

# Hodnocení českých medů z mikrobiologického hlediska

Bc. Markéta Mrázová

---

Diplomová práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta Mrázová**  
Osobní číslo: **T22418**  
Studijní program: **N0721A210004 Technologie potravin**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Hodnocení českých medů z mikrobiologického hlediska**

## Zásady pro vypracování

### I. Teoretická část

Vypracujte literární rešerši zaměřenou na výskyt mikroorganismů v medu, případně dalších včelích produktech.

### II. Praktická část

Odeberte vzorky medů a proveďte u nich mikrobiologickou analýzu. Vybrané izoláty charakterizujte dostupnými metodami.

U vybraných medů proveďte testy na jejich antimikrobní aktivitu.

Výsledky vyhodnoťte, diskutujte a formulujte závěry práce.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] XIONG, Z.R., SOGIN, J.H., WOROBO, R.W. Microbiome analysis of raw honey reveals important factors influencing the bacterial and fungal communities. *Frontiers in Microbiology*, 13:1099522. 2023
- [2] SKANDINS, I. LABSVĀRDS K.D. et al. Antimicrobial and antibiofilm properties of Latvian honey against causative agents of wound infections. *Antibiotics* 12:816. 2023
- [3] SCEPANKOVA, H., PINTO, C.A. et al. Conventional and emergent technologies for honey processing: A perspective on microbiological safety, bioactivity, and quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20: 5393-5420. 2021
- [4] BRUDZYNSKI, K. Honey as an ecological reservoir of antibacterial compounds produced by antagonistic microbial interactions in plant nectars, honey and honey bee. *Antibiotics* 10:551. 2021
- [5] Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně

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

Datum zadání diplomové práce: **1. ledna 2024**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

---

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

---

**Ing. Robert Gál, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 10. února 2024

## **PROHLÁŠENÍ AUTORKY 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 na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....  
podpis studentky

## ABSTRAKT

V této diplomové práci byly využity mikrobiologické molekulárně-biologické i chemické metody zkoumající vybrané charakteristiky medu. V úvodu teoretické části je však nutno zaměřit se i na samotné včelí společenství, které nám tento produkt, ceněný mnohými národy a kulturami napříč staletími, poskytuje. Jsou zde shrnuty základní poznatky o včelách jakožto i o samotném včelařství, od jejich historie přes chod celého úlu až po proces vzniku samotného medu, ale i dalších včelích produktů. Část je věnována i charakteristice medu a jeho vlastnostem, pro které byl med vždy tak ceněný.

Praktická část se zabývá analýzou 21 vzorků medů lišících se rokem stáčení, lokalitou a původem, které byly zakoupeny v obchodní síti nebo pocházely ze zásob soukromých včelařů z Česka i zahraničí. Mikrobiologická analýza byla provedena kultivačním stanovením s následnou identifikací vybraných izolátů metodou sekvenování genu pro 16S rRNA. Výsledkem bylo převážné zastoupení sporulujících bakterií *Bacillus*, konkrétně pak *Bacillus velezensis*. Využitím molekulárně-biologických metod pak byly vzorky testovány na přítomnost další sporulující bakterie *Clostridium botulinum*, která nebyla detekována v žádném z testovaných vzorků. Výsledky obou stanovení byly porovnány s taxonomickou analýzou bakteriálního a houbového profilu s využitím metody NGS. Stanovení antimikrobní aktivity bylo provedeno u vybraných vzorků medů mikrodiluční metodou a měřením optické denzity buněk. Testovací mikroorganismy pocházely z České sbírky mikroorganismů a ze Sbírký mlékařských kultur Laktoflora. Stanovení antioxidačních vlastností vybraných vzorků bylo provedeno korelačním vyhodnocením dvou metod. První bylo stanovení celkového počtu polyfenolů s využitím Folin-Ciocalteho činidla a druhou stanovení antioxidační aktivity zhášením radikálu DPPH. Vyšší antioxidační aktivita byla obecně prokázána u tmavších vzorků medů medovicového původu.

Klíčová slova: med, včela, včelařství, mikrobiota, sekvenace, antimikrobiální aktivita, MIC, antioxidační aktivita, *Clostridium botulinum*, včelí produkty.

## ABSTRACT

In this thesis, microbiological molecular-biological and chemical methods were used to examine selected characteristics of honey. In the introduction of the theoretical part, however, it is necessary to focus on the bee community itself, which this product, valued by many peoples and cultures across the centuries, provides us with. Basic knowledge of bees as well as beekeeping itself is summarized here, from their history to the running of the whole hive to the process of honey itself, as well as other bee products. A section is also devoted to the characteristics of honey and its qualities, for which honey has always been so prized.

The practical part deals with the analysis of 21 honey samples varying in year of bottling, location and origins that were purchased from a commercial network or were sourced from stocks of private beekeepers from the Czech Republic and abroad. Microbiological analysis was performed by culture determination followed by identification of selected isolates by gene sequencing for 16S rRNA. The result was a preponderant representation of the spore bacteria *Bacillus*, specifically *Bacillus velezensis*. Using molecular-biological methods, the samples were then tested for the presence of another spore bacteria, *Clostridium botulinum*, which was not detected in any of the samples tested. The results of both determinations were compared with a taxonomic analysis of the bacterial and fungal profiles using the NGS method. Determination of antimicrobial activity was made on selected honey samples by microdilution method and optical cell density measurement. The test microorganisms came from the Czech Collection of Microorganisms and the Lactoflora Collection of Dairy Cultures. The antioxidant properties of the selected samples were determined by a correlation evaluation of two methods. The first was to determine the total number of polyphenols using Folin-Ciocalteu reagent and the second was to determine antioxidant activity by extinguishing DPPH radical. Higher antioxidant activity has generally been shown in darker honeydew samples.

Keywords: honey, bee, beekeeping, microbiota, sequencing, antimicrobial activity, MIC, antioxidant activity, *Clostridium botulinum*, bee products.

Touto cestou bych chtěla poděkovat všem, díky kterým mohla tato práce vzniknout. V první řadě mé vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za ochotu, trpělivost a čas, který mi věnovala nejen při psaní závěrečné práce, ale i během celého studia. Stejně tak i doc. Ing. Daniele Sumczynski, Ph.D. za pomoc v laboratoři na Ústavu analýzy a chemie potravin, prof. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D. za vyhodnocení dat z NGS a laborantkám Ing. Veronice Kučabové a Mgr. Markétě Havlišťové za pomoc v mikrobiologických laboratořích na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí. Velký dík patří také včelařům, kteří mi byli ochotni poskytnout vzorky pro měření praktické části, mé rodině a přátelům za podporu během studia a v neposlední řadě chci poděkovat také svému partnerovi a současně včelaři, za jeho podporu a cenné rady při psaní této práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 VČELA MEDONOSNÁ</b> .....	<b>13</b>
1.1 HISTORIE A PŮVOD .....	13
1.2 TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ .....	13
1.3 <i>APIS MELLIFERA</i> .....	14
1.4 VČELSTVO.....	14
1.4.1 Matka.....	14
1.4.2 Dělnice .....	16
1.4.3 Trubec .....	17
1.5 VČELÍ DÍLO A PLOD .....	17
<b>2 VČELARŠTVÍ</b> .....	<b>18</b>
2.1 HISTORIE .....	18
2.2 VČELARŠKÝ ROK.....	19
2.2.1 Leden.....	19
2.2.2 Únor.....	20
2.2.3 Březen .....	20
2.2.4 Duben .....	20
2.2.5 Květen .....	21
2.2.6 Červen .....	21
2.2.7 Červenec.....	21
2.2.8 Srpen .....	21
2.2.9 Září .....	22
2.2.10 Říjen, listopad, prosinec .....	22
2.3 MEDOBRANÍ.....	22
<b>3 MED</b> .....	<b>24</b>
3.1 LEGISLATIVA.....	24
3.2 DEFINICE A CHARAKTERISTIKA .....	25
3.3 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA .....	26
3.4 ANTIMIKROBNÍ AKTIVITA .....	27
3.5 MIKROBIOTA MEDU.....	28
3.5.1 <i>Paenibacillus larvae</i> .....	30
3.5.2 <i>Clostridium botulinum</i> .....	30
3.5.3 Next Generation sequencing .....	31
3.6 FALŠOVÁNÍ MEDU .....	31
3.7 BIOLOGICKÉ ÚČINKY MEDU .....	32
<b>4 DALŠÍ VČELÍ PRODUKTY</b> .....	<b>33</b>
4.1 PYL .....	33
4.2 VČELÍ CHLÉB.....	34



4.3	MATEŘÍ KAŠIČKA .....	34
4.4	PROPOLIS .....	35
4.5	VČELÍ VOSK.....	35
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>CÍL PRÁCE .....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>METODIKA PRÁCE.....</b>	<b>39</b>
6.1	ANALYZOVANÉ VZORKY MEDŮ .....	39
6.1.1	Stáčení medu .....	40
6.2	PŘÍSTROJE, POMŮCKY A CHEMIKÁLIE .....	42
6.3	POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KMENY .....	45
6.4	METODIKA .....	45
6.4.1	Kultivační stanovení.....	45
6.4.2	Sekvenace genu pro 16S rRNA.....	46
6.4.3	Detekce <i>Clostridium botulinum</i> v medech molekulárně-biologickými metodami.....	50
6.4.4	Celogenomová sekvenace vybraných vzorků medů (NGS).....	52
6.4.5	Stanovení antimikrobní aktivity vybraných vzorků medů .....	55
6.4.6	Stanovení antioxidační aktivity.....	57
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>59</b>
7.1	KULTIVAČNÍ STANOVENÍ.....	59
7.2	VYHODNOCENÍ SEKVENACE GENU PRO 16S rRNA .....	63
7.3	VYHODNOCENÍ PŘÍTOMNOSTI <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> .....	65
7.4	MIKROBIOTA VYBRANÝCH MEDŮ .....	66
7.5	VYHODNOCENÍ ANTIMIKROBNÍ AKTIVITY .....	68
7.5.1	Vliv vzorků medů na růst <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953 .....	69
7.5.2	Vliv vzorků medů na růst <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53 .....	71
7.5.3	Vliv vzorků medů na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224.....	73
7.5.4	Vliv vzorků medů na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> CCDM 141 .....	75
7.5.5	Vliv vzorků medů na růst <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188 .....	77
7.5.6	Vliv vzorků medů na růst <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Typhimurium CCM 7933.....	79
7.5.7	Vliv vzorků medů na růst <i>Serratia marcescens</i> CCM 303 .....	81
7.5.8	Vliv vzorků medů na růst <i>Pseudomonas fluorescens</i> CCM 2115.....	83
7.6	VYHODNOCENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY .....	87
7.6.1	Folin-Ciocalteuho metoda .....	87
7.6.2	Metoda DPPH .....	88
7.6.3	Korelační analýza.....	89
<b>8</b>	<b>SOUHRNÁ DISKUZE .....</b>	<b>91</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>95</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>97</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>100</b>

<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>102</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>104</b>

## ÚVOD

Stejně, jako se řeší otázka, zda bylo první vejce nebo slepice, se lze zeptat i na otázku, zda byla první včela nebo kvetoucí rostlina. A ani na toto není možné jednoznačně odpovědět. Co ale víme je, že jedno bez druhého by nemohlo dokonale existovat.

