zanechat do medu (Rezic et al., 2004).

3.3.2. Antibiotika

Antibiotika se ve včelařství mnoha zemí např. USA používají k léčbě některých chorob, např. moru včelího plodu. Jejich rezidua se poté mohou vyskytnout v medu. V Evropě je používání těchto antibiotik zakázáno, proto by se tyto rezidua při náhodném testování medů ze zemí EU, neměla objevit. Německo je jedním z nejdůležitějších center dovozu medu do EU. Projde zde asi 90 000 tun medu každým rokem. Ze všech zásilek medů, které jsou kontrolovány veterinární správou, je asi 8 % dovezeno z neevropských zemí. V roce 2008 byli na prvních třech místech dovozu do EU Argentina, Mexiko a Čína. Při kontrolách medů, prováděných veterinární správou, bylo zjištěno, že některé druhy medů obsahují spolu s kontaminanty léčiv také spory mikroorganismu *P. larvae*. Dle legislativy není v Evropském společenství povolena aplikace antibiotik na postižená včelstva, tudíž by se v medu neměla vyskytovat ani jejich rezidua. Proto byla v Německu provedena studie různých vzorků medů na přítomnost reziduí antibiotik a přítomnost mikroorganismu *P. larvae* (Näumann et al, 2011). Cílem jejich studie bylo analyzovat vybrané medy pro přítomnost mikroorganismu *P. larvae*, která by mohla představovat potenciální hrozbu přenosu této bakterie ze zahraničí. Bylo analyzováno třicet německých medů a čtyřicet sedm medů ze zemí mimo Evropu na přítomnost sulfonamidů, tripetoprimu, tetracyklinů, makrolidů, linkomycinu a chloramfenikolu.

Z dovážených medů bylo dvacet sedm ze čtyřiceti sedmi pozitivních na přítomnost *P. larvae*. Většina z nich byla dovezena z Argentiny, Číny a Kanady. Medy dovezené z neevropských zemí, které byly negativní na přítomnost *P. larvae*, byly z Chile, El Salvadoru, Guatemaly, Indie, Mexika a Uruguaye. Celkem pět z třiceti německých medů bylo pozitivních na přítomnost spor *P. larvae* a všechny byly ze Severního Německa a jeden vzorek byl pozitivní na přítomnost rezidua sulfathiazolu. Z medů importovaných z neevropských zemí bylo pozitivních dvacet dva vzorků z celkových čtyřiceti sedmi. V patnácti vzorcích byl nalezen více než druh antibiotik, v některých vzorcích bylo nalezeno až pět různých reziduí antibiotických léčiv, např. sulfathiazolu, sulfadimidinu, trimetoprimu, oxytetracyklinu, chloramfenikolu v argentinském medu a sulfathiazolu, sulfamethoxazolu, trimetoprimu, tetracyklinu a epitetacyklinu v čínském medu. Nejčastěji vyskytujícím se antibiotikem, v devíti z dvaceti dvou pozitivních vzorků, byl sulfamethoxazol (Näumann et al., 2011). Tento výzkum prokázal, že téměř 50 % medů dovážených z mimoevropských zemí je pozitivních na rezidua antibiotik (Näumann et al., 2011).

3.3.3. Alkaloidy v medu

V rostlinné říši najdeme několik tisíc druhů rostlin, které obsahují sekundární metabolity, alkaloidy. Ty jsou jednou z nejvíce různorodých skupin sekundárních metabolitů a mají často velmi silné fyziologické účinky. Mohou zabránit mikrobiální degradaci nektaru, působit jako filtr opylovačů těch daných květín, mohou vést opylovače k rychlejšímu pohybu mezi květinami a tím zvýšit křížové opylování (Köhler et al., 2011). Patří sem námelové alkaloidy, opiáty, rostlinné jedy, nikotin, kofein aj. a mnohé z nich jsou nepostradatelné v dnešním lékařství. První alkaloid, který byl chemicky prozkoumán, bylo opium. Bylo používáno po staletí pro své analgetické a omamné vlastnosti. Alkaloidy je možno rozdělit podle struktury do několika skupin. První skupinou jsou pyridinové alkaloidy, do kterých spadá např. anabasin a nikotin. Do druhé skupiny, tropanových alkaloidů, patří např. atropin a kokain. Mezi izochinolinové a fenanthrenové alkaloidy patří např. morfin a heroin. Třetí skupinou jsou alkaloidy indolové, zastoupeny např. LSD (diethylamid kyseliny lysergové), ergotamin, ergometrin, strychnin a brucin. Mezi purinové alkaloidy spadá kofein, theofylin a theobromin. Další skupinou jsou pyrrolizidinové alkaloidy, které jsou v několika rodech čeledí Asteraceae, Boraginaceae a Fabaceae esterově vázány. Jsou tvořeny bazickou necinovou složkou a necinovou kyselinou či jejím fragmentem. Níže uvedený text je zaměřen hlavně na pyrrolizidinové alkaloidy, kam patří např. lykopsamin, echimidin a senecionin. Kvůli jejich toxickým vlastnostem je jim věnována v poslední době velká pozornost. Dále se text krátce věnuje také alkaloidům kofeinu, nikotinu a sanguinarinu. Ten byl použit pro jeho antibakteriální a protizánětlivé účinky také v našem výzkumu.

Je známo, že několik rostlin, které včely využívají ke sběru nektaru, obsahují pyrrolizidinové alkaloidy (Bogdanov et al., 2008). Pyrrolizidinové alkaloidy (PA) jsou hlavními rostlinnými jedy, toxické pro játra s možností vzniku rakoviny. Na rozdíl od antibiotik nebo pesticidů jsou PA čistě přírodní látky, produkovány rostlinami jako sekundární metabolity k ochraně před býložravci. Byly již zpozorovány případy toxicity na hospodářských zvířatech, pasoucích se na místech, kde rostou rostliny s obsahem těchto alkaloidů. Došlo již také k lidským otravám po požití kontaminovaného obilí nebo případně záměrném požití bylin s obsahem PA (Anonym, 2001). Bylo odhadnuto, že asi 3 % všech kvetoucích rostlin, což je více než 6000 rostlinných druhů, obsahuje PA (Dübecke et al., 2010)). Většinou jde o různé druhy čeledí brutnákovitých (např. *Heliotropium* spp., *Echium*

spp., *Myosotis* spp., *Borago* spp., *Cynoglossum* spp.), hvězdicovitých (např. *Senecio* spp., *Eupatorium* spp., *Chromolaena* spp., *Ageratum* spp.) a bobovitých (např. *Crotalaria* spp.).

V roce 1992 byly stanoveny limity pro obsah pyrrolizidinových alkaloidů ve farmaceutických výrobcích. Spotřeba byla omezena na 1 µg denně, pokud byl produkt konzumován po dobu kratší než šest týdnů, a 0,1 µg denně, pokud byla konzumace produktu delší než šest týdnů. U medu však žádné takové limity neexistují (Dübecke et al., 2010). Obilí, mléko, med, vnitřnosti a vejce jsou potravinami, ve kterých byl zjištěn výskyt PA. V australském medu, který pocházel hlavně z úlu včel, které opilovaly rostliny z oblasti výskytu Hadince (*Echium* spp.) byly nalezeny hodnoty PA až 1 µg/kg. Nicméně míchání medů z různých zdrojů tuto hodnotu podstatně snižuje (Anonym, 2001). V medu od včel, které sháněly potravu v oblasti s vysokým výskytem *Senecio jacobaea* byly přítomny alkaloidy senecifyllin, senecionin, jacobin, jacolin, jaconin a jacozin (Prakash et al., 1999). Bylo zjištěno, že cílovým orgánem toxicity PA u pokusných zvířat a lidí byla játra. U zvířat se tato toxicita projevuje anti-mitotickou aktivitou, která vede k rozsáhlé fibróze, nodulární regeneraci hepatocytů a rakovině. U lidí způsobuje hepatocelulární poškození, cirhózu a veno-okluzivní chorobu. Některé PA mohou v živočišné tkáni perzistovat a projevit se dlouho po požití. O PA je také známo, že působí teratogenně a vyvolávají potrat. Žádný výzkum ovšem zatím nepotvrdil, že jsou PA karcinogenní.

