



e-Newsletter Ústavu včelárstva

Na témy...

- ➔ Čo nám prezradila baktéria *Paenibacillus larvae*?
- ➔ Výroba máčaných sviečok v domácich podmienkach
- ➔ Fixácia voskovej medzistienky v rámkoch chovných úlikov



Impressum

Záujmový včelársky e-
štvrťročník Ústavu včelárstva
v Liptovskom Hrádku

Ročník: V.

Číslo 2/2022

Adresa redakcie:

Dr. J. Gašperíka 599
033 01 Liptovský Hrádok
vcela.hradok@nppc.sk
tel.: +421 44 290 10 56



Redakčná rada

MVDr. Martin Staroň, PhD.
Ing. Vladimíra Kňazovická, PhD.
RNDr. Ing. Simona Benčaťová, PhD.

Grafická úprava

MVDr. Martin Staroň, PhD.

Vydavateľ:

Národné poľnohospodárske a
potravinárske centrum Nitra
Ústav včelárstva v Liptovskom
Hrádku

ISSN 2585-9005

Fotografia na obálke:
Biochemické testy API 50 CHB
(V. Kňazovická, 2011)

Ilustrácie:
Miroslava Nábělková



Chcem odoberať tento
časopis:

OBSAH:

Slovo na úvod	1
Čo nám prezradila baktéria <i>Paenibacillus larvae</i> ?.....	2
Výroba máčaných sviečok v domácich podmienkach	6
Fixácia voskovej medzistienky v rámkoch chovných úlikov.....	9



Milí naši čitatelia, včelárky a včelári,

ani v tomto letnom, horúcom období sme na Vás nezabudli a prinášame niekoľko praktických tém. Veríme, že Vás zaujmú a možno aj niečo naučia.

V úvodnom článku sa kolegovia podrobne pozreli na baktériu *Paenibacillus larvae*, ktorá patrí k pôvodcovi moru včelieho plodu. Hoci nie je mechanizmus prepuknutia moru dostatočne známy, jeho negatívne dôsledky na včelstvá pozná každý, aj keď len z počutia. Ak sa chcete o tejto baktérii dozvedieť viac, venujte tomuto príspevku svoju pozornosť.

Ak sa Vám prvá téma bude zdať príliš odborná, pri druhej si určite oddýchnete. Môžete sa dozvedieť optimálny postup výroby klasických sviečok v domácom prostredí. V prípade, že ste sviečky doma ešte nerobili, určite si vyskúšajte vlastnú výrobu. Je to optimálna činnosť pre dlhé zimné večery. Odmenou bude sviečka, ktorá nebude obtekať a vytvorí príjemnú atmosféru vo vašom obydľí.

V poslednej téme sa pozrieme na technické riešenia v chovných úlikoch spojené s fixáciou medzistienok. Ak máte tradičné chovné úliky pre odchov voľne spárených včelích matiek, voskové pásiky tvoriace základ včelieho diela sa nalepujú na stropné trámiky. Nové, moderné úliky však už disponujú celodrevenými rámkami, pri ktorých môže byť vkladanie medzistienok problematické. Nami odporúčané riešenie Vám ušetrí starosti pri ich prvom použití.

Prajem Vám v mene všetkých kolegov príjemné čítanie a úspešnú včelársku sezónu.

Ing. Ľubica Rajčáková, PhD.

Vedúca Ústavu včelárstva, NPPC – VÚŽV Nitra



Čo nám prezradila baktéria *Paenibacillus larvae*?

Vladimíra Kňazovická¹, Michal Gábor², Martina Miluchová², Miriam Filipová³, Martin Staroň¹

¹Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav živočíšnej výroby Nitra, Ústav včelárstva Liptovský Hrádok

²Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Ústav výživy a genetiky

³Veterinárny a potravinový ústav Dolný Kubín, Národné referenčné centrum pre zdravie včiel

Úvod

Baktéria *Paenibacillus larvae* je včelárom známa po celom svete. Je strašiacom spôsobujúcim mor včelieho plodu. Ide o závažné ochorenie, ktorého klinické príznaky sa riešia likvidáciou včelstiev po laboratórnom potvrdení. Cieľom príspevku je popísať, ako sa *P. larvae* taxonomicky zaraďuje, ako sa prejavuje pri prepuknutí moru včelieho plodu vo včelstve, ako sa správa pri kultivácii v laboratórnych podmienkach, ako vyzerá pod mikroskopom, aké sú jeho typické biochemické vlastnosti a spôsoby detekcie.

Taxonómia

Baktéria *Paenibacillus larvae* patrí k bacilom, v skorších dobách bola nazývaná *Bacillus larvae*. Po vytvorení nového rodu *Paenibacillus* bol pôvodca moru včelieho plodu preradený. Metódy identifikácie sa vyvíjali a stále sa vyvíjajú, čím sa objavujú, prípadne dokazujú nové biochemické a molekulo-vo-genetické vlastnosti organizmov. Určitý čas boli rozoznávané dva druhy *Paenibacillus larvae* (predtým *Bacillus larvae*) a *Paenibacillus pulvificiens* (predtým *Bacillus pulvificiens*). Neskôr boli tieto dva druhy zlúčené do jedného druhu *Paenibacillus larvae* s rozlíšením dvoch poddruhov – *P. larvae subsp. larvae* a *P. larvae subsp. pulvificiens*. Pričom bolo uvádzané, že *P. larvae subsp. larvae* spôsobuje typický mor včelieho plodu a *P. larvae subsp. pulvificiens* spôsobuje podobné ochorenie, ale s miernejším priebehom a výsledným práškovým ostatkom plodu. Na základe záverov mnohých štúdií je v súčasnosti rozoznávaný len jeden druh – *Paenibacillus larvae*, pretože pozorované rozdiely boli posúdené ako nedostatočné pre poddruhovú delenie. Zistené rozdiely boli priradené k jednotlivým genotypom, pričom doposiaľ sledovaných päť genotypov je schopných spôsobiť mor včelieho plodu a líšia sa len priebehom ochorenia, kedy niektoré genotypy spôsobujú rýchly rozvoj a niektoré pomalší (Bakonyi et al. 2003, Genersch 2010, Beims et al. 2020).

