

# Sledování diverzity mikroflóry v medu

Bc. Veronika Pavlová

---

Diplomová práce  
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2019/2020

## **ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE** (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Pavlová**  
Osobní číslo: **T18386**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie potravin**  
Forma studia: **Kombinovaná**  
Téma práce: **Sledování diverzity mikroflóry v medu**

### Zásady pro vypracování

#### I. Teoretická část

1. Med a včelí produkty – charakteristické vlastnosti, složení, produkce
2. Mikroorganismy v medu a dalších včelích produktech
3. Možnosti stanovení mikroorganismů v medu a včelích produktech

#### II. Praktická část

1. Příprava vzorků pro mikrobiologickou analýzu
2. Stanovení přítomnosti mikroorganismů ve vzorcích medu
3. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce

Forma zpracování diplomové práce: **Tištěná/elektronická**

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] Grabowski, N.T., Klein, G. Microbiology and foodborne pathogens in honey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57: 1852-1862. 2017.
- [2] Corby-Harris, V., Maes, P., Anderson, K.E. The bacterial communities associated with with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLOS One*, 9: e95056. 2014.
- [3] Kačániová, M., Pavličová, S., Haščík, P., et al. Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 56: 285-295. 2009.
- [4] Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **17. února 2020**  
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. RNDr. Iva Burešová, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## ABSTRAKT

Náplní této diplomové práce bylo pozorování diverzity mikroflóry v medu s využitím molekulárně-genetické fingerprintové metody denaturační gradientové elektroforézy. V teoretické části byly popsány základní fyzikálně-chemické parametry a vlastnosti medu, s důrazem kladeným na antimikrobiální aktivitu, diverzitu mikroorganismů nacházejících se v medu a možnosti jejich stanovení. Praktická část byla věnována především molekulárně-genetické analýze mikrobiálního prostředí u sedmdesáti vzorků medu, kde bylo prokázáno a sekvenční analýzou identifikovaných 33 různých bakterií. Nejpočetněji byly ve vzorcích zastoupeny nepatogenní rody *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Acetobacteraceae* a *Propionibacterium*. Citlivější sekvenací nové generace se potvrdilo majoritní zastoupení bakterií rodu *Lactobacillus*, s absolutní většinou druh *Lactobacillus kunkeei*. Potvrzené mikroorganismy byly identifikovány jako běžně se vyskytující v nektaru, trávicím traktu včely a úlovém prostředí.

Klíčové slová: med, mikroflóra, PCR, DGGE

## ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was to investigate the diversity of microflora in honey using the molecular-genetic fingerprint method of denaturing gradient gel electrophoresis. The theoretical part describes the basic physicochemical parameters and properties of honey, with emphasis on antimicrobial activity, diversity of microorganisms found in honey and the possibility of their determination. The practical part was mainly devoted to molecular-genetic analysis of the microbial environment in seventy samples of honey, where 33 different bacteria were demonstrated and identified by sequence analysis. Non-pathogenic genera *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Acetobacteraceae* and *Propionibacterium* were most abundant in the samples. The more sensitive sequencing of the new generation confirmed the majority of *Lactobacillus* bacteria, with the absolute majority of *Lactobacillus kunkeei*. Confirmed microorganisms have been identified as being common in the nectar, the bee's digestive tract of bees and the hive environment.

Keywords: honey, microflora, PCR, DGGE

Touto cestou by som rada poďakovala svojej školiteľke doc. Leoně Buňkové, Ph.D. za príležitosť pracovať na zaujímavej téme a za rady, ochotu a čas, ktorý mi venovala. Veľká vďaka patrí aj pani laborantkám Ing. Olze Vlčkové a Ing. Veronice Kučabové za pomoc v laboratóriu, rady a priateľskú atmosféru pri realizácii praktickej časti tejto práce. V neposlednej rade ďakujem svojmu priateľovi a celej rodine, ktorí ma s láskou a trpezlivosťou podporovali počas celého môjho štúdia.

Prehlasujem, že odovzdaná verzia diplomovej práce a verzia elektronická nahratá do IS/STAG sú totožné.

# OBSAH

ÚVOD.....	9
<b>I TEORETICKÁ ČASŤ.....</b>	<b>10</b>
<b>1 MED.....</b>	<b>11</b>
1.1 HISTÓRIA MEDU .....	11
1.2 TVORBA MEDU .....	12
1.3 DELENIE MEDU.....	13
<b>2 FYZIKÁLNO-CHEMICKÉ VASTNOSTI MEDU .....</b>	<b>15</b>
2.1 CHEMICKÉ ZLOŽENIE.....	16
2.2 FYZIKÁLNE VLASTNOSTI .....	19
2.3 ANTIMIKROBIÁLNA AKTIVITA .....	22
<b>3 MIKROBIÁLNA DIVERZITA V MEDE .....</b>	<b>24</b>
3.1 DELENIE PODĽA ZDROJA KONTAMINÁCIE .....	26
3.1.1 Primárna kontaminácia.....	26
3.1.2 Sekundárna kontaminácia .....	27
3.2 DELENIE PODĽA PATOGENITY.....	27
3.2.1 Nepatogénne mikroorganizmy .....	27
3.2.2 Patogénne mikroorganizmy .....	28
<b>4 METÓDY IDENTIFIKÁCIE MIKROORGANIZMOV .....</b>	<b>32</b>
4.1 MOLEKULÁRNE-GENETICKÉ METÓDY.....	32
4.1.1 Polymerázová reťazová reakcia .....	33
4.1.2 Denaturačná gradientová gélová elektroforéza .....	34
4.1.3 Sekvenčná analýza .....	37
<b>II PRAKTICKÁ ČASŤ .....</b>	<b>38</b>
<b>5 CIEĽ PRÁCE .....</b>	<b>39</b>
<b>6 MATERIÁL A METÓDY .....</b>	<b>40</b>
6.1 PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE, POMÔCKY A CHEMIKÁLIE .....	40
6.1.1 Stanovenie obsahu vody.....	40
6.1.2 Optimalizácia metódy izolácie DNA a izolácia DNA .....	40
6.1.3 PCR .....	41
6.1.4 DGGE.....	42
6.1.5 Purifikácia DNA.....	43
6.2 CHARAKTERISTIKA VZORIEK.....	44
6.3 STANOVENIE OBSAHU VODY.....	46
6.4 STANOVENIE MIKROBIÁLNEJ DIVERZITY METODOU DGGE.....	47
6.4.1 Optimalizácia metódy izolácie DNA zo vzorky .....	47
6.4.2 Izolácia DNA zo vzorky.....	48
6.4.3 Stanovenie koncentrácie DNA .....	49

6.4.4	PCR .....	50
6.4.5	DGGE.....	54
6.4.6	Sekvenčná analýza a identifikácia mikroorganizmov .....	57
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSIA.....</b>	<b>58</b>
7.1	STANOVENIE OBSAHU VODY.....	58
7.2	STANOVENIE MIKROBIÁLNEJ DIVERZITY METODOU DGGE.....	60
7.2.1	Optimalizácia metódy izolácie DNA a izolácia DNA zo vzorky .....	60
7.2.2	PCR .....	62
7.2.3	DGGE a Sekvenčná analýza .....	63
	<b>ZÁVER .....</b>	<b>71</b>
	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....</b>	<b>72</b>
	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A ZKRATIEK .....</b>	<b>78</b>
	<b>ZOZNAM OBRÁZKOV .....</b>	<b>80</b>
	<b>ZOZNAM TABULIEK .....</b>	<b>81</b>



## ÚVOD

*"Z včelárstva naučil som sa prírodu více znáti  
a více milovati, než z mnoha knih učených."*

*J. A. Komenský*

Med bol už v histórii považovaný za vzácnu, liečivú a zdraviu prospešnú surovinu, ktorej vznik je výsledkom neúnavnej a koordinovanej činnosti celého včelstva. Faktory vplývajúce na povahu a kvalitu medu sú rôzne, od zdravotného stavu včelstva, období medorania, lokality úľa a povahy botanického zdroja, až po manipuláciu s medom a jeho skladovanie, ale aj zručnosť a skúsenosti včelára. Hoci medzi jednotlivými medmi existujú viaceré odlišnosti, ich spoločným unikátom sú ich výnimočné fyzikálno-chemické vlastnosti. Vďaka nim vytvára med pre mikroorganizmy tak nehostinné prostredie, že bezpečnosť jeho konzumácie je nespochybniteľná.

Napriek tomu vystáva predovšetkým u rodičov malých detí otázka, či je bezpečné konzumovať med aj v ranom veku dieťaťa. Pochyby súvisia s faktom, že jediné ochorenie spájané s medom je tzv. dojčenský botulinizmus, ohrozujúci predovšetkým deti do 1 roku.

Cieľom práce bolo preto izolovať a identifikovať mikroorganizmy nachádzajúce sa v mede a zároveň diskutovať možné zdroje kontaminácie medu. V detekcii mikroorganizmov majú nezastupiteľné miesto molekulárne-genetické metódy, výsledkom ktorých sú v porovnaní s kultivačnými metódami presnejšie, citlivejšie a rýchlejšie výsledky analýz. V tejto práci bola pozornosť zameraná na stanovenie mikrobiálnej diverzity medu pomocou denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy.

K dosiahnutiu týchto cieľov bolo v priebehu niekoľkých mesiacov zozbieraných 65 vzoriek medu od malých a stredných včelárov a zakúpených 5 vzoriek komerčných medov. Vďaka rozsiahlosti analyzovanej vzorky medov je očakávaný komplexný náhľad na rozmanitosť baktérii nachádzajúcich sa v mede a potvrdenie respektíve vylúčenie prítomnosti patogénnych baktérii. Prínos práce sa taktiež očakáva v možnosti využitia zozbieraných vzoriek k ďalším analýzám.

## **I. TEORETICKÁ ČASŤ**

## 1 MED

### 1.1 História medu

Ľudská história bola vždy spätá s medom, ale aj s včelárstvom všeobecne. Najstaršia kresba, ktorá bola zachovaná a súvisí so včelárením znázorňuje medobranie a je staršia ako 12 000 rokov. Kresba pochádza z tzv. „Pavúčej jaskyne“ (zo španielskeho „Cauveas de la Arana“) v Španielsku (Obr. 1). Možno preto uvažovať, že med tvoril súčasť potravy už u prehistorického človeka [1].



Obrázok 1: Nástenná malba v Cauveas de la Arana v Španielsku [2]

Za priekopníkov včelárenia sú považovaní Kréťania a Egypťania, ktorí uskutočňovali prvé známe kočovné včelárenie, keď v noci v hlinených rúrach prevážali včely loďou, aby ich cez deň vypustili vždy na inom, na vegetáciu bohatom mieste, čím vedeli veľmi zvýšiť výťažok medu u včelstiev [3]. V každom národe či kultúre možno nájsť dôkazy o tom, že med slúžil nielen ako potravina, ale i ako predmet náboženských, kúzelnických a liečiteľských obradov [1]. Med bol neobyčajne vzácny, veľmi drahý a podávaný len privilegovaným osobám, v stredoveku bola dokonca krádež včiel v niektorých krajinách trestaná smrťou [3]. Neobyčajnú úlohu mal tiež v náboženských rituáloch, kedy bol, nielen Egypťanmi, častokrát darovaný bohom ako obetný dar. Okrem toho bol používaný pri mumifikácii a vkladal sa aj do hrobiek faraónov, o čom sa zachoval dôkaz v podobe 3000 rokov starého medu objaveného v pyramíde. Zaujímavé je, že aj keď med bol skryštalizovaný, bol po hygienickej stránke nezávadný. [1, 4] Samozrejme, nezameniteľnú

úlohu mal v liečiteľstve, kedy už grécky lekár Hippokrates v rokoch 460 – 377 pred naším letopočtom doporučoval med pri horúčke a ošetroval ním zapálené rany. Akokoľvek neuveriteľne to znie, včely sa využívali taktiež ako bojová zbraň, kedy napríklad v bitke vo švajčiarskom kantóne Uri na seba znepriatelené strany hádzali včelie úle. Na našom území je taktiež zdokumentované včelárenie Slovanov. V roku 448 popísal grécky filozof Priscus vpád ázijských Hunov na ľavý breh Dunaja, kedy obyvatelia prinášali namiesto obilia proso a namiesto vína medovinu a med. Med bol jediným sladidlom jedál a nápojov až do 19. storočia, kedy jeho privilegované postavenie nahradil cukor [1, 3, 4, 5].

## 1.2 Tvorba medu

Definíciu medu podľa slovenskej legislatívy stanovuje Vyhláška č. 41/2012 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky o mede, kde je med definovaný ako „prírodná sladká látka produkovaná včelou medonosnou (*Apis mellifera*) z nektáru rastlín, výlučkov živých častí rastlín alebo výlučkov hmyzu cicajúceho živé časti rastlín, ktorý včely zbierajú, pretvárajú a obohacujú vlastnými špecifickými látkami, ukladajú, zahusťujú, uskladňujú a ponechávajú v plástoch, aby vyzrel“ [6].

Med, ale aj všetky včelie produkty vznikajú ako výsledok koordinovanej práce včelstva. Přidal et al. [1] dokonca uvádza, že jedna včela by sama nedokázala vyrobiť med, čo len dokazuje, o akú kolektívnu prácu včelstva ide. Uvádza sa, že na 1 kg medu je potrebné, aby včela zhromaždila nektár alebo medovicu z najmenej troch miliónov kvetov [4]. Z rastlín je včelami zbieraný buď nektár alebo medovica. Nektár je prírodná sladká šťava vylučovaná žľaznatým pletivom rastliny. Naproti tomu medovica je hustá tekutina, vznikajúca ako výlučok rovnakokrídeho hmyzu (*Hemiptera*), ktorá zanecháva na rastlinách kvapôčky vytvárajúce lepkavé povrchy [1, 7].

Samotná tvorba medu zahŕňa proces od nasatia nektáru z rastliny včelou, až po uzavretie nezrelého medu nevzdušným voskovým viečkom v pláste. Ide o komplexný zložitý proces, kedy prvým krokom je nasatie sladkých štiav včelou a ich uloženie do medového vačku, kde dochádza k prvým chemickým zmenám. Po príchode do úľa je táto sladina reťazovo odovzdávaná ďalším včelám, až nakoniec končí v bunkách plástu. Tam riedky med dozrieva, až kým sa v ňom obsah vody nezníži pod 20 %, kedy včely bunku uzavrujú voskovým viečkom. V slede týchto reakcií dochádza k viacerým fyzikálno-chemickým reakciám. Počas prenosu sladiny dochádza k obohateniu látkami pochádzajúcich z hltanových a pyskových žliaz včiel, najmä enzýmami invertáza, diastáza a glukózooxidáza (Kap. 2.1.).

Diastáza je zodpovedná za štiepenie škrobu až na glukózu, invertáza štiepi predovšetkým sacharózu na glukózu a fruktózu a glukózooxidáza zohráva dôležitú úlohu v antimikrobiálnej aktivite medu, popísanú bližšie v kapitole 2.3. Sladina je tiež obohatená o aminokyseliny, pričom v mede je percentuálne najväčší podiel aminokyseliny prolín. Dôvod, prečo včely pridávajú vo väčšej miere práve prolín, nie je objasnený, aj keď existuje hypotéza, že zohráva úlohu v spojovaní roztoku nektáru alebo medovice s roztokom enzýmov [1]. Okrem vyššie uvedených chemických reakcií, dochádza tiež k výraznému zahusteniu medu. Z veľkej miery k nemu dochádza v súvislosti so spôsobom, akým včela opakovaně nasáva sladinu a akým je následne odovzdávaná medzi včelami. To umožní čiastočné odparenie vody a šťava sa zahustí. Po uložení produktu do buniek plástu je med ďalej zahusťovaný jeho prenášaním do ďalších buniek a pomocou odvetrávania celého úľa sa tak dosahuje požadovaná hustota medu. Biochemické procesy dozrievania však pokračujú ešte nejaký čas i v zaviečkovaných bunkách [1, 4, 5, 7].

### 1.3 Delenie medu

Základné delenie medu je buď podľa pôvodu, alebo podľa spôsobu, akým sa med získava, upravuje a uvádza na trh. Podľa pôvodu je rozlišovaný med kvetový pochádzajúci z nektáru kvetov a med medovicový pochádzajúci z medovice. Aj keď vo Vyhláske č.41/2012 o mede nie je definovaný, viaceré zdroje uvádzajú aj med zmiešaný, vznikajúci zo znášky nektáru aj medovice, bez výraznej prevahy jedného z nich. Jednotlivé druhy sa medzi sebou líšia vlastnosťami ako sú farba, konzistencia, chuť alebo obdobie znášky. Med kvetový pochádza najmä z jarnej znášky, vyznačuje sa bleďou žltou alebo zlatavou farbou a ľahkou stráviteľnosťou. Medovicový med je najčastejšie tmavohnedý až červenohnedý, s výraznejšou chuťou a arómou, pochádzajúci najčastejšie z letnej znášky. Výraznejší je taktiež obsah minerálnych látok, čo spoločne s nižším obsahom glukózy a fruktózy a vyšším obsahom organických kyselín zvyšuje vodivosť medovicového medu [6, 8, 9].

Druhé delenie prináša prehľad podľa spôsobu, akým bol med získavaný, upravovaný a uvádzaný na trh. Vo vyššie spomenutej Vyhláske č.41/2012 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky o mede [6] je toto rozdelenie jasne definované: „Med vytočený je získavaný odstredovaním odviečkovaných plástov bez plodu včiel. Med lisovaný sa získava lisovaním plástov bez plodu s použitím alebo bez použitia zahriatia nepresahujúceho 45 °C. Med plástikový je med uložený do novopostavených buniek plástov neobsahujúcich plod včiel alebo do tenkých plástových základov

vytvorených iba zo včelieho vosku a uvádzaný na trh v zaviečkovaných celých plástoch alebo v častiach takýchto plástov. Odkvapkávaný med je získavaný odkvapkávaním odviečkovaných plátov bez plodu včiel. Kusový med alebo rezané plásty v mede je med, ktorý obsahuje jeden druh alebo viac druhov plástikového medu. Filtrovaný med je med získaný odstraňovaním cudzích anorganických alebo organických látok takým spôsobom, aby sa do značnej miery odstránil peľ. Pekársky med je med, ktorý je vhodný na priemyselné účely alebo ako prísada do iných potravín, ktoré sa potom spracúvajú; môže mať cudziu chuť alebo pach, začať kvasiť alebo už byť skvasený alebo prehriaty“.

## 2 FYZIKÁLNO-CHEMICKÉ VASTNOSTI MEDU

Analýza fyzikálno-chemických parametrov medu je dôležitá k posúdeniu faktorov, ako sú kvalita, druh a botanický pôvod, poprípade pravosť medu [9]. Maximálne a minimálne hodnoty fyzikálno-chemických parametrov sú záväzne dané Vyhláškou č.41/2012 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky o mede (Tab. 1).

Tabuľka 1: Hodnoty fyzikálno-chemických parametrov medu [6]

Limity parametra			
Fyzikálno-chemický parameter medu	Med kvetový	Med medovicový	Med zmiešaný
<b>Súčet obsahu fruktózy a glukózy (g/100 g)</b>	min. 60	min. 45	min. 45
<b>Obsah sacharózy (g/100 g)</b> <i>výnimka:</i> agát biely, lucerna siata, Mensies Banksia, zemolez francúzsky, eukalyptus, židelník ohybný, židelník bahenný, Citrus spp (max. 10); levanduľa, borák lekársky (max. 15)	max. 5	max. 5	max. 5
<b>Obsah hmotnostného percenta vody (%)</b> <i>výnimka:</i> vres a pekársky med (max. 2); pekársky med z vresu (max. 25)	max. 20	max. 20	max. 20
<b>Obsah látok nerozpustných vo vode (g/100 g)</b> <i>výnimka:</i> lisovaný med (max. 0,5)	max. 0,1	max. 0,1	max. 0,1
<b>Elektrická vodivosť (mS/cm)</b>	max. 0,8	max. 0,8	max. 0,8
<b>Obsah voľných kyselín (miliekvivalenty kyseliny/1000 g)</b> <i>výnimka:</i> pekársky med (max. 80)	max. 50	max. 50	max. 50
<b>Diastatická aktivita (číslo Schadeho stupnice)</b> <i>výnimka:</i> medy z nízkym prirodzeným obsahom enzýmov (napr. citrusové medy) a obsahom HMF najviac do 15 mg/kg (min 3)	min. 8	min. 8	min. 8
<b>Obsah HMF (mg/kg)</b> <i>výnimka:</i> medy s deklaroványm pôvodom z regiónov s tropickým podnebím a zmesi takýchto medov a pekársky med (max 80)	max. 40	max. 40	max. 40

Aj keď sledovanie týchto vlastností nemá zásadný vplyv na posúdenie bezpečnosti medu (snáď len negatívny dopad na mikrobiologickú kvalitu v prípade odchýlky od prípustnej hodnoty daného parametra), určenie parametrov predstavuje dôležitý faktor napríklad pri obchodovaní s medom na medzinárodnej úrovni.

## 2.1 Chemické zloženie

**Cukry** tvoria kvantitatívne najvýznamnejšiu zložku medu, s celkovým zastúpením sušiny v rozmedzí 95 – 99 % [5, 7]. Sú zodpovedné za vlastnosti ako sú energetická hodnota, viskozita, hygroskopicitá, kryštalizácia, ale aj za antimikrobiálnu aktivitu. Aké cukry a v akom množstve sú prítomné v mede, závisí najmä od jeho botanického a geografického pôvodu, spracovania a skladovania [10]. Hlavný podiel tvoria jednoduché cukry – glukóza a fruktóza, pričom ich súčet patrí k legislatívne normovaným parametrom určujúcim kvalitu medu (Tab. 1) [5, 6]. Takmer u všetkých medov fruktóza tvorí majoritnú zložku oproti glukóze, s ich vzájomným pomerom 1 – 1,3. Tento pomer je parameter určujúci či, a akou rýchlosťou bude med kryštalizovať (Kap. 2.2.). U agátového, vresového a gaštanového medu je tento pomer dokonca vyšší ako 1,3 [5]. Naopak, medy repkové alebo púpavové obsahujú vyššie množstvo glukózy ako fruktózy, a tieto medy tak budú podliehať rýchlej kryštalizácii [10, 11]. V mede tiež možno nájsť di-, tri- a oligosacharidy, aj keď ich množstvo je oproti monosacharidom skôr minoritné. Z disacharidov sa vyskytuje maltóza (7 %) a sacharóza (1 %) [11]. Aj keď je sacharóza prirodzenou súčasťou nektáru a medovice, v mede ju možno detekovať len v malom množstve. Príčinou je jej rozklad enzýmom invertáza, prítomného v hltanových žľazách včiel, ktorý ju štiepi na monosacharidy [5]. V niektorých vzorkách medu však môže byť zvýšená, napríklad levanduľový med sacharózu prirodzene obsahuje vo vyššej koncentrácii [11]. Taktiež vplyvom intenzívnej znášky je presiahnutá kapacita invertázy a nedochádza tak k štiepeniu všetkej prítomnej sacharózy, a tá sa potom vyskytuje v mede vo zvýšenej miere. Obsah sacharózy je záväzným parametrom v posudzovaní kvality medu (Tab. 1) [5]. Disacharidy galaktóza, laktóza a rafinóza boli popísané ako látky toxické pre včely, nakoľko ich tráviaci trakt neobsahuje potrebné enzýmy pre ich strávenie [11, 12]. Z trisacharidov je významná melecitóza (3 – 20 %) vznikajúca reverzným pôsobením invertáz v tráviacom trakte producentov medovice, ktorá sa vyznačuje veľmi intenzívnou kryštalizáciou už v plástoch [1, 12]. Aj keď včely dokážu rozložiť melecitózu na jednoduchšie cukry, trvá im to veľmi dlho a zaťažuje to ich tráviaci systém. Preto ju často včely vynášajú v podobe kryštálov von z úľa [12]. Špecifický pre med je výskyt dextrínov, oligosacharidov, ktorých percentuálne



zastúpenie v mede tvorí 10 % v medovicových a 2 – 3 % v nektárových medoch. Zdrojom je, podobne ako u melecitózy, enzymatická premena substrátu v tráviacom trakte producentov medovicového medu [5, 12]. Je potrebné tiež dodať, že v mede sa môžu vyskytnúť aj neobvyklé vyššie cukry, väčšinou indikujúce miešanie viacerých druhov medu alebo prídavok rôznych lacných sirupov za účelom falšovania medu [7].