Včely tvoří dokonale fungující společenství, včelstvo, které svou organizovaností a náročnou prací zajišťuje nejen produkci medu a dalších včelích produktů, ale jsou neodmyslitelnou součástí životního prostředí jako opylovači. Ne nadarmo se říká „*pilný jako včelka*“.

Med byl velmi ceněný již v historii a patří k nejstarším složkám lidské výživy. Mimo to byl ceněný i pro své biologické účinky. Ze všech včelích produktů je neodmyslitelně nejžádanějším produktem. Ovšem stejně jako u jiných potravin dochází i u medu často k jeho falšování.

Jedná se o potravinu sacharidového původu, která vzniká přeměnou přírodních šťáv a dalších specifických látek samotnými včelami. Oproti cukru má podstatně významnější nutriční hodnotu. Nejen kvůli obsahu monosacharidů, a jejich snazšímu zpracování v organismu, ale také kvůli obsahu dalších nutričních látek, jako jsou minerální látky, vitaminy, enzymy, organické kyseliny nebo antioxidanty.

Složení různých druhů medů je však proměnlivé, což bývá způsobeno například zdrojem původu medu, lokalitou nebo obdobím snůšky. To ovlivňuje i vlastnosti produkovaného medu, jako je schopnost vykazovat antioxidační aktivitu, kterou mohou vykazovat například fenolické sloučeniny, nebo antimikrobní vlastnosti, které mají za následek odolnost medu vůči nežádoucím mikrobiálním vlivům. Existují však i mikroorganismy, které mohou těmto vlivům odolávat. Příkladem mohou být sporulující bakterie jako jsou *Clostridium botulinum* nebo bakterie rodu *Bacillus* sp.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 VČELA MEDONOSNÁ

## 1.1 Historie a původ

O tom, kdy se na Zemi poprvé objevily včely, lze stále jen spekulovat. Nicméně první výskyt včel lze teoreticky datovat do období před 80 miliony let, kdy na Zemi začaly růst první kvetoucí rostliny produkující nektar. Tomu napovídají i nálezy fosilií včel zalitých v jantaru, které byly nalezeny v New Jersey. Předkem včel, které známe dnes, byl s největší pravděpodobností živočich podobající se vose, který s výskytem nektarodárných rostlin vyměnil masitou potravu za pyl a nektar (Přidal, Čermák, 2005). Včely, jak je známe dnes, žijí na Zemi asi 15 milionů let (Šefčík, 2014).

Původně obývanými oblastmi včely medonosné byly Afrika, kde přečkaly dobu ledovou, Arabský poloostrov a Evropa, kam se přesunuly asi před 10 tisíci lety. Díky člověku pak byla dále zavlečena na Dálný východ, do Asie, Ameriky nebo Austrálie. Postupně došlo k jejímu rozšíření do klimaticky rozdílných oblastí, kde docházelo k diferenciaci jejich populací a vzniku širokého spektra nových poddruhů (Přidal, Čermák, 2005; Šefčík, 2014). Podle jeskynních maleb se včela jako domácí zvíře začala chovat asi před 15 000 lety (Přidal, 2003). Podle předpokladů ještě dříve než například skot (Vorlová, 2002).

## 1.2 Taxonomické zařazení

V nadčeledi *Apoidea* bylo doposud popsáno zhruba 20 000 druhů včel, jež jsou rozděleny do několika čeledí. Většina čeledí zahrnuje solitérní druhy. Nicméně pro čeleď *Apidae* (včelovití) je charakteristické vytváření dočasných či trvalých společenství. Tato čeleď se dále dělí na *Apini* (včely), *Bombini* (čmeláci a pačmeláci) a *Meliponini* (bezzihadlé včely) (Přidal, Čermák, 2005).

Rod *Apis* (včela) je, vzhledem k odlišné biologii a morfologii druhů, rozdělený na tři podrody. Jedná se o *Apis*, *Megapis* a *Micrapis*. Druhy podrodu *Apis* lze označit jako včely střední velikosti, která je charakteristická i pro včelu medonosnou (*Apis mellifera*). Podrod *Megapis*, jak poukazuje název, je zastoupen druhy včel podstatně větší velikosti než nám známá včela medonosná, a naopak menší jsou druhy podrodu *Micrapis* (Přidal, Čermák, 2005).

### 1.3 *Apis mellifera*

*Apis mellifera*, nebo jak ji známe pod českým názvem včela medonosná, je světově nejrozšířenější a hospodářsky nejvíce využívaným druhem. Je tomu především z důvodu vysoké užitkovosti a vysoce vyvinutému sociálnímu chování (Přidal, Čermák, 2005). Označení medonosná není však úplně přesné. Důvodem je fakt, že včela med nenosí, nýbrž vytváří. Přesnějším pojmenováním by tedy mělo být, místo *Apis mellifera*, *Apis mellifica*, česky včela med vytvářející. Mezinárodní zoologická pravidla však uplatňují princip priority prvního způsobu pojmenování. Proto se spíše uplatňuje první způsob zápisu (Přidal, 2005; Přidal, Čermák, 2005).

### 1.4 Včelstvo

Včela medonosná tvoří dokonale fungující společenství, tzv. včelstvo, které tvoří matka, někdy též označována jako královna, dále trubci a nejpočetněji zastoupené dělnice. Každá jednotlivá včela v úlu plní úkony k zajištění chodu úlu, který funguje na základě organizace a souhry celého včelstva. Včely tvoří společenství, ve kterém se může nacházet až 50 tisíc jedinců. V každém včelstvu se nachází jedna matka, omezené množství trubiců, a tisíce dělnic. Jednotlivé včely jsou na ostatních natolik závislé, že by jedna bez druhé nemohly existovat (Čermáková et al., 2010). Bez existence včel by mohlo s velkou pravděpodobností dojít ke globální potravinové krizi. Včely jsou schopné opylovat asi 85 % všech kvetoucích rostlin, včetně 90 % všech květů ovocných stromů. Roční spotřeba silného a zdravého včelstva představuje asi 120 kg potravy. (Šefčík, 2014).

#### 1.4.1 Matka

Matka je plně vyvinutá samička. V úlu se vyskytuje vždy pouze jedna (Obrázek 1). Chování matky k jiným matkám bývá zpravidla agresivní a při styku se snaží jedna druhou usmrtit. Dochází i k výjimkám při tzv. tiché výměně matky nebo krátkodobě při rojení. Od dělnic se mimo plně vyvinuté pohlavní orgány liší i velikostí a nemá vyvinuté žádné pracovní orgány, jako jsou kartáčky, pylové košíčky ani žlázy produkující vosk. Matky produkují charakteristický feromon, podle kterého se řídí celé včelstvo. Jedná se o směs látek, která zabezpečuje soudržnost včelího společenství. V případě snižující se koncentrace tohoto feromonu nebo jeho nedostatku začnou dělnice vychovávat matky náhradní. Jejich vývoj probíhá ve speciálních buňkách, tzv. matečnicích, který se nacházejí na okraji plástů a líhnou se zpravidla po 16 dnech. Dělnice plod v matečnicích krmí mateří kašičkou. Po dosažení

pohlavní dospělosti se na shromaždišti trubců spáří s trubci během tzv. snubních letů. Po nakladení už zpravidla úl neopouští. Matka se dožívá kolem 3 až 5 let, ale v závislosti na kvalitě bývá samotnými včelaři vyměňována ve druhém nebo třetím produkčním roku (Čermáková et al., 2010; Přidal, 2003; Šefčík, 2014; Veselý et al., 1997).



Obrázek 1 Odlišení matky ve včelstvu (archiv autorky)

### ***Přirozená výměna matky***

Rojení je přirozený proces, při kterém si včelstvo vyměňuje staré matky za nové. Z jednoho včelstva se tak následně stávají dvě. Zpravidla k němu v našich klimatických podmínkách dochází v období května až června. Před tímto procesem v úlu dochází k tvorbě trubčiny a matečnicků, ze kterých se líhne nová matka. Ještě před tím však původní matka úl opouští s polovinou včelstva. Během toho dochází k seskupení do chomáče a poté roj hledá nový domov. V případě objevu roje včelařem jej setřese a vsadí do nového úlu. V původním úlu se během toho líhne první matka, která se snaží usmrtit dosud nevylihnuté matky, čímž zaujímá místo po původní matce. Výměna matky však může proběhnout i bez rojení. Jedná se o tzv. tichou výměnu, kdy je mladá matka vychována včelstvem za přítomnosti stávající matky. Ta se pak sama nechá mladou matkou zabít (Čermáková et al., 2010; Šefčík, 2014).