Klinické prejavy moru včelieho plodu vo včelstve

P. larvae je patogénny pre včelí plod. Dospelé včely sú proti moru včelieho plodu odolné. Spóry v ich tráviacom ústrojenstve síce nevyklíčia, ale svoju životaschopnosť si

zachovávajú (Veselý et al. 2003). Klíčia v žalúdku lariev a vegetatívne bunky prenikajú do hemolymfy a pomocou nej sú roznesené do všetkých tkanív (Dingman a Stahly 1983, Veselý et al. 2003). Bunky úspešne sporulujú v hemolymfe, uvoľňujú sa z mŕtvych lariev a rozširujú do ďalších (Dingman a Stahly 1983).

Plod obyčajne hynie po zaviečkovaní. Keď plod uhynie v štádiu vzpriamenej predkukly, rozkladá sa a hryzdá sa sú typicky otočené smerom k vrchnej strane bunky. Infikovaný plod sa najprv jemne sfarbí na svetlohnedo. Keď ochorenie postupuje, mení sa aj sfarbenie celého organizmu predkukly na tmavohnedé a zároveň stráca členitosť. Po mesiaci sa vysuší na veľmi tmavý príškvar, ktorý príľne k stene bunky a nedá sa odstrániť. Viečka klesajú dovnútra, vlnú a ich sfarbenie je tiež tmavohnedé. Niektoré viečka sú prederavené ako výsledok pokusu včiel odstrániť uhynuté predkukly. Iné bunky majú viečka úplne odstránené, a teda infekčný materiál sa stáva odkrytým a nechráneným. V ťažko infikovaných kolóniách má plodisko medzerovitý vzhľad (obr. 1) spôsobený nepravidelným zoradením zdravých buniek, navzájom sa miešajúcich s nezaviečkovanými bunkami a zaviečkovanými bunkami mŕtveho plodu s prederavenými a vpadnutými viečkami. Medzerovitý plod sa vyskytuje aj pri hnilobe včelieho plodu. Je však odlišný. Kým pri more včelieho plodu majú viečka tmavohnedé sfarbenie, pri hnilobe nie sú výrazne sfarbené (Hornitzky a Anderson 2003).



Obr. 1 Včelí plodový plást s klinickými príznakmi moru včelieho plodu (foto: V. Kňazovická, 2011)

Mechanizmus prepuknutia moru včelieho plodu ešte nie je úplne objasnený. Spóry *P. larvae* sa bežne nachádzajú v prostredí. Včelstvo má svoje prirodzené obranné mechanizmy. Napríklad z najnovších výskumov *Brevibacillus laterosporus* vyplýva, že tento mikroorganizmus nachádzajúci sa na tele včely produkuje prirodzene účinné látky proti *P. larvae* (Marche et al. 2019). Jeho potenciál využitia ako prostriedku biologickej kontroly moru včelieho plodu, rovnako ako niektorých špecifických bakteriofágov (vírusov) (Bozdeveci et al. 2021) sú sľubnou cestou kontroly šírenia ochorenia v prostredí.

Kultivácia v laboratórnych podmienkach

Kultivačné metódy sú založené na splnení fyziologických požiadaviek jednotlivých mikroorganizmov. V laboratóriu im simulujeme chemicky definované zloženie prirodzeného prostredia, ktoré im vyhovuje. Po kultivácii je vhodné kultúry zhodnotiť makroskopicky a mikroskopicky. Sleduje sa morfológia kolónie (veľkosť, tvar, konzistencia, sfarbenie, povrch, ohraničenie k okoliu). Potom sa zväčša urobí Gramovo farbenie a nasleduje zisťovanie biochemických vlastností (napr. prítomnosť niektorých enzýmov, prípadne produktov metabolizmu). Podozrenie na mor včelieho plodu musí byť potvrdené profesionálnou laboratórnou diagnostikou. Na izoláciu hmyzích patogénnych baktérií (*Paenibacillus larvae*, *P. popilliae* a *P. lentimorbus*) v laboratórnych podmienkach sú potrebné špecifické živné média, napr. J-agar (obsahujúci tryptón, kvasinkový extrakt, hydrogénfosforečnan draselný, glukózu a agar s pH 7,4) (Todar 2011). *P. larvae* vyžaduje pre svoj rast tiamín (vitamín B1) a niektoré aminokyseliny (Shimanuki a Knox 2000).

Dingman a Stahly (1983) vyvinuli tekuté médium TMYPGP, podporujúce sporuláciu *P. larvae*. Okrem neho uvádzajú zloženie MYPGP agaru, ktoré sa využíva na bežnú kultiváciu. Použitie selektívnych živných médií a uskutočnenie mikroskopických a biochemických pozorovaní je potrebné, pretože niektoré druhy *Bacillus* spp. a *Paenibacillus* spp. (s podobným spôsobom života) potláčajú v laboratórnych podmienkach rast *P. larvae*. Preto sa používajú živné média obohatené o kyselinu nalidixovú alebo piperimidovú (Chantawannakul a Dancer 2001). Úlohou kyseliny nalidixovej je inhibícia rastu *Paenibacillus alvei*, ktorý býva bežne nájdený v medoch z oblastí, kde sa vyskytuje hniloba včelieho plodu (Hornitzky a Anderson 2003).