**Voda** predstavuje druhú najväčšiu zložku medu. Jej obsah môže byť značne variabilný. U väčšiny zrelých, neupravovaných medov dosahuje hodnotu v rozmedzí 14 – 19 % [7]. Je pritom nutné, aby med vyhovoval legislatívnym požiadavkám požadujúcich maximálny obsah hmotnostného percenta vody 20 %. Výnimku tvoria medy vresové a pekársky med s maximálnou prípustnou hodnotou obsahu vody 23 % [6]. Veľmi nízky obsah vody môže v dôsledku výraznej viskozity priniesť problém pri spracovávaní a medobraní. Naopak, vyšší obsah vody prináša riziko spojené s kvasením, najmä v dôsledku pomnoženia kvasiniek [11]. S vyšším obsahom vody sú spojené napríklad medy nezrelé, čo je typické pre medy z intenzívnych znášok. Taktiež u melecitóznych medov možno pozorovať vyšší obsah vody, nakoľko, ako bolo už spomínané vyššie, dochádza k rýchlej kryštalizácii medu už v plástoch, a tak včelári chcú predchádzať tejto skutočnosti a k medobraniu dochádza skôr, ako med dozreje [1]. Machadode et all. [11] taktiež uvádzajú, že obsah vody môže súvisieť aj s faktorom, ako je kryštalizácia, kedy med v kryštalizovanom stave obsahuje vyšší obsah vody ako v tekutom stave. Tento fakt súvisí so skutočnosťou, že počas kryštalizácie dochádza k uvoľňovaniu vody, ktorá bola pôvodne spojená s glukózou. Z tohto dôvodu niektoré štúdie naznačujú, že lepšie kritérium kvality medu by v porovnaní s obsahom vody mohlo byť stanovenie vodnej aktivity, nakoľko vodná aktivita určuje množstvo vody dostupnej pre biochemické reakcie mikroorganizmov. Obsah vody sa stanovuje refraktometricky, podľa indexu lomu. Orientačne ho však možno stanoviť aj stanovením hustoty medu presným zvážením známeho objemu medu [7]. Tento parameter možno ovplyvniť faktormi ako sú technika medobrania alebo skladovanie medu. Významne závisí aj na počasí, vlhkosti vnútri úľa, botanickom pôvode a fyzikálnych vlastnostiach medu, ako sú viskozita a kryštalizácia [10].

**Organické kyseliny** sú dôležitou súčasťou medu ovplyvňujúce jeho farbu a chuť, a tiež jeho fyzikálno-chemické vlastnosti ako sú kyslosť vyjadrená hodnotou pH, elektrická vodivosť a stabilita [10]. Pochádzajú priamo z nektáru alebo medovice, aj keď vznik väčšiny z nich je spojený s enzymatickými premenami substrátu počas dozrievania medu [11]. Celková kyslosť medu je vyjadrená ako hodnota pH, u medu s priemernou hodnotou v

rozmedzí 3,9 – 6,1. Medovicové medy majú tieto hodnoty oproti nektárovým medom vyššie v dôsledku vyššieho obsahu minerálnych látok [5]. Najviac zastúpenou kyselinou v mede (70 – 90 %) je kyselina glukónová vznikajúca z glukózy pôsobením enzýmu glukózooxidáza. Okrem nej bolo v mede detekovaných celkovo viac ako 30 iných organických kyselín, pričom k najviac zastúpeným patria kyselina octová, citrónová, maslová, mravčia, mliečna, jablčná, šťaveľová a kyselina glykolová [10, 11].

**Minerálne látky** tvoria 1 % obsahu sušiny. Keďže med odráža chemické zložky rastlín, z ktorých nektár a medovica pochádza, obsah minerálnych látok naznačuje tiež botanický pôvod medu [10]. Významnejší je najmä obsah draslíku, prevažujúci nad ostatnými prvkami. Po ňom nasledujú sodík, vápnik, horčík, síra a fosfor. Zo stopových prvkov sú zastúpené najmä železo, meď, zinok a mangán. Na obsah minerálnych látok sú v porovnaní s nektárovými medmi oveľa bohatšie medovicové medy, s charakteristickým výskytom striebra, molybdénu, vanádu a cínu [1, 5].

Med obsahuje aj malé množstvo **vitamínov**, najmä komplex vitamínu B pochádzajúceho z peľových zŕn. Vitamíny nájdené v mede zahŕňajú thiamín (B1), riboflavín (B2), kyselinu nikotínovú (B3), kyselinu pantoténovú (B5), pyridoxín (B6), kyselinu listovú (B9) a tiež vitamín C. Vitamíny rozpustné v tukoch sa v mede takmer nenachádzajú [1, 10].

Obsah a aktivita **enzýmov** je jedným z parametrov posúdenia kvality medu, nakoľko patria medzi zložky medu s vysokou citlivosťou na prehriatie a nevhodné skladovanie [7]. Počiatočná aktivita enzýmov je podmienená celkovým stavom včelstva a intenzitou znášky, na ich aktivitu v priebehu spracovania a skladovania medu vplýva najmä spôsob vykonania týchto procesov a teplota [1, 11]. Najdôležitejšími enzýmami medu sú diastáza, invertáza a glukózooxidáza.

*Invertáza* je enzým pochádzajúci z hltanových žliaz včiel štiepiaci sacharózu na glukózu a fruktózu. V staršej literatúre možno jej aktivitu nájsť ako tzv. sacharózové číslo určujúce množstvo sacharózy (g) premenené enzýmom v 100 g medu za daných podmienok. Je jedným z ukazovateľov kvality medu, keďže je veľmi citlivá na prehriatie medu [5, 7].

*Diastáza* tiež pochádza z hltanových žliaz včiel a je zodpovedná za štiepenie škrobu na jednoduché cukry [7]. Hodnota, tzv. diastatická aktivita, ktorá vyjadruje množstvo enzýmu konvertujúceho 0,01 g škrobu za 1 hodinu pri 40 °C, je legislatívne stanovená. Na Slovensku je minimálna hodnota diastatickej aktivity 8 (podľa Schadeho jednotiek), výnimku tvoria

medy z nízkym prirodzeným obsahom enzýmov (napr. citrusové medy) a obsahom HMF najviac do 15 mg/kg, kde je prípustná hodnota min 3 [6].

Za antimikrobiálnu aktivitu medu je, okrem iného, vo veľkej miere zodpovedný enzým *glukózooxidáza*, konvertujúci glukózu na kyselinu glukónovú a peroxid vodíka [5]. Bližšie bude tento enzým popísaný v kapitole 2.3.

**Hydroxymetylfurfural (HMF)** je významným parametrom hodnotení kvality medu, ktorého maximálnu hodnotu stanovuje Vyhláška 41/2012 o mede (Tab. 1) [6]. Táto bezfarebná, kryštalická, furánová zlúčenina je veľmi reaktívna a reaguje s ostatnými zložkami medu, čím dochádza k vzniku žltohnedých farbív. V čerstvom a neupravenom mede sa obvykle nachádza v množstve do 10 mg na 1 kg medu [5]. Jeho obsah sa však razantne zvyšuje vplyvom teploty. Možno tak odhaliť tepelnú úpravu medu alebo jeho falšovanie pomocou nekvalitného cukru, čím dochádza k výraznému pozmeneniu jeho biologickej hodnoty a nutričných vlastností. Aj keď HMF v mede pre človeka nepredstavuje riziko, pre včely je vysoko toxický [1, 5, 11].

## 2.2 Fyzikálne vlastnosti

**Viskozita** predstavuje významný technologický parameter ovplyvňujúci tok medu počas medobrania, cedenia, filtrácie a zmiešavania medov, nakoľko čím je viskozita vyššia, tým nižšia je fluidita medu [1, 11]. Vplyv na viskozitu majú faktory ako sú druh medu, obsah vody a teplota. Jej úprava môže byť žiadúca napríklad pri zmiešavaní rôznych druhov medu, kedy vplyvom rôznej viskozity nemusí dôjsť k dokonalej homogenizácii [1]. Možnosť ovplyvnenia procesu môže byť zahriatie medu, kedy zvýšením teploty o 10 °C, dôjde k poklesu viskozity 5 až 10 násobne [5]. Zvyšovanie teploty však musí byť opatrné a nesmie byť dlhodobé, aby nedošlo k znehodnoteniu medu. Ako bolo uvedené vyššie, viskozita súvisí aj s botanickým druhom rastliny. Unikátnym je napríklad vresový med, vyznačujúci sa vysokou viskozitou, ktorá sa miešaním výrazne znižuje, vykazuje tzv. tixotropné vlastnosti. Na opačnej strane stojí eukalyptový med, ktorý miešaním naopak hustne [1, 7].

Oproti viskozite je **povrchové napätie medu** tak nízke, že mu aj napriek jeho vyššej hustote umožňuje prenikať aj najmenšími netesnosťami obalu alebo napríklad pórmí pokožky, čo sa využíva najmä v kozmetickom priemysle [7].

**Index lomu** medu súvisí predovšetkým s obsahom vody a je ovplyvňovaný teplotou prostredia a vzorky. Obsah vody je stanovovaný refraktometricky, práve prostredníctvom

merania indexu lomu. Obsah vody patrí medzi jeden z najdôležitejších parametrov kvality, pretože ovplyvňuje mikrobiologickú kvalitu a s tým súvisiace ovplyvnenie senzorických vlastností, dobu skladovania, spracovanie medu a iné. Vyšší obsah vody možno stanoviť u nezrelých medov, tzn. u tých, ktoré boli vytočené skôr, než včely dokončili konzerváciu. Do pôvodne hustých medov môže byť voda tiež umelo pridaná nepoctivými obchodníkmi, aj keď falšovanie medu zriedovaním nie je úplne bežné, nakoľko by sa to nepriaznivo prejavilo na konzistencii medu a tiež na prípadnom kvasení v dôsledku pomnoženia mikroorganizmov [5, 7, 13, 14].

**Farba medu** je vlastnosť značne variabilná, ktorá je podmienená najmä pôvodom medu. Pôvodcami farby medu sú prírodné rastlinné farbivá (flavonoidy, antokyany, karotenoidy, xantofyly a chlorofyly) vnesené do medu činnosťou včiel [5]. Čisto agátové alebo repkové sú medy patriace k veľmi svetlým. Naopak, k tmavým medom, sú radené medy pohánkové, gaštanové a medovicové. Farba medu je tiež ovplyvňovaná faktormi ako sú spôsob spracovania, kryštalizácia a skladovanie medu. Príkladom je skryštalizovaný med, ktorého pevná kryštalická časť je oproti tekutej časti svetlejšia, nakoľko kryštály glukózy sú biele. Naopak tmavšia farba môže súvisieť s prehriatím medu, kedy sa vplyvom vysokej teploty mení cukor na karamel [1, 5, 7].

**Hygroskopicita**, alebo schopnosť látky pohlcovať a udržiavať vlhkosť, je spojená s vysokou koncentráciou cukrov v mede. Spoločne s vlhkosťou sú prijímané aj pachy. Z týchto dôvodov je kladený veľký dôraz na skladovanie medu, najlepšie v hermeticky uzatvorených nádobách. V otvorených nádobách dochádza k absorpcii vzdušnej vlhkosti a med redne. Uvádza sa, že med s obsahom vody v rozmedzí 16,8 – 18,3 % je v rovnováhe so vzduchom pri približne 55 – 60 % vlhkosti vzduchu [1, 5, 15].

**Elektrická vodivosť** je fyzikálny parameter popisujúci schopnosť materiálov viesť elektrický prúd. V mede túto schopnosť umožňuje prítomnosť minerálnych látok, anorganických iónov a organických kyselín [10]. U nezriedeného medu je hodnota elektrickej vodivosti tak nízka, že je stanovovaná až u jeho 20 % vodného roztoku [7]. Táto fyzikálna vlastnosť je tiež využívaná k rozlíšeniu nektárového a medovicového medu, keďže medovicové medy majú vyššiu koncentráciu minerálnych látok a niektorých iónov, a teda vyššiu vodivosť [5,7,10].

**Kryštalizácia** patrí medzi prirodzenú vlastnosť medu. Nesprávnou domnienkou niektorých konzumentov môže byť, že med kryštalizuje v dôsledku prídavku repkového cukru alebo súvisí so zhoršením kvality. Kryštalizácia je podmienená chemickým zložením medu,

konkrétne jeho vysokým obsahom cukrov. Med sa stáva tak presýteným roztokom, tzn. že obsahuje väčšie množstvo cukrov, ako môže zostať v rozpustenej forme. S postupom času tak dochádza k vytesneniu časti cukru z roztoku, a keďže najmenej rozpustným cukrom je glukóza, ako prvá kryštalizuje práve ona. Medzi rýchlo kryštalizujúce medy tak patria napríklad repkový alebo agátový med [1, 5, 8]. Vlastný proces kryštalizácie pritom neprebieha v jednom momente. Ide o postupný proces, kedy najskôr dochádza k zakaleniu medu, ktoré naznačuje tzv. nukleáciu alebo vytvorenie zárodočných kryštálov. To je nasledované narastaním týchto kryštálov až do makroskopických rozmerov a med postupne tuhne [1, 15]. Tento proces je urýchlený prítomnosťou peľových alebo prachových zrní, poprípade mechanickým alebo tepelným šokom, keďže následne ľahšie dochádza k vytvoreniu zárodočných kryštálov. Významný vplyv má aj teplota. Uvádza sa, že v prostredí o teplote vyššej ako 25 °C a nižšej ako 5 °C ku kryštalizácii nedochádza [5].

Na vznik a rýchlosť, s akou prebieha kryštalizácia, významne vplýva druh, a teda aj zloženie medu. Proces je napríklad spomaľovaný fruktózou, ktorá v porovnaní s glukózou dosahuje pri rovnakej teplote stupeň presýtenosti až pri vyšších koncentráciách. Z tohto dôvodu medovicové medy kryštalizujú pomalšie, či dokonca k nej nedochádza vôbec. Rovnakú schopnosť má aj melecitóza, trisacharid, ktorý je príčinou veľmi rýchlej kryštalizácie medov. V tomto pomerne zriedkavom prípade ku kryštalizácii medu dochádza ešte v pláste, počas dozrievania medu, čo predstavuje technologický problém pri medobraní [1, 8, 15].

### 2.3 Antimikrobiálna aktivita

Med sa už v minulosti tradične používal ako účinný liek v liečbe infikovaných rán. V súčasnosti je taktiež hojne využívaný nielen v domácej liečbe [16]. Jeho liečebné účinky sú dané jeho unikátnymi vlastnosťami a zložením, vďaka ktorým dochádza k potlačeniu alebo úplnému zastaveniu rastu a rozmnožovaniu mikroorganizmov.

Jedným z mechanizmov pôsobenia medu proti mikroorganizmom je **glukózovo-oxidázový systém**, kde je prostredníctvom enzýmu glukózooxidáza glukóza štiepená na kyselinu glukónovú a peroxid vodíka, čo sú látky s výraznou antimikrobiálnou aktivitou. Najmä množstvo peroxidu vodíka má hlavný vplyv na povahu antimikrobiálnej aktivity, pričom v porovnaní s baktériami sú na jeho obsah citlivejšie mikroskopické huby. Nakoľko je enzým glukózooxidáza aktívny len v nevyzretom alebo zriedenom mede a vo vyzretom mede je tak peroxid vodíka v minimálnom množstve, dá sa predpokladať, že peroxid vodíka hrá nezameniteľnú úlohu pri inhibičnom pôsobení na baktérie v procese zretia medu [17, 18].

Okrem vyššie popísaného, tzv. „peroxidového“ mechanizmu, existujú aj tzv. **neperoxidové medy**. Z komerčne využívaných ide najmä o manukový med pochádzajúci z nektáru novozélandského kríka *Leptospermum polygalifolium*, ale aj iné, napríklad medy z levandule [16]. Podstatou antimikrobiálneho pôsobenia u takýchto medov je prítomnosť iných látok ako peroxidu vodíka, napríklad polyfenolov alebo metylglyoxátu. Práve metylglyoxát patrí k dobre preskúmaným látkam, ktoré sú v hojnej miere zastúpené v manukovom mede. Na rozdiel od vyššie spomenutého systému, neperoxidový systém vykazuje antiseptický efekt aj pri vyššom zriedení, je necitlivý na teplo a svetlo. Okrem toho zostáva neporušený aj pri dlhodobom skladovaní medu, nakoľko sa jeho koncentrácia počas zretia a skladovania medu zvyšuje v dôsledku jeho kontinuálneho vzniku z dihydroxyacetónu [14, 17, 18].

V mede sa tiež prirodzene nachádza aj veľké množstvo **látok vykazujúcich antimikrobiálny účinok**, ako sú napríklad fenolové kyseliny, lyzozým, benzol, terpény a defenzíny, majúce schopnosť narušovať membrány baktérií, húb a niektorých vírusov, vedúcich k deštrukcii bunky [19, 20].

Okrem vyššie uvedených antimikrobiálnych mechanizmov, med sám o sebe predstavuje svojím chemickým zložením nevhodné prostredie pre rast a množenie mikroorganizmov. Jednou z vlastností medu, podporujúce toto tvrdenie, je **vysoký obsah cukru** (až 80 %),

a teda vysoký osmotický tlak. S tým súvisí dostupnosť voľnej vody pre metabolické procesy mikroorganizmov, ktorá je vyjadrená ako aktivita vody  $a_w$ . Väčšina medov má  $a_w$  približne 0,6, zatiaľ čo mnoho mikrobiálnych druhov vyžaduje na rast  $a_w$  medzi 0,94 a 0,99 [21]. Tento stav, kedy je nedostatočné množstvo dostupnej voľnej vody pre metabolické procesy mikroorganizmov sa označuje ako fyziologické sucho [1]. Taktiež faktory ako vyššia koncentrácia kyselín, ktoré sú zodpovedné za **nízke pH** (3,4 – 6,1) a **nízky obsah kyslíka** súvisiaci s vysokou viskozitou medu, predstavujú pre mikroorganizmy nekomfortné prostredie [17, 19].

Antimikrobiálna aktivita medu je závislá na viacerých faktoroch. Dôležité sú najmä zdroj nektáru, a teda druh kvetu, nakoľko jeho chemické zlúčeniny môžu antimikrobiálnu aktivitu zvyšovať alebo znižovať. Okrem toho, aj samotný kvetinový zdroj je premenlivý v závislosti na sezóne a lokalizácii rastlín [19].

Veľký vplyv má aj spracovanie, prípadné riedenie a skladovanie medu. Bogdanov et al. [14] taktiež v štúdiu popisujú vplyv podmienok skladovania medu na antimikrobiálnu aktivitu, podľa ktorej pre jej podporenie je vhodné skladovať med na chladnom a tmavom mieste (Obr. 2).

**Table 6.** Effect of Heat, Light and Storage Time on the Antibacterial Activity of Honey; the Antibacterial Activity Is Expressed in % of the Untreated Controls [63]

	Non-peroxide activity		Peroxide activity	
	light	dark	light	dark
Storage: 15 months rt				
Blossom honey	76	86	19	48
Honeydew honey	78	80	63	70
Heat: 15 min 70°C				
Blossom honey		86		8
Honeydew honey		94		78

rt = room temperature 15–20°C.

Obrázok 2: Vplyv faktorov na antimikrobiálnu aktivitu medu [14]

### 3 MIKROBIÁLNA DIVERZITA V MEDE

Všetky mikroorganizmy si vyžadujú dostupnosť živín, ktoré poskytujú uhlík, dusík, minerály a vodu. V prípade akéhokoľvek obmedzenia dostupnosti jedného z týchto kľúčových zdrojov, dôjde k zhoršeniu mikrobiálneho metabolizmu [21]. Vzhľadom na antimikrobiálnu aktivitu medu a jeho fyzikálno-chemické zloženie, by sa zdanlivo dalo predpokladať, že med poskytuje natoľko nehojné podmienky, že v ňom nemožno očakávať takmer žiadne mikroorganizmy. Napriek tomu sa v mede nachádzajú také mikroorganizmy, ktoré svoj metabolizmus dokázali prispôbiť nehostinným podmienkam.

Olaitan et al. [22] vo svojej štúdiu uvádzajú zoznam mikrobov najčastejšie detekovaných v mede (Obr. 3).

Bacteria	Yeasts	Moulds
<i>Alcaligenes</i>	<i>Ascosphaera</i>	<i>Asperhillus</i>
<i>Achromobater</i>	<i>Debaromyces</i>	<i>Alihia</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Bettsia alvei</i>
<i>Bacteridium</i>	<i>Lipomyces</i>	<i>Cephalosporium</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Nematospora</i>	<i>Chaetomium</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Oosporidium</i>	<i>Coniothecium</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Pichia</i>	<i>Hormiscium</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Peronsporoaceae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Peyronelia</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Trichosporium</i>	<i>Triposporium</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Torula</i>	<i>Uredianaceae</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Ustilaginaceae</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Zygasaccharomyces</i>	
<i>Neisseria</i>		
<i>Pseudomonas</i>		
<i>Xanthomonas</i>		

Obrázok 3: Mikroorganizmy nachádzajúce sa v mede [22]

Celkový počet mikroorganizmov vyskytujúcich sa v mede sa pritom odhaduje v rozmedzí od 0 po desiatky tisíc kolónii tvoriacich jednotiek na 1 gram medu. Prítomnosť mikroorganizmov v mede je však značne premenlivý údaj. Premennivosť súvisí s faktormi ako sú typ, kvalita, vlastnosti a skladovanie analyzovaného medu [23].