### 1.4.2 Dělnice

Nejpočetněji zastoupenými jsou ve včelstvu dělnice (Obrázek 2), které zajišťují optimální životní podmínky celého včelstva v podobě tvorby tepla, obranných látek, shromažďování zásob nebo krmení. Jedná se o samičky s nedokonale vyvinutým pohlavním ústrojím. Stejně jako matky se vyvíjejí z oplozených vajíček. Rozdíl nastává během larválního stádia v kvalitě potravy, která způsobí neplodnost dělnic. Liší se také délkou života, kdy je možné dělnice rozdělit na jarní a letní, které se dožívají asi 5 týdnů. Ty, které se vylíhnou na podzim, se dožívají několika měsíců, přečkávají zimu v semknutých shlucích tvořících teplo. Další odlišnost je v jejich stavbě těla, a to konkrétně tím, že disponují pracovními nástroji. Mají sosák, kterým odebírají nektar či medovici. Tyto tekutiny následně ukládají do medných váčků. Na končetinách mají pylové košíčky a kartáčky pro přenos pylu. Dělnice lze dále rozdělit podle stáří a úkonu, který v danou chvíli v úlu vykonávají. První skupinu tvoří mladušky, což jsou mladé včely staré do cca 3 týdnů, kdy svou úlohu plní v úlu. Podle toho je lze dále rozdělit na čističky, krmičky, stavitelky nebo hlídačky. Kolem dvacátého dne se z nich stávají létavky. Vylétávají z úlu a jejich úkolem je snůška surovin pro přípravu medu (Čermáková et al., 2010; Drašar, 1978; Veselý et al., 1997).



Obrázek 2 Dělnice shromažďující zásoby pylu (archiv autorky)



### 1.4.3 Trubec

Trubci ve včelstvu zůstávají jen do konce produkčního období letních měsíců. Jedná se o samce, jejichž počty ve včelstvu průběžně kolísají. Jejich počty se pohybují v rozmezí stovek až několika jednotek tisíc. Od ostatních včel jsou podstatně zavalitější a nemají žihadlo ani pracovní nástroje. Jejich vývoj probíhá nejdéle v neoplozených buňkách, zpravidla 24 dnů. Během prvních dvou týdnů od vylíhnutí jsou krmeni dělnicemi, protože si nejsou schopni sami opatřit potravu. Poté dosahují pohlavní dospělosti a jejich úkolem je spáření se s matkou, po kterém umírají. V případě, že se trubci nepodaří s matkou spářit, oddělí je dělnice na konci produkčního období od potravy a vytlačí z úlu v důsledku čehož následně zahynou (Čermáková et al., 2010; Drašar, 1978; Šefčík, 2014).

### 1.5 Včelí dílo a plod

Včelí dílo je neodmyslitelnou součástí každého včelstva v podobě plástů. Ty jsou tvořeny stavitelkami z včelího vosku. Díky nim je v každém úlu zajištěno vhodné prostředí (Obrázek 3). Jednou z funkcí plástů je zajištění vývoje jednotlivých pohlavních forem včelstva. Takové buňky lze rozdělit na dělničí, trubčinu a matečníky. Dále pak slouží pro ukládání medu a pylových zásob. Plásty jsou tvořeny oboustranně vystavěnými buňkami, do kterých matka klade vajíčka. Následně v nich probíhá embryonální vývoj, který se odvíjí podle pohlavního typu. Z vajíčka se tedy líhne larva, která je krmena dělnicemi. Ta postupem času roste, dokud nezaplní celou buňku. V této chvíli dělnice buňku uzavírají voskem a larva se zakuklí a postupně přemění v dospělého jedince (Čermáková et al., 2010).



Obrázek 3 Uložení rámků s plásty v úlu (archiv autorky)

## 2 VČELÁŘSTVÍ

### 2.1 Historie

Včely a samozřejmě i včelí produkty, mezi které neodmyslitelně řadíme i med, byly napříč dějinami ceněné u nespočtu různých národů, kultur a vyznání (Čermáková et al., 2010). Včelařství patří k nejstarším oborům lidské činnosti, kdy byl chov včel prováděn za účelem zisku medu a včelího vosku (Veselý et al., 1997). Nejstarší dochované důkazy, ukazující na schopnost člověka včelařit, pocházejí z doby paleolitické, tedy z doby před asi 15 000 lety. Jedná se o kresbu z jeskyně u vesnice Bicorn nacházející se ve Španělsku. První písemnou zmínku lze najít i ve staroegyptských hieroglyfech (Přidal, 2003). I z tohoto důvodu jsou za první průkopníky v oblasti včelařství považováni starověcí Egypťané. Ti, aby dosáhli co nejvyššího výtěžku medu, převáželi celá včelstva a lodích a vypouštěli je vždy na jiných místech s bohatou vegetací. Mimo to začali vytvářet první úly. Jejich využití medu však nespočívalo jen v jeho konzumaci. Mimo potravinu sloužil i ke konzervaci jiných potravin, byl využíván k výrobě mastí a léčivých přípravků, k balzamování a při různých náboženských obřadech. (Knoller, 1996; Med, 2010). Své místo si med našel i u křesťanských národů. Chov včel byl ve středověku prováděn především v kláštrech, pro které byl mimo med ceněným produktem i včelí vosk, který byl využíván pro výrobu svící (Med, 2010). Lidé využívali také divoké včely, které osidlovaly duté kmene stromů, tzv. brť. Později pak začali včely chovat v uříznutých kmenech nebo dřevěných špalcích, které různě vyřezávali a zdobili (Švamberg, 2003). Historicky byl na území Evropy med jediným sladidlem, dokud se nezačal používat cukr. Ten byl zprvu využíván jen bohatými občany, protože import třtinového cukru byl poměrně nákladný. To se však změnilo s první produkcí řepného cukru z bílé krmné řepy. Tím se stal cukr mnohem lépe dostupným i pro nižší vrstvy. Mimo to se produkce řepného cukru ukázala jako jednodušší a stabilnější než produkce medu, která se tímto přesunula do pozadí (Frank, 2010; Hanke, 2001). V dnešní době zažívá české včelařství rozmach a pohybuje se na velmi vysoké úrovni. Stále stoupající počty včelstev pomáhají v zemědělské činnosti, ale i dostatečné produkci medu pro domácí spotřebu i export do zahraničí (Frank, 2010; Švamberg, 2003).

#### *České včelařství*

České včelařství patří ke skupinám s největší organizovaností včelařů. Včelařství na našem území patří k nejstarší lidské činnosti. V jednom z církevních spisů z roku 1267 se lze dočíst o rozlišnostech mezi včelami lesními a včelami žijícími poblíž usedlostí, pro které se

zakládaly tzv. „zahrady pro včely“. Ve 14. století se pak začalo s hromadným získáváním medu z lesních brtí. Tento proces spočíval ve šplhání po stromech a vylamování medových plástů z dutin obývaných včelami. První patent pro včelaře vydal Karel IV. a včelaři tak zakládali cechy a byli velmi ceněnými členy společnosti. Postupně se včely začaly přesouvat blíže obydlím, kde je ukládali do tzv. klátů. Jednalo se vydlabané kmény stromů. V roce 1775 byl Marií Terezií vydán tzv. Včelařský patent, který pro včelaře znamenal řadu výhod, např. v podobě zrušených poplatků. Na oplátku však museli dodávat vosk. O rok později byly založeny včelařské školy v Brně a Novém Kníně, kde se včelařství přednášelo v kněžských seminářích. Během první poloviny 20. století došlo k obrovskému rozmachu včelařství, který trval až do roku 1990. Důvodů k poklesu chovu včel bylo několik. Především se včelaři nebyli schopni zorientovat v nové veterinární a potravinářské legislativě, dalším důvodem byly stále se zvyšující náklady a modernizace provozů. Do roku 1997 se počty včelstev snížily až o 40 %. Od té doby však dochází k postupnému zvyšování (Šefčík, 2014; Švamberk, 2003).

## 2.2 Včelařský rok

V průběhu včelařského roku je počet jedinců ve včelstvu odlišný. V období, kdy nastává biologický klid, se v úlu počty včel pohybují kolem 10-20 tisíc. Naopak v období nejvyšší produkce jejich počty dosahují až 60 tisíc jedinců (Čermáková et al., 2010). Jednotlivé kroky se během včelařského roku prolínají a odvíjí od počasí a teploty dané lokality (Včelařství, 2021).

### 2.2.1 Leden

Leden je zdánlivým obdobím klidu, kdy venkovní teploty obvykle klesají pod bod mrazu. Aby se včelstvo před nízkými teplotami ochránilo a především, aby ochránilo matku, shlukují se jedinci do alespoň dvou shluků (včelaři tento pojem nahrazují termínem chumáč). První chumáč včely vytvářejí kolem matky, čímž kolem ní zajistí teplotu pohybující se mezi 20-30 °C. Druhý chumáč následně obklopuje první chumáč a včely se mezi nimi postupně střídají od krajních směrem dovnitř. V případě, že se venkovní teploty pohybují nad 10 °C, dochází k vylétávání včel z úlu (Šefčík, 2014). Reakce včelstva se liší podle počasí a teploty. (Včelařství, 2021). Pro včelaře je hlavním úkolem odstraňování sněhu a uhynulých včel, aby došlo k co nejlepšímu přívodu vzduchu do úlu. Přímou ve včelstvu není v tomto období povoleno provádět žádné zákroky. Výjimkou je laboratorní vyšetření mrtvých včel a měli (měl je směsný odpad dopadající na dno úlu) na přítomnost roztočů (Šefčík, 2014).

### 2.2.2 Únor

Při postupném zvyšování teploty a dosažení denních teplot nad 10 °C dochází k postupnému rozpadu chumáče. Následně včely postupně začínají čistit úl. Uhynulé včely přenášejí blíže česnu a při proletech vyprazdňují výkalové váčky. Současně začínají se snůškou prvního pylu (Šefčík, 2014). Úkolem včelaře je v tomto období pomoci včelstvu za účelem podpory jejich činnosti v nastávající sezóně. To se provádí podáváním medových zásob odložených z předzimního období. V případě, že včelař tyto zásoby nemá, lze dodat včelstvu do úlu tenkou placku medocukrového těsta o hmotnosti 0,5-1 kg. Další možností je řídký cukrový roztok míchaný s vodou v poměru 1:1 nebo 1:2. V případě vyššího nálezu varoázy z laboratorních vyšetření se provádí předjarní léčebné ošetření (Včelařství, 2021).