Morfológia

Ako vyzerajú bunky baktérie? *P. larvae* je sporujúca G+ (grampozitívna) baktéria s dĺžkou 2,5-8,5 µm a šírkou 0,5-0,8 µm (Veselý et al. 2003). Má paličkovitý tvar s jemne zaokrúhlenými koncami a tendenciou rastu v retiazkach (Shimanuki a Knox 2000, obr. 2). Pohybuje sa dlhými bičikmi, vyrastajúcimi po celom povrchu bunky (Veselý et al. 2003). *P. larvae* je fakultatívne anaeróbna baktéria so schopnosťou tvorby veľmi odolných spór (Lauro et al. 2003), ktorých rozmery sú 1,2-1,9 µm × 0,4-0,9 µm (Veselý et al. 2003).

Uvedme si niekoľko faktov pre lepšiu predstavu, ako asi bunka tejto baktérie vyzerá. Jeden mikrometer (µm) je jednou milióntinou metra a jednou tisícinou milimetra. Gramovo farbenie je používanou diagnostickou metódou v mikrobiológii, na základe ktorej delíme baktérie do troch skupín na grampozitívne (G+), gramnegatívne (G-) a



Obr. 2 Mikroskopický obraz *P. larvae* (mierka 5 µm; foto: V. Kňazovická, 2011)

gramlabilné (G±). Pri tejto metóde sa využíva odlišnosť v zložení bunkovej steny. Bunka stena G+ baktérií, a teda aj baktérie *P. larvae* je tvorená hrubou vrstvou peptidoglykánu, ktorá je popretkávaná retiazkami kyseliny teichoovej a lipoteichoovej a po Gramovom farbení sa bunky farbia na fialovo (Musilová 2018, obr. 2). G- baktérie majú bunkovú stenu štruktúrne i chemicky zložitejšiu, ale tenšiu, čoho dôsledkom je vyššia mechanická krehkosť buniek (Kaprálek 1986). G+ bunky sú mechanicky odolnejšie. *P. larvae* má ďalší skrytý tromf – možnosť sporulácie. Spóry *P. larvae* sú extrémne odolné proti nepriaznivým podmienkam, napr. veľmi vysokým a nízkym teplotám, vysychaniu, chemickým prostriedkom (Chantawannakul a Dancer 2001).

Biochemická charakteristika

P. larvae dokáže rozložiť včelí plod - produkuje veľké množstvo proteáz (proteolytických enzýmov, ktoré sa podieľajú na rozklade bielkovín). Antúnez et al. (2009) uvádzajú, že plásty infikované morom včelieho plodu, resp. príškvary a vláknitá hmota sú vysoko proteolytické. Je to znak, ktorý sa často využíva pri rýchlej diagnostike - očkovaním infikovaného materiálu do mlieka, čo spôsobuje koaguláciu proteínov počas niekoľkých hodín. Už Holst a Sturtevant (1940) našli proteolytické enzýmy v larvách včiel, ktoré boli infikované baktériou *P. larvae*. Tieto proteolytické enzýmy stekutovali želatínu, rozkladali bielkoviny v mlieku a objavovali sa súčasne so sporuláciou, pričom s ďalšou sporuláciou narastali. Na základe týchto pozorovaní, Holst vyvinul jednoduchý test nazývaný Holstov mliečny test. Test je vykonávaný vložением podozrivých príškarov alebo steru z chorých lariev do skúmavky obsahujúcej 3-4 ml 1 % vodného roztoku práškového odstredeného mlieka. Skúmavka je následne inkubovaná pri teplote 37 °C. Ak je prítomný mor včelieho plodu, dochádza k vyčíreniu suspenzie, avšak test nie je vždy spoľahlivý (Shimanuki a Knox 2000).

P. larvae produkuje aj enzým enolázu, ktorá je považovaná za potenciálny faktor virulencie. Nachádza sa na bunkovom povrchu, kde reaguje s rôznymi látkami (Lehner et al. 2017).

Ďalšou zaujímavou vlastnosťou je, že *P. larvae* nemá vo svojej výbave enzým katalázu, prípadne len vo veľmi malom

množstve. Väčšina aeróbných sporulujúcich baktérií vykazuje prítomnosť katalázy (Hornitzky a Anderson 2003). *P. larvae* vykazuje veľmi miernu, spomalenú alebo žiadnu katalázovú aktivitu (De Graaf et al. 2006) podobne ako ďalšie bakteriálne patogény hmyzu, konkrétne *P. popilliae* a *P. lentimorbus* (Todar 2011).

Ďalšou možnosťou biochemickej charakteristiky baktérií je sledovanie skupiny sacharidov, ktoré sú schopné sa rozložiť. Test sa vykoná v skúmavkách alebo v existujúcich zjednodušených systémoch. Napríklad API 50 CH systém pozostáva z 50 mikroskúmaviek, určených na skúmanie fermentácie sacharidov a ich derivátov. Použitie API 50 CHB umožňuje identifikáciu *Bacillus* spp. a príbuzných rodov (BioMérieux, Francúzsko, obr. 3). Spektrum sacharidov a ich derivátov, ktoré rozkladajú zbierkové kmene *P. larvae* a izoláty z ohnisk moru včelieho plodu, pozostáva najmä z ribózy, D-glukózy, N-acetylglukozamínu a trehalózy, často aj D-manózy, D-tagatózy a glycerolu (Carpana et al. 1995, Hansen et al. 2003, De Graaf et al. 2006, Kňazovická et al. 2011b).