Molekula PA je tvořena ze dvou pětičlenných kruhů, které jsou nakloněny k sobě a sdílejí dusík na pozici 4. Většina PA, které se vyskytují, jsou deriváty 1-methylpyrrolizidinu, zatímco toxické PA jsou estery 1-hydroxymethyl-1,2-dehydropyrrolizidinu. Po požití organismus alkaloidy v nezměněné podobě z velké části vyloučí, zbytek se metabolizuje v játrech, v hepatocytech, zvláště v centrilobulární krajině. Existují tři hlavní cesty metabolismu těchto alkaloidů v játrech, hydrolýza, dehydratace a N-oxidace (Cheeke, 1988). Dochází k dehydrogenaci PA na pyrroly, ty jsou elektrofilní a reagují s nukleofilními tkáňovými komponenty, jako jsou nukleové kyseliny a proteiny. Protože jsou játra vznikem toxického pyrrolu, jsou jedním ze dvou cílových orgánů, které bývají postiženy. Plíce jsou druhým orgánem, který může být zasažen. Pyrroly vytvořené v játrech mohou cestovat do plic. Z počátku jsou zasaženy plicní cévy tromby, poté dochází k zánětu, až nakonec dojde k úplnému uzávěru cévy. Tyto účinky spolu s interalveolární septální fibrózou vedou k plicní hypertenzi. Výsledkem je zhoršený průtok krve plicemi, což více zaměstnává pravou srdeční komoru, dochází k její hypertrofii a končí to městnavým srdečním selháním (Prakash et al., 1999).

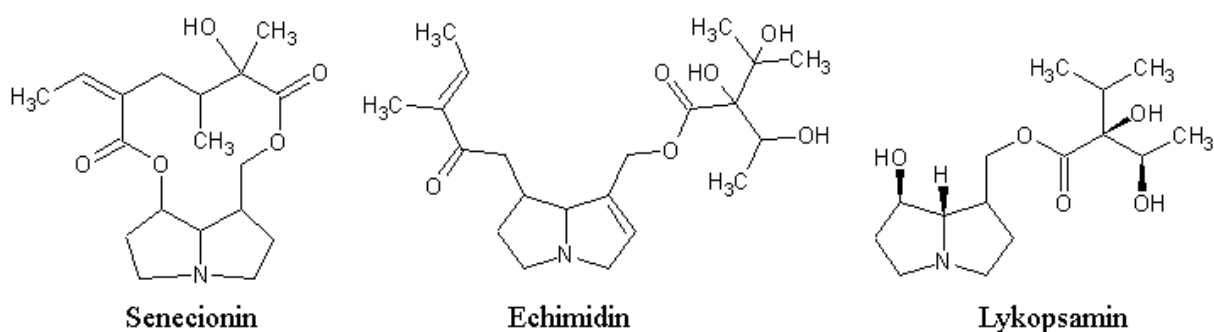
Tab. 2: Nejdůležitější toxické rostliny, obsahující pyrrolizidinové alkaloidy (Cheeke, 1988)

Botanický název	Běžný název
Čeleď <i>Boraginaceae</i>	<i>Brutnákovité</i>
<i>Amsinckia intermedia</i>	<i>Vijan</i>
<i>Borago officinalis</i>	<i>Brutnák lékařský</i>
<i>Cynoglossum officinale</i>	<i>Užanka lékařská</i>
<i>Echium plantagineum</i>	<i>Hadinec jitrocelovitý</i>
<i>Echium vulgare</i>	<i>Hadinec obecný</i>
<i>Heliotropium europaeum</i>	<i>Otočník evropský</i>
<i>Symphytum officinale</i>	<i>Kostival lékařský</i>
Čeleď <i>Asteraceae</i>	<i>Hvězdicovité</i>
<i>Senecio alpinus</i>	<i>Starček alpský</i>
<i>S.brasiliensis</i>	<i>Starček brazilský</i>
<i>S.cineraria</i>	<i>Starček přímořský</i>
<i>S.integerrimus</i>	–
<i>S.jacobaea</i>	<i>Starček přímětník</i>
<i>S.longilobus</i>	–
<i>S.ridellii</i>	–
<i>S.vulgaris</i>	<i>Starček obecný</i>
Čeleď <i>Fabaceae</i>	<i>Bobovité</i>
<i>Crotalaria retusa</i>	<i>Chřestnatec</i>
<i>C.spectabilis</i>	–

Echium plantagineum a *Heliotropium europaeum* jsou dva nejdůležitější druhy z čeledi Brutnákovitých, které nejhojněji rostou v Austrálii a jsou zodpovědné za otravy ovcí, dobytka, koní, prasat a drůbeže. Dalším významným druhem z čeledi brutnákovitých je *Symphytum officinale* (kostival lékařský), bylina, která obsahuje nejméně osm hepathotoxických PA. V Severní Americe je rozšířena čeleď brutnákovitých (*Boraginaceae*) a hlavně druh *Cynoglossum officinale* (užanka lékařská) zde způsobuje otravy dobytka. Také starček *Senecio jacobaea* spadající do čeledi *Asteraceae* (hvězdicovitých), je hojně rozšířen

po celém světě. Vyskytuje se hlavně v místech s mírným klimatem Austrálie, Nového Zélandu, Jižní Ameriky, Západní Evropy a Severní Ameriky. V Brazílii a Argentině se vyskytuje druh *Senecio brasiliensis*. Semena *Crotalaria retusa* a *Crotalaria spectabilis*, dvou druhů z čeledi Fabaceae (bobovité), jsou obyčejným plevelem obilných polí a mají za následek otravy zvířat a drůbeže v Americe a Austrálii. Tyto kontaminovaly v sedmdesátých letech osivo prosa a způsobily tím epidemii u lidí (Cheeke, 1988).

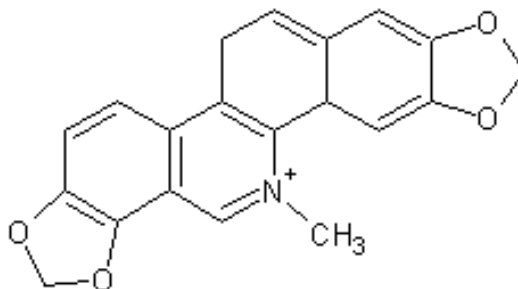
Ve výzkumu Dübecke et al. (2010) bylo přezkoumáno 696 vzorků a zjištěno, že 94 % z nich je pozitivních na výskyt PA s koncentracemi v rozmezí 1–267 $\mu\text{g}/\text{kg}$ medu. Med prodáváný v obchodních sítích je většinou směsí různých medů z různých zemí a různých rostlin, obsah PA byl tedy očekáván. Nejhojněji nalezenými PA byly senecionin, echimidin a lykopsamin, jejichž struktury lze vidět na Obr. 1. Dále bylo analyzováno 2839 vzorků z Jižní Ameriky a 68 % bylo pozitivních na obsah PA s koncentracemi v rozmezí 1–1089 $\mu\text{g}/\text{kg}$ medu. Z Evropy bylo analyzováno 381 vzorků medů, z nichž 65 % bylo pozitivních na výskyt PA. Nalezeny koncentrace byly v rozmezí hodnot 1–225 $\mu\text{g}/\text{kg}$ medu. V porovnání se vzorky ze zemí Jižní Ameriky, obsahovaly ty z evropských zemí většinou nižší množství, pouze ve vzorcích z Itálie a Španělska byl větší výskyt stejně jako ze zemí jižní Ameriky. Více než 75 % ze vzorků pozitivních na nález PA ze všech zemí obsahovalo množství PA v koncentracích do 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ medu, pouze medy z Itálie a Španělska měly tyto koncentrace až 225 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Dübecke et al., 2010).



Obr. 1: Struktura pyrrolizidinových alkaloidů, nalezených v medu

Sanguinarin (SA) patří spolu s chelerythrinem (CHE) mezi kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy, hlavním zdrojem sanguinarinu jsou *Sanguinaria canadensis* L. (krevnice kanadská), *Chelidonium majus* L. (vlaštovičník větší) a *Macleaya cordata* (Zdařilová et al., 2005). Je považován za fytoalexin, sekundární metabolit, který chrání rostlinu před napadením patogeny. Má protizánětlivý účinek a výraznou

antibakteriální aktivitu. Byla popsána jeho aktivita vůči Gram-pozitivním a Gram-negativním bakteriím, plísním a kvasinkám a jeho inhibiční účinek na *Mycobacterium* sp., *Helicobacter pylori*, *Trypanosoma brucei*. Dále byla také zjištěna inhibiční aktivita dihydro-SA vůči *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* a *Candida albicans*, srovnatelná s účinkem gentamycinu (Zdařilová et al., 2005).