### 2.2.3 Březen

V období března dochází k prodlužování dne a zvyšování intenzity slunečního svitu, společně se stoupajícími denními teplotami. V souvislosti s tím se rodí nové včely a probíhá výměna zimní generace. Silnější včelstva začínají koncem měsíce zakládat trubčinu (Včelařství, 2021). V závislosti na venkovních podmínkách včelař provádí prohlídky úlu. Podmínkou jsou dlouhodobě se pohybující denní teploty nad 10 °C. Kontrola spočívá, stejně jako v únoru, v kontrole zásob a jejich případném doplnění cukerným roztokem nebo medocukrové plackou (Šefčík, 2014).

### 2.2.4 Duben

Pro zachování zdravého včelstva je nutné sledovat jeho rozvoj, který se u každého včelstva může lišit i v závislosti na bioklimatických podmínkách daných lokalit nebo nadmořské výšce. Bez prohlídky nelze bezpečně určit, co se ve včelstvu během nadcházejících jarních měsíců děje (Šefčík, 2014). V tomto období dochází také k odesílání vzorků na vyšetření moru včelího plodu. Mimo to se do úlu postupně přidávají mezistěny a rozděluje se životní prostor úlu. Pokud chce včelař v květnu tvořit oddělky, je nutno zahájit přípravy již v období dubna, v době rozkvetu prvních třešní, a to přípravou chovu matek. Mimo to lze v průběhu dubna začít s ošetřováním včelstev proti roztočům. K tomu lze využít např. Formidol, kyselinu mravenčí nebo kyselinu šťavelovou. Podmínkou ošetřování je, aby nebylo aplikováno v období, kdy by se mohla léčivá látka dostat do medu, a aby bylo včelstvo v tomto období ideálně bez plodu (Včelařství, 2020).

### 2.2.5 Květen

V úlu postupně dochází ke zrození nové generace včel a začínají kvést ovocné stromy a řepka olejka. V průběhu měsíce, při dobrém zdravotním stavu celého včelstva a kvalitní matce, dosahuje včelstvo maximální síly. Často dochází k rojení, které včelař může mírně regulovat tvorbou oddělků (Šefčík, 2014). Během května také dochází ke značení matek. Od konce dubna až do poloviny června je snůška nektaru a produkce medu nejvyšší. Přichází tak období prvního medobraní (Včelařství, 2020), které je podrobněji shrnuto v kapitole 2.3.

### 2.2.6 Červen

V tomto měsíci nastává slunovrat, který se považuje za začátek nového včelařského roku. Včelstvo je ve své plné síle a stále mohou přetrvávat rojové nálady, které lze utlumit tvorbou nových oddělků. Matka v tomto období klade 1500-2000 vajíček denně a je proto důležité, aby bylo v úlu dostatek místa (Šefčík, 2014). V tomto období je pro včelaře důležitým úkolem odchyt rojů, a především jejich vyšetření na včelí mor. Probíhá také medobraní, při kterém je ale nutná obezřetnost, vyhýbání se plodišti a odebírání pouze nástavků s medem. Ty se následně po vytočení vracejí včelám. Červen je také obdobím, ve kterém dochází k výměně matek (Včelařství, 2020).

### 2.2.7 Červenec

V červenci postupně začínají mizet zdroje snůšky, čímž se v úlech postupně zastavuje stavební činnost včel. Úkolem včelaře je odstranit nedostavené mezistěny a prázdné pláсты z prostorů, ve kterých budou včely zimovat. Musí však dávat pozor, aby neodstranil i pylové zásoby, které společně se zásobami na zimu tvoří, podle síly včelstva, kolem 3-5 kg (Šefčík, 2014).

### 2.2.8 Srpen

V tomto období má včelař asi nejvíce práce, aby zajistil zdárné přezimování a položil tak základ pro docílení dobrých chovatelských výsledků v nadcházejícím roce. Jeho práce spočívá v krmení včelstva cukerným roztokem v poměru 1:3, zabezpečení česnového prostoru proti škůdcům a jeho zúžení proti loupežím jinými včelami. Provádí se také lisování plástů jako ochrana před zavíječem (Šefčík, 2014).

### 2.2.9 Zář

Zář je obdobím, kdy by už včelstvo mělo být nakrmené a připravené na nadcházející zimní období. Krmení by se mělo v prvním týdnu měsíce ukončit, aby se včely stihly připravit na zimu. Mimoto se už v úlu neprovádějí žádné zákroky. Jediné, na co včelař nesmí zapomenout, je vložení podložek na dno úlu, které slouží pro záchyt roztočů po podzimním ošetření (Šefčík, 2014).

### 2.2.10 Říjen, listopad, prosinec

Období od října až do prosince je obdobím, kdy se provádí léčení včelstev. Státní veterinární správa vydává jednotná nařízení pro chovatele, jakým způsobem bude provedeno ošetření včel proti roztočům. V tomto období se nesmí včelstva ošetřovat žádným jiným postupem. Mimoto se v tomto období nesmí, jakkoliv přímo zasahovat do včelstva, pokud to není nezbytně nutné, nesmí se zmenšovat česnový prostor, a kromě doby provádění ošetření uzavírat větrací očka úlu (Šefčík, 2014).

## 2.3 Medobraní

Včelí dělnice, konkrétně létavky, sbírají nektar a medovici a prostřednictvím medných váčků je přenášejí do úlu, tam je předají včelám, které tekutiny uloží do buněk. Kvůli vysokému obsahu vody sladkých šťáv je včely postupně přenášejí mezi buňkami. Během toho tyto šťávy zahušťují prostřednictvím výměšků slinných žláz a celý proces opakují, dokud nedojde k poklesu obsahu vody pod 18 %. Poté je již vzniklý med uložen do buněk, ve kterých je zavíčkovan voskem (Šefčík, 2014).

Během medobraní jsou včelstvu odebírány plásty, ve kterých je zralý med. Takový med by měl v ideálním případě obsahovat méně než 18 % vody. Pro rychlé zjištění obsahu vody v medu lze využít refraktometru. Z pravidla se uvádí, že pokud je medný plást ze 2/3 zavíčkovaný, je zralý, a může se odebírat. Není to však vždy pravidlem. V případě, že včelař nevládní refraktometr, je možné provést rychlý test zralosti medu silným trhnutím plástu. V případě, že z něj med vystříkne, není med ještě dostatečně vyztáhlý. Pokud včelař stáčí med, musí zároveň myslet i na včely, které vždy potřebují zásobu alespoň 3 kg pro vlastní spotřebu (Šefčík, 2014). Při odebírání plástů je nutné odstranit všechny včely. To se provádí setřesením včel zpět do úlu. Zbylé jsou pak šetrně smeteny a rámy s medovými plásty jsou ukládány do přepravních beden nebo prázdných nástavků a přepraveny do místa vytáčení medu (Kamler et al., 1999).

Místnost, která slouží pro vytáčení medu, by měla splňovat podmínky základních hygienických požadavků (Šefčík, 2014). Před samotným stáčením je potřeba provést odvíčkování medových plástů. K tomu se využívá tradiční způsob pomocí odvíčkovací vidlice. Med je následně možné nechat odkapat. Nejčastěji se však při získávání medu z plástů využívá medometu, který pracuje na principu odstředivé síly. Med je z plástů oddělen odstříkáním na stěny medometu, po kterých stéká ke dnu. Vypouštěcím otvorem je pak med vypouštěn přes síta, na kterých dojde k oddělení zbytků plástů od nežádoucích příměsí (Kamler et al., 1999).

Med lze skladovat pouze v potravinářských uzavíratelných obalech, které nikdy nebyly použity k jiným účelům. Zpravidla se skladuje při pokojové teplotě v suchém prostředí, aby nedošlo k navázání pachů a vlhkosti z okolí (Šefčík, 2014).

## 3 MED

### 3.1 Legislativa

V české legislativě je med charakterizován ve vyhlášce č.76/2003 aktuálního znění, která stanovuje požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. Med je zde charakterizován jako potravina přírodního sacharidového charakteru, která je složena převážně z glukózy a fruktózy, dále organických kyselin, enzymů a pevných částic, které jsou zachyceny při sběru nektaru, medovice nebo na živých částech rostlin včelami, které je sbírají, přetvářejí a kombinují se specifickými látkami, dále uskladňují a nechávají dehydratovat a zdát v plástech. Legislativa dále uvádí rozdělení medů podle původu na medy květové a medovicové, ale také podle způsobu získávání nebo úpravy na medy vytočené, plástečkové, lisované, vykapávané, medy s plástečky, filtrované medy, pastové medy a pekařské medy (Česko, 2003).

Pro celosvětové obchodování s medem je pak závazný *Codex Alimentarius*, který jej definuje jako přírodní sladkou látku produkovanou včelami, která je vytvořena ze sbíraného květního nektaru, sekretů z živých částí rostlin nebo výměšků hmyzu sajícího rostliny, kterou včely sbírají, přeměňují specifickými látkami, ukládají, dehydratují, skladují a nechávají vyzrát v medových plástech. Tento dokument mimo to charakterizuje základní složení a faktory kvality produkovaných medů, kontaminanty, hygienu, značení a metody odběru vzorků a analýz (*Codex Alimentarius*, 2001). Pro země Evropské unie je uznávanou legislativou Směrnice Rady 2001/110/ES, která opět stanovuje definici medu a jeho zpracování (SMĚRNICE RADY 2001/110/ES, 2002).