Vlastnosti mikroorganizmov sa líšia aj podľa miesta výskytu. Ramya et al. (2008) izolovali a identifikovali *P. larvae* z pôdneho spoločenstva, kde sa prirodzene nachádza a zistili jeho vysokú účinnosť pri degradácii indigo karmínu,

ktorý sa využíva pri farbení modrých džínsov. Degradácia indigo karmínu je metabolicky náročná. *P. larvae* použili úspešne na odfarbenie textilných odpadových vôd, pričom izolovaný kmeň vykazoval odlišné biochemické vlastnosti v porovnaní so štúdiami mnohých autorov, ktorí sledovali kmene spôsobujúce mor včelieho plodu. Todar (2011) konštatuje, že aeróbne sporulujúce baktérie sú veľmi prispôsobivé a mnohé dokážu meniť svoj energetický metabolizmus podľa prostredia výskytu a jeho špecifických podmienok.

V mnohých prípadoch biochemickej identifikácie mikroorganizmov sa objavujú problémy, pretože databázy na úrovni rodov sú neúplné. Molekulovo-genetické metodiky preto ponúkajú alternatívny laboratórny mechanizmus na identifikáciu mikroorganizmov (Tolba et al. 2007).

Molekulovo-genetické metódy detekcie

Detekcia *P. larvae* prostredníctvom metód izolácie DNA a jej následného hodnotenia patrí k moderným a rýchlym spôsobom identifikácie baktérií. Molekulovo-genetické metódy sa dajú použiť na identifikáciu mikrobiálnej kolónie, ktorú pred tým kultivujeme na pevných pôdach v Petriho miskách ako aj identifikáciu hľadanej baktérie priamo z vyšetrovaného materiálu.

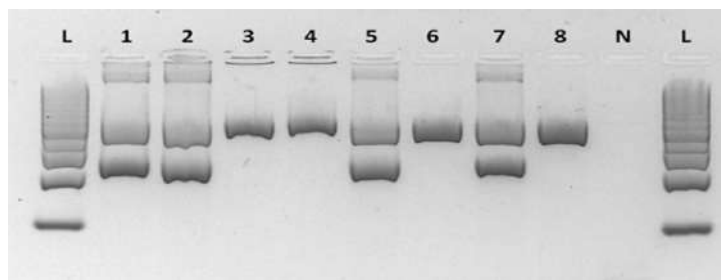
Použitím rôznych typov PCR (polymerázovej reťazovej reakcie) sa nám podarilo identifikovať zbierkové kmene *P. larvae* ako aj jeho prítomnosť vo vzorkách plodových plástov zo včelstiev s klinickými príznakmi moru včelieho plodu (reprezentatívne výsledky - obr. 4). Avšak nepodarilo sa nám dokázať prítomnosť *P. larvae* vo vzorkách náhodne odobratých slovenských medov, pričom v rôznych zahraničných štúdiách sa uvádza relatívne vysoká frekvencia záchytu. Taktiež sme sa stretli s rozdielmi v identifikácii podľa použitej metódy i času (Kňazovická et al. 2008, Kňazovická et al. 2011a,b).

Mikroorganizmy často importujú cenné zložky z externého prostredia, pretože



Obr. 3 Výsledky biochemických testov API 50 CHB (BioMérieux, Francúzsko) dvoch kmeňov *P. larvae* (foto: V. Kňazovická, 2011)

Pozitívnu reakciu indikuje žltá farba. Baktéria rozkladá prítomný sacharid. Vznikajú kyseliny, ktoré oxidujú prostredie a zmení sa farba indikátora z fenolovej červenej na žltú. Pri eskulínovom teste (3. rad zhora, 6. mikroskúmavka zľava) je pozitívna reakcia vizualizovaná zmenou z červenej na čiernu.



Obr. 4 Reprezentatívne výsledky detekcie *Paenibacillus larvae* pomocou multiplex PCR na 2 % agarózovom géle (foto: M. Gábor, 2011)
 L – ladder (štandard) 100-bp (bázových párov) (Fermentas); 1, 2, 5, 7 – prítomnosť produktu špecifického pre *P. larvae* (233 bp) a kontrolného fragmentu 16S rRNA génu (433 bp); 3, 4, 6, 8 – prítomnosť kontrolného fragmentu (433 bp), bez fragmentu špecifického pre *P. larvae* (233 bp); N – negatívna kontrola multiplex PCR

je to jednoduchšie, ako by ich mali vytvárať „na novo“ (Stoffer-Bittner et al. 2018). Alberts et al. (2003) uvádzajú, že baktérie môžu prijímať DNA zo svojho okolia, napr. pri pôdnej baktérii *Bacillus subtilis* bolo pozorované, že uprednostňuje mechanizmus prenosu génov, označovaný ako transformácia. Tieto baktérie zachytávajú molekuly DNA prítomné v ich okolí (DNA, pochádzajúcu z mŕtvych a rozbitých buniek) a transformujú ju cez svoju bunkovú membránu. DNA môže byť rekombináciou začlenená do genómu. A práve názov „transformácia“ pochádza z prvých pozorovaní tohto javu, keď sa zdalo, že sa jeden bakteriálny druh premenil na iný (Alberts et al. 2003). Schopnosť transformácie má len každá tisíca bunka, ktorá sa potom nazýva kompetentná a veľkosť úseku DNA, ktorý si prenáša, je okolo 10 bázových párov (Musilová 2018).

V roku 2019 sme vykonali metagenomickú analýzu 30 vzoriek medov, ktorá nám priniesla všeobecný pohľad na bakteriálnu DNA na úrovni rodov prítomnú v mede. *Paenibacillus* spp. sme zachytili v 2 vzorkách medu (z 30), z toho v 1 sme dodatočne potvrdili druhovo *P. alvei* (Kňazovická et al. 2019). Diagnostika zo vzoriek meliva a medu je považovaná za včasnú diagnostiku, kedy vo včelstve ešte nemusia byť prítomné klinické príznaky ochorenia a môže sa pristúpiť k ochranným opatreniam (dezinfekcia, karanténa).