Obr. 2: Sanguinarin

Sekundární metabolity produkované rostlinami k obraně proti býložravcům se často nacházejí v květinovém nektaru, ale jejich vliv na potravní chování a fyziologický výkon opylovačů je neznámý. Nicméně, strávení sekundárních metabolitů může být prospěšné, jako tomu bylo u housenek na tabáku a čmeláčích, kde bylo dokázáno snížení patogenů a parazitoidů. V několika studiích na sekundární metabolity v nektarech byly zahrnuty alkaloidy, které jsou známy spíše jako odstrašující pro svou hořkou chuť. Nikotin je alkaloid, který se v přírodě vyskytuje v hojném množství, nejhojnější je ovšem jeho výskyt v čeledi Solanaceae (lilkovité). Tato čeleď zahrnuje mnoho zemědělských plodin a tabák. Nikotin je pro většinu býložravců vysoce toxický kvůli jeho působení na receptory acetylcholinu. Byl zkoumán vliv nikotinu na včely a jejich larvy v jádře úlu. Přirozeně se vyskytující koncentrace neovlivnila líhivost larev, ovšem vyšší koncentrace (300 μM) snížila přežití larev a snížila činnost dělnic shánět potravu (Köhler et al., 2011). Mimo přirozený výskyt v rostlinách je nikotin přidáván do přípravků na bázi insekticidů v ekologickém zemědělství. Syntetické analogy nikotinu, přesněji neonikotinoidy, jsou celosvětově užívány jako insekticidy díky vysoké afinitě nikotinu na acetylcholinové receptory hmyzu. Tím může do značné míry přispět k poklesu opylovačů. Nikotin ve vysokých koncentracích je pro opylovače odrazující, ale jsou k tomuto alkaloidu tolerantnější, pokud je vyšší koncentrace cukru. Při zjištění vyššího obsahu nikotinu v nektaru ho přestaly včely skladovat. Nikotin dodává nektaru hořkou chuť, a i když mají včely špatné vnímání chuti, množství důkazu

naznačuje, že tyto jsou schopny detekovat sekundární metabolity v nektaru a jejich chuťový vjem bude pravděpodobně složitější, než se domníváme (Köhler et al., 2011).

Rostliny, obsahující alkaloid kofein spadají do čeledi Rubiaceae (mořenovité), Theaceae (čajovníkovité), Sapindaceae (mýdelníkovité), Sterculiaceae (slézovité), Rutaceae (routovité) a Aquifoliaceae (vrabečnicovité). Purinový alkaloid kofein se, i když v nízké koncentraci vyskytuje v listech a květech několika druhů citrusů. Bylo zjištěno, že kofein se vyskytuje také v medu včel, které navštěvují často nebo sporadicky plantáže s pomerančovíky (Kretschmar et al., 1999).

4. Včelí mor a jiná mikrobiální onemocnění jako hrozba evropského včelařství

Všechny živé organismy mohou být cílem napadení jejich přirozeným nepřítelem a u včel tomu není výjimkou. Protože včely ve svých koloniích žijí spolu v těsném kontaktu a sdílejí mezi sebou jídlo ústně pozřené, což je jejich nejdůležitějším sociálním chováním, může se tak patogen v kolonii rychle rozšířit. Včela, jak dospělec, tak i její plod mohou onemocnět řadou nemocí. Podle původců dělíme tyto nemoci na infekční, způsobeny viry, bakteriemi a houbami, nebo nemoci invazní neboli parazitární, jejichž příčinou jsou roztoči a prvoci (Rada et al., 2009).

4.1. Virové nákazy včel

Viry jsou původci některých onemocnění včelího plodu a dospělých včel. Rozmnožují se v buňkách určitých tkání, působí jejich rozpad a nakonec smrt infikovaného jedince (Rada et al., 2009)

4.1.1. Virová nákaza včelího plodu

Původcem nákazy je kulovitý virus *Morator aetatulae* o průměru 30 nm, který je citlivý na vyschnutí a zvýšenou teplotu. Onemocnění, které se vyskytuje hlavně na jaře, je někdy označováno také jako pytlíčkový, sáčkový plod (Sacbrood virus – SBV). Virus se šíří potravou, ale může ho přenášet také matka transovariálně, ve vajíčkách. Nakazit se mohou jen larvy do věku čtyř dnů, starší larvy jsou již odolné. Klinicky se onemocnění projeví až po zavíčkování, než se larva zakuklí. Když ji vyjmeme z buňky pinzetou, vypadá jako váček naplněný tekutinou. Zbarvení larvy je změněno z perlově bílé na bledě žlutou, tělo vysychá do tmavě hnědé, tenké šupiny. Dospělé larvy se mohou infikovat od plodu při krmení pylem, nebo při trávení tekutiny z larvy. Infikované včely přestanou krmit larvy, čímž se přirozeně zabraňuje šíření nákazy (Bailey, 1975).

4.1.2. Ostatní virové nákazy včel

Mezi nákazy včel, které jsou virového původu spadá také Virus akutní paralýzy včel. Původcem je kulovitý Acute Bee Paralysis Virus (ABPV) o průměru 30 nm, který není infekční pro larvy, ale může napadat čmeláky. Virus se šíří pomocí sekretu slinných žláz, který přechází do uskladňovaných zásob. Po nakažení hynou včely za tři až čtyři dny. Nákaza způsobuje úhyny včelstev nejvíce na konci zimy a časně z jara (Rada et al., 2009).

Patří zde také onemocnění zvané Virus chronické paralýzy včel. Tuto infekci způsobuje Chronic Bee Paralysis virus (CBPV), který byl objeven a popsán jako jeden z prvních virů

napadající včely. Nákaza se šíří ve včelstvu, infikované dělnice jsou na letáku napadány a okusovány zdravými včelami a tím se choroba rozšiřuje. Nemocné včely nemohou létat, třesou se nebo mají trhavé pohyby celého těla, zrychlené pohyby zadečku i žihadla, částečně vyvrácena křídla a zvětšený zadeček díky zduření medného váčku. Včely ztrácí ochlupení, jsou lesklé a černé (Rada et al., 2009).

Virus deformovaných křídel (Deformed wing virus) je další z virových onemocnění včel. Představuje jeden z hlavních virů ohrožujících včelstva. Je přenášen ektoparazitom varroázou. Pathogen může být latentní, což znamená, že přítomnost viru nepůsobí ve včelstvu žádné větší škody. Jakmile je ale virus do včelstva přenesen roztočem *Varroa destructor*, jeho patogenita stoupá. Dochází k nedostatečnému vývoji plodu, dělnice mají zakrnělá a silně deformovaná křídla (Rada et al., 2009).

Virus černání matečnic, *Black Queen Cell Virus (BQCV)*, izoloval Bailey a Woods (1977). Při nákaze se kukla matky rozpadá a černá.

4.2. Bakteriální nákazy

4.2.1. Mor včelího plodu

Ještě po více než století výzkumu moru včelího plodu patří toto mezi nejvíce škodlivé včelí choroby. Jak již název napovídá, týká se onemocnění pouze larválního stádia včel, neprojevuje se u dospělých včel (Shimanuki a Knox, 2000). Jeho původcem je Gram-pozitivní, sporotvorná bakterie *P. larvae* (Genersch et al., 2008). V počáteční fázi infekce postihne jen pár jedinců z kolonie. Pokud nejsou následně přijata nápravná opatření, infekce se rychle šíří dál nejen v rámci kolonie, ale i na ostatní včelíny. Přírodní přenos probíhá v okruhu 1 km od ohniska nákazy. Larvy jsou nejvíce náchylné k infekci v prvním larválním stádiu, což odpovídá 12–36 hodinám po vylíhnutí z vajíčka. Během tohoto časového období se mohou larvy nakazit požitím spor spolu s potravou. Požité spory projdou trávicím traktem a klíčí ve střevě larvy asi 12 hodin po požití. Během této doby mikroorganismy žijí ve střevě komenzálním způsobem a živí se potravou, kterou larva přijímá. Larva hyne ještě před zakuklením a zavíčkováním buňky. Nakažený plod postupně mění barvu z mléčně bílé, na kávově hnědou až nakonec zcela zčerná. Konzistence rozpadajícího se plodu je měkká. Na plodových plástech jsou propadlá víčka, pod nimi mrtvé larvy a při napíchnutí zápalkou se hmota z buňky táhne. Na dně buňky se vytváří tmavohnědý, pevně přilnutý příškvár.

4.2.2. Hniloba včelího plodu

Toto bakteriální onemocnění se projeví již na nezavíčkovaném plodu ve věku 3–4 dnů. Jde o nákazu vyvolanou různými druhy bakterií. Především se jedná o nesporulujícího mikroba *Melissococcus pluton* a sporulujícího mikroba *Bacillus alvei*. Kromě těchto dvou se mohou na nákaze sekundárně nebo příležitostně podílet ještě *Bacillus euridice*, *Streptococcus faecalis* aj. Mikrob se dostane do žaludku s potravou, rychle se pomnoží a vyplní celou žaludeční dutinu. Infikované larvy hynou ještě před zavíčkováním, rychle se rozkládají a pokud nejsou z buněk odstraněny včelami, vyschnou v příškvár. *M. pluton* je schopen v příškváru přežít téměř tři roky (Rada et al, 2009).