#### **Označení „Český med“**

Po vstupu Česka do EU byla Českým svazem včelařů pro své členy sepsána a schválena norma jakosti Český med. Jedná se o standard zahrnující ochranné známky a specifikace pro med vyráběný v České republice, který dosahuje vyšších parametrů kvality, než definuje evropská legislativa. Označení „Český med“ tedy znamená, že včelař je členem Českého svazu včelařů, a med, který získává, splňuje požadavky Svazové normy. Produkce medu tedy probíhá na území České republiky, včelař dodržuje pravidla při ošetřování včelstev a správnou výrobní a hygienickou praxi. Oproti vyhlášce č. 76/2003 Sb. Jsou zpřísněny požadavky na obsah vody, který podle normy může být nejvýše 18 %. Dalším parametrem je obsah hydroxymethylfurfuralu maximálně 30 mg/kg, a nakonec obsah sacharózy může tvořit maximálně 5 %. Podle této normy nelze použít označení „Český med“ pro med



filtrovaný a pekařský. Tyto požadavky jsou hodnoceny podle Harmonizovaných metod zkoušení medu Evropské komise pro med, 2002 (Český svaz včelařů, 1999).

### 3.2 Definice a charakteristika

Med můžeme popsat jako jeden z produktů včel medonosných. Lze jej definovat jako komplexní směs živin a bioaktivních sloučenin s mnoha bioaktivními aktivitami (Giampieri et al., 2022). Z pohledu včelaře se jedná o nejdůležitější včelí produkt, který je bohatý na cukry, a vzniká namáhavou prací celého společenství včel. Dělnice sbírají rostlinné šťávy v podobě nektaru nebo medovice a ty následně mísí se svými výměšky a výslednou tekutinu nechávají zrát v plástech (Přidal, 2003). Mimo to obsahuje množství chemických látek a z chemického hlediska lze na med pohlížet jako na přesycený roztok sacharidů rozpuštěných ve vodě s přítomností rostlinných a specifických látek včelí produkce (Čermáková et al., 2010; Frank, 2010). Dle legislativních předpisů lze med rozdělit na medy medovicové a květové, pocházející z nektaru květů kvetoucích rostlin. Ty pak lze dále dělit na jednodruhové nebo vícedruhové. (Česko, 2003; Škrovánková et al., 2019).

Chemické složení medů je u jednotlivých medů velmi proměnlivé, stejně jako jeho biologická aktivita. Složení je závislé na květinovém a geografickém původu, typu medu, počasí a ročním období, ale také na podmínkách stáčení a jeho skladování (Škrovánková et al., 2019). Med obsahuje především cukr, který tvoří 95-99 % sušiny medu. Většina je tvořena jednoduchými cukry, fruktózou a glukózou, které představují zhruba 85-95 % celkových cukrů. Poměr glukózy a fruktózy ovlivňuje rychlost krystalizace, a to tak, že s rostoucím obsahem glukózy roste rychlost krystalizace. Naopak medy, které obsahují vyšší zastoupení fruktózy, vykazují dlouhodobější tekutost. Zbytek sacharidů je tvořen disacharidy, jako jsou maltóza nebo sacharóza, případně oligosacharidy (Čermáková et al., 2010; Olaitan et al., 2007). Díky obsahu cukrů se jedná o poměrně vysoce energetickou potravinu (Škrovánková et al., 2019). Druhou nejdůležitější složkou medu je voda, jejíž obsah je v medu kritický z důvodu jeho skladování. Její obsah se pohybuje mezi 13-20 % a závisí na mnoha faktorech prostředí během produkce, jako jsou počasí, vnitřní vlhkost úlu nebo původ nektaru. Dále závisí na úpravě medu během vytáčení nebo jeho skladování. S rostoucím obsahem vody klesá kvalita medu a roste riziko vzniku kvašení. Medy s vyšším obsahem vody než 21 % mohou poukazovat na zředění nebo na jejich nezralost medu. Své zastoupení mají také organické kyseliny, které tvoří asi 0,57 % medu, a zahrnují kyselinu glukonovou, která je vedlejším produktem enzymatického štěpení glukózy. Organické

kyseliny jsou mimo to zodpovědné za kyselost medu a přispívají jeho charakteristické chuti. Co se týče minerálního zastoupení prvků, ty jsou přítomny ve velmi malém množství. Nejhojněji zastoupený je draslík, dále pak vápník, měď, železo, mangan a fosfor (Čermáková et al., 2010; Olaitan et al., 2007; Přidal, 2003). Přestože hlavní složkou medu jsou redukující sacharidy, složení medu je velmi složité a obsahuje asi 200 látek (Skadiňš et al., 2023).

Medy květové a medovicové se však neliší jen složením, ale už na první pohled také barvou. Medovicové medy jsou obvykle tmavší barvy, kterou produkují cukry, minerální látky a aminokyseliny (Škrovánková et al., 2019).

Vodní aktivita medu se zpravidla pohybuje v rozmezí 0,5-0,65. Med je obecně považován za kyselou potravinu s pH v rozmezí 3-5, což je způsobeno přítomností organických kyselin, jako je např. kyselina glukonová (Xiong et al., 2023).

### 3.3 Antioxidační aktivita

Med je považován za bohatý zdroj enzymatických i neenzymatických antioxidantů (Dezmirean et al., 2012). Obsahuje řadu důležitých bioaktivních sloučenin s několika pozitivními účinky. Mimoto bývá považován za přírodní potravinářský antioxidant. Jeho přídavek pomáhá zabránit nebo oddálit kažení potravin v důsledku oxidačních reakcí a zvýšit tak jejich oxidační stabilitu (Škrovánková et al., 2019). S antioxidační aktivitou medu souvisí mnohé látky, jako jsou např. fenolové kyseliny, flavonoidy, karotenoidy, kyselina askorbová nebo některé enzymy, jako oxidáza nebo kataláza (Combarros-Fuertes et al., 2019). Tmavé medy obsahují zpravidla vyšší obsah fenolických sloučenin a vykazují vyšší antioxidační aktivitu (Škrovánková et al., 2019).

Antioxidanty vychytávají volné radikály s negativními účinky na lidský organismus. I z tohoto důvodu jsou vyhledávanými přírodními potravinářskými produkty, které mohou obsahovat fotochemikálie s antioxidační aktivitou. O tom, že je med bohatým zdrojem enzymatických i neenzymatických antioxidantů, existuje již řada vědeckých studií. Chemické složení, a zejména tak antioxidační aktivita medu, je závislá především na květinovém zdroji, ze kterého včely získávají nektar, který je hlavním zdrojem antioxidantů v medu a pylu. Další rozdíly jsou závislé například na geografickém či enviromentálním faktoru (Dezmirean et al., 2012).

### 3.4 Antimikrobní aktivita

Med je široce využíván v tradiční medicíně a moderním výzkumu pro své širokospektrální antimikrobiální, protizánětlivé a antioxidační vlastnosti (Skadiņš et al., 2023). Med obsahuje různé antimikrobiální sloučeniny, které usmrcují nebo potlačují růst, širokého spektra mikroorganismů, včetně některých multirezistentních patogenů (Brudzynski, 2021).

Antimikrobní aktivita se v případě jednotlivých medů může lišit v závislosti na zdroji nebo způsobu zpracování (Grabowski, Klein, 2015). Antibakteriální vlastnosti jsou spojeny s vlastnostmi medu, jako jsou vysoká osmolarita a kyselost nebo přítomností sloučenin, jako jsou např. peroxid vodíku, metabolity oxidu dusnatého, fenolové kyseliny nebo flavonoidy (Combarros-Fuertes et al., 2019; Grabowski, Klein, 2015).

Většina dosud identifikovaných antibakteriálních sloučenin v medu cílí na bakteriální buňky nespécifickým způsobem. Dalo by se tedy tvrdit, že díky neselektivnímu mechanismu účinku hlavních antimikrobiálních sloučenin med vykazuje tak široké spektrum antibakteriální aktivity. Příkladem hlavních baktericidních sloučenin mohou být peroxid vodíku a methylglykoxal, jejichž koncentrace silně koreluje s antimikrobní aktivitou medů a jejich minimální inhibiční koncentrací (MIC) (Brudzynski, 2021). Ukazuje se, že vysoký obsah cukrů a viskozita medu hrají zásadní roli při inhibici růstu mikroorganismů a v prevenci tvorby biofilmu. Mimoto je med bohatým přírodním zdrojem fenolických sloučenin, které lze použít k urychlení procesu hojení ran (Skadiņš et al., 2023).

Některé látky, inhibující růst bakterií, vznikají chemickými přeměnami v medu, přičemž dochází ke štěpení cukrů působením enzymů. I z tohoto důvodu je med svým složením vhodný k potlačení střevních infekcí, infekcí dýchacích cest nebo při ošetření ran (Frank, 2010). Hlavním zdrojem antibakteriálních sloučenin v medu jsou samotné mikroorganismy, které produkují řadu metabolitů, mezi které řadíme například antimikrobiální peptidy, antibiotika, surfaktanty, proteolytické enzymy nebo enzymy degradující buněčnou stěnu. Antimikrobiální sloučeniny, produkované mikrobiotou v medu, se mohou akumulovat v medu horizontálním přenosem (Brudzynski, 2021). Samotná antimikrobní aktivita se pak v případě různých medů liší, v závislosti na jejich původu nebo způsobu zpracování. Významný vliv vůči mikrobiálním vlivům mají i chemické látky, které do medu přicházejí od včel samotných (Combarros-Fuertes et al., 2019). V laboratorních studiích bylo prokázáno, že med vykazuje antimikrobní účinek proti širokému spektru bakterií a plísní.

Příkladem byl pozoruhodný účinek na bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, která je známa svou odolností vůči různým antimikrobiálním sloučeninám (Olaitan et al., 2007).

### ***Vliv polyfenolů***

Polyfenoly patří do skupiny přírodních sloučenin, které jsou široce distribuovány v rostlinách a bylo zjištěno, že mají antibakteriální vlastnosti působící proti řadě grampozitivních i gramnegativních bakterií. Mají schopnost narušovat bakteriální buněčné membrány vlivem modifikace membránových potenciálů nebo rozpadem membránových proteinů, ovlivňovat cytoplasmu nebo narušovat buněčné funkce jako je syntéza nukleových kyselin a proteinů nebo inaktivace enzymů. Podobně jako u medů se ukázalo, že polyfenoly mají také schopnost zvyšovat aktivitu antibiotik proti biofilmům několika bakteriálních druhů, včetně gramnegativní *Pseudomonas aeruginosa* nebo grampozitivní *Staphylococcus aureus*. Tyto bakterie, včetně jejich rezistentních zástupců, bývají nejčastějšími původci infekcí ran, které lze získat v nemocnicích nebo komunitním šířením (Skadiņš et al., 2023).