Okrem toho sa pomocou molekulovo-genetických metód sledujú jednotlivé izoláty z ohnísk moru včelieho plodu pre bližšie pochopenie faktorov virulencie. Napr. gén pre enolázu je posudzovaný ako kandidátsky pre posudzovanie fenotypu, pretože ovplyvňuje virulenciu i metabolizmus (Lehner et al. 2017).

Zatiaľ sme sa nestretli so štúdiami, ktoré by hovorili o primárnej škodlivosti *P. larvae* pre ľudí. Med vytvára prostredie, ktoré postupne ničí vegetatívne formy baktérií, ostanú len spóry. Konzum medu so spórmi *P. larvae* je pre človeka bezpečný. Avšak vysoká škodlivosť baktérie pre včely predpovedá riziko straty mnohých včelstiev, čo už

predstavuje značné nepriame nebezpečenstvo pre ľudí a náš okolitý prírodný systém. Med funguje aj ako indikátor zdravotného stavu včelstiev.

Záver

Pozorovania a analýzy, ktoré boli uskutočnené, naznačujú, že v prostredí úľa spolu so včelami žijú rôzne mikroorganizmy. Niektoré žijú aktívne, iné pasívne. Je možné, že pôsobením určitých činiteľov, sa spolu s ich „mikroprostredím“ menia ich pomery a formy. Je zaujímavé, že baktéria, ktorá je veľmi citlivá v laboratórnom prostredí a kultivácii ktorej sa vedci venovali desaťročia (pretože mnohé príbuzné baktérie ju v laboratóriu potláčajú), dokáže spôsobiť tak závažné ochorenie. Metódy, ktoré sa používajú na detekciu *P. larvae* majú všetky svoje výhody a nevýhody a je dobré ich kombinovať.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Udržateľné systémy inteligentného farmárstva zohľadňujúce výzvy budúcnosti 313011W112, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Použitá literatúra

- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2003). Základy bunčnej biológie : Úvod do molekulárnej biológie buňky. 2. české vyd. Ústí nad Labem : Espero Publishing, 740 s. ISBN 80-902906-2-0.
- Antúnez K., Anido M., Schlapp G., Evans J.D., & Zunino P. (2009). Characterization of secreted proteases of *Paenibacillus larvae*, potential virulence factors involved in honeybee larval infection. *Journal of invertebrate pathology*, 102(2), 129-132.
- Bakonyi T., Derakhshifar I., Grabensteiner E., Nowotny N. (2003). Development and evaluation of PCR Assays for the Detection of *Paenibacillus larvae* in Honey Samples: Comparison with Isolation and Biochemical Characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1504-1510.
- Beims H., Bunk B., Eler S., Mohr K. I., Spröer C., Pradella S., Günther G., Rohde M., von der Ohe, W., & Steinert, M. (2020). Discovery of *Paenibacillus larvae* ERIC V: Phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(2), 151394.
- Bozdeveci A., Akpınar R., & Karaoğlu Ş. A. (2021). Isolation, characterization, and comparative genomic analysis of vB_PlaP_SV21, new bacteriophage of *Paenibacillus larvae*. *Virus Research*, 305, 198571.
- Carpana E., Marocchi L., Gelmini L. (1995). Evaluation of the API 50CHB system for the identification and biochemical characterization of *Bacillus larvae*. *Apidologie*, 26(1), 11-16.
- Chantawannakul P., & Dancer, B.N. (2001). American foulbrood in honey bees. *Bee World*, 82(4), 168-180.
- De Graaf D.C., Alippi A.M., Brown M., Evans J.D., Feldlaufer M., Gregor A., Hornitzky M., Pernal S.F., Schuch D.M.T., Titěra D., Tomkies V., Ritter W. (2006). Diagnosis of American Foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Letters in Applied Microbiology*, 43(6), 583-590.
- Dingman D.W., Stahly, D.P. (1983). Medium Promoting Sporulation of *Bacillus larvae* and Metabolism of Medium Components. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(4), 860-869.
- Genersch E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(1), S10-S19.

Hansen H., Brødsgaard C.J., Kryger P., Nicolaisen M. (2003). A scientific note on the presence of *Paenibacillus* larvae spores in sub-Saharan African honey. *Apidologie*, 34(5), 471-472.

Holst E.C., & Sturtevant A.P. (1940). Relation of proteolytic enzymes to phase of life cycle of *Bacillus* larvae, and two new culture media for this organism. *Journal of Bacteriology*, 40(5), 723-731.

Hornitzky M.A., Anderson D.L. (2003). Honeybee diseases : Australia and New Zealand Standard Diagnosis Procedures. 13 s.

Kaprálek F. (1986). Fyziologie baktérií. 1. vyd. Praha : Státní pedagogické nakladatelství. 608 s.

Kňazovická V., Kačániová M., Nováková I., Fixelová M., & Sudzina M. (2008). Detection of *Paenibacillus* larvae in honey samples by the PCR. *J. Agrobiol. Sci*, 25(1), 73-75.

Kňazovická V., Miluchová M., Gábor M., Kačániová M., Melich M., Kročko M., & Trakovická A. (2011a). Using Real-time PCR for Identification of *Paenibacillus* larvae. *Animal Science and Biotechnologies*, 44(1).

Kňazovická V., Kačániová M., Miluchová M., Gábor M., Dovičičová M., Melich M., & Trakovická A. (2011b). Honey and Microorganisms: Monitoring of Microorganisms in Slovak Honey by Molecular-Biological Methods in Relation to Physico-Chemical Properties. LAP Lampert Academic Publishing : Saarbrücken. ISBN 978-3-8473-2310-5.

Kňazovická V., Gábor M., Miluchová M., Bobko M., & Medo J. (2019). Diversity of bacteria in Slovak and foreign honey, with assessment of its physico-chemical quality and counts of cultivable microorganisms. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(special), 414-421.