4.2.3. Ostatní bakteriální nákazy včel

K dalším bakteriálním onemocněním včel patří Septikémie včel. Původcem této nákazy je gram-negativní tyčinkovitý nesporulující mikrob *Pseudomonas apisepticus*, který rozkládá pojivovou tkáň hrudi, nohou, křídel a tykadel. Následkem destrukce tkání včela zahyne (Shimanuki a Knox, 2000). Mohou ji však vyvolat i příležitostné patogeny například *Bacillus pulvifaciens* nebo *Bacillus cereus*, kteří jsou běžně v prostředí a do těla včely se dostanou vzdušnicemi nebo potravou. Při nákaze včely někdy ztrácí ochlupení, jsou nápadně černé a lesklé a nakonec po uhynutí vysychají, nebo se rozpadnou na prach (Rada et al., 2009).

Rickettsiáza je dalším bakteriálním onemocněním. Způsobuje ho *Rickettsie*, malá Gram-negativní bakterie, která je přirozeným parazitem některých členovců. U včel mohou rickettsie vyvolat onemocnění, které není příliš závažné. Většinou se vyskytují společně s nosemovou nákazou. Hemolymfa infikovaných včel je mléčně zakalená a vyskytují se v ní drobné oválné útvary (Rada et al., 2009).

4.3. Invazivní nákazy

4.3.1. Měňavková nákaza včel

Měňavková nákaza je parazitární onemocnění postihující dospělé včely, jejímž původcem je měňavka včelí (*Malphighamoeba mellificae*). Měňavka včelí má dvě formy, vegetativní, žijící ve vyměšovacím ústrojí (malphigických žlázách) včel, a trvalou, cystu, která je mimo včelí organismus. Včely se cystami nakazí potravou nebo vodou, v jejich trávicím ústrojí se uvolní zárodek, který proniká do malphigických žláz, kde cizopasí. V napadených žlázách včel dochází k atrofii výstelkových buněk, hromadění cyst a během

třech až čtyřech týdnů postupnému ucpání žlázy. Tělo je pak zaplaveno zplodinami vlastní látkové výměny. Množství cyst odchází z těla včely s výkaly a je zdrojem kontaminace pro ostatní. Nemoc obvykle vrcholí na jaře, včely hynou mimo úl a včelstvo slábne (Rada et al., 2009).

4.3.2. Nosematóza

Nejrozšířenější nákaza dospělých včel, jejímž původcem je prvok hmyzomorka včelí (*Nosema apis*). Je to jednobuněčný, spory vytvářející parazit, která útočí na stěny střev dospělých včel (Le-Conte a Navajas, 2008). Dostane se s potravou přes medový váček do žaludku, kde se spory otevírají, parazit se množí a s výkaly jsou spory opět vylučovány. V důsledku porušení střevní bariéry dochází k prostupu saprofytických bakterií z trávicího traktu do hemolymfy a následnému hynutí včel na septikémii. Dochází k narušení činnosti žaludku a nedokonalému trávení, včela tak nemůže využít z potravy všechny bílkoviny. To způsobí atrofii hltanových žláz a včely poté nemohou krmit plod ani matku, předčasně stárnou a hynou v důsledku vyčerpání svých tělesných zásob. Nejvíce se ve včelstvu onemocnění šíří požíráním výkalů, což je přirozený čistící instinkt včel. Nemoc se obvykle objevuje v předjaří, po dlouhé, vlhké zimě, kdy včely nemohou vyletět ven z úlů a vypustit zde své výkaly, kterými zamořují úly a jsou zdrojem infekce pro další včely (Le-Conte a Navajas, 2008).

4.3.3. Syndrom zhroucení včelstev

Toto onemocnění, označováno také jako Colony collapse disorder (CCD), způsobuje náhlé úmrtí včel. Nebyla zatím prokázána přesná příčina či původce nákazy. Někteří autoři se přiklánějí k názoru, že toto onemocnění způsobuje varroáza, *Nosema Apis* nebo jiné virové onemocnění, nebo stres způsobený změnou prostředí, podvýživa či kočovný způsob včelaření (Rada et al., 2009).

4.3.4. Varroa destructor

Škůdce, jenž ničí kolonie včel *Apis mellifera* na celém světě kromě Austrálie, kam zatím nebyl rozšířen. Původně to byl parazit napadající asijské včely medonosné, *A. cerana*, později ve dvacátém století se díky výměně genetických informací z mnoha zemí rozšířil i na evropskou včelu medonosnou, *Apis mellifera* (Le-Conte a Navajas, 2008). Napadá plod i dospělou včelu. Roztoče *Varroa destructor* můžeme pozorovat pouhým okem, je 1,3 mm dlouhý a 1,7 mm široký. Samičky vlezou do buněk s larvami před zavíčkováním, nakladou zde vajíčka a během osmi dnů se z nakladených vajíček vyvinou dospělí roztoči, kteří při líhnutí včel opouštějí buňky. Vyvíjející se paraziti se živí sáním na včelím plodu, čímž

dochází k poškozování včel. Ty pak mohou mít poškozená křídla, nohy, popřípadě jiné deformace a nejsou schopny dalšího života. Rozmnožování parazita ve včelstvu je pomalé, klinické příznaky se proto objeví za dlouhou dobu od nakažení. Včelstvo zamořené tímto parazitem umírá do dvou až tří let po nákaze (Le-Conte a Navajas, 2008). Nákaza roztočem *Varroa destructor* přispívá ke snížení imunitní odolnosti včel, ty jsou poté náchylnější k infekcím virovým a bakteriálním (Le-Conte a Navajas, 2008). Je nemožné vymítit toto onemocnění, tyto parazity se stávají rezistentní na akaricidy, které používají včelaři, aby je vyhubili (Le-Conte a Navajas, 2008).

5. Materiál a metody

Metoda odchovu larviček byla dříve publikována řadou autorů. Odchov se může provádět v 96-jamkových destičkách (Aupinel et al., 2005), 48-jamkových (Brodschneider et al., 2009) nebo na Petriho miskách. Pro účely našeho odchovu jsme zvolili metodu dle Kaftanoglu et al. (2010), která spočívá v odchovu larev na Petriho miskách s následným zakuklením v 48-jamkových destičkách.

Materiál

Glukosa a fruktosa od firmy Sigma-Aldrich (CZ) byly připraveny jako roztoky 200 mg/ml v 50 ml penicilinkách, které byly následně autoklávovány a skladovány při teplotě 4 °C. Kvasničný extrakt (Oxoid, UK) byl připraven jako 16 % roztok v 50 ml penicilinkách a také byl následně autoklávován a skladován při teplotě 4 °C. Voda, která byla použita pro krmivo, byla ultrafiltrována v systému Millipore (Waters, US) a před přípravou krmení autoklávována. Mateří kaše byla získána od dodavatele Ing. J. Šíma, Dolní Pěna, Jindřichův Hradec.

Základ krmiva tvořilo krmivo 12 ml. Byl připraven smícháním a sestával z 6 ml mateří kaše, dále z 360 µl (200 mg/ml) glukosy, 360 µl (200 mg/ml) fruktózy, 750 µl (16 % roztoku) kvasničného extraktu a 4,5 ml vody, což tvořilo 50 % (w/w) mateří kaše, 6 % glukosy, 6 % fruktosy, 1 % kvasničného extraktu a 37 % ultrafiltrované vody.

Sanguinarin (30% obohacený extrakt ve směsi s chelerythrinem; verifikován metodou HPLC) byl od firmy Naturalin Bio (Sifangping Changsha City, provincie Hunan, Čína). DMSO byl od firmy Lach-Ner (CZ). Oxytetracyklin byl od firmy Sigma-Aldrich.

K základu krmení byla přidána testovaná látka (sanguinarin, antibiotikum a kontrola – DMSO) a byly tak připraveny 4 varianty krmení (Tab. 3). Sanguinarin byl rozpuštěn v DMSO v koncentraci 10 a 1 mg/ml. Antibiotikum bylo rozpuštěno v DMSO v koncentraci 0,1 mg/ml. K základu krmení pak bylo přidáno vždy 15 µl roztoku testovaných látek, zatímco do kontrolní skupiny bylo přidáno pouze 15 µl DMSO.

Všechny varianty krmení byly připraveny ve dvou opakováních, vždy jedno z opakování bylo zaočkováno spory *P. larvae* v koncentraci $1 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1}$ a druhé bylo ponecháno bez zaočkování.

K infikování larev byly použity spory moru *P. larvae*, které byly ze sbírky Včelařského výzkumného ústavu v Dole. Spory byly rozpuštěny v 50 mM fosfátovém pufru ($K_2HPO_4 + KH_2PO_4$, pH 7,5) v koncentraci $1 \cdot 10^7 \text{ ml}^{-1}$ pufru. Suspenze byla naředěna sériovým ředěním na 106 a vždy 15-20 μl bylo použito na zaočkování 1,5 ml krmiva.