Vzhľadom na antimikrobiálne vlastnosti medu sú tiež zaujímavé štúdie zamerané na schopnosť jednotlivých mikroorganizmov prežiť v tomto prostredí. V rámci analýz boli zavedené do medu vegetatívne formy prirodzene sa nevyskytujúcich patogénnych mikroorganizmov a bol pozorovaný čas ich prežitia v závislosti na rôznych teplotách skladovania, na rôznom riedení medu a pod. Taktiež bola analyzovaná možnosť prenosu patogénnych mikróbov z ľudských výkalov na med prostredníctvom včely. Táto hypotéza sa ukázala ako veľmi nepravdepodobná [23]. Viaceré štúdie preukázali, že vegetatívne formy baktérií v mede dokážu pretrvať len niekoľko dní až týždňov, v závislosti na druhu a podmienkach, aj keď výnimku tvorili medy skladované pri nízkych teplotách, kde mikroorganizmy prežívali dlhodobejšie. Spóry sporulujúcich baktérií sú naopak často prítomné v analyzovaných vzorkách medu, ich vyklíčenie je však vysoko nepravdepodobné. O prítomnosti alebo pretrvávaní vírusov a parazitov nie sú žiadne dostupné informácie [23,24].

Možností, akými možno popísať mikrobiálnu diverzitu medu je hneď niekoľko. Možno uvažovať rozdelenie do štyroch skupín: **(1)** mikroorganizmy bežne vyskytujúce sa v mede; **(2)** mikroorganizmy súvisiace so sanitárnou a obchodnou kvalitou; **(3)** mikroorganizmy spôsobujúce za určitých podmienok ochorenie a **(4)** mikroorganizmy spôsobujúce ochorenia včely medonosnej [23].

Mikroorganizmom patriacich do prvých troch skupín bude venovaná pozornosť v kapitolách nižšie. Štvrtá skupina nie je pre človeka zdraviu nebezpečná, ale často dochádza k prenosu mikroorganizmov v rámci včelstiev [5]. V najväčšej miere je zastúpená druhmi *Paenibacillus larvae*, *Paenibacillus alvei*, *Aspergillus*, *Ascosphaera apis* a *Nosema apis*. Najvýznamnejší včelí patogén je *Paenibacillus larvae*, spôsobujúci mor včelieho plodu, pričom sú citlivé výlučne larvy mladšie ako 53 hodín, staršie larvy a dospelé včely nie sú postihnuté. Patogén sa vyskytuje vo vegetatívnej forme alebo v podobe spór, pre včely sú však infekčné len spóry. Larvy sa nakazia prehltnutím spór v prijímanej potrave, následne v ich tráviacom trakte dôjde k vyklíčeniu spór, baktérie sa pomnožia, larvy tak hynú na celkovú sepsu a po úhyne sa formujú nové spóry [25].

### 3.1 Delenie podľa zdroja kontaminácie

Jednou z možností delenia mikroorganizmov v mede je prehľad podľa spôsobu, akým sa patogény dostali do medu.

#### 3.1.1 Primárna kontaminácia

V prípade **primárnej kontaminácie** je zdrojom samotná včela, poprípade úľové prostredie a k prenosu mikróbov dochádza prostredníctvom peľu, nektáru, prachu, vzduchu, pôdy a tráviaceho traktu včely. Je zrejmé, že táto cesta prenosu je takmer neovplyvniteľná. K prenosu patogénov dochádza už u lariev, kedy larvy v ranom štádiu vývinu sú prakticky sterilné a k ich kontaminácii dochádza v priebehu kŕmenia dospelými včelami prostredníctvom potravy, tzn. peľu a nektáru z vonkajšieho prostredia [23, 27]. Mikrobiálna diverzita jednotlivých zdrojov primárnej kontaminácie je uvedená v Tabuľke 2.

Tabuľka 2: Mikrobiálna diverzita zdrojov primárnej kontaminácie medu [23]

Zdroj kontaminácie	Druh mikroorganizmu
<b>Pôda</b>	<i>Actinetobacter, Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Pseudomonas, Psychrobacter</i> a <i>Vagococcus</i>
<b>Vzduch a prach</b>	<i>Bacillus, Clostridium</i> a <i>Micrococcus</i>
<b>Cukor</b>	<i>Bacillus</i> a <i>Clostridium</i> , kvasinky <i>Saccharomyces</i> a <i>Torula</i> (najmä u vlhkých cukrov)
<b>Rastliny a nektár</b>	<i>Brochothrix, Citrobacter, Enterobacter, Erwinia, Flaobacterium, Lactobacillus, Luctococcus, Leuconostoc, Listeria</i> a <i>Pediococcus</i>
<b>Črevná mikroflóra</b>	Kvasinky, <i>Bacillus, Bacteridium, Streptococcus</i> a <i>Clostridium, Achromobacter, Citrobacter, Enterobacter, Erwinia, Escherichia coli, Flavobacterium, Klebsiella, Proteus</i> a <i>Pseudomonas</i>

### 3.1.2 Sekundárna kontaminácia

**Sekundárna kontaminácia** je v porovnaní s primárnou veľmi dobre ovplyvniteľná, keďže ide o kontamináciu medu zo zariadení, budov, včelárskeho vybavenia a človeka [28, 29]. Ak došlo ku kontaminácii medu, ktorý nebol upravovaný, a teda jeho fyzikálno-chemické a antimikrobiálne vlastnosti neboli zmenené, môžu med kontaminovať v podstate akékoľvek mikroorganizmy, ktoré majú schopnosť odolávať týmto podmienkam. Ako už bolo uvedené vyššie, v tomto prípade možno očakávať najmä spóry sporulujúcich patogénov. V prípade ak však dôjde k pozmeneniu týchto špecifických vlastností (napríklad riedenie), vytvorí sa tým prostredie, kde možno očakávať výskyt aj takých mikroorganizmov, ktoré by tam za prirodzených podmienok neprežili [30]. Obmedzenie možnosti sekundárnej kontaminácie tak možno veľmi dobre ovplyvniť, napríklad aj prostredníctvom správnej hygieny pri manipulácii s medom [24, 31].

## 3.2 Delenie podľa patogenity

Mikroorganizmy vyskytujúce sa v mede možno tiež rozdeliť podľa patogenity na **nepatogénne a patogénne**.

### 3.2.1 Nepatogénne mikroorganizmy

Nepatogénnou mikroflórou v čreve včely medonosnej, ktorá je zároveň súčasťou medu, sú probiotické baktérie rodu *Bifidobacteria*, *Bacillus* a *Lactobacillus*. Táto mikroflóra vykazuje sezónne kolísanie, čo je spájané najmä so spôsobom výživy včely, nakoľko v lete potravu tvorí predovšetkým nektár a peľ, kým v zimnom období je potravou najmä cukor, med a materská kašička [28]. V nevyzretom mede možno preukázať baktérie tolerujúce vysoký obsah cukrov, ako sú *Gluconobacter* a vyššie spomenutý *Lactobacillus*. Tieto ale postupne vymiznú v priebehu zrenia, nakoľko v mede prebehnú fyzikálno-chemické zmeny súvisiace najmä s poklesom obsahu vody pod 20 % [24].

*Gluconobacter oxydans* patrí medzi gram negatívne aeróbne baktérie disponujúce jedinečnou vlastnosťou vstrebávať cholesterol, a tým znižovať jeho absorpciu v ľudskom tele. Okrem toho bola preukázaná ich schopnosť prežiť aj v podmienkach veľmi podobných žalúdočnému prostrediu, tzn. pri nízkom pH a v prostredí o 2 %-nej koncentrácii žľčových kyselín. Po požití medu im tak tieto schopnosti dávajú predpoklad absolvovať transport cez žalúdok až do tenkého čreva, kde pôsobia prospešne ako tzv. probiotika.

Taktiež sa podarilo izolovať zo včiel a z medu 13 druhov baktérií mliečného kvasenia. Najpočetnejšie zastúpenie mal pritom rod *Lactobacillus* so schopnosťou inhibovať rast iných mikroorganizmov pomocou tzv. bakteriocínov, proteínov s inhibičným účinkom voči niektorým mikroorganizmom [10].

### 3.2.2 Patogénne mikroorganizmy

Vstup patogénnych mikroorganizmov do medu je realizovaný prostredníctvom primárneho alebo sekundárneho prenosu, podrobnejšie popísaných vyššie (Kap. 3.1.). Oproti patogénnym formám plesní a kvasiniek, ktoré boli nájdené v mede aj vo vegetatívnej forme, nález vegetatívnych foriem patogénnych baktérií v mede indikuje jeho sekundárnu kontamináciu tesne pred stanovením. Táto skutočnosť je daná antimikrobiálnymi vlastnosťami medu, ktorá neumožňuje ich prežitie po dlhšiu dobu. Naopak, vo vzorkách možno potvrdiť prítomnosť spór sporulujúcich mikroorganizmov rodu *Bacillus* a *Clostridium*. Spóry sú buď včlenené do medu samotnými včelami počas zberu peľu a nektáru alebo nedostatočnou hygienou zariadenia a neopatrným zaobchádzaním pri manipulácii s medom [10, 29].

**Kvasinky** v mede predstavujú pre včelárov významný faktor znižovania kvality medu. Najmä osmofilné druhy, ktoré tolerujú prostredie s vysokým obsahom sacharózy, nízkeho pH a nízkej vodnej aktivity hrajú významnú rolu pri kvasení medu [27]. Tento jav, ktorý v mede prebieha najmä počas skladovania, spôsobuje veľké ekonomické straty, nakoľko dochádza k znehodnoteniu kvality medu vplyvom zmeny výživových zložiek a tiež rozvojom senzorických väd, ako sú napríklad nežiadúca vôňa a kyslá chuť. Činnosťou kvasiniek dochádza totiž k premene sacharidov na alkohol, ktorý sa vplyvom vzdušného kyslíka mení na kyselinu octovú, čo zvyšuje kyslosť takto kvasiaceho medu [27, 32].

Pôvod **kvasiniek** v mede je rôzny. Zdrojom jednak môže byť pôda, vzduch a rastliny z vonkajšieho prostredia, ale aj telo včely, poprípade tiež cukor, ktorým sa včely prikrmujú na zimu. Rizikovou surovinou je najmä vlhký cukor, kde je vyššia vodná aktivita, umožňujúca rast kvasiniek vo väčšej miere [23, 28]. Medzi vodnou aktivitou a množstvom kvasiniek v mede existuje totiž priama úmernosť [31]. Ak napríklad dôjde k úprave napríklad riedením a med by sa zriedil tak, že bude obsahovať aspoň 20 % vody, ako prvé sa začnú rozmnožovať osmofilné kvasinky, najmä rod *Zygosacharomyces*, s typickým rastom len na povrchu medu, keďže k rozmnožovaniu vyžadujú kyslík. Kvasenie v celom objeme je zase typické pre kvasinky rodu *Torula* a *Torulopsis* [1]. Dominantné zastúpenie

medzi kvasinkami izolovanými z medu má *Sacharomyces cerevisiae*. Medzi ďalšie kvasinky izolované z medu patria tiež druhy *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Debaryomyces* alebo *Cryptococcus* [10, 23]. Počet kvasiniek vo vzorkách medu je premenlivý, zvyčajne sa udáva rozmedzie medzi 0 až 100 000 kolónii tvoriacich buniek na 1 g medu [19].

Ako zdroj **plesní** sa uvádza tráviaci trakt včely, úl a prostredie, v ktorom včely žijú alebo, podobne ako u kvasiniek, môžu pochádzať z cukru pri prikrmovaní včiel [23]. Potraviny, a teda aj med, napadnuté plesňami sa vyznačujú makroskopicky viditeľným micéliom, typickým zápachom a senzoricky nepríjemnou chuťou. Čo je však závažnejšie, plesne produkujú tzv. mykotoxíny, prírodné toxíny nebielkovinovej povahy vznikajúce ako produkty ich sekundárneho metabolizmu. Hlavnými producentmi mykotoxínov sú rody *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* a *Penicillium* [27,33]. Kačániová et al. [28] na analýze 50 vzoriek slovenského medu uvádza najväčšie zastúpenie druhov *Aspergillus flavus*, *Mucor sp.*, *Cladosporium cladosporioides* a *Penicillium*. Zoznam všetkých plesní, ktoré boli identifikované v mede je uvedený v Tabuľke 2.

V prípade výskytu **baktérií** v mede ide prevažne o spóry sporulujúcich mikroorganizmov rodu *Bacillus* a *Clostridium*. Okrem nich sa môžu vyskytnúť taktiež koliformné baktérie a zástupcovia rodu *Salmonella*, obe indikujúce environmentálnu a fekálnu kontamináciu medu, i keď niektorí autori pripisujú ich výskyt skôr kontaminácii z hmyzu, nevhodnému manipulačnému prostrediu a nedostatočnej úrovni sanitácie. V dôsledku nesprávneho zaobchádzania s medom možno v mede detekovať aj prítomnosť *Staphylococcus aureus* [34].

### ***Rod Bacillus***

Značne variabilný rod tvorený desiatkami až stovkami druhov, zahŕňa grampozitívne, aeróbne, prípadne fakultatívne anaeróbne tyčinky, prostrediu veľmi prispôsobivé. Tieto baktérie sú radené medzi sporulujúce mikroorganizmy, pričom u rodu *Bacillus* tvorba spór prebieha len za prítomnosti kyslíku, nakoľko energiu pre ich tvorbu bunka získava predovšetkým oxidáciou zásobných lipidov z cytoplazmy [33]. Viaceré analýzy vzoriek medu naznačujú výskyt baktérii rodu *Bacillus* s pomerne vysokou frekvenciou, najčastejšie zástupcovia druhov *B. cereus* a *B. coagulans*, ďalej *B. megaterium* a *B. alvei* [23].

### *Rod Clostridium*

Rod obsahujúci viac ako 80 druhov tvoria grampozitívne tyčinky. Na rozdiel od rodu *Bacillus*, klostrídiá pre svoj rast vyžadujú anaeróbne prostredie, aj keď niektoré druhy sú schopné tolerovať aj malé množstvo kyslíku. V prírode sú značne rozšírené. Aj keď väčšinou ide o saprofyty, niektoré klostrídiá sú schopné vyvolať ochorenie ľudí, a to najmä prostredníctvom produkcie exotoxínov. Ide najmä o druhy *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens* a *C. tetani* [35]. Podobne ako predchádzajúci rod, patria aj klostrídiá medzi sporujúce mikroorganizmy. Oválne spóry sú prítomné v pôde, vode, prachu a môžu kontaminovať potraviny. Sú veľmi odolné voči nepriaznivým podmienkam vonkajšieho okolia, ako je teplota, žiarenie, nízky obsah vody a rôzne chemické látky, vrátane dezinfekcie [33, 35]. Za tak značnú rezistenciu sú z veľkej miery zodpovedné takmer mizivá vodná aktivita v ich štruktúrach a tiež vápenatý obal. Na ich inaktiváciu je potrebné vystaviť ich extrémnym podmienkam, ako je teplota vyššia ako 120 °C po dobu viac ako 20 minút, kyslé pH alebo použite dezinfekčných prostriedkov označené ako sporocídne [36].

Zo vzoriek medu sú často izolované spóry baktérie *C. botulinum* [23]. Množstvo detekovaných spór v mede je pritom údaj značne variabilný, uvádza sa, že obvykle je počet 0,01 spór na 1 g medu, ale niektoré analýzy uvádzajú oveľa vyššie číslo – 5 až 80 spór na 1 g medu. Jeden z dôvodov by mohol byť nárast množstva spór napríklad v dôsledku ochorenia včelstva hnilobou včelieho plodu, kedy sa v uhynutých larvách môže veľmi ľahko množiť mikroflóra sprevádzajúca toto ochorenie. Med z takýchto včelstiev tak môže byť silne infikovaný [1]. Druh *Clostridium botulinum* je heterogénna skupina baktérií kontaminujúca pôdu, vodu, prach a potraviny. Spóry v kontaminovanej potrave za anaerobných podmienok vyklíčia na vegetatívnu formu, ktorá má vlastnosť tvoriť toxín [37].

Toxíny majú zhodný biologický účinok, ale rôznu antigénnu štruktúru, podľa ktorej sa delia na antigénne typy A – G. Kým toxíny typu A, B, E a vzácné F sú patogénne pre človeka, toxíny C, D a G spôsobujú ochorenia cicavcov, vtákov a rýb [36]. Klostrídiá produkujúce toxín A sú kontaminantmi hlavne ovocia a zeleniny, v mäsových výrobkoch je možné izolovať predovšetkým klostrídiá produkujúce toxín B [33]. Botulotoxín je bezfarebný, bez chuti a vône a s letálnou dávkou menej ako 1 µg je považovaný za najsilnejší známy bakteriálny toxín. Do prostredia je uvoľňovaný po rozpade buniek. Je radený do kategórie tzv. neurotoxínov, nakoľko jeho účinkom dochádza k blokácii uvoľňovania acetylcholínu, látky zodpovednej za prenos vzruchu z nervov na svaly. Najväčšia toxicita bola preukázaná u toxínu A, ktorý má najväčšiu afinitu k nervovému tkanivu [35, 36, 37].

Botulotoxíny sú zodpovedné za ochorenie označované ako botulizmus. Klinické prejavy sa mierne líšia podľa spôsobu nákazy a zahŕňujú svalovú slabosť, zápchu, rozšírené zreničky, bolesť brucha, čiastočnú paralýzu a v niektorých prípadoch aj smrť v dôsledku paralýzy dýchacieho svalstva [36]. K nákaze dochádza hneď niekoľkými spôsobmi. Človek môže požiť botulotoxín v potrave, kde došlo k pomnoženiu klostrídií a nebola dostatočne tepelne opracovaná, tzv. alimentárna nákaza. Druhou cestou nákazy je požitie spór, ktoré následne vyklíčia a množia sa v čreve. Ďalšou cestou nákazy je intoxikácia rany, tzv. ranný botulizmus. Špeciálnou formou ochorenia je dojčenský botulizmus [37].

**Dojčenský botulizmus** je jediným ochorením spájajúcim sa s medom [23]. Najviac ohrozenou skupinou sú deti mladšie ako 1 rok, najčastejšie vo veku od 1 do 6 mesiacov [38]. V mede nedochádza k produkcii toxínov, nakoľko klostrídiá sa v ňom nenachádzajú vo vegetatívnej forme, ale vo forme spór. Spóry nie je možné zničiť, v prípade vystaveniu medu extrémnym podmienkam potrebných k ich eliminácii, by došlo k znehodnoteniu medu. Spóry sú za normálnych okolností po konzumácii takto kontaminovaného medu vplyvom črevnej mikroflóry zničené v tráviacej sústave človeka. Situácia je však iná u malých detí, keďže ich črevná mikroflóra nie je dostatočne vyvinutá. Spóry tak kolonizujú črevo a vzhľadom na absenciu mikroflóry, môžu vyklíčiť a produkovať botulotoxíny [36, 37, 39].

Klinický obraz sú len nešpecifické príznaky ako zápcha, slabý plač, neschopnosť sať, v prípade závažnejšieho stavu postupná čiastočná paralýza a v letálnych prípadoch zástava dýchania [36].

Výskyt dojčenského botulizmu bol po prvý krát potvrdený v roku 1976 v USA. Napriek tomu, že ide o pomerne vzácne ochorenie, v USA bolo v rokoch 2001 – 2014 zachytené priemerne 80 – 110 potvrdených prípadov za rok a tejto krajine tak patrí celosvetové prvenstvo. Výskyt v Európe je nízky, aj keď, pravdepodobne vplyvom lepšej diagnostiky, má mierne vzostupný trend. Od roku 2006 do roku 2012 ide o 54 prípadov. Celková úmrtnosť dosahuje menej ako 2 %, vo väčšine prípadov neurologické následky nepretrvávajú a dôjde k úplnému uzdraveniu [37].

## 4 METÓDY IDENTIFIKÁCIE MIKROORGANIZMOV

Metód identifikácie mikroorganizmov je hneď niekoľko. Predpokladom kultivačných metód je rast a množenie mikroorganizmov za podmienok, ktoré vyžadujú pre svoj metabolizmus, ako sú zdroj uhlíka, vzťah k teplote, kyslíku, vlhkosti a iné špecifické nutričné požiadavky. Biochemické metódy sú založené na sledovaní a analýze biochemických charakteristík, ktoré sú špecifické pre konkrétny rod alebo druh mikroorganizmov, ako sú tvorba enzýmov, produkty metabolizmu, utilizácia určitého substrátu a iné [40]. Od týchto tradičných metód sa však pomaly upúšťa a sú postupne nahradzované modernými, presnejšími metódami. Dôvodom ustupovania kultivačných metód je prácnosť, časová náročnosť metódy a jej nepresnosť [40, 41]. Výsledky kultivácie môžu viesť k chybám a skresleným výsledkom, keďže väčšinou chýba dostatok poznatkov o skutočných podmienkach a kultivačné médium tak nereprezentuje skutočné prostredie s ohľadom na faktory potrebné k rastu a metabolizmu. Okrem toho odhady ukazujú, že až 99 % všetkých mikroorganizmov nie je možné izolovať ako čisté kultúry a kultivovať ich [42, 43, 44].

### 4.1 Molekulárne-genetické metódy

Kvalitu identifikácie významne zvýšili techniky molekulárne, založené na detekcii špecifického úseku DNA alebo RNA mikroorganizmu. Techniky tzv. fingerprintu vytvárajú „genetický odtlačok“ reprezentujúci genetickú mikrobiálnu diverzitu komunity konkrétneho prostredia. Ide o metódy pomerne rýchle, veľmi citlivé, avšak limitované nutnosťou izolácie genetickej informácie z analyzovaného prostredia. Jednou z najbežnejšie používaných metód je denaturačná gradientová gélová elektroforéza (DGGE), pomocou ktorej bola v tejto práci sledovaná mikrobiálna diverzita medu. Táto metóda je spojená s technikou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR), pomocou ktorej je dosiahnuté mnohonásobné zmnoženie vybraného úseku DNA [40, 41, 42].