## **3.5 Mikrobiota medu**

Byť se med vyznačuje schopností inhibice růstu většiny mikroorganismů, či jejich úplným usmrcením, lze v něm mnohdy pozorovat i mikroorganismy schopné tomuto kyselému prostředí s vysokou koncentrací cukrů odolávat (Snowdon, Cliver, 1996). Je známo, že med i přes svou užitečnost obsahuje různé mikroorganismy. Mikrobiální kolonizace nektaru, medu i včel je souhrn antagonistických mezidruhových interakcí (Bruzynski, 2021). Svůj vliv na mikrobiotu medu si připisují také jeho jednotlivé složky. Mikroorganismy se do samotného medu mohou dostávat primární kontaminací, která je způsobena samotnými včelami. Většina těchto mikroorganismů pochází z pylu květin, půdy, vzduchu, prachu nebo trávicího traktu včel. Jejich počet však bývá poměrně proměnlivý. V případě nektaru může být detekováno značné mikrobiologické zastoupení, ale i naopak může být téměř sterilní. Vzhledem k původu medovice, lze u ní zase pozorovat variabilitu mikroflóry střevního traktu hmyzu, kterým je vylučována. Mikrobiota pylu se zase odráží od druhu rostliny, ze které pyl pochází. Ten pak může obsahovat široké spektrum různých bakterií, plísní nebo kvasinek. Sekundární kontaminace pak může být způsobena včelařem při stáčení medu prostřednictvím kontaminovaných nástrojů, nádob a dalších pomůcek (Grabowski, Klein, 2015; Snowdon, Cliver, 1996). Vliv na mikrobiální společenstva mají i fyzikálně-chemické vlastnosti. Nízká aktivita vody, nízké pH a antimikrobní složky, mezi kterými lze zmínit peroxid vodíku nebo antioxidanty, mají schopnost inhibovat růst vegetativních

bakteriálních buněk (Olaitan et al., 2007). Vzhledem k vysokému obsahu cukru, a tedy i vysokému osmotickému tlaku ve zralém medu, nedochází k pomnožení mikroorganismů. V medu však může započít proces kvašení, který je způsoben přítomností osmofilních kvasinek. Kvašení může probíhat dvěma způsoby, a to buď na povrchu, za což jsou zodpovědné kvasinky rodu *Zygosaccharomyces*, nebo v celém objemu, které je charakteristické pro *Torula* a *Torulopsis*. Tento jev často poukazuje na zvýšený obsah vody v medu v důsledku jeho ředění (Kačániová et al., 2009; Přidal, 2003).

Gastrointestinální trakt včel je tvořen symbioticky žijícím společenstvím mikroorganismů, který však může být velmi různorodý, v závislosti na potravě včelstva, ročním období nebo zdravotního stavu včel (Kačániová et al., 2009). Hlavní složky mikrobiomu včelího střeva tvoří bakterie mléčného kvašení, či probiotické bakterie *Lactobacillus* popř. nově vyčleněných rodů z rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Bacillus*, které je možné následně izolovat z medu a nektaru. Mimo ně lze izolovat i bakterie rodů *Apibacter*, *Acetobacter* nebo *Asaia*. Mezi bakterie, které lze dále nalézt v trávicím traktu, a mohou způsobovat u včel nemoci, patří *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* a *Serratia*. Mezi kvasinkami pak lze zmínit zástupce jako *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* nebo *Candida* (Kačániová et al., 2009; Raymann, Moran, 2018; Xiong et al., 2023).

Bakterie a huby, které se běžně vyskytují na rostlinách a v půdě se mohou do úlu přenést během opylení. Některé z těchto mikroorganismů jsou včelám prospěšné, jako například *Actinobacteria*. Některé bakterie *Actinobacteria* spp. jsou však rostlinnými patogeny. Přesto mohou být včelám a dalšímu hmyzu prospěšné z toho důvodu, že produkují sekundární metabolity, které brání růstu plísní, jež by je mohly napadat. Mezi další bakterie, které by mohly být obsaženy ve včelích produktech, pocházejících z rostlin mohou být *Enterobacteriaceae*, *Firmicutes*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, a *Weissella* spp. Z plísní se pak jedná o *Botrytis*, *Penicillium*, a *Mucor*. Mezi kvasinkami pak můžeme najít zástupce jako *Candida*, *Cryptococcus*, *Kloeckera*, *Metschnikowia* nebo *Rhodotorula* (Grabowski, Klein, 2015; Xiong et al., 2023).

Analýza mikrobiomu medu by mohla potenciálně pomoci s pochopením dynamiky procesů probíhajících v úlu, což by mohlo přispět ke zlepšení produkce medu nebo i zabránit šíření chorob ve včelstvech. Ne všechny mikroorganismy jsou však kultivovatelné a nelze je tedy identifikovat běžnými kultivačními metodami. Tyto mikroorganismy lze však identifikovat moderními metodami, např. sekvenací nové generace (NGS), jejíž princip je popsán níže v kapitole 3.5.3 (Xiong et al., 2023).

### 3.5.1 *Paenibacillus larvae*

Dalším zástupcem, který je spojován s výskytem u rostlin a v půdě, je bakterie *Paenibacillus* spp. Některé tyto bakterie jsou včelími patogeny. Příkladem je například *Paenibacillus larvae*, který je spojován s výskytem moru včelího plodu (Xiong et al., 2023). Jedná se o grampozitivní sporulující bakterii rezistentní vůči antibiotikům. I z tohoto důvodu je výskyt moru včelího plodu velmi nepříjemnou komplikací každého včelaře. Jedná se o nejničivější bakteriální onemocnění postihující včelu medonosnou. *Paenibacillus larvae* a jejich spory jsou pro včelí larvy velmi infekční. K infekci dochází obvykle při krmení larvy potravou, která je kontaminovaná právě spory této bakterie. Spory následně vyklíčí ve střevech larvy, kde se rychle množí, a infikovanou larvu zabíjí. Ta se postupně začne rozkládat v tekutinu, která následně ztuhne a vytvoří šupiny obsahující miliony infekčních spor. Při odstranění uhynulé larvy dělnicemi dochází k rozšíření a spuštění masivní infekce, která nakonec zapříčiní úhyn larev a zhroucení celého úlu. Samotné spory jsou velmi odolné vůči vnějšímu prostředí a mohou zůstat infekční i po celá desetiletí. V současnosti je jediným způsobem, jak zamezit dalšímu rozšíření tohoto onemocnění, spálení (Tsourkas, 2020).

### 3.5.2 *Clostridium botulinum*

*Clostridium botulinum* tvoří skupinu heterogenních grampozitivních tyčinek, jejichž společným znakem je tvorba toxinu. Jedná se o bakterii schopnou se vyskytovat ve dvou formách, a to ve vegetativní, a ve formě subterminálních spor. Ve vegetativní formě jsou aktivní za anaerobních podmínek, během kterých jsou schopny množení a metabolických pochodů. Jedním z metabolických produktů těchto bakterií je toxin, znám pod názvem botulotoxin, který může mít různou antigenní strukturu, podle které jej můžeme dělit na typy A-G. Jeho biologické účinky jsou však obdobné. Ve vegetativní formě je však tato bakterie velmi citlivá a mírnou změnou podmínek ji lze snadno eliminovat. I z tohoto důvodu se častěji vyskytuje ve sporulující formě, která ji zabezpečuje přežití nepříznivě působících vnějších podmínek (Nováková, 2017; Wojtacka et al., 2016). Přirozeně se tato bakterie může vyskytovat v půdě, prachu nebo sedimentu vodních toků. Právě tyto zdroje jsou nejčastější příčinou kontaminace potravin, přičemž takovou potravinou může být v tomto případě i med. Přítomnost klostridií v medu je pravděpodobně zapříčiněna kontaminací samotnými včelami, které po dosednutí na kontaminovaný povrch mohou přenést bakterie přímo do úlu a posléze i do medu samotného. Vzhledem k tomu, že med není tepelně upravován, nelze

zamezit přítomnosti spor tepelným ošetřením (Špačková, Mand'áková, 2017; Wojtacka et al., 2016).

Účinkem botulotoxinu může docházet ke vzniku onemocnění. Přítomné spory za anaerobních podmínek přecházejí do vegetativní formy, ve které mají schopnost produkovat již zmíněný toxin. Ten se po požití potravy dostává do gastrointestinálního traktu, ve kterém dochází k jeho postupnému vstřebávání a jeho enzymatickou aktivitou následně dojde k uvolnění acetylcholinu, který blokuje přenos nervového vzruchu do svalových vláken. Nejvíce rizikovou skupinou jsou kojenci, u kterých není plně vyvinutá střevní mikrobiota, která by zabránila rozvoji infekce, která může mít mírný, ale i velice rychlý průběh. Ve vážných případech, kdy nedojde k včasnému rozpoznání, dochází i k náhlým úmrtím kojence v důsledku ochrnutí dýchacích svalů, které je spojeno s následnou zástavou dechu. Mezi prvotními projevy lze pozorovat jen nespecifické projevy jako hypotonie, nechutenství nebo snížení motility střev. Později se začne projevovat celková slabost, problémy spojené s příjmem potravy jako je třeba špatné polykání v důsledku ochabujících svalů (Špačková, Mand'áková, 2017; Votava, 2003).

### 3.5.3 Next Generation sequencing

Next Generation sequencing (NGS), sekvenování nové generace, umožňuje zpracování velkého množství vzorků v krátkém časovém úseku. Tato metoda využívá sekvenování pracujícího na principu paralelizace, během kterého vznikají současně miliony sekvencí. NGS využívá různých technologií, které však lze využít jen na konkrétní aplikace. V případě studia mikrobiální diverzity se jedná o metodu metagenomické analýzy, která se skládá z několika kroků (Ansorge, 2009; Faure, Joly, 2015).