Odběr larviček

Pro výzkum byly použity larvy včelstva (*Apis mellifera* L.) umístěného v době mezi říjen 2011 – únor 2012 v proletové hale ve Výzkumném ústavu včelařském v Dole, kde byly podmínky nastaveny tak, aby se i v době plodové přestávky nacházely ve včelstvu larvy vhodné k přelarování. Vybrané larvy byly ve stáří jednoho nebo dvou dnů.

Vlastní odchov

Včelí larvy byly rozděleny do čtyř skupin podle podávané potravy. V rámci každé skupiny byly včelí larvy rozděleny do dvou podskupin, kdy jedna byla zaočkována sporami *P. larvae* v koncentraci $1 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1}$ a druhá byla ponechána nezačkována. Každá podskupina sestávala ze 7-10 larev. Celkový přehled skupin včetně podávané potravy je v Tab. 3. Pro odchov larev a testy aktivity látek proti moru byla použita metoda dle (Kaftanglu 2010a, 2010b)

Tab. 3: Celkový přehled skupin a složení podávaného krmiva

zaočkování <i>P. larvae</i>	skupina	Složení krmiva
NEINFIKOVANÉ	N1	ZK ⁽¹⁾ + 15 µl DMSO
	N2	ZK ⁽¹⁾ + 15 µl 0,1 SA ⁽²⁾
	N3	ZK ⁽¹⁾ + 15 µl 0,01 SA ⁽³⁾
	N4	ZK ⁽¹⁾ + 15 µl ATB ⁽⁴⁾
INFIKOVANÉ	I1	N1
	I2	N2
	I3	N3
	I4	N4
		+ 20 µl spor <i>P. larvae</i> o koncentraci $1 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1}$

⁽¹⁾ základ krmiva

⁽²⁾ sanguinarin o koncentraci 10 mg/ml

⁽³⁾ sanguinarin o koncentraci 1 mg/ml

⁽⁴⁾ antibiotikum oxytetracyklin o koncentraci 0,1 mg/ml

Larvy byly přelarovány z buněk plástu na Petriho misku se základem krmiva, převezeny do laboratoře ČZU a ponechány v inkubátoru při řízené atmosféře (96 % vlhkost, 34 °C).

Druhý den byly k přelarování na testovací krmení pro účely experimentu vybrány pouze larvy, které přežily převoz. Ty byly rozděleny na Petriho misky po 7–10 larvách do čtyř skupin se dvěma podskupinami podle Tab. 3. Každá skupina larev dostala do Petriho misky krmivo v objemu 1,5 ml. Larvy vždy do druhého dne zkonsumovaly krmivo bezprostředně v jejich dosahu. Třetí den byly larvy pouze posunuty v krmení, aby nedošlo ke zbytečnému stresování při přelarování na další krmení. Čtvrtý den byly larvy opět přelarovány na nové Petriho misky s objemem krmiva 3 ml a pátý den opět pouze přisunuty blíže ke krmivu. Během stádia vývoje byly larvy uloženy v inkubátoru s teplotou 34 °C a relativní vlhkostí vzduchu 96 % (Vandenberg and Shimanuki, 1987). Relativní vlhkost vzduchu byla udržována s pomocí nasyceného roztoku síranu draselného. Šestý den došlo k přesunu larev na Petriho misky s filtračním papírem, který byl předem autoklávován. Po defekaci larev byl v sedmý den špinavý filtrační papír odstraněn a larvy uloženy do 48-jamkových destiček k vylíhnutí. Pro zakuklení byly larvy uloženy do inkubátoru s teplotou 34 °C a relativní vlhkostí vzduchu 80 %. Relativní vlhkost vzduchu v této komoře byla

udržována prostřednictvím nasyceného roztoku NaCl. Celkové množství potravy podávané skupině 10 larev na misce tak činilo 4,5 ml.

6. Výsledky

V této práci byla studována schopnost larev čelit infekčnímu tlaku patogenního mikroorganismu *Paenibacillus larvae* po podání sanguinarinu ve dvou různých koncentracích 0,1 mg/ml a 0,01 mg/ml.

Pracovali jsme se čtyřmi skupinami podle složení podávaného krmiva. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4 a 5, kde je možno najít závislost přežití larev na druhu krmiva. Nejistoty výsledných hodnot byly určeny standardním způsobem jako směrodatná odchylka aritmetického průměru při opakovaném měření. Z uvedených výsledků je patrné, že neinfikované skupiny přežívají více.

Ve výsledcích ve čtvrtém dni je vidno, že larvy, jež byly zaočkovány *P. larvae*, přežily v největším procentu ve skupině s koncentrací SA 0,01 mg/ml. Nejmenší procento přeživších larev ve čtvrtém dni, jež byly zaočkovány *P. larvae*, bylo ve skupině s koncentrací SA 0,1 mg/ml. Larvy, jež nebyly zaočkovány *P. larvae*, přežily opět v největším procentu ve skupině s koncentrací sanguinarinu 0,01 mg/ml. Nejmenší procento přeživších nezaočkových larev *P. larvae* bylo v kontrolní skupině, avšak kvůli vyšší směrodatné odchylce to je neprůkazné.

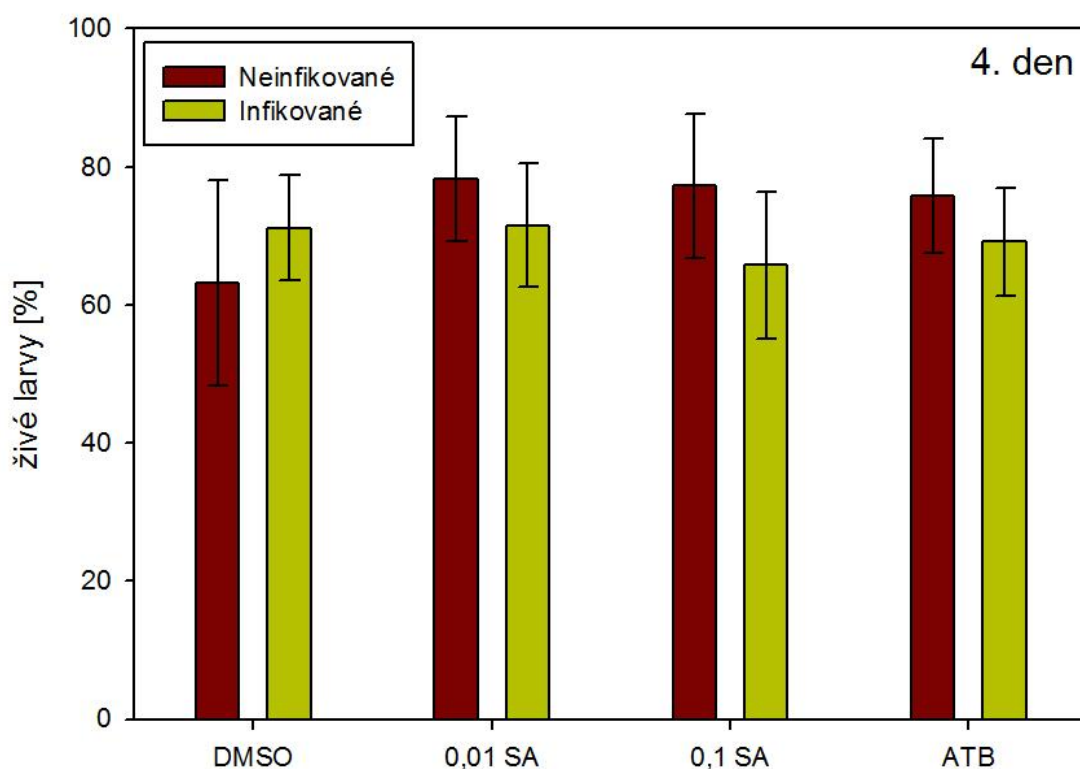
Po šesti dnech pozorování bylo největší procento přeživších larev, jež byly zaočkovány, ve skupině, které bylo do krmiva přidáno antibiotikum. Nejmenší procento zaočkových, přeživších larev bylo v kontrolní skupině. Mezi nezaočkovánými larvami *P. larvae* bylo největší procento přeživších ve skupině s koncentrací sanguinarinu 0,1 mg/ml. Nejmenší procento přeživších larev, jež nebyly zaočkovány, je stejné ve skupině s koncentrací 0,01 mg/ml SA i v kontrolní skupině.

V příloze jsou dále uvedena uvedená fotografická dokumentace.