#### 4.1.1 Polymerázová reťazová reakcia

PCR (z anglického „Polymerase Chain Reaction“) je metóda umožňujúca mnohonásobné zmnoženie konkrétnej vybranej nukleotidovej sekvencie DNA alebo RNA, ktorá je vymedzená pomocou pripojenia dvoch krátkych oligonukleotidov, tzv. primerov [45]. Tie sú navrhnuté tak, aby hybridizovali pri rovnakej teplote, a preto je nutné, aby mali rovnakú alebo takmer zhodnú teplotu topenia. Zároveň je potrebné, aby boli komplementárne ku koncovým sekvenciám oblasti, ktorá má byť zmnožená. Syntéza DNA je umožnená aj vďaka termostabilnej DNA polymeráze, ktorá zabezpečuje syntézu DNA úseku na oboch matricových vláknach [41]. Súčasťou reakčnej zmesi je aj zmes štyroch deoxynukleotidtrifosfátov (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), tvoriace stavebné súčasti novo vznikajúcej DNA, taktiež pufo s obsahom horečnatých iónov a voda v kvalite pre PCR [45]. Samotná reakcia zahŕňa tri, cyklicky sa opakujúce kroky, pričom každý z nich prebieha za inej, špecificky danej teploty. Prvý krok, prebiehajúci za teploty 94 °C, predstavuje **denaturáciu templátu**, kedy dochádza k rozrušeniu vodíkových mostíkov medzi bázami, dvojreťazová DNA sa rozvoľňuje a vznikajú tak dva samostatné reťazce. V druhom kroku dochádza k zníženiu teploty na 30 – 65 °C, čo je teplota potrebná k pripojeniu (**hybridizácii primerov**, tzv. annealing. Zároveň sa na miesto nasadnutia primerov viaže DNA polymeráza, pre ktorú táto teplota predstavuje teplotné optimum. Vlastná **syntéza (elongácia, polymerizácia)** nových úsekov DNA je tretím a posledným krokom PCR, prebiehajúca za teploty 65 – 75 °C, kedy vzniká nové, komplementárne vlákno k pôvodnej matrici [40, 45, 46]. Tieto tri kroky tvoria jeden PCR cyklus, celkovo s opakovaním 25 až 35-krát, pričom postupným opakovaním exponenciálne vzrastá počet kópii vybraného úseku DNA. Reakcie prebiehajú v termostatickom zariadení, ktoré presne riadi a reguluje vývin teplôt počas reakcie, v tzv. termocykleri. Analýza PCR produktu je umožnená pomocou elektroforetického delenia v agarózovom géle s farbivom, najčastejšie etidium bromidom, ktorý sa interkaluje medzi bázy DNA a pod UV svetlom fluoreskuje, čo umožňuje vizualizáciu. Identifikácia fragmentu je vykonávaná na základe jeho porovnávania so štandardom obsahujúcim fragmenty o známej veľkosti. PCR metóda je najčastejšie kombinovaná s ďalšími molekulárne-biologickými metódami [40, 41, 45, 46].

#### 4.1.2 Denaturačná gradientová gélová elektroforéza

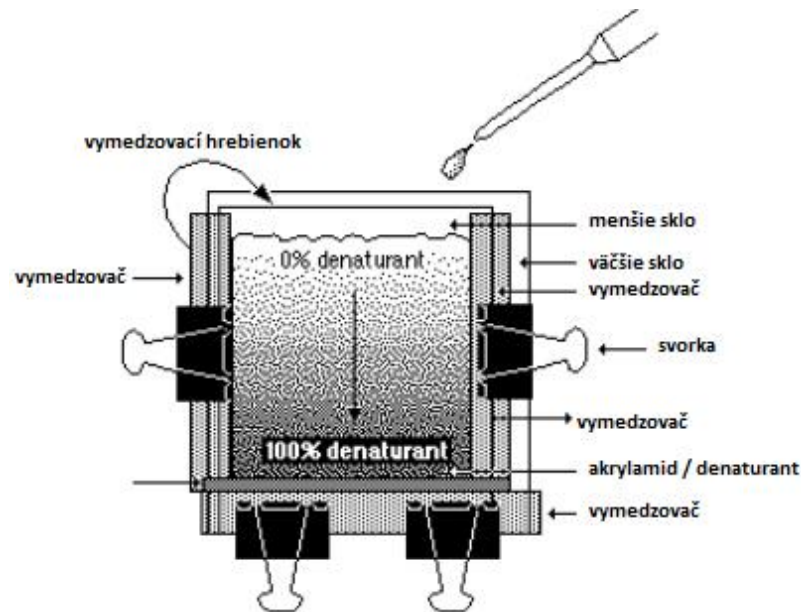
Ako bolo už uvedené vyššie (Kap. 4. 1.), pre štúdium mikrobiálnej diverzity vzorku, ale aj k odhaľovaniu bodových mutácii DNA, sa využíva denaturačná gradientová gélová elektroforéza. DGGE (z anglického „Denaturing Gradient Gel Electrophoresis“) nachádza uplatnenie vo viacerých odvetviach mikrobiológie, nakoľko jej výsledkom je odtlačok mikrobiálnej komunity prostredia, z ktorej bola DNA izolovaná. Analýza diverzity mikroorganizmov je často založená na identifikácii bakteriálneho génu 16S rRNA, kódujúci ribozomálnu RNA v malej ribozomálnej podjednotke 16S [42, 43]. Vďaka veľkému počtu variabilných oblastí je tento gén považovaný za univerzálny fylogenetický marker umožňujúci identifikáciu mikroorganizmov na úrovni druhu až rodu. Molekuly ribozomálnej RNA navyše patria medzi najviac evolučne konzervované makromolekuly vo všetkých živých organizmoch. Ich výhoda spočíva v univerzálnosti, vhodnej veľkosti poskytujúcej dostatočné množstvo nukleotidov na porovnanie sekvencií a zároveň sú dostatočne malé, aby umožňovali pohodlnú analýzu [47].

Princípom metódy je separácia približne rovnako veľkých fragmentov DNA majúcich rôznu sekvenciu nukleotidov v polyakrylamidovom géle [40, 42]. K separácii dochádza na základe ich stupňa denaturácie, pričom platí nepriama úmera medzi pohyblivosťou fragmentov a lineárnym gradientom denaturačných činidiel (zmes močoviny a formamidu) [40, 43]. Rýchlosť denaturácie je daná sekvenciou nukleotidov a najmä počtom vodíkových mostíkov medzi jednotlivými nukleotidmi. Kým medzi párami A-T sa nachádzajú dve vodíkové väzby, pár G-C je fixovaný tromi vodíkovými väzbami, čo im dáva vyššiu stabilitu voči denaturácii [45, 48]. Fragment DNA sa elektroforeticky pohybuje v géle až do chvíle, kedy vplyvom určitej koncentrácie denaturačných činidiel dôjde k denaturácii dvojvláknovej DNA (dsDNA) na jednovláknovú DNA (ssDNA), čo má za následok jeho spomalenie až úplne zastavenie [40]. Mulyser a kol. [54] popisuje použitie aj tzv. GC-svorky, krátkej sekvencie bohatej na GC páry, ktorej úloha spočíva najmä v zabránení úplnej disociácii dsDNA na jednoreťazové formy. V mieste GC-svorky reťazce denaturujú horšie, úsek DNA so svorkou vytvorí tvar písmena Y a zadrží ju tak v géle v správnej pozícii tam, kde nastala pôvodná denaturácia. Týmto spôsobom je významne zlepšená rozlišovacia schopnosť metódy [43, 48]

Usporiadáním aparatury je DGGE radená k vertikálnym elektroforézam, kde tenká vrstva polyakrylamidového gélu je umiestnená a fixovaná medzi dvoma sklenenými

tabuľami (Obr. 4). Takto pripravený nosič je umiestnený do vodného kúpeľa medzi dve elektródy, medzi ktorými prebieha jednosmerný prúd.

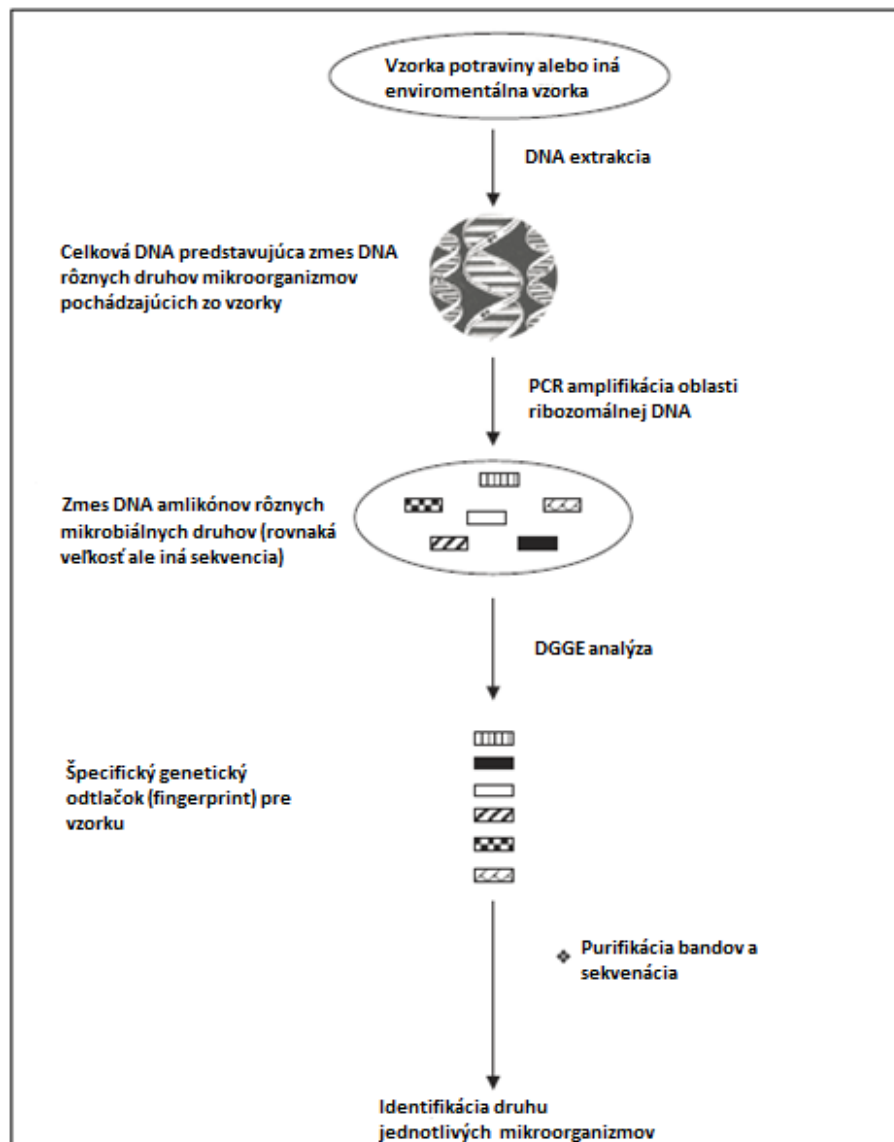
Gél je pripravovaný polymeráciou monoméru akrylamidu a bis-akrylamidu. Polymeračné reakcie vyvolávajú voľné radikály uvoľňujúce sa z persulfátu amónneho (APS). Tvorbu voľných radikálov katalyzuje NNN'N'-tetraetyletylendiamin (TEMED), čím dochádza k urýchleniu polymerácie [48].



Obrázok 4: Schéma aparatury pre polyakrylamidový gél v DGGE [49]

Pri príprave vzorky k analýze pomocou metódy DGGE je v prvom kroku izolovaná zo vzorky komplexná DNA, ktorá predstavuje zmes DNA rôznych druhov mikroorganizmov prirodzene sa vyskytujúcich alebo kontaminujúcich danú vzorku. Izolovaná zmes DNA je následne podrobená amplifikácii určitého úseku DNA pomocou PCR metódy, čím je získaná zmes PCR produktov viacerých druhov pochádzajúcich z pôvodnej analyzovanej vzorky (Obr. 5). Tieto sú následne nanesené do jamiek polyakrylamidového gélu a pomocou elektroforetickej separácie v géle dochádza k vytvoreniu špecifického genetického odtlačku (fingerprint), ktorý charakterizuje mikrobiálnu rozmanitosť danej vzorky. Reakčné podmienky zahŕňajú teplotu vodného kúpeľa medzi 55 – 60 °C, napätie 50 – 250 V a čas prebiehajúcej separácie 5 – 20 hodín, podľa typu vzorky. Pre zobrazenie bandov reprezentujúcich jednotlivé skupiny mikroorganizmov, je nutné gél ofarbiť a vizualizovať. Farbenie gélu je realizované najčastejšie komerčným farbivom SYBR Green a gél je následne vizualizovaný pomocou UV žiarenia v transiluminátore [42, 48].

Keďže vizualizované bandy sú neurčitého pôvodu, je vhodná ich izolácia z gélu, reamplifikácia a následná sekvenácia, čím sa jednoznačne preukáže ich identita [42].



Obrázok 5: Schéma PCR-DGGE vrátane izolácie DNA zo vzorku [42]

### 4.1.3 Sekvenčná analýza

Sekvenovanie je metóda k identifikácii primárnej štruktúry, tzn. k určeniu poradia (sekvencie) nukleotidov v reťazci DNA. Znalosť genetickej informácie tvorí nevyhnutný predpoklad pre identifikáciu mikroorganizmu. Sekvenčné metódy možno rozdeliť do dvoch skupín, na klasické metódy, zahrňujúce chemickú a enzymatickú metódu, a na sekvenovanie novej generácie. Z klasických metód je najviac rozšírenou **enzymatická metóda podľa Sangera**. Princípom metódy je včlenenie fluorescenčne značených dideoxynukleotidtrifosfátov (ddNTP) do novo syntetizujúceho sa vlákna DNA, čím dôjde k zastaveniu polymerizácie. Dôvod zastavenia polymerizácie možno nájsť v absencii hydroxylovej OH skupiny v molekulách ddNTP, čím je znemožnené naviazanie ďalšieho nukleotidu. Reakcia prebieha v štyroch skúmavkách, kedy každá obsahuje všetky štyri deoxynukleotidtrifosfáty (dNTP) a následne je pridaný do každej zo skúmaviek aj jeden zo značených ddNTP. Pri polymerácii tak prednostne dochádza k zabudovávaniu dNTP a len náhodne sa inkorporuje ddNTP, čím sa syntéza zastaví. Vznikne tak súbor DNA fragmentov o rôznej veľkosti, vždy zakončených príslušným označeným ddNTP. Tie sú následne analyzované kapilárnou elektroforézou v genetickom analyzátore (sekvenátore), kde sú zaznamenávané fluorescenčné signály jednotlivých fragmentov CCD kamerou a pomocou softvérového spracovania je získaná DNA sekvencia [48, 50].

Neskôr bolo vyvinuté **sekvenovanie novej generácie – NGS** (z anglického „Next-Generation Sequencing“). Hlavným rozdielom oproti klasickým metódam je schopnosť NGS sekvenovať oveľa väčší rozsah DNA, čím sú získané tisíce až milióny sekvencií naraz, čo výrazne skraca čas a tiež znižuje náklady na analýzu. Z tohto dôvodu sú tieto metódy označované aj ako „masívne paralelné sekvenovanie“ alebo „high-throughput sequencing“. V súčasnosti sa jedná o viacero technológií líšiacich sa v technickom prístupe a aplikovateľnosti [51, 52].

## **II. PRAKTICKÁ ČASŤ**

## 5 CIEĽ PRÁCE

Základným cieľom tejto diplomovej práce bolo identifikovať mikroorganizmy nachádzajúce sa v 65 vzorkách medu získaného od malých včelárov a v 5 vzorkách komerčne dostupných medov. K dosiahnutiu tohto cieľu viedlo niekoľko čiastkových cieľov:

- v prípravnej fáze zozbierať vzorky medu z čo najrozsiahlšieho územia prednostne Slovenskej republiky,
- vypracovanie prehľadnej literárnej rešerše prinášajúcej základný prehľad fyzikálno-chemických vlastností medu, vrátane jeho antimikrobiálnej aktivity a prehľad mikroorganizmov nachádzajúcich sa v mede, s možnosťami ich stanovenia,
- praktické zoznámenie sa s molekulárne-genetickými metódami s dôrazom kladeným na stanovenie mikroorganizmov prostredníctvom spojenia metód polymerázovej reťazovej reakcie a denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy,
- pomocou molekulárne-genetických metód identifikovať mikroorganizmy nachádzajúce sa vo vzorkách medu,
- vyhodnotenie výsledkov a formulácia záverov práce.

## 6 MATERIÁL A METÓDY

### 6.1 Prístrojové vybavenie, pomôcky a chemikálie

#### 6.1.1 Stanovenie obsahu vody

Prístroje a pomôcky

- Refraktometer ručný RHB90ATC (YH, Nemecko)
- Ostatné – kovová lyžička, drevená špachtľa, buničina, kadička

#### 6.1.2 Optimalizácia metódy izolácie DNA a izolácia DNA

Prístroje a pomôcky

- Váhy 440 – 47 N d=0,01 g (KERN, Nemecko)
- Vortex-Genie® 2 Vortex vrátane vortexového adaptéru (Mo Bio Laboratories, USA)
- Mechanická trepačka PSU 10 (Biosan, Lotyšsko)
- Biological Thermostat BT 120 (TME, Poľsko)
- Centrifúga Z 300 K (HERMLE, Nemecko)
- DNeasy® mericon® Food Kit (QIAGEN, USA)
- Fluorometr QFX (Denovix, USA)
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO, Japonsko)
- Centrifúga minispin plus (Eppendorf, Nemecko)
- Laboratórne sklo – odmerné valce, kadičky
- Ostatné – centrifugačné skúmavky 50 ml (Kartell, Taliansko), nitrilové rukavice, kovová lyžička, stojan na skúmavky, plynový kahan, sterilné špičky, sterilné mikroskúmavky (1,5 ml)

Chemikálie

- Etanol 70% (sigma-Aldrich, USA)
- Sterilná destilovaná voda
- Chloroform v čistote pre molekulárnu biológiu (Sigma-Aldrich, USA)
- DNeasy® mericon® Food Kit (QIAGEN, QIAGEN, USA)
- AccuGreen High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit (Biotium, USA)



### 6.1.3 PCR

#### Prístroje a pomôcky

- PCR box AURA PCRTM (BIOAIR, Taliansko)
- Mikropipety (Eppendorf, Nemecko)
- Vortex V-1 plus (Biosan, USA)
- Termocykler pre PCR gradientový Aeris™ (ESCO, Singapur)
- Váhy KB d=0,01 g (KERN, Nemecko)
- Mikrovlnná trúba (Electrolux, Švédsko)
- Elektroforetická vaňa vrátane príslušenstva MultiSUB Mini (Consort, Belgicko)
- Elektroforetická vaňa vrátane príslušenstva HU10 Mini-Plus Horizontal (SCIE-PLAS, Anglicko)
- Elektrický zdroj pro elektroforézu EV243 (Consort, Belgicko)
- UV-Transiluminátor InGeniusLHR (SYNGENE, Veľká Británia)
- Osobný počítač ESPRIMO (Fujitsu-Siemens, Japonsko, Nemecko)
- Laboratórne sklo – odmerné valce, Erlenmeyerova banka
- Ostatné – sterilné špičky pre PCR s filtrom, sterilné mikroskúmavky pre PCR (1,5 ml), sterilné skúmavky pre PCR 8 ks v stripe s viečkami (0,2 ml), stojan na skúmavky, nitrilové rukavice, kovová lyžička, termo rukavica

#### Chemikálie

- Etanol 70% (Sigma-Aldrich, USA)
- Redestilovaná voda pre molekulárnu biológiu
- 1x TAE pufoer (20 mM Tris-acetát, 10 mM acetát sodný, 0,5 mM EDTA, pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA)
- Agaróza SeaKem (Lonza, Švajčiarsko)
- Etidiumbromid 1:30 H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, USA)
- 100 bp DNA Ladder N3231L (Biolabs. Inc., New England)
- GoTaq® Hot Start Green MasterMix (Promega, USA)
- DNA Gel Loading Dye (6x) (Thermo Scientific, USA)
- Primery (Eastport – Metabion, ČR)

Tabuľka 3: Použité primery pre 1. fázu PCR

Názov primeru	Sekvencia	Publikácia
FD1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Weisburg et al., 1991 [53]
RD1	5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC	Weisburg et al., 1991 [53]

Tabuľka 4: Použité primery pre 2. fázu PCR

Názov primeru	Sekvencia	Publikácia
341F(GC)*	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer et al., 1993 [54]
907R	5'-CCGTCAATTCMTTTGAGTTT	Muyzer et al., 1993 [54]

\*GC svorka – CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG [54]

#### 6.1.4 DGGE

##### Prístroje a pomôcky

- Analytické váhy ADVENTURER Pro d=0,0001 g (OHAUS, USA)
- Miešadlo s ohrevom MR Hei-Tec (Heidolph, Nemecko)
- Trepačka Titramax 100 (Heidolph, Nemecko)
- Vortex V-1 plus (Biosan, USA)
- Elektroforetický tank pre DGGE (C. B. S. Scientific Company, USA)
- Elektrický zdroj pre DGGE EPS-300x (C. B. S. Scientific Company, USA)
- Mini-peristaltická pumpa MPP-100-220 (C. B. S. Scientific Company, USA)
- Gradient maker, 2x 20 ml (C. B. S. Scientific Company, USA)
- Magnetické miešadlo vrátane magnetov Hei-Mix S (Heidolph, Nemecko)
- DGGE set sklenených dosiek (C. B. S. Scientific Company, USA)
- Jednoduchá kazeta pre DGGE z plexiskla (C. B. S. Scientific Company, USA)
- Tesnenie pre DGGE 1,0 mm (C. B. S. Scientific Company, USA)
- Svorky, spacers, vertikálne hrebenky pro DGGE (C. B. S. Scientific Company, USA)
- Kanyla modrá s krídelkami
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO, Japonsko)
- 2 priestorné nádoby na farbiaci kúpeľ
- Laboratórne sklo – odmerné valce, reagenčné fľaše (100ml), kadička na odpad

- Ostatné – sterilné špičky, sterilné špičky pre nanášanie na elektroforetické gély, sterilné mikroskúmavky pre PCR (1,5 ml), plastové kónické skúmavky s viečkom (50 ml), stojan na skúmavky, nitrilové rukavice, injekčná striekačka s ihlou, kovová lyžička, sklenené guľičky, skalpely ochranný štít

#### Chemikálie

- Etanol 70% (Sigma-Aldrich, USA)
- Sterilná destilovaná voda
- Formamid pre molekulárnu biológiu (SERVA, Nemecko)
- Močovina (Sigma-Aldrich, USA)
- 40 % w/v akrylamid/bis-solution 37:5:1 (SERVA, Nemecko)
- Amonium persulfát (SERVA, Nemecko)
- NNN'N'- tetraetyletylendiamin (Sigma-Aldrich, USA)
- 50x TAE pufor (2M Tris-base, 1M kyselina octová, 0,05M EDTA Na<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich, USA)
- 1x TAE pufor (40mM Tris-base, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA Na<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich, USA)
- Fluorescenčné farbivo GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA)
- 100 bp DNA Ladder N3231L (Biolabs. Inc., New England)