## 3.6 Falšování medu

Med je poměrně drahý přírodní produkt, u kterého bylo zjištěno jeho občasné falšování (Škrovánková et al., 2019). Falšování a špatné označování medu za účelem maskování jeho skutečného původu se stává celosvětovým problémem. Pylová mikroskopie pro identifikaci geografického a rostlinného původu je obtížná, neboť vyžaduje dlouhodobou zkušenost a mimo to nedokáže identifikovat filtrovaný med, stejně jako med, který byl obohacen pylem, aby se zamaskoval jeho původ (Chavan et al., 2022).

Jedním ze způsobů falšování medu je krmení včelstev cukernými sirupy s přídavkem ovocných nebo zeleninových šťáv. V takových případech včely cukr sice zpracují,

ale získaný produkt nelze považovat za med. Častým způsobem falšování je také přidávek cukerných sirupů přímo do medu. V ojedinělých případech dochází i k ředění medu pro navýšení jeho objemu. To se provádí v případech, kdy je získán med s nízkým obsahem vody. V některých případech se můžeme setkat i s náhražkami, které prodejci nabízejí jako med. Jednou z takových náhražek je například pampeliškový med. Jedná se o svařený cukerný sirup s pampeliškovými květy (Titěra, 2006).

### 3.7 Biologické účinky medu

Antibakteriální látky jsou nezbytnou součástí při léčbě chronických ran. Ačkoli jsou k léčbě kožních infekcí používána antibiotika, jejich nadměrné užívání může vést ke vzniku problémů jako je rozvoj bakteriální rezistence nebo široké spektrum nežádoucích vedlejších účinků. I z tohoto důvodu výzkum nových alternativ antibiotik nebo kombinací antibakteriálních látek, vede ke studiu přísad z rostlin a přírodních produktů, kterým je například med (Skadiňš et al., 2023).

Med se využíval jako léčivý prostředek v celé historii lidstva. Již starověcí Egypťané, Řekové nebo Římané jej využívali v léčivých přípravcích, kosmetice nebo balzamovacích prostředcích. S nástupem moderní medicíny se od využití medu upustilo. Předním důvodem je absence vědeckých studií. Nicméně v posledních letech se objevují výzkumy prokazující bioaktivní vlastnosti medu (Combarros-Fuertes et al., 2019).

Pro léčebné vlastnosti byly starověkými civilizacemi využívány i další vedlejší produkty včel. Ovšem stejně jako u medu se od jejich využívání v moderní době omezilo. Nicméně i přesto jsou vynikajícími zdroji bioaktivních látek a živin, které svou přítomností ve zdravotních produktech a výživových doplňcích, propůjčují produktům četné biologické aktivity. Příkladem mohou být antimikrobní, antioxidační nebo protizánětlivé vlastnosti (Giampieri et al., 2022).

Med je prastarým lékem pro léčbu infikovaných ran, ke kterému se začíná čím dál častěji vracet. Vzhledem k obsahu mikroorganismů, ale na druhou stranu k antimikrobiální aktivitě medu, existuje v lékařství rozpor o významu medu (Olaitan et al., 2007). Nicméně několik studií doporučuje používat med samotný nebo s antibiotiky, protože zvyšuje antimikrobní účinek a vytváří synergické nebo aditivní interakce proti bakteriálním biofilmům. Takové užívání by mohlo snížit používání antibiotik a minimalizovat nežádoucí antibiotické reakce, případně i zvýšit účinnost léčby (Skadiňš et al., 2023).



## 4 DALŠÍ VČELÍ PRODUKTY

Smyslem chovu včel byl již odedávna zisk medu a včelího vosku. Postupem času se včelí produkty rozšířily o mateří kašičku, propolis, nebo žihadla a včelí jed (Veselý et al., 1997). Tyto produkty mohou pocházet z pylových zrn, nektarů a jiných rostlinných materiálů či sekretů, samotných nebo ve směsi se sekrety slinných žláz včel. Obecně byly včelí produkty využívány spíše v minulosti a moderní doba od jejich využití spíše upouštěla. Nicméně v posledních letech roste zájem vědecké komunity a počet tedy i počet studií při zkoumání příznivých účinků těchto produktů na lidské zdraví. I přes to tyto produkty nacházejí stále malou možnost využití. Důvodem je jejich chemická, nutriční i fytochemická variabilita, která je ovlivněna mnoha faktory jako rozdílné druhy rostlin a včel, zeměpisná oblast nebo roční období. Z tohoto důvodu je velmi obtížné provedení standardizace výsledných produktů (Giampieri et al., 2022).

### 4.1 Pyl

Včelí pyl je produktem sběru pylových zrn včelami. Pomocí slinných sekretů, nektaru a případně medu dochází k jeho aglutinaci a vzniku granulí. Ty jsou následně ukládány v úlu. Hlavní funkcí pylu je využití jako zdroje živin pro včelstvo. Jeho složení je však proměnlivé, a to především z důvodu různorodosti rostlinných druhů, zeměpisné oblasti nebo ročního období, ve kterém je pyl sbírán. Je cenným zdrojem bílkovin, esenciálních aminokyselin, vitaminů a masných kyselin. Hlavní složkou jsou však sacharidy, které v sušině tvoří až dvě třetiny hmotnosti, z nichž asi 94 % je tvořeno monosacharidy, především fruktózou a glukózou. Zhruba 3-4 % pylu jsou tvořena celulózou, která je hlavní složkou vrstev pylových zrn. Pyl vykazuje také potenciální terapeutické vlastnosti, vynikající antioxidační aktivitu nebo protizánětlivé účinky. Jeho konzumace má také příznivý vliv na kardiovaskulární systém, snižuje obsah cholesterolu triacylglycerolů a celkových lipidů. V neposlední řadě se pyl vyznačuje i antimikrobními účinky na některé bakterie patogenních kmenů jako jsou *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* nebo *Pseudomonas aeruginosa*. Tento účinek byl prokázán také v případě některých kmenů hub a kvasinek. Příkladem mohou být *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Candida tropicalis*, *Geotrichum candidum*, *Fusarium culmorum*, *Penicillium verrucosum* atd. (Giampieri et al., 2022).

## 4.2 Včelí chléb

Včelí chléb je jedním z nejméně známých včelích produktů. Včely se vyrovnávají se svými nutričními potřebami sběrem vody, nektaru a pylu. Během zimního a brzkého jarního období se však pro včely stává jediným zdrojem potravy med, a právě včelí chléb. Ten vzniká mísením sbíraného pylu s medem a se slinami včel, které tuto vzniklou směs uloží do plástů. Působením vnitřních podmínek úlu společně s enzymatickou a mikrobiální aktivitou žlázových sekretů dochází zhruba po dvou týdnech k vytvoření potravy pro včelstvo s označením včelí chléb. Tento proces lze označit také jako fermentace pylu. Kromě toho se využívá i ke krmení larev nebo k výrobě mateří kašičky. Stejně jako u medu je jeho složení velmi proměnlivé v závislosti na složení vstupních složek, jejich geografickému i botanickému původu, klimatických podmínkách nebo přítomné mikrobiotě. Asi 30 % hmotnosti je tvořeno vodou. Sušina je pak tvořena 13 až 70 % sacharidů, hlavně fruktózou, glukózou a sacharózou. Jejich obsah závisí na vnitřních reakcích v procesu přeměny pylu na včelí chléb. Vzhledem k přítomnosti bakterií, které procesem fermentace přetvářejí přítomné cukry na etanol, kyselinu mléčnou a oxid uhličitý, bývá konečný obsah cukrů velmi proměnlivý. Bílkovinné zastoupení se pak pohybuje v rozmezí 17 až 30 % v sušině a tuky v rozmezí 1 až 11,5 %, přičemž ve včelím chlebu byla popsána přítomnost až 37 mastných kyselin. Mimo to zde zaujímají své místo i minerální látky s obsahem až 3,4 % (Giampieri et al., 2022).

## 4.3 Mateří kašička

Mateří kašička je sekret krémovité konzistence produkováný hypofaryngálními a mandibulárními žlázami mladých včel. Obvykle je využíván ke krmení larev včelích dělnic v období prvních tří dnů jejich života a mimo to se jedná o celoživotní potravu matky. Jedná se o středně kyselou hustou směs, která má ne vždy zcela homogenní konzistenci z důvodu přítomnosti nerozpuštěných pylových zrn různých velikostí. Barevná škála mateří kašičky se pohybuje od bílé po žlutou a vůně a chuť jsou lehce štiplavé. Mateří kašička je tvořena převážně vodou, jejíž obsah se pohybuje kolem 60 až 70 %. Sacharidy pak představují asi 7 až 18 %, přičemž největší zastoupení, asi 90 %, tvoří glukóza a fruktóza. Obsah bílkovin se pohybuje v rozmezí 9 až 18 %. Mastné kyseliny, vosky, fenoly, steroidy a fosfolipidy pak tvoří lipidovou frakci, která tvoří 3-8 % mateří kašičky. Své uplatnění našla v kosmetickém průmyslu jako přísada různých kosmetických přípravků nebo ve farmacii jako psychofarmakum a mastí k léčbě dermatóz (Giampieri et al., 2022; Přidal, 2003).

## 4.4 Propolis

Propolis je lepkavá látka pryskyřicového původu, kterou včely sbírají z živých rostlin. Jedná se o komplexní směs tvořenou rostlinnými pryskyřicemi, vosky, silicemi, pyly a dalšími sloučeninami organického původu. Jeho barva se liší podle botanického zdroje a může se pohybovat od zelené přes červenou až k hnědým odstínům. Včelami je obvykle využíván k udržení stabilních podmínek uvnitř úlu v podobě udržování teploty a vlhkosti nebo k utěsnění trhlin. Před tím, než je propolis dodán na trh, je nutno jej vyčistit a odstranit nežádoucí materiál. K tomu se využívá různých metod, jako jsou máčení, extrakce nebo reflux s využitím širokého spektra rozpouštědel. Všechny tyto faktory pak silně ovlivňují výtěžky bioaktivních látek zůstávajících v propolisu. S ohledem na chemické a nutriční složení propolisu tvoří hlavní skupinu sloučenin fenolické látky, především flavonoidy, fenolové kyseliny, ligniny atd. Dalšími minoritními složkami jsou pak včelí vosk, látky lipidového charakteru, terpeny, pryskyřice, sacharidy, bílkoviny a aminokyseliny, minerální látky a vitaminy, které ale tvoří zanedbatelnou část složení propolisu (Giampieri et al., 2022; Med, 2010; Přidal, 2003).