Tab. 4: Procento přeživších larev ve 4. dni

zaočkování <i>P. larvae</i>	varianta	<i>n</i> pokusů	přeživší larvy (%)
			4. den ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)
NEINFIKOVANÉ	DMSO	7	63,2 ± 14,9
	0,01 SA	7	78,2 ± 9,0
	0,1 SA	7	77,2 ± 10,5
	ATB	3	75,8 ± 8,3
INFIKOVANÉ	DMSO	7	71,2 ± 7,7
	0,01 SA	7	71,5 ± 8,9
	0,1 SA	7	65,7 ± 10,7
	ATB	3	69,1 ± 7,8

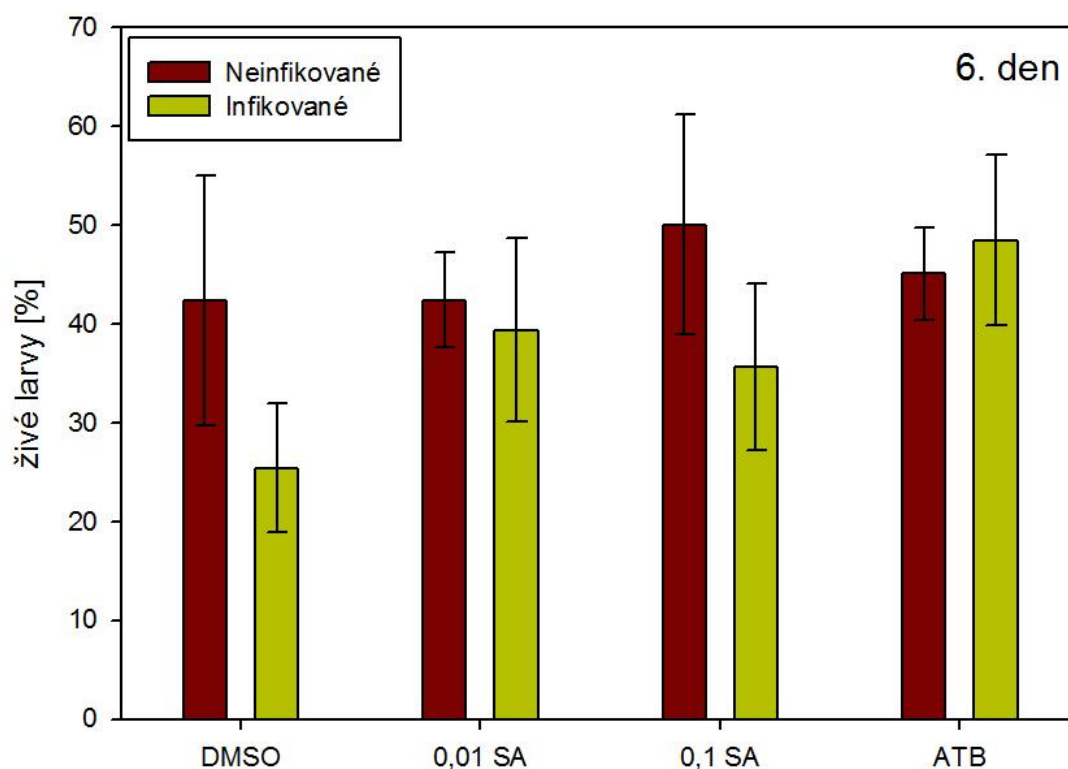
Obr. 3: Přežití larev ve 4. dni po přidání jednotlivých účinných látek (chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku aritmetického průměru)



Tab. 5: Procento přeživších larev v 6. dni

zaočkování <i>P. larvae</i>	varianta	n pokusů	přeživší larvy (%)
			6. den ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)
NEINFIKOVANÉ	DMSO	7	42,4 ± 12,6
	0,01S	7	42,4 ± 4,8
	0,1S	7	50,1 ± 11,1
	ATB	3	45,1 ± 4,7
INFIKOVANÉ	DMSO	7	25,4 ± 6,5
	0,01S	7	39,4 ± 9,4
	0,1S	7	35,6 ± 8,4
	ATB	3	48,5 ± 8,7

Obr. 4: Přežití larev v 6. dni po přidání jednotlivých účinných látek (chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku aritmetického průměru)



7. Diskuze

Včely *Apis mellifera* jsou nejdůležitějším opylovacím hmyzem na celém světě. Z tohoto důvodu má včelařství celosvětový význam na zemědělskou produkci a zdravotní stav včel se stal výrazným problémem mnoha zemí celého světa. Mor včelího plodu je běžné onemocnění, které postihuje včely po celém světě. Ten je smrtelný pro infikované larvy *Apis mellifera* a může být zničující jak pro včelí kolonie, tak pro včelíny a způsobit tím velké finanční ztráty pro včelaře (Forsgren et al., 2005).

Potrava pro včelí plod by měla být bohatá na bílkoviny, sacharidy, lipidy, steroly, vitaminy, minerály a stopové prvky, aby se organismus mohl správně vyvíjet. Dle Kaftanoglu et al. (2010a) bylo potvrzeno, že larvy *Apis mellifera* chované *in vitro* mohou přežívat a růst na umělé stravě složené z mateří kašičky, glukosy, fruktosy, kvasničného extraktu a destilované vody. Odchovem včelích larev *in vitro* se již zabývalo mnoho autorů a rovněž bylo o této metodě sepsáno mnoho článků. Aupinel et. al (2005) vylepšili metodu odchovu včelích larev *in vitro* o tři základní parametry v krmení. Optimalizovali režim krmení, množství stravy na larvu a složení stravy dle věku larvy. V jejich studii byly vytvořeny dvě skupiny, které se lišily v množství krmiva. První skupina byla celkově (během šesti dnů) krmena 130 μ l a druhá skupina 160 μ l. Aupinel et al. (2005) uvádí, že larvy krmeny 160 μ l krmiva byly podstatně těžší (120,3 mg) než larvy krmeny 130 μ l krmiva (98,0 mg). Kaftanoglu et al. (2010b) se zaměřili na vliv složení diety na chované larvy *in vitro*. Vytvořili sedm různých diet se změnou koncentrace cukru a vody. Výsledky dokázaly, že larvy jsou schopny přežít ve směsi kvasničného extraktu, vody a mateří kaše, bez přídavku sacharidů. Nemohou se ovšem zakuklit a stát se dospělci, pokud nemají v krmivu dostatek sacharidů. Bylo také zjištěno, že přežití larev bylo větší ve skupině, jejíž krmivo obsahovalo 12 % cukru, než ve skupinách larev, jejichž krmiva obsahovala 6 % nebo 24 % cukru (Kaftanoglu et. al, 2010b).

Při našem výzkumu jsme vycházeli z práce dle Kaftanoglu et al. (2010a), kde byly využity k odchovu larev *in vitro* Petriho misky. Larvy byly v Petriho miskách uloženy volně ve skupinách několika jedinců. Tato metoda má výhodu oproti výzkumu dle Aupinel et al. (2005), kde odchovávali larvy na 96-jamkových mikrotitračních destičkách. Zmíněnou výhodou je větší prostor pro larvy, které se poté netopí v krmivu. V úlu krmí mladušky larvy dosyta a mohou tak regulovat množství krmiva. Larvy, plovoucí na Petriho misce se mohly najíst *ad libitum*. Kaftanoglu et al. (2010a) rozděluje larvy do šesti skupin s rozdílným intervalem krmení (intervaly 1–6 dní). Dále uvádí, že nebyly zpozorovány výrazné rozdíly

přežívání mezi skupinami, ale nejvyšší hmotnosti dosáhly larvy krmeny každý druhý den (Kaftanoglu et al., 2010a). Proto jsme se pro náš výzkum rozhodli použít tento interval krmení.