#### 6.1.5 Purifikácia DNA

##### Prístroje a pomôcky

- Centrifúga minispin plus (Eppendorf, Nemecko)
- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Švajčiarsko)
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO, Japonsko)
- Ostatné – sterilné špičky, sterilné mikroskúmavky pre PCR (1,5 ml a 0,5 ml), nitrilové rukavice, stojan na skúmavky

## 6.2 Charakteristika vzoriek

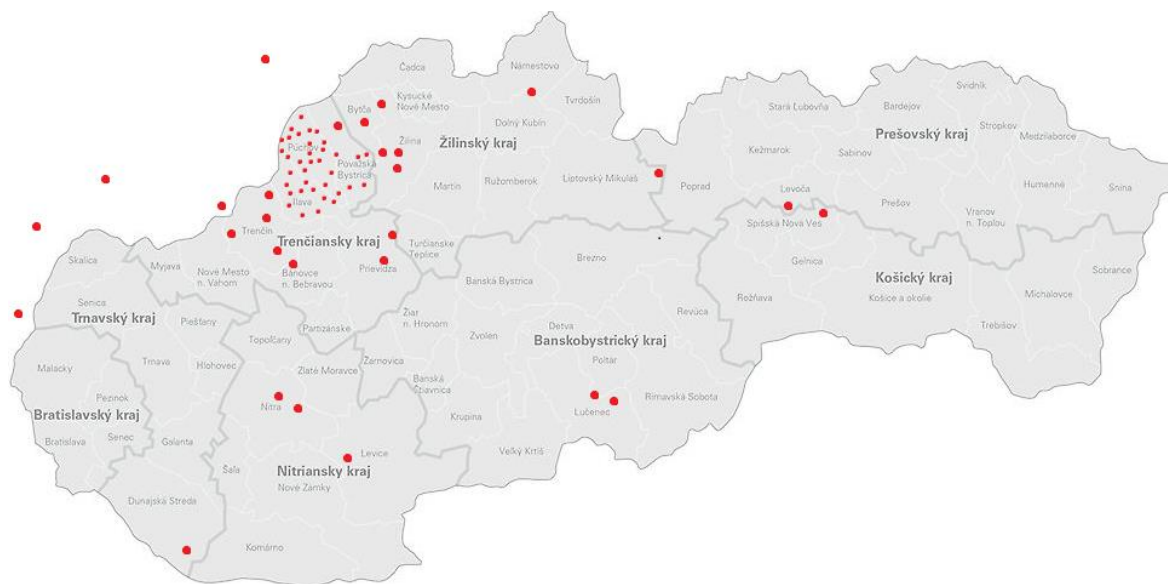
Pre sledovanie mikrobiálnej diverzity medu bolo celkovo získaných 70 vzoriek medu kvetového, medovicového aj zmiešaného (Obr. 7). U 65 vzoriek medy pochádzali od malých a stredných včelárov, 5 vzoriek tvorili komerčne dostupné medy zakúpené v obchodných reťazcoch. Medy od malých a stredných včelárov boli prevažne zo Slovenskej republiky, so zastúpením až 61 vzoriek, z Českej republiky pochádzali 3 medy a 1 vzorka bola z Rakúska. U komerčných medov sa jednalo predovšetkým o zmesi medov pochádzajúcich z rôznych oblastí a krajín, najmä mimo Slovenskej republiky. Pri výbere vzoriek bola snaha o zber medu z čo najväčšieho územia, predovšetkým Slovenskej republiky. Prehľad lokalít úľov, z ktorých vzorka medu pochádza, je zobrazený v Tabuľke 5 a na Obrázku 6.

Tabuľka 5: Lokalita úľa priradená k číslu vzorky

Č. vzorky	Lokalita úľa	Č. vzorky	Lokalita úľa
1	Salaš, Nimnica (SR)	36	Oravská Magura (SR)
2	Salaš, Nimnica (SR)	37	Košeca (SR)
3	Salaš, Nimnica (SR)	38	Mestečko (SR)
4	Salaš, Nimnica (SR)	39	Milevsko (CZ)
5	Salaš, Nimnica (SR)	40	Košeca (SR)
6	Salaš, Nimnica (SR)	41	Vápenice (CZ)
7	Horná Poruba (SR)	42	Valašská Belá (SR)
8	Horná Poruba (SR)	43	CZ/Moldavská republika*
9	Zubák (SR)	44	Papradno (SR)
10	Horná Poruba 1 (SR)	45	Lysá pod Makytou (SR)
11	Horná Poruba 2 (SR)	46	Tuchyňa (SR)
12	Červený Kameň (SR)	47	Tomášovce (SR)
13	Hloža, Beluša (SR)	48	Beluša (SR)
14	Hloža, Beluša (SR)	49	Kréta*
15	Beluša (SR)	50	Spišská Nová Ves (SR)
16	Dolný Lieskov (SR)	51	Rašov (SR)
17	Prečín (SR)	52	Pribilina (SR)
18	Prečín (SR)	53	Rastislavice, Nitra (SR)
19	Brvnište (SR)	54	Štitare (SR)
20	Brvnište (SR)	55	Hvozdnica (SR)

21	Podjavorník (SR)	56	Teneck, Rakúsko (A)
22	Podjavorník (SR)	57	Čáry (SR)
23	Zubák (SR)	58	Tekovské Lužany (SR)
24	Šebeš'ťanová (SR)	59	Grécko*
25	Trenčín (SR)	60	Spišská Nová Ves (SR)*
26	Upohlav (SR)	61	Nemecko*
27	Kotešová (SR)	62	Lednické Rovne (SR)
28	Praznov (SR)	63	Horná Breznica (SR)
29	Nemšová, Kľúčové (SR)	64	Trenčianske Stankovce (SR)
30	Zubák (SR)	65	Papradno (SR)
31	Bobot (SR)	66	Tomášovce (SR)
32	Bobot (SR)	67	Sklené (SR)
33	Salaš, Nimnica (SR)	68	Podhorie (SR)
34	Salaš, Nimnica (SR)	69	Podhorie (SR)
35	Polštejn (CZ)	70	Podhorie (SR)

\* vzorky označené žltou farbou sú komerčné medy zakúpené v obchodných reťazcoch



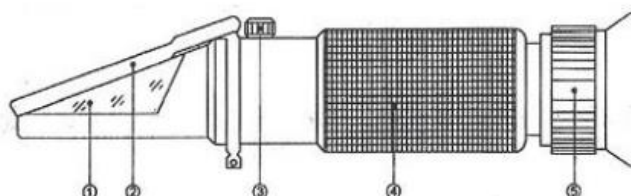
Obrázok 6: Geografická lokalizácia úľov



Obrázok 7: Rôznorodosť vzoriek medu

### 6.3 Stanovenie obsahu vody

Pomocou ručného refraktometra určeného k meraniu obsahu vody v mede bol stanovený percentuálny obsah vody vo vzorkách medu. Na hranol refraktometra bolo pomocou kovovej lyžičky kvapnuté a pomocou drevenej špachtle rozvrstvené malé množstvo vzorky medu. Následne bol hranol prekrytý krycím sklíčkom tak, aby vo vrstve medu neboli prítomné vzduchové bubliny. Hodnota obsahu vody v % bola oproti svetlu cez okulár refraktometru odčítaná zo stupnice. Rozsah stupnice je závislý na type refraktometru, použitím Refraktometru RHB90ATC (YH, Nemecko) bolo umožnené stanovovať obsah vody v rozmedzí 12 – 27 % s presnosťou  $\pm 0,5$  %. Takýmto spôsobom boli postupne zmerané všetky vzorky medu, pričom medzi jednotlivými vzorkami bol hranol refraktometru opláchnutý vodou a osušený buničinou.

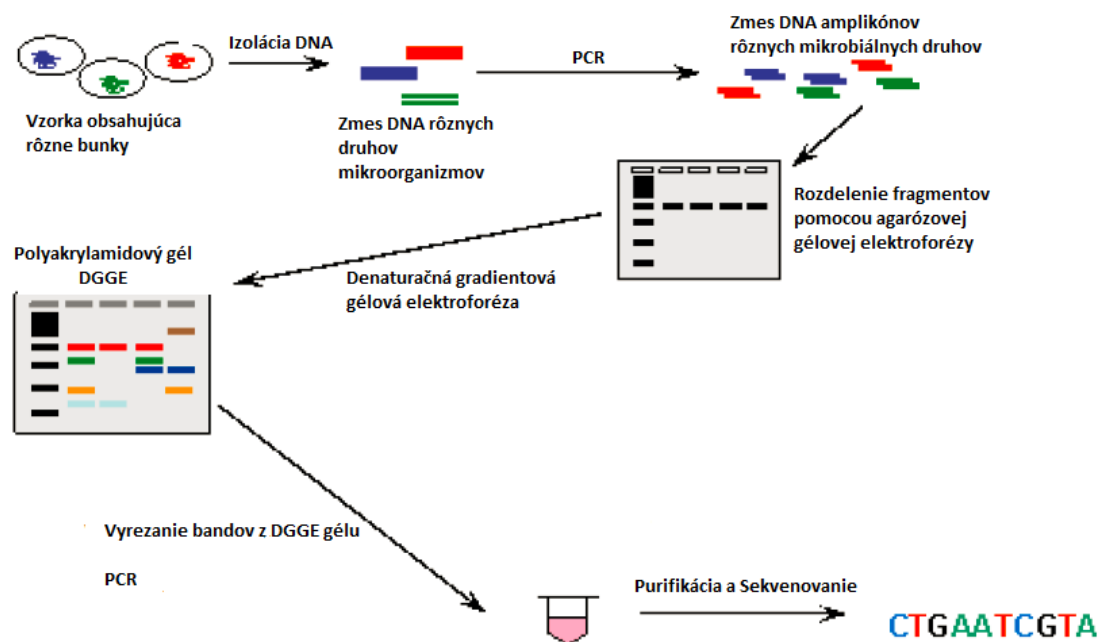


1. Hranol
2. Krycia doštička
3. Korečňý šroub
4. Zrkadlová trubica
5. Okulár (nastavovací dioptrický krúžok)

Obrázok 8: Časti ručného refraktometra [57]

## 6.4 Stanovenie mikrobiálnej diverzity metódou DGGE

V posúdení diverzity mikroorganizmov v mede bola využitá technika DGGE, radená k metódam molekulárno-biologickej analýzy. Samotnej technike DGGE predchádza viacero krokov a keďže jednotlivé kroky sú na seba naviazané (Obr. 9), úspech metódy je podmienený správnym vykonaním každého z nich.



Obrázok 9: Jednotlivé kroky metódy DGGE [58]

### 6.4.1 Optimalizácia metódy izolácie DNA zo vzorky

Prvou úlohou bolo stanovenie vhodného postupu izolácie DNA. Pri optimalizácii metódy izolácie bola použitá komerčná súprava určená pre potraviny DNeasy<sup>®</sup> mericon<sup>®</sup> Food Kit (QIAGEN). Boli testované 4 postupy:

- **Prvá metóda** obsahovala navážku sterilne odobranej vzorky medu o hmotnosti 5 g, ktorá bola suspendovaná v 10 ml lyzačného pufru. Následne bolo pridané 25 µl proteinkinázy K a vzorka bola ďalej spracovávaná v súlade s manuálom v komerčnom kite. Nakoniec bola stanovená koncentrácia takto vyzolovanej DNA.
- **V druhej metóde** bola použitá väčšia navážka sterilne odobratej vzorky – 10 g medu, ktorá bola suspendovaná v 10 ml lyzačného pufru a následne bolo opäť pridané 25 µl proteinkinázy K. Vzorka bola ďalej spracovávaná podľa manuálu v komerčnom kite, kedy po dokončení protokolu izolácie bola zmeraná koncentrácia vyzolovanej DNA.

- **Pri tretej metóde** sa použila rovnaká navážka medu ako v druhej metóde, tzn. 10 g, ktorá bola zmiešaná s 5 ml lyzačného pufru. Následne bolo pridané opäť 25  $\mu$ l proteínkinázy K a vzorka bola ďalej spracovávaná podľa manuálu v komerčnom kite. Po poslednom kroku izolácie genetickej informácie bola stanovená koncentrácia DNA.
- **Pri štvrtej metóde** bola použitá navážka vzorky medu o hmotnosti 10 g, sterilne navážená do centrifugačnej skúmavky o obsahu 50 ml. Obsah skúmavky bol doplnený sterilnou vodou na objem 45 ml a následne bola suspenzia za stáleho trepania na mechanickej trepačke inkubovaná v termostate pri teplote 65 °C počas 30 minút. Po inkubácii a miernom schladení vzorky na izbovú teplotu bol obsah skúmavky centrifugovaný 30 minút pri 4500 rpm. Supernatant obsahujúci rozpustené cukry bol odliaty tak, aby na dne zostala neporušená peletka, obsahujúca peľový zbytok. Táto mikrobiálna biomasa bola ďalej spracovávaná v súlade s manuálom v komerčnom kite.

#### 6.4.2 Izolácia DNA zo vzorky

Keďže štvrtá metóda bola vybraná ako najvhodnejšia (Kap . 7.2.1.), bola genetická informácia zo vzorky medu izolovaná touto metódou. Po izolácii mikrobiálnej biomasy, bola peletka ďalej spracovávaná pomocou komerčnej súpravy určenej pre potraviny DNeasy<sup>®</sup> mericon<sup>®</sup> Food Kit (QIAGEN) podľa nasledujúceho:

- Do skúmavky bolo k peletke pridané 1 ml lyzačného pufru a 2,5  $\mu$ l proteínkinázy K. Skúmavky obsahujúce suspenziu boli umiestnené do termostatu, kde pri teplote 60 °C boli 30 minút trepané na mechanickej trepačke. V tomto kroku došlo k mechanickému a chemickému narušeniu bunčných membrán a k uvoľneniu DNA do roztoku.
- Po schladení skúmaviek na izbovú teplotu, boli vzorky centrifugované 5 minút pri 2500 rpm.
- Supernatant bol opatrne odobratý (700  $\mu$ l) a prenesený do čistej 2 ml skúmavky. Následne bolo pridaných 500  $\mu$ l chloroformu, suspenzia bola krátko premiešaná na vortexe a následne centrifugovaná 15 min pri 14 000 rpm. Týmto krokom došlo k eliminácii nežiadúcich látok nerozpustných vo vode (zvyšky buniek).
- Po centrifugácii bola vodná fáza odobratá a prenesená do čistej 2 ml skúmavky a následne bol v pomere 1:1 pridaný pufo PB, spôsobujúci vyvrážanie DNA.
- Po krátkom premiešaní zmesi na vortexe bola zmes pipetovaná do kolónky s kremičitou membránou a centrifugovaná 1 minútu pri 13 000 rpm. Prefiltrovaný



roztok bol vyliaty. Tento krok bol opakovaný so zvyškom zmesi a filtrát, ktorý obsahoval kontaminujúce zložky, bol opäť vyliaty. Týmto krokom sa zabezpečilo naviazanie DNA na membránu kolónky.

- Kolónka so zachytenou DNA bola premiestnená do čistej 2 ml skúmavky, do ktorej bolo pridané 500 µl pufru AW<sub>2</sub>. Obsah bol centrifugovaný 2 minúty pri 13 000 rpm. Prefiltrovaný roztok bol vyliaty.
- Kolónka bola opäť centrifugovaná, tentokrát bez pridania akéhokoľvek roztoku tak, aby bola membrána dokonale suchá a aby došlo k dokonalému odstráneniu premývacieho pufru AW<sub>2</sub>.
- Kolónka bola opäť prenesená do čistej 2 ml skúmavky a prevrstvená 50 µl elučného roztoku pufru EB. Po centrifugácii skúmavky s kolónkou po dobu 1 minúty pri 13 000 rpm došlo k uvoľneniu izolovanej DNA z membrány a jej izolácii do pufru.

#### 6.4.3 Stanovenie koncentrácie DNA

Úspešnosť izolácie DNA bola overená stanovením koncentrácie DNA pomocou Fluorometru QFX (Denovix, USA). Vizualizácia DNA bola zabezpečená pomocou komerčného kitu AccuGreen High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit (Biotium, USA). Pri stanovení koncentrácie DNA bolo postupované nasledujúcim spôsobom:

- V 50 ml skúmavke bolo zmiešaných 200 µl pufru Accu Green a 1 µl farbiva DYE Accu Green. Tento objem odpovedal použitiu pre jednu vzorku, objem bol preto prepočítaný na 70 vzoriek. Obsah skúmavky bol krátko premiešaný na vortexe.
- Z takto pripravenej zmesi bol pipetou prenesený objem 200 µl do sedemdesiatich sterilných mikro skúmaviek o objeme 1 ml a následne boli pridané 2 µl vzorky DNA. Zmes bola krátko premiešaná na vortexe.
- V prvom kroku bola do fluorometra vložená mikro skúmavka obsahujúca blank a prístroj bol kalibrovaný.
- Následne bola postupne premeraná hodnota koncentrácie DNA u všetkých vzoriek a výsledky boli prehľadne zaznamenávané do tabuľky (Tab.12).

#### 6.4.4 PCR

Druhým krokom analýzy bolo namnoženie vybraného úseku DNA pomocou PCR. Metóda PCR pozostávala z dvoch krokov, ktoré na seba nadväzovali. Ako vybraný úsek genetickej informácie bol pre prvý krok zvolený gén 16S rRNA obsahujúci veľké množstvo variabilných oblastí (Obr.10). Optimalizácia reakčných podmienok nebola predmetom tejto práce, nakoľko sa ňou zaoberali v svojich prácach Ing. Iveta Kalousková a Ing. Veronika Kučabová, a tak reakčné podmienky danej metódy vychádzali zo záverov ich prác [55, 56].

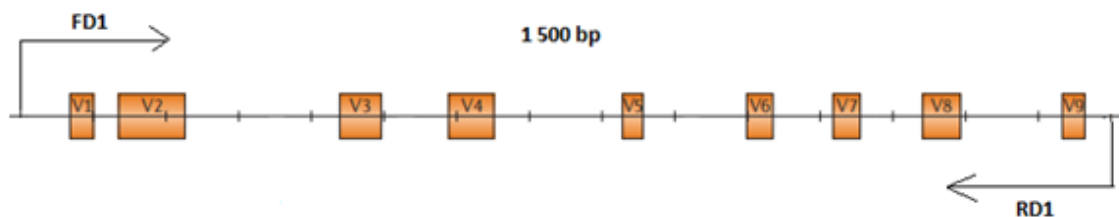
##### Prvý krok

V prvej fáze PCR bola pripravená reakčná zmes v sterilnom PCR boxe sterilizovaným ultrafialovým žiarením po dobu minimálne 20 minút. Pre každú vzorku bolo namiešané 20  $\mu$ l reakčnej zmesi, ktorej zloženie je uvedené v Tabuľke 6.

Tabuľka 6: Zloženie reakčnej zmesi pre 1. krok PCR

Zložka reakčnej zmesi	Objem zložky pre 1 vzorku [ $\mu$ l]
GoTaq® Hot Start Green MasterMix	10
Sterilná voda pre PCR	7
Forward primer FD1	1
Reverse primer RD1	1
DNA	1
<b>Spolu</b>	<b>20</b>

Použitý reakčný pufr GoTaq® Hot Start Green MasterMix obsahoval DNA polymerázu, deoxynukleotidy a chlorid horečnatý ( $MgCl_2$ ). V prvej fáze boli použité primery FD1 a RD1, ohraničujúce úsek DNA o veľkosti 1 500 bp (Obr. 10).



Obrázok 10: Úsek génu 16S rRNA amplifikovaný v prvom kroku PCR [59]

V príprave reakčnej zmesi bolo postupované nasledujúcim spôsobom:

- Do sterilnej skúmavky (1,5 ml) pre PCR boli postupne napipetované MasterMix, sterilná voda pre PCR a oba primery v množstve vypočítanom na daný počet vzoriek navýšenom o rezervu. Obsah skúmavky bol premiešaný na vortexe.
- Takto pripravená zmes bola následne rozpipetovaná do pripravených sterilných mikroskúmaviiek o objeme 200  $\mu$ l spojených do stripov po 8. Pipetovaný objem predstavoval 19  $\mu$ l.
- Posledný komponent zmesi tvoril 1  $\mu$ l DNA vyizolovanej zo vzorky medu. Celý obsah bol krátko premiešaný na vortexe a následne vložený do termocyklu.

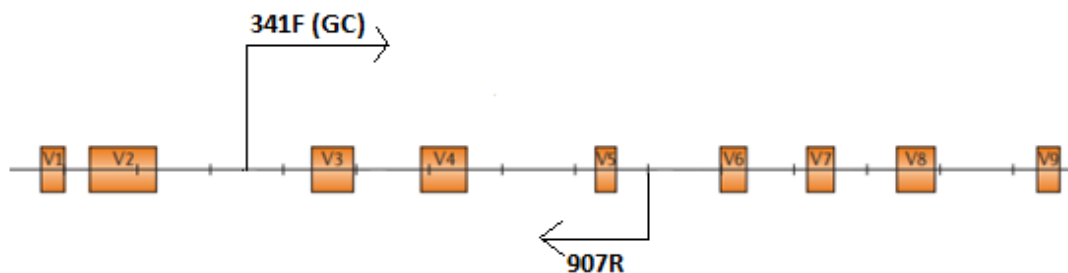
Samotná PCR prebiehala za použitia programu Touch Down, ktorého priebeh je znázornený v Tabuľke 7. Vyznačuje sa postupným znižovaním teploty nasadenia primeru na polynukleotidový reťazec, čím sa dosiahne špecifické nasadenie primerov a presné ohraničenie úseku amplifikovanej DNA.

Tabuľka 7: Teplotný a časový priebeh 1. kroku PCR

	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	95	3,0	
Denaturácia	95	0,5	10x – zníženie teploty o 0,5 °C v každom cykle
Nasadenie primerov	62	0,5	
Elongácia	72	1,5	
Denaturácia	95	0,5	25x
Nasadenie primerov	57	0,5	
Elongácia	72	1,5	
Záverečná elongácia	72	10,00	
Uchovanie	4	$\infty$	

## Druhý krok

Príprava reakčnej zmesi pre druhý krok PCR prebiehala rovnako, ako v prvej fáze. Zloženie zmesi bolo pozmenené použitím inej dvojice primerov, konkrétne 341F (GC) a 907R, ohraničujúce úsek DNA o veľkosti 560 bp (Obr. 11).



Obrázok 11: Úsek génu 16S rRNA amplifikovaný v druhom kroku PCR [59]

Zmenu v zložení reakčnej zmesi predstavovala aj DNA, kedy vyizolovaná DNA bola nahradená produktom z prvého kroku PCR. Presné zloženie reakčnej zmesi je uvedené v Tabuľke 8.