Lauro F.M., Favaretto M., Covolo L., Rasso M., Bertoloni G. (2003). Rapid detection of *Paenibacillus* larvae from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *International Journal of Food Microbiology*, 81(3), 195-201.

Lehner B.W., Schultes N.P., & Dingman D.W. (2017). *Paenibacillus* larvae

subspecies with dissimilar virulence patterns also group by vegetative growth characteristics and enolase isozyme biochemical properties. *Agri Gene*, 6, 31-36.

Marche M.G., Satta A., Floris I., Lazzeri A.M., & Ruiu L. (2019). Inhibition of *Paenibacillus* larvae by an extracellular protein fraction from a honeybee-borne *Brevibacillus laterosporus* strain. *Microbiological research*, 227, 126303.

Musilová Š. (2018). Mikrobiologie (1. část) pro posluchače FAPPZ. Praha : ČZU. 66 s. ISBN 978-80-213-2882-2.

Ramya M., Anusha B., Kalavathy S. (2008). Decolorization and biodegradation of indigo carmine by a textile soil isolate *Paenibacillus* larvae. *Biodegradation*, 19(2), 283-291.

Shimanuki H., Knox D.A. (2000). *Diagnosis of Honey Bee Diseases : Agriculture Handbook No. 690*. Washington : U. S. Department of Agriculture. 61 s.

Stoffer-Bittner A.J., Alexander C.R., Dingman D.W., Mourad G.S., & Schultes N.P. (2018). Functional characterization of the uracil transporter from honeybee pathogen *Paenibacillus* larvae. *Microbial pathogenesis*, 124, 305-310.

Todar K. (2011). *Todar's textbook of Bacteriology* [on line]. Dostupné na: <<http://www.textbookofbacteriology.net>>.

Tolba O., Earle J.A.P., Millar B.Ch., Rooney P.J., Moore J.E. (2007). Speciation of *Bacillus* spp. in honey produced in Northern Ireland by employment of 16S rDNA PCR and automated DNA sequencing techniques. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(12), 1805-1808.

Veselý V., Bacílek J., Kamler F. et al. (2003). *Včelářství*. 2. upr. vyd. Praha : Nakladatelství Brázda, 257 s. ISBN 80-209-0320-8.



Výroba máčaných sviečok v domácich podmienkach

Martin Staroň

Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav živočíšnej výroby Nitra, Ústav včelárstva Liptovský Hrádok

Z jarmočných pultov včelárov poznáme prevažne odlievané ozdobné sviečky, ktoré nám neraz skrášlia príbytok a zaplnia ho príjemnou vôňou včelieho vosku. Niekedy si zas doprajeme zmenu a siahneme po sviečke vytvorenej stáčaním z medzistienky. Presne týmto sviečkam dám v nasledujúcom texte pokoj a pokúsim sa predstaviť vám ich staršiu príbuznú – máčanú sviečku.

Čo ma na máčanej sviečke zaujalo?

V prvom rade jej jednoduchosť. Na vzhľad nenápadná, bez ornamentov a niekedy aj nie úplne dokonale rovná. Tieto vlastnosti ale vyvažuje praktickosťou. Pri zapálení prvej máčanej sviečky ma oslovila najmä jej schopnosť horieť bez zbytočného vytekania vosku. Pokiaľ do nej deti nestrkajú, nefúkajú do nej, či nevymýšľajú iné nezbedy, dokáže zhorieť takmer bez zvyšku. Za tento dar vďačí dvom javom sprevádzajúcich jej vznik. V prvom rade správnu voľbou priemeru sviečky ku knôtu a v druhom, neposlednom rade aj tomu, že je tvorená vrstvením vosku rovnomerne na

knôt. Ten tak leží vždy uprostred priemeru sviečky, a to aj vtedy, keď sviečka vykazuje mierne zakrivený tvar.

Pátranie po vhodnom postupe

V ponukách internetových obchodov nájdete rôzne nerezové prípravky na výrobu máčaných sviečok. Ich veľkým prínosom je, že počas máčania sviečky držia vždy napnutý knôt a sviečka je tak na pohľad dokonale rovná. Ich veľkým mínusom je fakt, že ak by ste na jedenkrát potrebovali vyrobiť veľa sviečok potrebujete aj veľa týchto prípravkov, čo vie byť finančne nákladné. Druhá nevýhoda je aj v postupnom nanášaní vosku na konštrukciu prípravku, čo znamená, že vosk na prípravku musíte nechať za každým cyklom výroby sviečok roztopiť, aby ste mohli začať ďalší cyklus.

Ja som hľadal cestu výroby, kedy by som bol pri jednom roztopení vosku s čo najnižšími investíciami schopný vyrobiť približne 100 sviečok za večer. Preto som zvolil inú cestu. Pre výrobu som použil priame máčanie knôtu do vosku roztopeného v gastro-nádobe na ohrev pokrmov. Ako prípravok na fixáciu knôtu som zvolil jednoduchú doštičku s klincami. Na jednom takomto jednoduchom prípravku som schopný vyrobiť 12 sviečok.



Obr. 1 Prvotná impregnácia knôtu včelím voskom. (foto: M. Staroň)

Aký materiál použiť na knôt? Odskúšal som rôzne komerčné knôty, no najviac sa mi osvedčil obyčajný bavlnený špagát o priemere približne 1,5 mm. Pri horení vôbec neprekáža, že nemá splietanie typické pre sviečkové knôty. Pekne rovnomerne odhára a jeho priaznivá cena ma nenúti extrémne šetriť pri navязovaní knôtov. To robí prácu s ním aj neuveriteľne komfortnou.