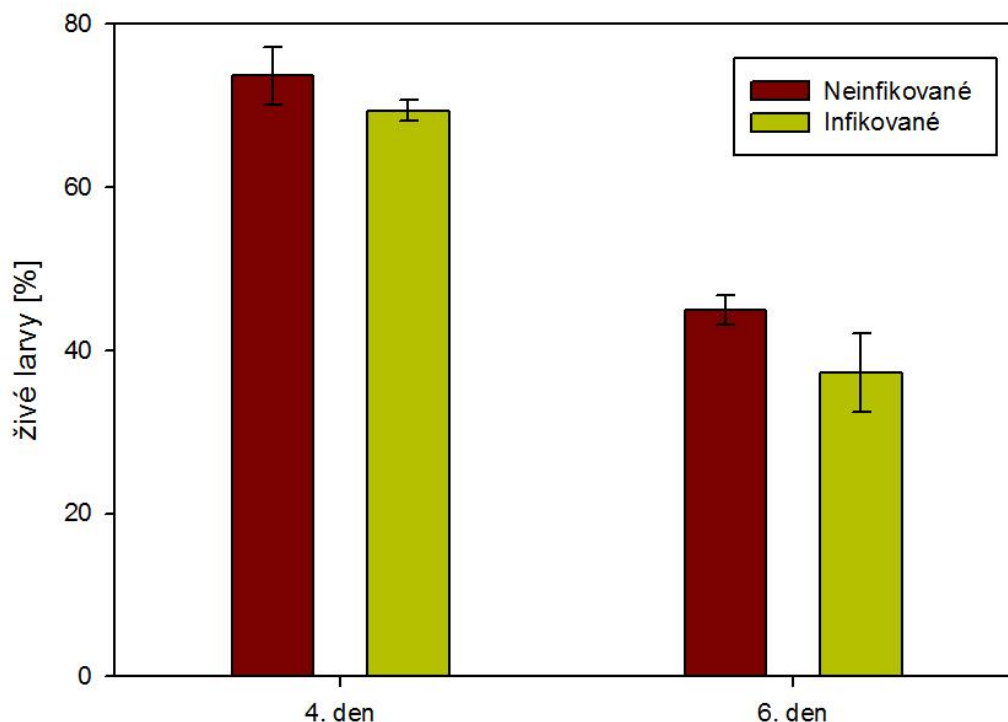
Brodsgaardem et al. (1998) byl testován vliv *P. larvae* na včelí larvy při odchovu *in vitro* ve třech různých skupinách věku larev. Bylo zjištěno, že nejvíce jsou k nákaze *P. larvae* náchylné včelí larvy ve stáří věku 24–28 hodin a čím více byly larvy starší, tím více byly k nákaze *P. larvae* odolnější. Cílem této práce bylo ověřit antimikrobiální účinek přírodní látky SA proti patogennímu mikroorganismu *P. larvae*, jak již bylo zjištěno ve výzkumu Flesar et. al (2010). Avšak účinek tohoto alkaloidu na infikované včelí larvy daným patogenem doposud testován nebyl. Podobné studii se již věnovali také Forsgren et al. (2009), kteří hodnotili účinek nově identifikovaných bakterií mléčného kvašení, *Lactobacillus* sp. a *Bifidobacterium* sp., ze včelích žaludků. V jejich testu byly použity čtyři různé kmeny *P. larvae* a jejich odolnost vůči jedenácti druhům bakterií mléčného kvašení. Výsledky ukazují silný inhibiční efekt vůči všem čtyřem kmenům *P. larvae*, které měly dva druhy bakterie *Lactobacillus* (Forsgren et al., 2009).

Z výsledků našeho výzkumu, uvedených v Tab. 6, je patrné, že neinfikované skupiny přežívají více, což potvrzuje negativní vliv patogenního mikroorganismu *P. larvae* na včelí larvy.

Tab. 6: Celkový počet přeživších larev ve 4. a 6. dni

zaočkování <i>P. larvae</i>	přeživší larvy (%)	
	4. den ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)	6. den ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)
NEINFIKOVANÉ	73,6 ± 3,5	45,0 ± 1,8
INFIKOVANÉ	69,4 ± 1,3	37,2 ± 4,8

Obř. 5: Celkový počet přeživšich larev ve 4. a 6. dni (chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku aritmetického průměru)



Sanguinarin v obou koncentracích i antibiotikum měly vliv na lepší životaschopnost a tedy i na procento přežití u infikovaných i neinfikovaných larev.

Přežití larev bylo sledováno 4. a 6. den., ale 4. den byly výsledky méně jednoznačné, zřejmě proto, že za tak krátkou dobu se účinek látek nestihl projevit nebo že ještě nedošlo k rozvoji onemocnění včelího moru v infikované skupině.

Ve skupině infikovaných larev byla životaschopnost 6. den v kontrole 25 %. Podávání sanguinarinu v koncentraci 0,1 mg/ml vedlo ke zvýšení přežití larev v průměru o 10,2 % oproti kontrole a v případě koncentrace 0,01 mg/ml SA o 14 %. Antibiotikum mělo předpokládaný nejlepší vliv na životaschopnost larev, kde procento přežití oproti kontrole bylo o 23 % vyšší.

Ve skupině neinfikovaných larev bylo procento přežití zhruba stejné u všech typů podávaných krmiv. Jedině ve skupině s krmivem obsahujícím 0,1 mg/ml SA bylo zvýšené množství přeživšich larev (o 7,6 %), avšak kvůli vysoké směrodatné odchylce (11,13 %) je neprůkazné, že by tento typ krmiva měl pozitivní vliv na přežití larev.

Dále je z výsledků našeho výzkumu zřejmé, že z infikovaných larev bylo největší procento přeživších ve skupině s koncentrací 0,01 mg/ml SA ve čtvrtém dni (71,5 %). Srovnáme-li larvy ve čtvrtém a šestém dni, v šestém dni bylo největší procento přeživších larev ve skupině s přidáním antibiotikem (48,5 %). Tento pokus byl ovšem testován pouze třikrát ze všech sedmi pokusů. Porovnání s antibiotiky jsme dělali pro poslední tři měření pouze informativně. Výsledek s největším počtem přeživších ve skupinách s přidáními antibiotiky byl očekáván, protože je přirozenou funkcí těchto antibiotik ničit mikroorganismy. V našem výzkumu jsme se ovšem zaměřili na přírodní látky, protože antibiotika jsou pro boj s mikroorganismem *P. larvae* v EU zakázána. Z Obr. 4 je také patrné, že pomineme-li antibiotika, největší procento přeživších larev bylo opět ve skupině s koncentrací 0,01 mg/ml SA (39,4 %).

V práci jsme se zaměřili na dvě různé koncentrace SA a to 0,01 mg/ml a 0,1 mg/ml. Z výsledků obou porovnávaných dnů měla koncentrace 0,01 mg/ml lepší účinek na přežití larev v porovnání s koncentrací 0,01 mg/ml. Ve čtvrtém dni to bylo 39,4 % oproti 35,6 % a v šestém dni výzkumu 71,5 % oproti 65,7 %. Oproti tomu, v kontrolní skupině (DMSO) bylo přežití infikovaných larev po čtyřech dnech porovnatelné s oběma skupinami, kterým byl přidán do krmiva SA (71,7 %). Avšak šestý den výzkumu je procentuální zastoupení živých larev viditelně nižší (25,4 %). Tyto výsledky jsou ovšem zatíženy vyšší směrodatnou odchylkou (zhruba 9 %), proto nejsou úplně průkazné. Nicméně určitý trend se dá vypožorovat.

SA jako alkaloid působí antimikrobiálně, jak je již zmiňováno výše, čehož důsledkem je vyšší procento přeživších larev po šesti dnech při jeho použití oproti kontrolní skupině (39,4 % oproti 25,4 % při koncentraci 0,01 mg/ml). Je potřeba nezapomenout, že SA jako alkaloid může být při určitých koncentracích toxický, což ve svém výzkumu již popsali Zdražilová et al. (2005). Toto může být příčinou nižšího procenta (35,6 %) přeživších larev, kterým byl do krmiva přidán SA o koncentraci 0,1 mg/ml, což je desetinásobně větší koncentrace než 0,01 mg/ml (39,4 %). V této koncentraci toxické účinky SA mohly převažovat účinky antimikrobiální, což mohlo mít za následek nižší procento přeživších larev.

8. Závěr

Tato práce byla zaměřena na vliv přírodní látky sanguinarinu vůči patogennímu mikroorganismu *P. larvae* na včelích larvách chovaných *in vitro*.

V rámci studie byl k porovnání použit kontrolní vzorek a vzorek s přidáním antibiotika oxytetracyklinu. Tato práce dokazuje, že použití alkaloidu sanguinarinu zvyšuje procentuální přežití larev, infikovaných mikroorganismem *P. larvae* o 14 % v případě koncentrace 0,01 mg/ml a o 10,2 % v případě koncentrace 0,1 mg/ml. Avšak kvůli vyšší hodnotě směrodatné odchylky je neprůkazné, která koncentrace má pozitivnější vliv. Proto bude nutností v budoucnu vykonat další pokusy měření v této problematice. Pro dosažení ještě lepších výsledků s alkaloidem sanguinarin je potřeba se v budoucnu zaměřit na širší škálu koncentrací.