Tabuľka 8: Zloženie reakčnej zmesi pre 1. krok PCR

Zložka reakčnej zmesi	Objem zložky pre 1 vzorku [ $\mu$ l]
GoTaq® Hot Start Green MasterMix	10
Sterilná voda pre PCR	7
Primer 341F (GC)	1
Primer 907R	1
PCR produkt z 1. kroku PCR	1
<b>Spolu</b>	<b>20</b>

Po namiešaní reakčnej zmesi v sterilnom PCR boxe boli mikroskúmavky umiestnené do termocyklieru, kde za použitia upraveného programu Nested PCR prebiehala amplifikácia daného úseku. Časový priebeh a teplotný profil reakcie zobrazuje Tabuľka 9.

Tabuľka 9: Teplotný a časový priebeh 2. kroku PCR

	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	95	3,0	
Denaturácia	95	0,5	30
Nasadanie primerov	57	0,5	
Elongácia	72	1,0	
Záverečná elongácia	72	10,0	
Uchovanie	4	∞	

### Elektroforetická separácia PCR produktov

Po priebehu prvej aj druhej fázy PCR bola overená úspešnosť amplifikácie pomocou elektroforetickej separácie PCR produktov v agarózovom géle, pričom bola overovaná intenzita a dĺžka jednotlivých produktov. Pri príprave gélu sa postupovalo podľa nasledujúceho postupu:

- Keďže bol zvolený 1 % agarózový gél, bolo vypočítané potrebné množstvo surovín.
- Do Erlenmayerovej banky bolo navážené vypočítané množstvo agarózy (Lonza) a následne k nej bol pridaný 1x koncentrovaný TAE pufo (50x TAE: 2 M Tris, 0,05 M EDTA Na<sub>2</sub>, 1 M kyselina octová, všetko Sigma-Aldrich).
- Zmes bola v mikrovlnnej rúre privedená k varu, ktorý bol opakovaný, kým sa rozpustila agaróza. Číry agar bol mierne ochladený a bol k nemu pridaný ethidium-bromid (Sigma-Aldrich). Ide o interkalačné činidlo, ktoré sa inkorporuje medzi nukleotidové báze a umožňuje vizualizáciu DNA.
- Agar bol vyliaty do pripravenej horizontálnej aparatúry a bol umiestnený deliaci hrebienok. Po zatuhnutí bol hrebienok vytiahnutý a agar bol premiestnený do elektroforetickej vane s 1x koncentrovaným pufrom TAE.
- Do vytvorených jamiek v géle bolo nanosené 5 µl PCR produktu a do prvej jamky bolo pipetovaných 5 µl porovnávacieho markeru (100 bp DNA Ladder, Biolabs).
- K elektroforetickej vane bol pripojený zdroj elektrického napätia. Samotná separácia prebiehala približne 20 minút pri konštantnom elektrickom napätí 90 V.
- Po elektroforetickej separácii bol gél umiestnený do transiluminátoru, kde pod UV svetlom bol vizualizovaný a pomocou fotodokumentačného systému GeneSnap zaznamenaný.

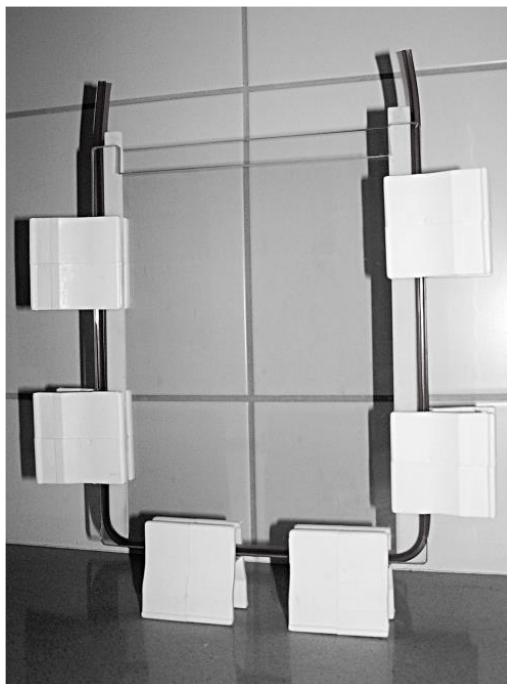
#### 6.4.5 DGGE

Podobne ako u PCR metódy, optimalizácia reakčných podmienok DGGE techniky vychádzali zo záverov prác Ing. Kučabovej a Ing. Kalouskovej a nebola predmetom tejto práce [55, 56].

##### **Zostavenie aparatury pre výrobu gélu a príprava gélu**

Správne zostavenie aparatury je dôležitým krokom v príprave gélu, keďže v prípade netesností by mohlo dôjsť k vytečeniu časti gélu a nebolo by možné správne umiestniť hrebienok. Bolo postupované v súlade s nasledujúcimi krokmi:

- K zostaveniu aparatury boli použité dva typy skiel – jedno so zaoblenými spodnými rohmi a druhé, hrubšie s výrezom o rozmeroch 17,7 x 22,0 cm. Skla boli omyté etanolom a vyleštené.
- Po obvode užšieho skla bolo natiiahnuté tesnenie do tvaru písmena U tak, že horná hrana zostala bez tesnenia. Medzi skla boli umiestnené vymedzovače, tzv. spacers zaistujúce vytvorenie priestoru medzi sklami.
- Po obvode boli sklá zaistené svorkami a celá aparatura bola uvedená do vertikálnej polohy (Obr. 12).



Obrázok 12: Správne zostavená aparatura na DGGE gél [55]

- Gél bol pripravený z dvoch denaturačných roztokov, každý obsahujúci inú koncentráciu denaturačných činidiel (formamid a močovina). Keďže najlepšie rozlíšenie gélu poskytovalo zloženie denaturačných roztokov v pomere 70 : 30, bol použitý práve tento pomer.
- Boli pripravené dve skúmavky o objeme 50 ml, jedna bola označená ako „A“, obsahujúca vyššiu koncentráciu denaturačných činidiel a druhá, označená „B“, obsahujúca nižšiu koncentráciu denaturačných činidiel. Do oboch skúmaviek bolo odmerané 15 ml zásobného denaturačného roztoku s príslušnou koncentráciou činidiel a následne boli pridané polymeračné činidlá APS (10 %) 104,4  $\mu$ l a TEMED 6,5  $\mu$ l (Sigma-Aldrich).
- Obsah skúmaviek bol dôkladne premiešaný tak, aby na povrchu zmesi nevznikali výrazné bubliny.
- Koncentračný gradient denaturačných činidiel v géle bol zaistený pomocou plniaceho systému, ktorého súčasťou bol tzv. marker gradientu a miniperistaltická pumpa.
- Celá aparátúra bola premytá destilovanou vodou a bola overená funkčnosť pumpy a priechodnosť všetkých súčastí.
- Do markeru gradientu boli naliate oba roztoky, do pravej časti roztok A a do ľavej časti roztok B. Po zapnutí peristaltickej pumpy, otvorení ventilov a umiestnenia ihly medzi sklá pripravenej aparátúry, bol dávkovaný gél medzi sklá. Následne bol umiestnený deliaci hrebienok s 16 alebo 22 zubmi a gél tuhol približne 1 hodinu.
- Celá aparátúra bola dôkladne premytá destilovanou vodou.

### **Elektroforetická separácia a spracovanie DGGE gélu po separácii**

Vlastná elektroforetická separácia prebiehala v elektroforetickom tanku, kde boli umiestnené sklá s DGGE gélom pripraveným postupom uvedeným vyššie.

- Elektroforetický tank bol naplnený 1x TAE pufrom a vyhriaty na 60 °C. Zo skiel, medzi ktorými bol pripravený gél, boli odstránené svorky a aparátúra bola umiestnená do pufru.
- Po odstránení deliaceho hrebienku boli jamky za pomoci pipety a špičky vymyté pufrom, čím boli odstránené zvyšky denaturačného roztoku, ktoré neboli zadržané v géle.

- Do jamiek bolo nanosené 8  $\mu$ l PCR produktu, pričom prvá jamka vždy obsahovala marker Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder o rovnakom objeme.
- Po zapojení aparatury k zdroju elektrického napätia, prebiehala elektroforéza pri napätí 90 V po dobu 900 minút.
- Po ukončení elektroforézy bola aparatura vybraná z pufri, opatrne bolo odstránené jedno zo skiel a gél bol premiestnený do farbiaceho kúpeľa, zloženého z 350 ml 1x koncentrovaného pufri TAE a 35  $\mu$ l interkalačného farbiva GelRed (Biotium). Farbenie prebiehalo za mierneho trepania jednu hodinu.
- Následne bol gél opatrne premiestnený do transiluminátoru, kde bol pod UV svetlom vizualizovaný a vyfotený pomocou fotodokumentačného systému GeneSnap.

### **Spracovanie produktov DGGE – reamplifikácia a purifikácia**

Vizualizácia DGGE gélu prináša informácie o bakteriálnej diverzite daného vzorku, aby však mohli byť jednotlivé mikroorganizmy identifikované, bolo potrebné jednotlivé bandy spracovať a zaslať na sekvenčnú analýzu.

- Jednotlivé bandy na géle boli označené, skalpelom vyrezané a prenesené do sterilných mikroskúmaviek o objeme 1,5 ml. Následne bolo pridané 200  $\mu$ l sterilnej vody pre PCR a sterilné sklenené guľičky.
- Obsah skúmavky bol krátko premiešaný na vortexe a vzorky boli následne inkubované pri teplote 4 °C do druhého dňa, čím sa zabezpečil prechod DNA z gélu do roztoku.
- Reamplifikácia prebiehala rovnako ako druhý krok PCR (Kap. 6.4.4.). Tentokrát bol použitý primer 341F bez GC svorky a ako templát bolo použité 1  $\mu$ l DNA z gélu.
- Po amplifikácii pomocou PCR techniky boli vzorky elektroforeticky separované na 2 % agarózovom géle (Kap. 6.4.4.), z ktorého boli následne vyrezané a purifikované.
- K purifikácii vyrezaných produktov z gélu bola použitá komerčná súprava High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE).
- Vyrezaný PCR produkt bol prenesený do 1,5 ml skúmavky a bolo k nemu pridaných 300  $\mu$ l Binding Bufferu. Zmes bola premiešaná a inkubovaná pri 56 °C do úplného rozpustenia agarózy.
- K zmesi bolo pridané 150  $\mu$ l isopropanolu. Po premiešaní na vortexe bol roztok prepipetovaný do kolónky so silikátovou membránou a centrifugovaný 0,5 minúty pri 13 000 rpm. Týmto krokom bola DNA naviazaná na membránu.



- Do kolónky bolo napipetované 500  $\mu\text{l}$  Wash Bufferu a zmes bola opäť centrifugovaná 1 minútu pri 13 000 rpm.
- Kolónka bol premiestnená do sterilnej mikroskúmavky o objeme 1,5 ml a membrána bola prevrstvená 30  $\mu\text{l}$  Elution Buffer, zahriatym na 70 °C.
- Obsah bol centrifugovaný 1 minútu pri 13 000 rpm, čím došlo k uvoľnení DNA z membrány do pufu.

#### **6.4.6 Sekvenčná analýza a identifikácia mikroorganizmov**

Purifikované produkty o objeme 7,75  $\mu\text{l}$  boli v PCR skúmavkách zmiešané s 1,25  $\mu\text{l}$  primeru 341F (bez GC svorky) o koncentrácii 20  $\mu\text{M}$ . Takto upravené vzorky boli následne zaslané na sekvenáciu do firmy SEQme s.r.o., kde zistené nukleotidové sekvencie DGGE produktov boli porovnané so známymi sekvenciami v databáze BLAST (z anglického „Basic Local Alignment Search Tool“). Na základe podobnosti jednotlivých sekvencií bol mikroorganizmus identifikovaný a zároveň bolo určené percento spoľahlivosti identifikácie, tzv. identifikačné skóre.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUSIA

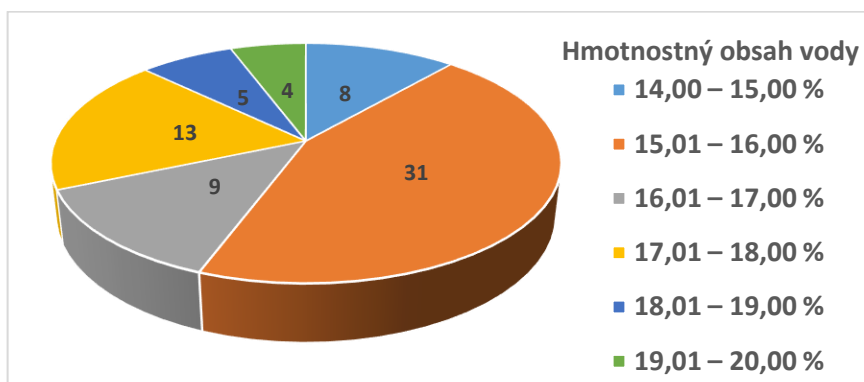
### 7.1 Stanovenie obsahu vody

Obsah vody je veľmi dôležitým parametrom medu súvisiaci s kvalitou medu, nakoľko ovplyvňuje jednak senzorické vlastnosti, ale aj skladovanie a spracovanie medu. Nízky obsah vody priamo súvisí s jeho antimikrobiálnou aktivitou, nakoľko sa tak vytvára nepriaznivé prostredie pre rast a rozmnožovanie mikroorganizmov (Kap. 2) [1, 13]. V priebehu analýzy bol pomocou ručného refraktometru stanovený obsah vody vo vzorkách medu. Výsledky sú prehľadne zobrazené v Tabuľke 10.

Tabuľka 10: Nameraný obsah vody vo vzorkách medu

Č. vzorky	Obsah vody (%)	Č. vzorky	Obsah vody (%)	Č. vzorky	Obsah vody (%)	Č. vzorky	Obsah vody (%)
1	15,0	19	14,9	37	17,2	55	15,0
2	15,5	20	15,8	38	16,6	56	16,8
3	15,5	21	15,8	39	17,7	57	15,7
4	14,6	22	17,5	40	15,4	58	18,0
5	15,2	23	16,0	41	16,7	59	14,4
6	16,2	24	14,6	42	16,6	60	16,0
7	18,0	25	18,1	43	16,5	61	16,0
8	19,0	26	17,2	44	17,1	62	17,4
9	15,3	27	15,6	45	15,8	63	16,0
10	15,0	28	16,9	46	15,1	64	15,5
11	15,3	29	15,9	47	15,4	65	16,1
12	17,4	30	16,0	48	17,0	66	16,0
13	18,1	31	19,1	49	14,0	67	18,1
14	15,5	32	17,2	50	19,1	68	15,4
15	16,9	33	15,5	51	15,4	69	19,8
16	15,7	34	15,5	52	15,8	70	19,7
17	18,4	35	15,2	53	17,5		
18	17,5	36	15,7	54	16,0		

Výsledky merania boli porovnávané s hodnotou pre obsah hmotnostného percenta vody danou Vyhláškou č.41/2012 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky o mede [6], ktorá jasne stanovuje maximálny obsah hmotnostného percenta vody v mede, ktorý nesmie prekročiť hodnotu 20 %. Možno zhodnotiť, že tak ako vzorky pochádzajúce od malých a stredných včelárov, tak vzorky komerčne dostupných medov vyhoveľi požiadavke na maximálnu prípustnú hodnotu. Hodnoty obsahu vody sa pohybovali v rozmedzí od 14,0 (vzorka 49 – komerčný med Kréta) do 19,8 (vzorka 69 – Podhorie, SR), pričom až 31 vzoriek malo obsah vody v rozmedzí 15,01 – 16 % (Obr. 13).



Obrázok 13: Rozdelenie vzoriek podľa obsahu vody

U piatich medov (vzorka 8, 31, 50, 69 a 70) bol obsah vody najvyšší, a to v rozmedzí 19 – 19,8. U vzoriek medu č.69 (Podhorie, SR) a č. 70 (Podhorie, SR) bola badateľná aj zhoršená senzorická akosť, ktorá síce nebola predmetom záujmu tejto práce, ale pri nanášaní vzoriek bola zaznamenaná výrazne senzoricky nepríjemná vôňa. Po ochutnaní mal med senzoricky nepríjemnú kyslú chuť. Oba medy patrili medzi vzorky s najvyšším obsahom vody – vzorka 69 s obsahom 19,8 a vzorka 70 s hodnotou 19,7. Možno preto predpokladať, že ich kvalita mohla byť zhoršená činnosťou kvasiniek produkujúcich kyslé metabolity premenou sacharidov.



Obrázok 14: Vzorky s najvyšším obsahom vody

## 7.2 Stanovenie mikrobiálnej diverzity metódou DGGE

### 7.2.1 Optimalizácia metódy izolácie DNA a izolácia DNA zo vzorky

Prvým a veľmi dôležitým krokom v ceste smerujúcej k stanoveniu mikrobiálnej diverzity pomocou metódy DGGE bolo nájsť vhodný postup, akým bude izolovaná DNA zo vzoriek medu. Boli otestované celkovo štyri metódy, ktorých vhodnosť bola overená stanovením koncentrácie DNA vo vzorke (Tab.11).

Tabuľka 11: Overenie metód izolácie DNA stanovením koncentrácie DNA

Metóda izolácie DNA	1	2	3	4
Koncentrácia DNA [ng/μl]	0,083	0,026	0,968	4,28

Ako možno vyčítať z výsledkov stanovenia, prvé tri metódy neposkytli uspokojivú výťažnosť získanej koncentrácie DNA. V prípade týchto metód bola izolácia založená na priamom použití komerčnej súpravy určenej pre potraviny, čo sa však nepreukázalo ako vhodný postup. Príčinou týchto neuspokojivých výsledkov mohla byť nedostatočná eliminácia sacharidov. Preto v štvrtom postupe samotnej izolácii pomocou komerčného kitu predchádzalo rozpustenie vzorky medu vo vode a jej rozdelenie na organickú peletku a supernatant. Vďaka inkubácii a intenzívnemu trepaniu vzoriek došlo k extrakcii sacharidov a vo vode rozpustných látok, ktoré boli po centrifugácii odstránené v podobe supernatantu. Druhá časť usadená na dne skúmavky, peletka, obsahovala peľový zvyšok predstavujúci mikrobiálnu biomasu. Tento medzikrok bol, na základe získanej koncentrácie genetickej informácie zo vzorky (Tab. 11), posúdený ako vhodný. Peletka bola ďalej spracovaná postupom popísaným v kapitole 6.4.2.

Úspešnosť izolácie u všetkých 70 vzoriek bola overená opäť pomocou stanovenia koncentrácie DNA, ktorej hodnoty sú prehľadne uvedené v tabuľke 12. Po overení koncentrácie DNA izolovanej zo vzoriek bola v prípade 17 vzoriek dosiahnutá neuspokojivá hodnota (0 – 0,5 ng/μl) a izolácia bola u nich zopakovaná. Príčinou neuspokojivých výsledkov bolo pravdepodobne nedostatočné tesnenie uzáveru skúmavky, v ktorej prebiehalo trepanie a inkubácia vzorky pri 60 °C, čím došlo k vytečeniu obsahu vzorky, a tým k zmenšeniu organickej peletky. Keďže ani po utesnení pomocou parafilmu nedošlo k zlepšeniu, boli použité iné skúmavky, čím sa podarilo u 15 vzoriek problém odstrániť.

Napriek tomu sa však u vzoriek 70 (Podhorie – obsah vody 19,7 – koncentrácia DNA 0,44), 41 (Vápenice – obsah vody 16,7 – koncentrácia DNA 0,24) a 49 (Podhorie – obsah vody 14,0 – koncentrácia DNA 0,08) nepodarilo ani na tretí pokus izolovať DNA v dostatočnej koncentrácii. Príčinou by mohla byť napríklad prítomnosť inhibítorov v mede, ktoré môžu ovplyvňovať enzymatické reakcie v priebehu protokolu alebo znemožňujú naviazanie DNA na membránu v posledných krokoch izolácie. Jednými z takýchto látok sú aj polyfenoly, ktoré sú silnými oxidačnými činidlami a môžu znížiť výťažok a čistotu extrahovanej DNA [60].

Tabuľka 12: Namerané hodnoty koncentrácie izolovanej DNA

Č. vzorky	Koncentrácia DNA [ng/μl]	Č. vzorky	Koncentrácia DNA [ng/μl]	Č. vzorky	Koncentrácia DNA [ng/μl]	Č. vzorky	Koncentrácia DNA [ng/μl]
1	6,71	19	7,12	37	4,27	55	1,31
2	12,40*	20	1,77	38	3,93	56	1,39
3	7,45	21	3,07	39	1,10	57	0,88*
4	9,29	22	3,09	40	18,70*	58	0,68*
5	0,62*	23	6,18	41	0,24*	59	2,66
6	12,30*	24	1,97	42	3,29	60	0,95*
7	6,20	25	5,13	43	1,35	61	1,53
8	4,55	26	4,47	44	0,77*	62	6,80
9	4,20	27	3,43	45	3,12	63	1,21
10	1,12	28	4,52	46	5,51	64	8,44
11	1,45	29	10,10*	47	15,20*	65	5,12
12	2,79	30	3,45	48	3,63	66	2,82
13	9,51	31	1,62	49	0,08*	67	1,77
14	13,40*	32	2,93	50	7,85	68	4,94
15	3,70	33	5,33	51	2,57	69	3,57
16	7,37	34	4,64	52	7,61	70	0,44*
17	0,71*	35	1,33	53	4,03		
18	4,07	36	7,58	54	23,60*		

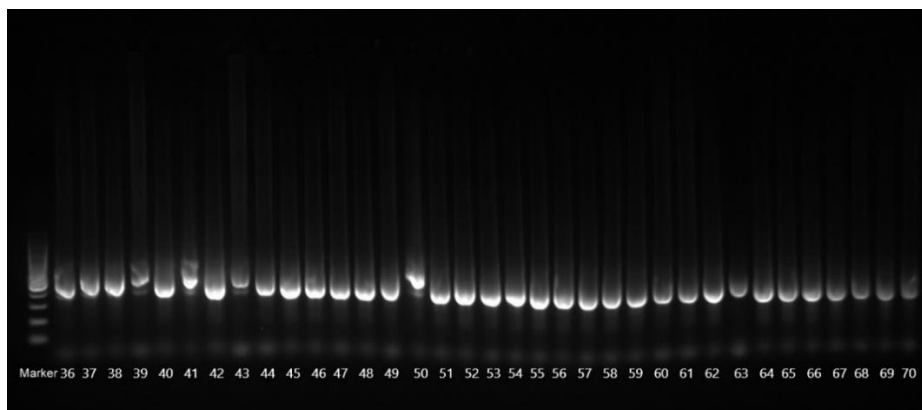
\* bledým odtieňom šedej zvýraznené hodnoty  $\leq 1$ , tmavým odtieňom šedej zvýraznené hodnoty  $\geq 10$

### 7.2.2 PCR

Na základe výsledkov izolácie DNA bola zhodnotená úspešnosť izolácie ako optimálna a vyhovujúca pre ďalšie analýzy pomocou molekulárne-genetických metód. Ďalším krokom pred analýzou vzoriek pomocou metódy DGGE bolo preto zmnoženie úseku DNA. Amplifikácia úseku genetickej informácie každej vzorky prebiehala vždy v dvoch krokoch (Kap. 6.4.4.).