Postup výroby

Opísaný postup výroby určite nie je určený pre veľkovýrobcov a nie je možno ani ekonomicky úplne najefektívnejší. Jedná sa o pohodlný a jednoduchý postup výroby v domácich podmienkach. Pre predaj sviečok ako doplnkového sortimentu k medu, je to ale spôsob rentabilný. Tu by som rád spomenul, že investíciu do vodného kúpeľa využije včelár aj pri čistení včelieho vosku sedimentačnou metódou. Získa tak čistý voskový koláč, či skôr tehlu na skladovanie.

Roztopenie vosku

V spomínanej gastro-nádobe je najprv potrebné rozpustiť

vosk. Vhodné sú zariadenia o výške 205 mm. Prevažne s označením „BM 1/1 205“. Samotná nádoba funguje ako vodný kúpeľ, to znamená, že do nej nalejete vodu. Táto je špirálou zahrievaná takmer do bodu varu regulovateľnou špirálou. Do zariadenia môžeme ponoriť tri nádoby. Na trhu sú samozrejme rôzne veľkostí zariadení s rôznym delením a k nim prislúchajúce gastro-nádoby. Určite nájdete tú správnu pre vaše zámery. Ja používam kúpeľ s tromi nádobami s výškou nádoby 20 cm. Do nádob dáme roztopiť vyčistený včelí vosk (vosk bez zvyškov košielok a iných drobných nečistôt). Pri prvotnom roztápaní vosku môže byť špirála nastavená na maximum, aby sa vosk čo najrýchlejšie roztopil. Následne pri máčaní sviečok je potrebné nastaviť špirálu na druhý z troch dostupných výkonnostných stupňov, aby nemal vosk príliš vysokú teplotu. Tá by spôsobila príliš špicatý tvar sviečky. Príliš nízka teplota vosku sa naopak prejavuje postupnou tvorbou jemnej vrstvičky tuhnuceho vosku na hladine, čo na sviečke pri máčaní vytvára nerovný, zvrásnený povrch sviečky.

Príprava knôtu

Prvým krokom pri mojom postupe výroby je príprava, impregnácia knôtu (Obr. 1). Túto je potrebné vykonať, kým má vosk v nádobe ešte pomerne vysokú teplotu. Hneď po kompletom roztopení voskového koláča. Teplý vosk tak pekne penetruje do vnútra knôtu. Knôty určené k penetrácii sú naviazané na prípravok vždy vo spojenom formáte pre dve sviečky. Po dôkladnej (cca. 15 sekundovej) impregnácii zavesíme prípravok na stojan (mne sa osvedčil vyradený sušiac na bielizeň) a každú dvojicu budúcich knôtov zaťažíme dočasným závažím na háčiku (Obr. 2). Takto zaťažené knôty necháme dôkladne vychladnúť, aby pri následnom máčaní samotnej sviečky (kým je ešte tenká) tvorili chladné a pevné jadro. Sviečky tak budú rovnejšie, ako keby sme ich máčali bezprostredne po impregnácii knôtov. Z tohto dôvodu končím vždy výrobu sviečok tým, že si impregnujem knôty na prípravkoch pre nasledujúci termín výroby sviečok.



Obr. 2 Vytuhnutie impregnovaného knôtu pod záťažou. (foto: M. Staroň)



Obr. 3 Základ budúcich máčaných sviečok pripravený k vrstveniu včelieho vosku postupným namáčaním. (foto: M. Staroň)

Máčanie sviečok

Vytuhnuté, voskom napustené spojené formáty knôtu pre sviečky rozstriháme v ich spoji, vmieste kde bolo predtým zavesené závažie. Vzniknú nám tak základy budúcich sviečok (Obr. 3), ktoré môžeme postupne máčať do tekutého vosku. Vrstvu po vrstve sa nám tak bude formovať sviečka. Tvar máčanej sviečky je závislý od teploty, pokiaľ by bol vosk príliš teplý, vrch sviečky by bol hrubší a spodok sviečky naopak príliš tenký. Pri optimálnej teplote je hrúbka jednotlivých vrstiev v celej výške sviečky približne rovnaká. Ak je vosk príliš chladný, nebudú jednotlivé vrstvy navzájom dobre držať a na reze sviečky (pri zarovnávaní spodného konca) bude viditeľné oddeľovanie sa jednotlivých vrstiev. Spravidla mám pre máčanie pripravených 10 prípravkov so 6-timi párami sviečok. Máčanie vykonávam krátkym dvojitým ponorením do tekutého vosku. Následne prípravok zavesím na sušiak a pokračujem ďalším prípravkom v poradí až po posledný desiaty. Počas tejto doby mi prípravok, ktorý bol máčaný ako prvý dostatočne vytuhne, ochladne a môžem celé kolo opakovať.

Máčanie sviečok prevediem do ich požadovanej hrúbky (Obr. 4). Približne v polovici procesu sa na spodnej časti sviečky vytvorí špicatý koniec bez knôtu, ktorý jednoducho zrežem aby mi nebránil pri nasledujúcom máčaní, a aby som dosiahol pekný tvar sviečky. Zrezané konce dám naspäť do nádoby na roztopenie. Zo spomínaných troch nádob používam na máčanie len jednu. No rozpustený vosk mám vo všetkých troch. Zvyšné dve nádoby mi slúžia na dopĺňanie dostatočnej hladiny v nádobe na máčanie sviečok. Najmä pri posledných namáčaniach, keď je už povrch sviečky výrazne väčší je pokles hladiny pomerne rýchly a je ju potrebné neustále dopĺňať.

Používanie

Ako veľmi praktické sa mi zdajú byť sviečky o priemere 18 mm a dĺžke 15 cm. Vydržia horieť približne 5 hodín veľmi pokojným a oslnivým plameňom. Hodia sa najmä do viacramenných ozdobných svietnikov (Obr. 5), kde je ich jednoduchosť priam dokonalým kontrastom.