9. Seznam literatury

- Adler, L.S. 2001. The Ecological Significance of Toxic nectar. *OIKOS*. 91. 409-420.
- Allen, K.L., Molan, P.C., Reid, G.M. 1991. A Survey of the Antibacterial Activity of Some New Zealand Honeys. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 43 (12). 817 – 822.
- Anaya, A.L., Cruz-Ortega, R., Waller, G.R. 2006. Metabolism and Ecology of Purine Alkaloids. *Frontiers in Bioscience*. 11. 2354 – 2370.
- Anonym. 2001. Pyrrolizidine alkaloids in food - A Toxicological Review and Risk Assessment. Australian New Zealand Food Authority. *Technical Report*. 2.
- Aupinel, P., Fortini, D., Dufour, H., Tasei, J.N., Michaud, B., Odoux, J.F., Delegue, M.P. 2005. Improvement of artificial feeding in a standard *in vitro* method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of Insectology*. 58 (2). 107 – 111.
- Aurongzeb, M., Kamran Azim, M. 2011. Antimicrobial properties of natural honey: a review of literature. *Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 44 (3). 118 – 124.
- Bachanová, K., Klaudivy, J., Kopernický, J., Šimúth, J. 2001. Identification of honeybee peptide aktive against *Paenibacillus larvae* larvae through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie*. 33. 259 – 269.
- Bailey, L. 1975. Recent research on honey bee viruses. *Bee World*. 56. 55 – 64.
- Bilíková, K., Gusui, W., Šimúth, J. 2001. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. *Apidologie*. 32. 275–283
- Blasco, C., Fernández, M., Pena, A., Lino, C., Silveira, M.I., Font, G., Picó, Y. 2003. Assessment of Pesticide Residues in Honey Samples from Portugal and Spain. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*. 51. 8132 – 8138.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., Gallmann, P. 2008. Honey for Nutrition and Health: a Review. *American Journal of the College of Nutrition*. 27. 677 – 689.
- Brady, N.F., Molan, P.C., Harfoot, C.G., The sensitivity of dermatophytes to the antimicrobial activity of manuka honey and other honey. *Pharmacology Science*. 2. 1-3.
- Brodsgaard, C.J., Ritter, W., Hansen, H. 1997. Response of in vitro reared honey bee larvae to variol doses of *Paenibacillus larvae* larvae spores. *Apidologie*. 29. 569-578.
- Brodtschneider, R., Riessberger-Gallé, U., Crailsheim, K. 2009. Flight performace of artificially rezed honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 40. 441 – 449.

- Cavanagh, D., Beazley, J., Ostapowicz, F. 1970. Radical operation for carcinoma of the vulva. *An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 77 (11). 1037 – 1040.
- Cavia, M.M., Fernandez-Muin, M.A., Huidobro, J.F., Sancho, M.T. 2004. Correlation between moisture and water activity of honeys harvested in different years. *Journal of Food Science*. 69. 368 – 370.
- Corbet, S.A., Williams, I.H., Osborne, J.L. 1992. Bees and the pollination of crops and wild flowers in the European community. *Apiacta*. 4.
- Danihlík, J. 2011. Imunita včel. *Moderní včelař*. 5. 147
- Dübecke, A., Beckh, G., Lüllmann, C. 2010. Pyrrolizidine alkaloids in honey and bee pollen. *Food Additives and Contaminants*. 28 (3). 348 – 358.
- Flesar, J., Havlik, J., Kloucek, 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., Olofsson, T.C., Vasquez, A., Fries, I. 2009. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie*. 41. 99 – 108.
- Gegear, R.J., Manson, J.S., Thomson, J.D. 2007. Ecological context influences pollinator deterrence by alkaloids in floral nectar. *Ecology Letters*. 10. 375–382
- Genersch, E. 2009. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103. 10 – 19.
- Gheldof, N., Wang, X.H., Engeseth, N.J. 2002. Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*. 50. 5870 – 5877.
- Hermosin, I., Chicon, R.M., Cabezudo, M.D. 2003. Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food chemistry*. 83. 263 – 268.
- Cheeke, P.R. 1988. Toxicity and metabolism of Pyrrolizidine alkaloids. *Journal of animal Science*. 66. 2343 – 2350.
- Kaftanoglu, O., Linksvayer, T.A., Page, R.E. 2010a. Rearing honey bees, *Apis mellifera*, in vitro 1: Effects of sugar concentrations on survival and development. *Journal of Insect Science*. 11 (96).
- Kaftanoglu, O., Linksvayer, T.A., Page, R.E. 2010b. Rearing honey bees (*Apis mellifera* L.) in vitro: effects of feeding intervals on survival and development. *Journal of Apicultural Research and Bee World*. 49 (4). 311 – 317.

- Köhler, A., Pirk, C.W.W., Nicolson, S.W. 2011. Honeybees and nectar nicotine: Deterrence and reduced survival versus potential health benefits. *Journal of Insect Physiology*. 58. 286 – 292.
- Kretschmar, J.A., Baumann, T.W. 1999. Caffeine in Citrus Flowers. *Phytochemistry*. 52. 19 – 23.
- Kwakman, P.H.S., Velde, A.A., Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Zaat, S.A.J. 2010. How honey kills bacteria. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 24. 2576 – 2582.
- Kwakman, P.H.S., Zaat, S.A.J. 2012. Antibacterial Components of Honey. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*. 64 (1). 48 – 55.
- Le Conte, Y., Navajas, M. 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*. 27 (2). 499 – 510.
- Manyi-Loh, C.E., Clarke, A.M., Ndip, R.N. 2010. An overview of honey: Therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *African Journal of Microbiology Research*. 5 (8). 844 – 852.
- Marcucci, M.C. 1994. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 26. 83 – 99.
- Molan, P. 1992. The antibacterial activity of honey 2. Variation in potency of the antibacterial activity. *Bee World*. 73 (1). 5 – 28.
- Muli, E., Munguti, A., Raina, S.K. 2007. Quality of honey Harvested and Processed Using Traditional Methods in Rural Areas of Kenya. *Acta Veterinaria Brno*. 76. 315 – 320.
- Näumann, G., Mahrt, E., Himmelreich, A., Mohring, A., Frerichs, H. 2010. Traces of contamination—well preserved in honey. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. 7. 35–43
- Nazarian, H., Taghavizad, R., Majd, A. 2010. Origin of honey proteins and method for its quality control. *Pakistan Journal of Botany*. 42 (5). 3221 – 3228.
- Osato, M.S., Reddy, S.G., Graham, D.Y. 1999. Osmotic Effect of Honey on Growth and Viability of *Helicobacter pylori*. *Digestive Disease and Science*. 44 (3). 462 – 464.
- Pospíšilová, M. 2011. Situační a výhledová zpráva včely. *Ministerstvo zemědělství*. Praha. p. 25. ISBN: 9788070849798
- Prakash, A.S., Perena, T.N., Reilly, P.E.B., Seawright, A.A. 1999. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutation research*. 443. 53 – 67.

- Rada, V., Havlík, J., Flesar, J. 2009. Biologicky aktivní látky ve výživě včel. *Vědecký výbor výživy zvířat*.
- Rezić, I., Horvat, A.J.M., Babić, S., Macan, M.K. 2004. Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. *Ultrasonics Sonochemistry*. 12. 477– 481.
- Rial-Otero, R., Gaspar, E.M., Moura, I., Capelo, J.L. 2006. Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: *An overview*. *Talanta*. 71. 503 – 514.
- Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L., Caboni, M.F., Bogdanov, S., Almeida-Muradian, L.B. 2008. Quality and Standardisation of Royal Jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 1. 1-6.
- Stone, D. 2005. An Introduction to Bee Biology. *Entomology*. 1-22
- Tonks, A., Cooper, R.A., Price, A.J., Molan, P.C., Jones, K.P. 2001. Stimulation of TNF-release in monocytes by honey. *Cytokine*. 14 (4). 240 – 242.
- Veselý, V., Bacílek, J., Čermák, K., Drobníková, V., Haragsim, O., Kamler, F., Krieg, P., Kubišová, S., Peroutka, M., Ptáček, V., Škrotal, D., Titěra, D. 2003. Včelařství. *Nakladatelství Brázda*. Praha. p. 284. ISBN: 8020903208
- Wang, J., Kliks, M.M., Qu, W., Jun, S., Shi, G., Li, Q.X. 2009. Rapid Determination of the Geographical Origin of Honey Based on Protein Fingerprinting and Barcoding Using MALDI TOF MS. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*. 57. 10081 – 10088.
- White, J.W. 1975. The composition of honey. *Bee World*. 38 (3). 57 – 66.
- White, J.W., Subers, M.H., Schepartz, A.I. 1963. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in honey Glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta*. 73. 57 – 70.
- Won, S.R., Lee, D.C., Ko, S.H., Kim, J.W., Rhee, H.I. 2008. Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. *Food Research International*. 41. 952 – 956.
- Zdařilová, A., Malíková, J., Dvořák, Z., Ulrichová, J., Šimánek, V. 2006. Kvartérní isochinolinové alkaloidy Sanguinarin a Chelerythrin, účinky *in vitro* a *in vivo*. *Chemické listy*. 100. 30 – 41.