V prvom kroku PCR bola dosiahnutá amplifikácia génu pre 16S rRNA, gén kódujúci ribozomálnu RNA v malej ribozomálnej podjednotke. Ako už bolo uvedené (Kap. 4.1.2.), tento gén je vďaka univerzálnosti a vhodnej veľkosti, považovaný za univerzálny fylogenetický marker umožňujúci identifikáciu mikroorganizmov na úrovni druhu až rodu [42, 47]. Vďaka ohraničeniu tohto úseku génu použitými primerami FD1 a RD1, boli amplifikáciou získané fragmenty o veľkosti približne 1 500 bp.

Podobne bola realizovaná aj druhá fáza PCR. V tomto prípade boli zvolené primery 341F (GC) a 907R ohraničujúce fragment o veľkosti približne 560 bp. PCR produkty boli nanášané na agarózový gél, elektroforeticky separované a vizualizované pomocou farbiva a UV žiarenia (Obr. 15).

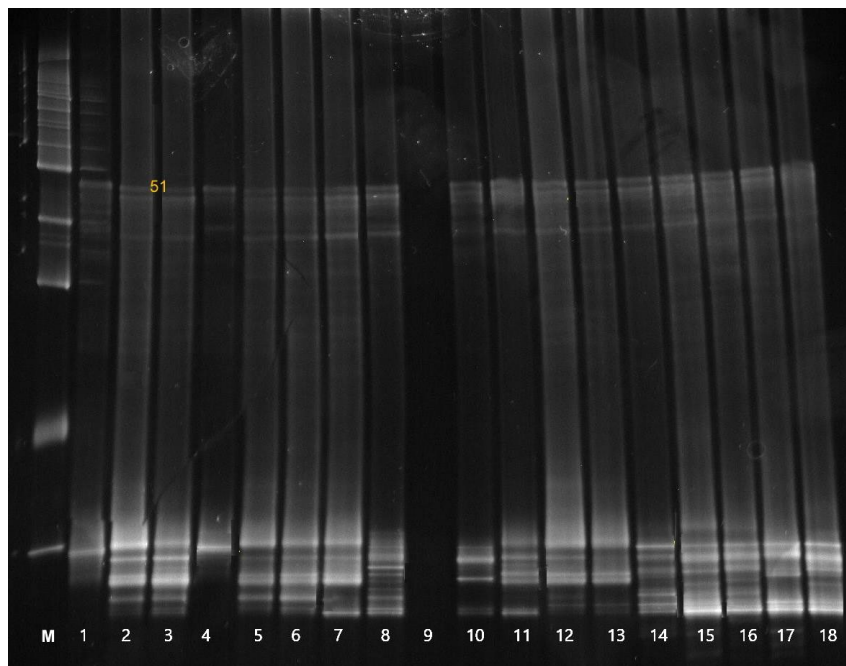


Obrázok 15: Druhá fáza PCR

Na obrázku 15, ktorý zobrazuje druhý krok PCR je možné pozorovať, že fragmenty naozaj odpovedajú požadovanej veľkosti (560 bp). Veľkosť bola pritom porovnávaná s markerom (Marker-Quick-Load 100bp DN Ladder, Biolabs) naneseným do prvej jamky na géle. O úspešnosti amplifikácie, ktorá je vyjadrená koncentráciou amplifikovanej DNA, vypovedala dostatočná intenzita bandov. Možno tak konštatovať, že obe fázy poskytli PCR produkty o požadovanej veľkosti a uspokojivej koncentrácii.

### 7.2.3 DGGE a Sekvenčná analýza

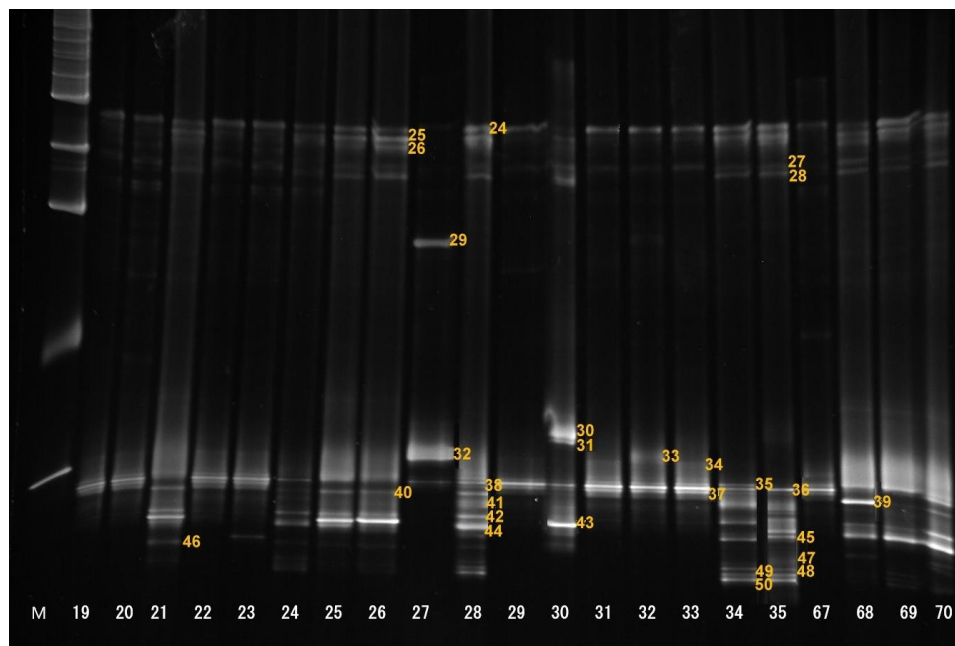
Úspešný priebeh amplifikácie pomocou PCR dal predpoklad pre následné stanovenie mikrobiálnej diverzity vzoriek medzi pomocou metódy DGGE. Ako už bolo uvedené (Kap. 4.1.2.), výsledkom techniky DGGE je odtlačok mikrobiálnej komunity prostredia, z ktorej bola izolovaná DNA. Princípom je zastavenie pohybujúceho sa fragmentu DNA v polyakrylamidovom géle v dôsledku jeho denaturácie vplyvom denaturačných činidiel vytvárajúcich lineárny gradient [40]. Keďže metóda DGGE poskytuje len informáciu o diverzite mikroorganizmov vo vzorkách, k identifikácii jednotlivých druhov mikroorganizmov bolo nutné spracovať bandy (Kap. 6.4.5.) a jednotlivé signály sekvenovať. Obrázky 16 až 19 znázorňujú mikrobiálnu diverzitu u 70 vzoriek medzi. Ako možno vidieť, počet izolovaných bandov bol vzhľadom na rozsah analyzovaného súboru veľmi rozsiahly. Opakujúce sa bandy rôznych vzoriek na rôznych géloch boli tak izolované len jeden krát.



Obrázok 16: DGGE gél 1 s vyznačenými bandami

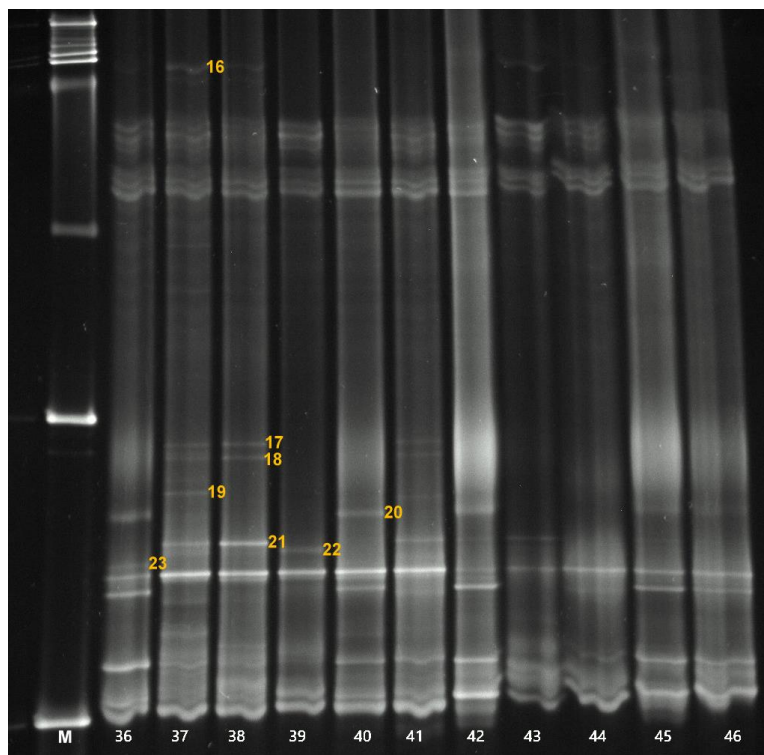
M: marker, 1 – 18: vzorky medzi č. 1 – 18, žltou farbou vyznačené vyrezané bandy

Na Obrázku 16 u vzorky č. 1 možno vidieť veľký počet veľmi špecifických bandov, ktoré u iných vzoriek nie sú detekované. Keďže jednotlivé fragmenty presne odpovedajú bandom markeru, príčinou je pravdepodobne nepresnosť pri nanášaní markeru do prvej jamky, čím došlo k jeho difundovaniu do dráhy vzorky č. 1.



Obrázok 17: DGGE gél 2 s vyznačenými bandami

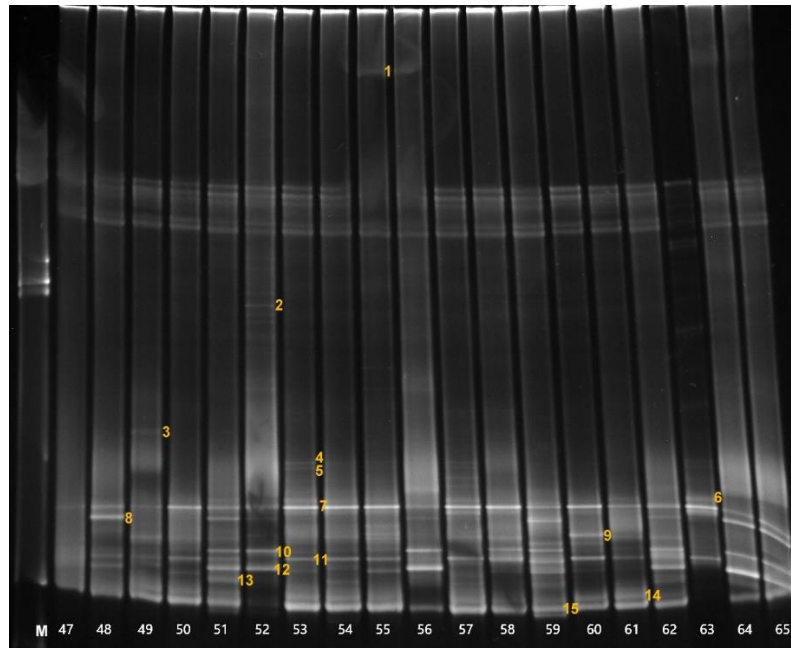
M: marker, 19 – 35 a 67 – 70: vzorky medu č. 19 – 35 a 67 – 70, žltou farbou vyznačené vyrezané bandy



Obrázok 18: DGGE gél 3 s vyznačenými bandami

M: marker, 36 – 46: vzorky medu č. 36 – 46, žltou farbou vyznačené vyrezané bandy

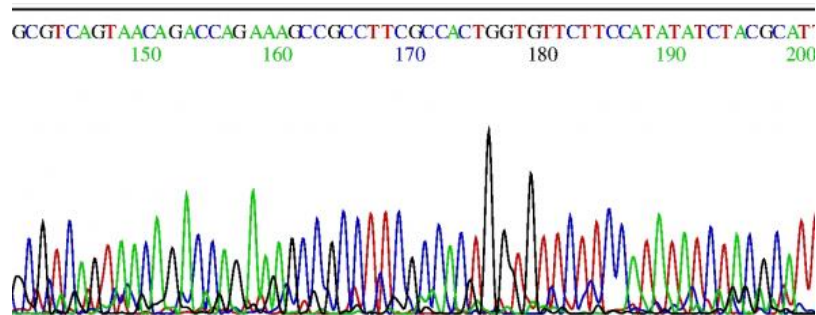




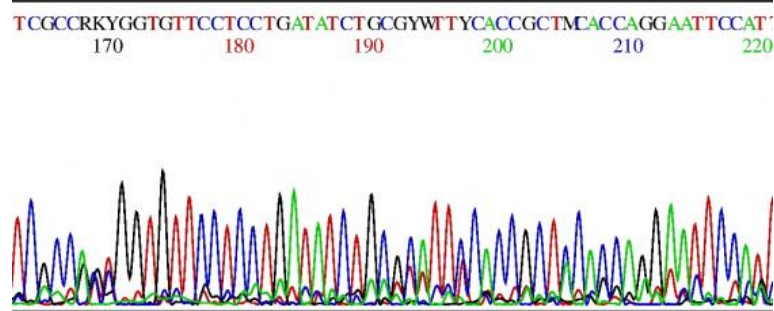
Obrázok 19: DGGE gél 4 s vyznačenými bandami

M: marker, 47 – 65: vzorky medu č. 47 – 65, žltou farbou vyznačené vyrezané bandy

Zo štyroch polyakrylamidových DGGE gélov bolo celkovo vyrezaných a izolovaných 51 bandov, ktoré boli reamplifikované v súlade s postupom bližšie popísaným v Kapitole 6.4.5. a zaslané na sekvenáciu do firmy SEQme s.r.o. Niektoré zo získaných sekvencií boli opravené na základe posúdenia chromatogramu v programe DNA Baser Assembler, umožňujúci opravovať chybné prečítané bázy, vkladať chýbajúce bázy a mazať nečitateľné časti záznamu. Upravené sekvencie boli potom vložené do databázy BLAST, kde na základe podobnosti alebo zhodnosti so známymi sekvenciami bol identifikovaný mikroorganizmus a následne bolo určené identifikačné skóre. Celkovo bolo identifikovaných 40 bandov, z toho u 10-tich bolo potrebné opravovať sekvenciu nukleotidov. V prípade 11-tich bandov sa nepodarilo realizovať opravu alebo neboli nájdené príbuzné mikroorganizmy.



Obrázok 20: Správna sekvencia neopravovaná – band č. 2  
– *Lactobacillus kunkei*



Obrázok 21: Nesprávna sekvencia opravovaná – band č. 48  
– *Cultibacterium acnes*

Výsledky identifikácie mikroorganizmov na základe sekvenčnej analýzy sú prehľadne zobrazené v Tabuľke 13. Názvy mikroorganizmov presne korešponujú s výsledkami sekvenácie. Väčšina signálov bola identifikovaná na úrovni druhu, niekoľko signálov na géle bolo identifikovaných len na úrovni rodu.

Viacere bandy izolované z DGGE gélu poskytujú tiež zmiešané kultúry. Zvlášť zjavné je to napríklad u signálu S1, kde bolo identifikovaných hneď niekoľko zástupcov rodu *Lactobacillus*. Rovnako signál S9 obsahoval zmiešanie rodu *Enterococcus* – *Enterococcus italicus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus hirae* a *Enterococcus faecalis*. Vzhľadom na to, že tieto druhy sú si navzájom veľmi podobné a v sekvencii sa vzájomne výrazne nelíšia, nebolo možné zástupcu jednoznačne určiť.

Celkovo bolo izolovaných a identifikovaných 33 druhov vegetatívnych foriem baktérií, ktoré najčastejšie pochádzali z tráviaceho ústrojenstva včely, nektáru alebo úľového prostredia. Med je pritom uvádzaný ako potravina, v ktorej sa vyskytuje minimum mikroorganizmov. Dalo by sa však uvažovať, že kultivačné analýzy mikrobiálnej diverzity medu by neprinesli tak rozsiahle mikrobiálne zastúpenie. Vzhľadom na citlivosť metódy DGGE oproti kultivačným metódam sa preto dala očakávať obsiahlejšia mikroflóra [10, 23, 29].

Tabuľka 13: Identifikácia mikroorganizmov prítomných vo vzorkách medu

Identifikovaný mikroorganizmus	Signál na géle (S) a identifikačné skóre (%)
<i>Lactococcus lacti subsp. lactis</i>	S3 (91,41 %); S4 (100,00 %); S5 (100,00 %); S6 (98,48 %); S7 (98,29 %); S17 (85,24 %); S18 (84,09 %); S19 (100,00 %); S21 (83,87 %); S24 (86,39 %); S32 (90,74 %); S33 (97,73 %); S34 (96,78 %); S36 (91,27 %); S37 (94,78 %)
<i>Lactococcus lacti subsp. tructae</i>	S3 (91,84 %); S (90,23 %)
<i>Lactococcus lacis subsp. cremoris</i>	S32 (90,47 %); S33 (97,54 %); S35 (90,23%)
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i>	S17 (85,24 %)
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	S2 (95,80 %); S27 (92,08 %); S29 (90,81 %)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	S1 (100,00 %)
<i>Lactobacillus casei</i>	S1 (100,00 %)
<i>Lactobacillus parabrevis</i>	S1 (100,00 %)
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	S1 (100,00 %)
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	S22 (73,12 %)
<i>Acetobacteraceae bacterium</i>	S8 (89,04 %); S10 (93,22 %); S12 (90,89 %); S38 (82,94 %); S42 (95,23 %); S44 (93,91 %); S46 (100,00 %)
<i>Commensalibacter sp.</i>	S8 (88,85 %); S38 (82,94 %); S39 (95,57 %)
<i>Cultibacterium acnes</i>	S14 (100,00 %); S48 (100,00 %); S49 (93,74 %)
<i>Parasaccharibacter apium</i>	S10 (93,22 %); S42 (95,23 %); S44 (93,91 %)
<i>Propionibacterium acnes</i>	S14 (100,00 %); S15 (100,00 %); S48 (100,00 %); S49 (93,74 %); S50 (88,11 %)
<i>Paludisphaera boealis</i>	S11 (100,00 %)
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	S21 (83,90 %)
<i>Niveispirillum sp.</i>	S28 (100,00 %)
<i>Weisseilla viridescens</i>	S28 (100,00 %)
<i>Saccharibacter floricola</i>	S42 (95,23 %); S44 (93,91 %)
<i>Bombella intestini</i>	S10 (93,22 %); S12 (90,89 %)
<i>Bombella apis</i>	S10 (93,22 %); S42 (95,23 %); S44 (93,91 %)
<i>Paraclostridium bifermentans</i>	S25 (85,00 %)
<i>Paraclostridium benzoelyticum</i>	S25 (85,00 %)
<i>Enterococcus italicus</i>	S9 (86,83 %)
<i>Enterobacter cloacae</i>	S9 (86,80 %)
<i>Enterococcus hirae</i>	S9 (86,44 %)
<i>Enterococcus faecalis</i>	S9 (86,59 %)
<i>Streptococcus mutans</i>	S19 (100,00 %)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S23 (88,64 %)
<i>Staphylococcus caprae</i>	S23 (88,43 %)
<i>Staphylococcus aureus</i>	S51 (84,28 %)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	S51 (84,28 %)

Na základe výsledkov je zjavné, že prevažná väčšina izolovaných a identifikovaných mikroorganizmov zo vzoriek medu bola tvorená mikroorganizmami rodu *Lactococcus*, konkrétne *Lactococcus lacti subsp. lactis*, *Lactococcus lacti subsp. tructae* a *Lactococcus lacis subsp. cremoris*. V priebehu analýzy boli tiež izolovaní a následne sekvenáciou potvrdení zástupcovia rodu *Lactobacillus*, konkrétne *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus parabrevis*. V oboch prípadoch sa jedná o nepatogénne baktérie mliečneho kvasenia, tvoriace prirodzenú súčasť nektáru. Medzi baktérie mliečneho kvasenia patria aj vo vzorkách potvrdené identifikované druhy rodu *Enterococcus*, druhy *Enterococcus italicus*, *Enterococcus hirae* a *Enterococcus faecalis* [23].

Jedným zo zdrojov primárnej kontaminácie medu je aj pôda a vzduch v okolí úľu. Práve pôda je prostredím, kde sa prirodzene vyskytujú bakteriálne druhy *Brevibacillus borstelensis* a *Brevibacillus parabrevis*. Keďže ide o sporulujúce baktérie, možno očakávať ich výskyt nielen vo vegetatívnej forme, ale aj vo forme spór.

Medzi sporulujúce baktérie patria tiež vo vzorkách potvrdení zástupcovia rodu *Paraclostridium* – *Paraclostridium bifermentalis* a *Paraclostridium benzoelyticum*.

Zástupcovia sporulujúceho druhu *Clostridium botulinum* neboli vo vzorkách potvrdení.

Ďalšia veľká skupina bola tvorená baktériami, ktoré tvoria prirodzenú súčasť tráviaceho ústrojenstva včely. Jeden zo zástupcov tejto skupiny je aj *Streptococcus mutans*, ktorý v ústnej dutine ľudí prispieva k rozvoji zubného kazu, nakoľko metabolizuje cukry za tvorby organických kyselín. Taktiež boli izolované baktérie *Bombella apis* a *Bombella intestini*, ktoré sa do medu dostávajú pravdepodobne prostredníctvom výlučkov včiel. Baktérie rodu *Acetobacteraceae* sú symbiotické baktérie veľkého množstva hmyzu, najčastejšie izolované z čreva, ale aj zo slinných žliaz a reprodukčných tkanív. Veľmi úzko súvisia s rodom *Saccharibacter*, nakoľko častokrát bývajú spoločne izolované z vnútorností včiel. V analýze bol potvrdený druh *Saccharibacter floricola*, ktorý tento fakt potvrdzuje, aj keď zdrojom tohto druhu by mohol byť aj peľ. Taktiež druhy *Parasaccharibacter apium* a *Propionibacterium acnes* tvoria prirodzenú črevnú mikroflóru včely [10, 23, 61].

Vo vzorkách boli taktiež potvrdené koliformné baktérie rodu *Enterobacter*. Bol izolovaný jediný zástupca tohto rodu – *Enterobacter cloacae*. Koliformné baktérie indikujú environmentálnu a fekálnu kontamináciu medu, aj keď v praxi možno ich výskyt pripísať skôr kontaminácii z hmyzu, poprípade nedostatočnej hygiene pri spracovaní medu [34].