Obr. 4 Jednotlivé fázy máčania. (foto: M. Staroň)

Niekedy sa môže stať, že knôt nedostatočne rýchlo odhorí a plameň začne mierne dymiť. Riešenie tohto zriedkavého javu nájdete o odstavce nižšie.



Obr. 5 Hotové sviečky pripravené k použitiu. Pod svietnikom kratiknôt na úpravu knôtu a zvonček na uhasenie plameňa sviečok. (foto: M. Staroň)

Užitoční pomocníci

O plameň sa treba starať a strážiť ho. Nie len preto, aby bol pekný, ale hlavne preto, aby sa z dobrého sluhu nestal zlý pán. Vašu bdelosť pri používaní sviečok udrží aj občasné používanie doplnkového vybavenia. Pri každom svietniku boli v minulosti dvaja pomocníci. „Kratiknot“ a „Zvonček“ (Obr. 5). Kratiknot je pomôcka, ktorá slúži na skrátenie knôtu počas horenia sviečky a to tak, aby odstrihnutý koniec nespadol do roztopeného

vosku. Nie je to len historický exponát, stále sa dá na internetových obchodoch objednať a slúži rovnako dobre, ako v dávnych dobách. Zvonček plameň kozmeticky neupravuje, ale naopak ho zháša. Prikryjete ním plameň a vrchnú časť sviečky a ak ho dostatočne dlho pridržíte, plameň pod ním spotrebuje kyslík a bez zbytočného dymenia zhasne.



Nikdy nenechávajte sviečku horieť bez dohľadu zodpovednej osoby.

Fixácia voskovej medzistienky v rámkoch chovných úlikov

Martin Staroň

Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav živočíšnej výroby Nitra, Ústav včelárstva Liptovský Hrádok

Vo 4 čísle 4. ročníka časopisu sme sa zmienili o rozdieloch vo veľkosti otvorov materskej mriežky a s tým spojenými problémami pri ich použití na chovných úlikoch. V tomto čísle sa podelíme s inou skúsenosťou spojenou s technickým riešením uchytenia voskovej medzistienky v rámkoch chovných úlikov.

Tradičný spôsob prípravy chovného úlika pre stavbu včelieho diela



Obr. 1 Tradičné nalepenie základu budúceho včelieho diela z voskovej medzistienky. (foto: M. Staroň)

Chovné úliky pre odchov voľne spárených včelích matiek sú prevažne veľmi jednoduchej konštrukcie. Neobsahujú rámiky, ale len stropné trámiky (Obr. 1), ktoré slúžia ako základ pre nalepenie voskového pásiku medzistienky. Včely si na tomto základe ochotne postavajú celé dielo, ktoré je pre včelára pri prehliadke dobre prehľadné vďaka možnosti odklopiť jeden z dvoch vystavaných plástov. Tento systém so sebou prináša aj veľkú výhodu pri prvotnom plnení chovných úlikov včelami. Rámiky ani dielo totiž nezavadzajú pri

nadávkovaní vodu zmáčaných včiel z pakety.

Nové technické riešenie

Nové chovné úliky disponujú celodrevenými (alebo plastovými) rámkami. Prevažne v počte troch alebo štyroch kusov. Takéto usporiadanie diela poskytuje včelstvičku väčší priestor, a preto sa v ňom dá včelia matka po spárení či inseminácii podržať spravidla dlhšie ako pri menších chovných úlikoch. To je výhodné najmä pri produkcii inseminovaných včelích matiek. Tento typ chovných úlikov primárne nie je určený na manuálne plnenie vodou zmáčanými alebo uspanými včelami. Do týchto chovných úlikov by sa mali, cez špeciálny spodný otvor, napúšťať včely z pakety nabehnutím za prirodzeným svetlom. To im poskytuje stropná fólia s durofolu. Moderne riešený chovný



Obr. 2 a 3 Dielo vystavané na spadnutej medzistienke vložené do drážok rámika bez dodatočnej fixácie voskom. (foto: M. Staroň)

úlik má vo svojich rámkoch vytvorenú drážku v spodnej aj vrchnej latke rámiku. Umožňuje to pripraviť si presný rozmer voskovej medzistienky a jednoducho ju do týchto rámkov zatlačiť. Je tu ale jedno „ale“

Problémy pri použití vkladanej medzistienky

Ak podľahnete pokušeniu rýchleho vkladania medzistienok do rámkov mali by ste ich pri vrchnej latke dodatočne zaistiť náterom tekutého včelieho vosku. V opačnom prípade vás nemilo prekvapí zborené včelie dielo (Obr. 2 a 3). Medzistienky proste nevidržia teplo a váhu včiel, nahrejú sa, ohnú, no a problém je na svete.

Riešením je buď zafixovať voskovú medzistienku vo vrchnej drážke alebo zvoliť starý, konzervatívny prístup a nalepiť do vrchnej drážky len pásik voskovej medzistienky. Takýto postup nám umožní chovné úliky plniť vodou zmáčanými včelami. Jednoducho dva rámiky s pásikom necháme v chovnom úliku, do ich voľného priestoru naberačkou umiestnime včely (prípadne panušku „na ostro“) a vložíme zvyšné dva rámiky.

Aby som moderné chovné úliky len nekritizoval, pridám aj jednu pochvalnú vetu. Skoro všetky majú materskou mriežkou oddelenú krmnu komoru, ktorá umožňuje dokrímenie sirupom. To je dokonca možné vykonávať aj počas dňa nakoľko stačí odklopiť durofóliu v časti krmnej komory a priestor s matkou tak počas dokrmovania vôbec nerušíme. Nehrozí tak strata včelej matky.

Dúfam, že vám článok ušetrí starosti pri prvom použití moderných chovných úlikov.