Izolácia zástupcov rodu *Staphylococcus* – *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus caprae* a *Staphylococcus aureus* poukazuje na sekundárnu kontamináciu medu, keďže spravidla neprežívajú medobranie a do medu sa tak dostali napríklad nevhodnou manipuláciou s medom [34].

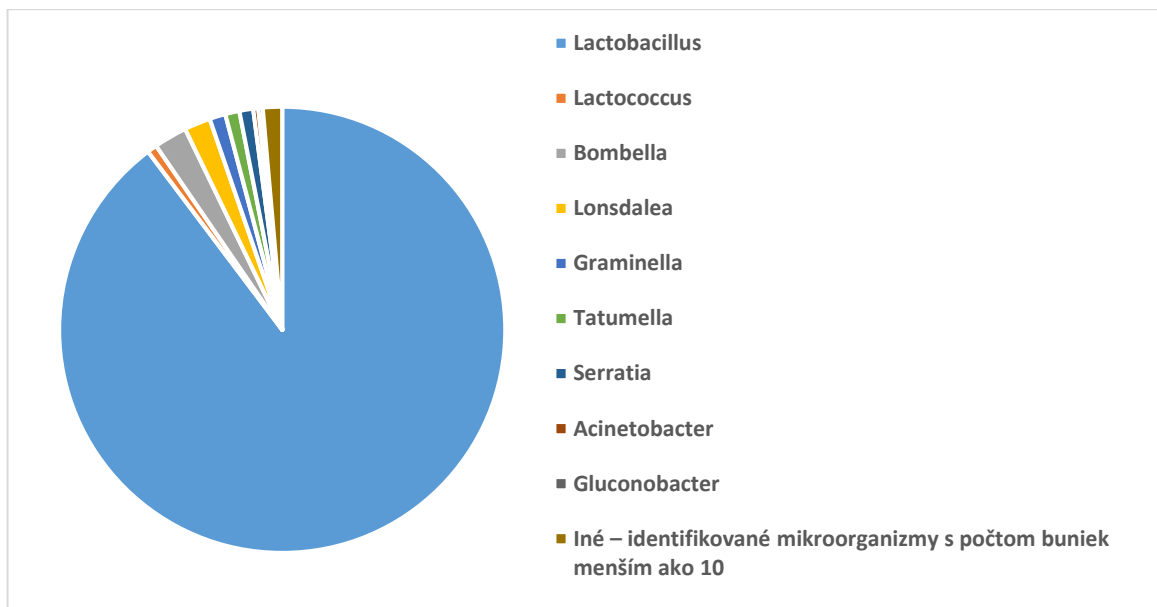
Pre porovnanie získaných výsledkov bola identifikácia urobená aj metódou NGS. Ako už bolo uvedené (Kap. 4.1.3), táto metóda umožňuje rýchlu analýzu veľkého rozsahu DNA, čím je umožnené sekvenovanie tisícov až miliónov sekvencií naraz. Táto metóda sekvenovania novej generácie je v porovnaní s klasickými metódami citlivejšia a rýchlejšia, nevýhodou je však vyššia cena. Výhoda spočíva aj v stanovení kvantity mikroorganizmov, vyjadrená počtom vegetatívnych buniek. Z dôvodu vyššej ceny analýzy bola zaslaná na sekvenčnú analýzu pre porovnanie len jedna vybraná vzorka medu, konkrétne vzorka č. 3 (Nimnica-Salaš – obsah vody 15,5 – koncentrácia DNA 7,45). Výsledky identifikácie sú prehľadne zobrazené v Tabuľke 14.

Tabuľka 14: Identifikácia mikroorganizmov vo vzorke č. 3 pomocou NGS

Druh identifikovaného mikroorganizmu	Počet buniek
<i>Lactococcus</i>	1
<i>Lactococcus</i>	27
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	3406
<i>Lactobacillus kullabergensis</i>	3
<i>Enterococcus faecium</i>	1
<i>Bombella</i>	91
<i>Lonsdalea quercina</i>	72
<i>Graminella nigrifrons</i>	44
<i>Tatumella saanichensis</i>	39
<i>Serratia symbiotica</i>	38
<i>Undibacterium</i>	4
<i>Acinetobacter</i>	14
<i>Acidovorax</i>	1
<i>Gluconobacter cerinus</i>	12
<i>Asaia platycodi</i>	9
<i>Snodgrassella alvi</i>	7
<i>Staphylococcus</i>	2
<i>Bombella intestini</i>	6
<i>Acinetobacter apis</i>	5
<i>Roseburia</i>	5
<i>Sphingomonas</i>	1
<i>Serratia</i>	3
<i>Prevotella</i>	1
<i>Fructobacillus fructosus</i>	2
<i>Commensalibacter apis</i>	2

Metóda potvrdila majoritné zastúpenie baktérii rodu *Lactobacillus*, najmä druh *Lactobacillus kunkeei*. Z najviac zastúpených možno tiež uviesť druhy *Bombella*, *Lonsdalea quercina*, *Graminella nigrifrons*, *Tatumella saanichensis*, *Serratia symbiotica* a *Lactococcus*.

Výsledky identifikácie mikroorganizmov pomocou metódy NGS boli následne graficky znázornené (Obr. 22).



Obrázok 22: Grafické zastúpenie mikroorganizmov vo vzorke č. 3 identifikovaných pomocou NGS

Z výsledkov možno usúdiť, že obe metódy potvrdili podobné výsledky mikrobiálnej diverzity vo vzorkách medu, aj keď zástupcovia rodu *Serratia*, *Gluconobacter*, *Roseburia* a *Sphingomonas* metódou DGGE neboli zachytení.

Pri porovnaní medov pochádzajúcich od malých a stredných včelárov a medov komerčných neboli pozorované viditeľné rozdiely v zastúpení mikroorganizmov.

## ZÁVER

Táto diplomová práca poskytuje prehľadnú literárnu rešerš zameranú predovšetkým na antimikrobiálnu aktivitu medu, prehľad mikroorganizmov v mede a možnosti ich stanovenia, so zameraním na molekulárne-genetické metódy, predovšetkým metódu denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy. Zameraním práce bolo sledovanie diverzity mikroflóry v mede v 65 vzorkách medu zozbieraných od malých a stredných včelárov predovšetkým z územia Slovenskej republiky a v 5 vzorkách komerčných medov. K analýze bola využitá fingerprintová metóda denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy, poskytujúca obraz mikrobiálnej komunity v mede. Záverom možno zhodnotiť nasledujúce výsledky:

- Všetky vzorky medu vyhoveli legislatívnej požiadavke na hmotnostný obsah vody (do 20 %), s primernou hodnotou 16,4 %. Hodnoty hmotnostného obsahu vody sa pohybovali v rozmedzí 14,0 – 19,8 %, pričom u dvoch vzoriek s najvyššou hodnotou bolo zistené zhoršenie sensorických vlastností, pravdepodobne v dôsledku rozvíjajúcej sa činnosti kvasiniek.
- Metódou DGGE bolo zachytených 33 mikroorganizmov, väčšina identifikovaná na úrovni druhu, ostatné na úrovni rodu. Najpočetnejšie zastúpenie vo vzorkách mali rody *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Acetobacteraceae* a *Propioniacterium*.
- Sekvenovaním pomocou NGS metódy bola u vzorky č. 3 dosiahnutá identifikácia 25-tich rôznych mikroorganizmov. Metóda odhalila aj mikroorganizmy, ktoré metódou DGGE a následnou klasickou sekvenáciou neboli zachytené, čo poukazuje na citlivosť tejto metódy. Výhodu predstavuje aj kvantitatívne stanovenie mikroorganizmov. Sekvenácia NGS potvrdila majoritné zastúpenie baktérii rodu *Lactobacillus*, s absolútnou väčšinou druh *Lactobacillus kunkeei*.
- Na základe výsledkov oboch metód možno zhodnotiť, že mikrobiálna komunita vo vzorkách bola porovnateľná, tvorená nepatogénnymi mikroorganizmami, väčšinou pochádzajúcich z primárnych zdrojov kontaminácie medu, tzn. z nektáru, tráviaceho traktu včely alebo z úľového prostredia.
- Zástupca druhu *Clostridium botulinum*, vyvolávajúci jediné ochorenie spojujúce sa s medou, dojčenský botulinizmus, nebol vo vzorkách preukázaný.

**ZOZNAM POUŽITEJ LITERATURY**

- [1] PŘIDAL, Antonín. *Včelí produkty*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-7157-7170.
- [2] Valencia Intenational [online]. © 2014 [cit. 2020-04-10]. Dostupné z: <http://valencia-international.com/pre-historic-taste-honey/>
- [3] KNOLLER, Rasso. *Knížka o medu*. Praha: Granit, 1996. ISBN 80-85805-43-x.
- [4] FRANK, Renate. *Zázračný med*. Líbeznice: Víkend, 2010. ISBN 978-80-7433-024-
- [5] VESELÝ, Vladimír. *Včelařství*. Praha: Brázda, 2003. ISBN 80-209-0320-8.
- [6] Vyhláška č. 41/2012 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky o mede. In: Ministerstvo pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky [online]. [cit. 2020-04-13]. Dostupné z: <https://mps.sk/vyhlaska-c-41-2012-ministerstva-podohospodarstva-a-rozvoja-vidieka-slovenskej-republiky-o-mede/901-111-901-5801/>.
- [7] TITĚRA, Dalibor. *Včelí produkty mýtů zbavené: med, vosk, pyl, mateří kašička, propolis, včelí jed*. Praha: Ve spolupráci s Českým svazem včelařů vyd. nakl. Brázda, 2006. ISBN 80-209-0347-x.
- [8] ŠVAMBERK, Václav. *Tajemný svět včel*. Líbeznice: Víkend, 2000. ISBN 80-7222-120-5.
- [9] KUKUROVÁ, Kristína.a kol. Analýza fyzikálno-chemických parametrov v mede z hľadiska kvality a autenticity. *Bulletin of Food Research*. 2004, 43(4), 201-217.
- [10] SILVA, Mayara Salgado, et al. Microorganisms in Honey. *Honey Analysis* [online]. Toledo: In Tech Publishers, 2017, 233-258 [cit. 2020-03-22]. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/honey-analysis/microorganisms-in-honey>
- [11] MACHADO DE-MELO, et al. Composition and properties of Apis mellifera honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 2017, 57(1), 5-37.
- [12] HARAGSIM, Oldřich. *Medovice a včely*. Praha: Ve spolupráci s Českým svazem včelařů vydalo nakl. Brázda, 2005. ISBN 8020903321.



- [13] OMAFUVBE, B. Microbiological and physico-chemical properties of some commercial Nigerian honey. *African Journal of Microbiology Research*, 2009, 3(12) 891-896.
- [14] BOGDANOV, Stefan, et al. Honey for Nutrition and Health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 2008, 27(6), 677-689.
- [15] WHITE, Jonathan W. Honey. *Advances in Food Research*, 1978, 287-374.
- [16] KOPAL, Tomáš. Med a hojenie rán. In: *Dermatol. Prax* [online]. 2016 [cit. 2020-03-18]. Dostupné z: [www.solen.sk](http://www.solen.sk).
- [17] SZWEDA, Piotr. Antimicrobial Activity of Honey. *Honey Analysis*, 2017, 03-15.
- [18] BOGDANOV, Stefan. Nature and Origin of the Antibacterial Substances in Honey. *LWT - Food Science and Technology*, 1997, 30(7), 748-753.
- [19] GRABOWSKI, N.T. a G KLEIN. Microbiology and Food-borne Pathogens in Honey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015, 57(9), 1852-1862.
- [20] KWAKMAN, Paulus H. S., et al. How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*, 2010, 24(7), 2576-2582
- [21] COOPER, Robert. *The antimicrobial activity of honey*. In: White R, Cooper R. *A modern wound management produkt*. [online]. Aberdeen: Wounds UK Publishing, 2005, 24-32 [cit. 2020-03-21]. Dostupné z: [http://www.medicalhoney.com/downloads/\\_pdfs/chapter\\_2.pdf](http://www.medicalhoney.com/downloads/_pdfs/chapter_2.pdf). kniha
- [22] OLAITAN, Peter B. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*, 2007, 7(3), 159-165.
- [23] SNOWDON, Jill A a Dean O CLIVER. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 31(1-3), 1-26.
- [24] PETROVÁ, J., TONKOVÁ, M., KAČÁNIOVÁ, M., KMEŤ, V. 2004. Mikrobiologická kvalita medu, *Aktuálne problémy riešené v Agrokomplexe*, Nitra: SPU, 2004, 383- 385.
- [25] Portál Štátnej veterinárnej a potravinovej správy Slovenskej republiky [online]. © 2003-2019 [cit. 2020-03-23]. Dostupné z: [https://www.svps.sk/zvierata/choroby\\_vciel\\_bakterialne.asp](https://www.svps.sk/zvierata/choroby_vciel_bakterialne.asp)

- [26] CHANTAWANNAKUL, Panuwan a Brian N DANCER. American foulbrood in honey bees. *Bee World*, 2015, 82(4), 168-180.
- [27] KIŠ, Maja, et al. Characterisation of Croatian honey by physicochemical and microbiological parameters with mold identification. *Journal of Food Safety*, 2018, 38(5).
- [28] KAČÁNIOVÁ, Miroslava, et al. Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2009, 56(3), 285-295.
- [29] SEREIA, Maria Josiane, et al. Microbial flora in organic honey samples of africanized honeybees from Parana river islands. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2011, 31(2), 462-466.
- [30] KŇAZOVICKÁ, Vladimíra, et al. Microbial quality of honey mixture with polen. *Potravinárstvo* [online], 2011, 5(1), 27-32. [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: <http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/110>
- [31] FINOLA, Mónica S., Mirta C. LASAGNO a Juan M. MARIOLI. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*, 2007, 100(4), 1649-1653.
- [32] AMIR, Y, et al. Physico-chemical and microbiological assessment of honey from Algeria. *Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 9(9), 1485-1494.
- [33] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 8090289665.
- [34] VÁZQUEZ-QUIÑONES, Carlos Ramón, et al. Microbiological assessment of honey in México. *Revista Argentina de Microbiología*, 2018, 50(1), 75-80.
- [35] BEDNÁŘ, Marek: *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. ISBN 8594031505280.
- [36] NOVÁKOVÁ, Elena. Clostridium botulinum. *Revue medicíny v praxi* [online], 2017 15(3) 1-4. [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: [http://www.vzbb.sk/sk/aktuality/spravy/2017/clostridium\\_revue\\_3\\_2017.pdf](http://www.vzbb.sk/sk/aktuality/spravy/2017/clostridium_revue_3_2017.pdf)

- [37] ŠPAČKOVÁ, Michaela. Kojenecký botulismus – med jako rizikový faktor. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie* [online], 2017; 26(4) 152–156. Dostupné z [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy\\_EM/26\\_2017/04\\_duben/152\\_botulismus.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/26_2017/04_duben/152_botulismus.pdf)
- [38] WOJTACKA J., et al. Prevalence of *Clostridium botulinum* Type A, B, E and F Isolated From Directly Sold Honey in Lithuania. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2017, 19, 335-343.
- [39] POORMONTASERI, S. et al. Characterization of *Clostridium botulinum* spores and its toxin in honey, *Iranian Journal of Veterinary Research*, 2014, 15(1), 36-39.
- [40] VLKOVÁ, Eva, Vojtěch RADA a Jiří KILLER. *Potravinářská mikrobiologie*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2006. ISBN 80-213-1583-0.
- [41] BURDYCHOVÁ, Radka a Pavla SLÁDKOVÁ. *Mikrobiologická analýza potravin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-116-4.
- [42] ERCOLINI, Danilo. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*. 2004, 56(3), 297-314.
- [43] MUYZER, Gerard, K. SMALLA. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 1998. 73(1), 127-141.
- [44] MUYZER, Gerard. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(3), 317-322.
- [45] FUKAL, Ladislav. *Bioanalytické metody pro fyziky*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006. ISBN 80-7080-611-7.
- [46] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 9788021038417.
- [47] SIQUEIRA, José F. a Isabela N. RÔÇAS. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *Journal of Dentistry*, 2003, 31(5), 333-339.

- [48] BURIÁNKOVÁ, I., BRABLCOVÁ, L., RULÍK, M. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) a její využití ve výzkumu metanogenních archeí. *Mikrobiologie vody a prostředí*, 2011, 12-15.
- [49] Current Protocols in human genetics [online]. © 1999-2020 [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <http://geguchadze.com/PDF/protocols/CPonline/Doc/8947-8947.html>
- [50] SANGER, F. a A.R. COULSON. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 1975, 94(3), 441-448.
- [51] PASTORÁKOVÁ, Andrea. *Molekulárne metódy aktuálne používané v klinickej genetike*. Bratislava: Univerzita Komenského, 2016. ISBN 978-80-223-4231-5.
- [52] ANSORGE, Wilhelm J. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnolog.*, 2009, 25(4), 195-203.
- [53] WEISBURG, W G, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2), 697-703.
- [54] MUYZER, Gerard, DE WAAL, Ellen C., UITTERLINDEN, Andre G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59 (3), 695-700.
- [55] KALOUSOVÁ, Iveta. *Změny vývoje mikroflóry během výroby a skladování masného výrobku*. Zlín, 2016. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [56] KUČABOVÁ, Veronika. *Využití moderních metod při sleování diverzity mikroflóry u fermentovaného masného výrobku*. Zlín, 2019. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
- [57] Včelárske potreby [online]. © 2010-2020 [cit. 2020-05-02]. Dostupné z: [https://apiprodukt.eu/index.php?route=product/product&product\\_id=2372](https://apiprodukt.eu/index.php?route=product/product&product_id=2372)
- [58] KAKSONEN, Anna, Molecular approaches for microbial community analysis [on-line]. [cit. 2019-04-15]. Dostupné z: [http://wiki.biomine.skelleftea.se/biomine/molecular/index\\_32.htm](http://wiki.biomine.skelleftea.se/biomine/molecular/index_32.htm)
- [59] KUCZYNSKI, Justin, et al. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13(1), 47-58.

- 
- [60] KHANUJA, Suman P.S., et al. Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, 17(1), 74-74.
- [61] CORBY-HARRIS, Vanessa, et al. Origin and Effect of Alpha 2.2 Acetobacteraceae in Honey Bee Larvae and Description of *Parasaccharibacter apium* gen. nov., sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(24), 7460-7472.

**ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A ZKRATIEK**

APS	amonium persulfát
$a_w$	aktivita vody
BLAST	basic local alignment search tool
bp	base pairs (párov báz)
DGGE	denaturing gradient del electrophoresis (denaturačná gradientová gélová elektroforéza)
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
dNTP	deoxyribonukleotid
ddNTP	dideoxyribonukleotid
dsDNA	double strand deoxyribonucleic acid (dvojvláknová deoxyribonukleová kyselina)
EtBr	etidumbromid
g	gram
HMF	hydroxymetylfurfural
mg/ml	miligram na mililiter
min	minúta
ml	mililiter
mm	milimeter
mM	milimol
NGS	Next-Generation Sequencing (sekvenovanie novej generácie)
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová reťazová reakcia)
RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribozomálna ribonukleová kyselina)
s	sekunda
ssDNA	single strand deoxyribonucleic acid (jednovláknová deoxyribonukleová kyselina)

---

USA	United States of America (Spojené štáty americké)
UV	ultraviolet (ultrafialové)
V	volt
TAE	tris-acetát-EDTA
TEMED	NNN'N'-tetraetylenylendiamin
°C	stupeň Celzia
μl	mikroliter

**ZOZNAM OBRÁZKOV**

Obrázok 1: Nástenná maľba v Cauveas de la Arana v Španielsku.....	11
Obrázok 2: Vplyv faktorov na antimikrobiálnu aktivitu medu.....	23
Obrázok 3: Mikroorganizmy nachádzajúce sa v mede.....	24
Obrázok 4: Schéma aparatury pre polyakrylamidový gél v DGGE .....	35
Obrázok 5: Schéma PCR-DGGE vrátane izolácie DNA zo vzorku .....	36
Obrázok 6: Geografická lokalizácia úľov .....	45
Obrázok 7: Rôznorodosť vzoriek medu.....	46
Obrázok 8: Časti ručného refraktometra.....	46
Obrázok 9: Jednotlivé kroky metódy DGGE.....	47
Obrázok 10: Úsek génu 16S rRNA amplifikovaný v prvom kroku PCR.....	50
Obrázok 11: Úsek génu 16S rRNA amplifikovaný v druhom kroku PCR.....	52
Obrázok 12: Správne zostavená aparatura na DGGE gél .....	54
Obrázok 13: Rozdelenie vzoriek podľa obsahu vody .....	59
Obrázok 14: Vzorky s najvyšším obsahom vody .....	59
Obrázok 15: Druhá fáza PCR .....	62
Obrázok 16: DGGE gél 1 s vyznačenými bandami .....	63
Obrázok 17: DGGE gél 2 s vyznačenými bandami .....	64
Obrázok 18: DGGE gél 3 s vyznačenými bandami .....	64
Obrázok 19: DGGE gél 4 s vyznačenými bandami .....	65
Obrázok 20: Správna sekvencia neopravovaná – band č. 2 – <i>Lactobacillus kunkee</i> .....	65
Obrázok 21: Nesprávna sekvencia opravovaná – band č. 48 – <i>Cultibacterium acnes</i> .....	66
Obrázok 22: Grafické zastúpenie mikroorganizmov vo vzorke č. 3 identifikovaných pomocou NGS.....	70



**ZOZNAM TABULIEK**

Tabuľka 1: Hodnoty fyzikálno-chemických parametrov medu.....	15
Tabuľka 2: Mikrobiálna diverzita zdrojov primárnej kontaminácie medu .....	26
Tabuľka 3: Použité primery pre 1. fázu PCR .....	42
Tabuľka 4: Použité primery pre 2. fázu PCR .....	42
Tabuľka 5: Lokalita úľa priradená k číslu vzorky .....	44
Tabuľka 6: Zloženie reakčnej zmesi pre 1. krok PCR.....	50
Tabuľka 7: Teplotný a časový priebeh 1. kroku PCR .....	51
Tabuľka 8: Zloženie reakčnej zmesi pre 1. krok PCR.....	52
Tabuľka 9: Teplotný a časový priebeh 2. kroku PCR .....	53
Tabuľka 10: Nameraný obsah vody vo vzorkách medu .....	58
Tabuľka 11: Overenie metód izolácie DNA stanovením koncentrácie DNA .....	60
Tabuľka 12: Namerané hodnoty koncentrácie izolovanej DNA .....	61
Tabuľka 13: Identifikácia mikroorganizmov prítomných vo vzorkách medu.....	67
Tabuľka 14: Identifikácia mikroorganizmov vo vzorke č. 3 pomocou NGS .....	69