Nejvíce studovanou a uznávanou vlastností propolisu je antimikrobní aktivita, která závisí především na synergických účincích několika jeho antimikrobních složek. Konkrétně propolis působí proti několika aerobním a anaerobním grampozitivním bakteriím, jako jsou *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, i gramnegativním, jako jsou *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Proteus mirabilis* nebo *Klebsiella pneumoniae*. Mimoto je účinný i proti některým virům, včetně adenovirů, virů chřipky, rotavirů, herpesvirů a dalším. Díky svým vlastnostem je propolis účinný při léčbě ran, žaludečních vředů nebo diabetických stavech, protože snižuje hladinu glukózy v krvi (Giampieri et al., 2022).

## 4.5 Včelí vosk

Včelí vosk je produktem voskových žláz včel. Ty ho používají především ke stavbě plástů. Jeho zisk se provádí roztavením plástů poté, co je z nich odstraněn med. Roztavení se provádí pomocí páry nebo vroucí vody. Pro odstranění nečistot se během procesu využívá aktivní uhlí nebo křemičitan. Právě nečistoty jsou odpovědné za jeho barvu. Ta se pohybuje ve žlutých tónech, ale může přecházet až v hnědou. Podle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) je včelí vosk charakterizován jako komplexní směs nasycených a nenasycených lineárních a komplexních monoesterů, uhlovodíků, volných mastných

kyselin a alkoholů a dalších minoritních látek produkovaných včelami. Jeho vlastnosti jsou závislé na teplotě, přičemž při nízkých teplotách bývá velice křehký. Kromě původního použití vosku samotnými včelami je také využíván k přípravě kosmetiky, farmaceutických výrobků, svíček atd. Pokud jde o nutraceutické, farmakologické a potravinářské využití včelího vosku, své využití nachází jako leštící látka, např. při výrobě cukrovinek. Využívá se také k ošetření některých druhů ovoce, jako nosič barvy, v doplňcích stravy nebo k potahování tablet (Giampieri et al., 2022; Přidal, 2003).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce byla analýza vzorků medů, získaných v období tří let z různých lokalit České republiky i zahraničí. Vzorky byly poskytnuty soukromými včelaři nebo zakoupeny v obchodní síti. Jednotlivé cíle této práce byly vytyčeny takto:

- kultivační stanovení mikroorganismů v testovaných medech a jejich následná identifikace metodou sekvenování genu pro 16S rRNA,
- izolace DNA s následným celogenomovým sekvenováním metodou NGS,
- testování medů na možnou přítomnost *Clostridium botulinum* s využitím molekulárně-biologických metod,
- stanovení antimikrobní aktivity vybraných vzorků medů,
- stanovení antioxidační aktivity testovaných vzorků medů.

## 6 METODIKA PRÁCE

### 6.1 Analyzované vzorky medů

Praktická část se zabývala analýzou 21 vzorků medů, z nichž 12 vzorků tvořily medy starší, které byly analyzovány již v mé bakalářské práci (Mrázová, 2022). Analyzované vzorky pocházely ze zásob soukromých včelařů nebo byly zakoupeny v obchodní síti. Za účelem zisku jednoho ze vzorků medu (vzorek 13) bylo, pod dohledem včelaře, provedeno stáčení medu postupem shrnutým v podkapitole 6.1.1. Jednotlivé lokality, původ a rok, ve kterém byly medy stáčeny jsou uvedeny níže v tabulce (Tabulka 1) a znázorněny pomocí mapy (Obrázek 4).

Tabulka 1 Analyzované vzorky medu, rok stáčení a jejich původ

Číslo vzorku	Starší vzorky medů			Číslo vzorku	Nové vzorky medů		
	Lokalita	Původ	Rok stáčení		Lokalita	Původ	Rok stáčení
1	Vlčková	Smíšený květový	2021	13	Ostrava	Smíšený květový	2022
2	Ludkovice	Smíšený květový	2021	14	Osoblaha	Smíšený květový	2023
3	Ludkovice	Smíšený květový	2021	15	Krásná	Medovicový	2023
4	Bystřice pod Hostýnem	Smíšený květový	2021	16	Rožnov pod Radhoštěm	Smíšený květový	2022
5	Bystřice pod Hostýnem	Smíšený květový	2021	17	Uhřice	Smíšený květový	2022
6	Vlčková	Medovicový	2021	18	Ukrajina**	Smíšený květový	2022
7	Maďarsko*	Květový	2021	19	Ukrajina**	Smíšený květový	2022
8	Chorvatsko*	Květový	2021	20	Vlčková	Medovicový	2022
9	Haviřov	Smíšený květový	2021	21	Vlčková	Medovicový	2022
10	Haviřov	Smíšený květový	2021				
11	Lukov	Smíšený květový	2021				
12	Řecko*	Květový	2021				

\*komerční vzorky zakoupené v obchodní síti; \*\*zahraniční vzorky od soukromých včelařů



Obrázek 4 Geografické zobrazení původu testovaných vzorků medu (vytvořeno pomocí [detske.napady.net](http://detske.napady.net) a [ucebnicemapy.cz](http://ucebnicemapy.cz))

### 6.1.1 Stáčení medu

Metod ke zjištění správné doby vytáčení medu je spousta. Jednou z nich je možnost řídit se dle tzv. včelařského kalendáře, který shrnuje všechny důležité kroky týkající se chovu včel. Také lze využít úlové váhy, díky kterým je možné sledovat přírůstky či úbytky medu. Další možností je umístění malé misky s cukerným roztokem do horní části medníku. V okamžiku, kdy včely tento roztok zkonzumují, je včelaři jasné, že včely již zásoby nenosí, ale pouze konzumují a nastává tedy nejvhodnější období pro stáčení medu, tzv. medobraní. Nejvhodnější dobou pro vytáčení medu jsou dopolední hodiny, kdy se v úlu nachází nejméně včel, které jsou tou dobou v proletu.

Před samotným stáčením byla provedena řádná dezinfekce prostředí a pracovních nástrojů (medomet, odvíčkovací vidlička, stáčecí nádoba, cedník se sítkem, sklenice, nádoby na med atd.) pro zamezení případné kontaminace získávaného medu. Následovalo převléknutí do včelařské kombinézy s kuklou a přesun k úlům, kde byla provedena kontrola zralosti medu. To bylo provedeno škrubnutím rámků a sledováním, zda nezavíčkované dílo neztéká či ve větší míře nekape. Dalším způsobem může být refraktometrické zjištění obsahu vody v medu.

Při odebrání rámků byly všechny včely opatrně sklepávány a smeteny zpět do úlu. V případě nutnosti byl ke zklidnění včel použit kuřák. Jednotlivé rámků byly umístěny do přepravní bedny a přemístěny do uzavřených prostor určených ke stáčení. Práce musela být rychlá a čistá.



Rámek byl následně umístěn na odvíčkovací talíř a za použití vidličky byla odstraněna zavíčkovaná část (Obrázek 5). Následně byly rámy umístěny do koše v třírámkovém medometu (Obrázek 6) a opatrně nastaveny otáčky, aby nedošlo k protržení díla. Rychlost otáček byla postupně zvyšována. Během procesu došlo působením odstředivé síly k oddělení medu z rámků, který byl „metán“ na stěny medometu a po kterých stékal dolů k cedníku. Na něm byla umístěna síta, hrubé a jemné, pro zachycení nežádoucích zbytků (Obrázek 7). Nakonec byl med převeden do sterilních sklenic a vyčištěné rámy vráceny zpět do úlu.



Obrázek 5 Odvíčkovávání plástů (archiv autorky)



Obrázek 6 Umístění rámků s medem v medometu (archiv autorky)



Obrázek 7 Odtok medu z medometu (archiv autorky)

## 6.2 Přístroje, pomůcky a chemikálie

Přístroje:

- Analytické váhy AFA-210 LC (Schoeller instruments)
- Aura PCR (Bioair instruments)
- Bio II Advance Biohazard Box (Telstar)
- Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf)
- Centrifuga Z 300 K (Hermle)
- CO<sub>2</sub> Water Jacket Blander 400 (Sevard)
- Densi-La-Meter (Erba Lachema)
- Elektroforetická vana včetně příslušenství (Clever Scientific)
- GeneSnap (InGenius)
- Mechanická třepačka PSU-10i (Biosan)
- Mikrovlnná trouba (Electrolux)

- Multifunkční modulární reader Infinite® M200 s destičkou NanoQuant Plate™ (Tecan)
- Spektrofotometr Specord 210 Plus (Analytikjena)
- Stomacher Lab Blander 400 (Sevard)
- Termocykler pro PCR Aeris™ (Esco)
- Termostat INE 600 (Memmert)
- Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex RK 52 (Bandelin Electronic)
- UV-Transiluminátor InGenius (Syngene)
- Váhy KB d = 0,01 g (Kern)
- Vodní lázeň (Memmert)
- Vortex V-1 plus (Biosan)
- Vortex-Genie®2 (Mo Bio Laboratories)

#### Pomůcky:

- Automatické mikropipety a sterilní špičky (Eppendorf)
- Centrifugační zkumavky (50 ml) (Kartell)
- Elektroforetická vana s příslušenstvím (Clever Scientific)
- Injekční stříkačka a stříkačkový filtr 0,02 µm (AHLSTROM ReliaPrep™)
- Laboratorní sklo a pomůcky (kádinky, odměrné válce, zkumavky, odměrné baňky, mikrozksamavky (1,5 a 2 ml), sterilní kličky, 10mm kyvety, sterilní mikrozksamavky s víčky spojené do stripů, sterilní sáčky do homogenizátoru, ...)
- Magnetický separátor NucleoMag SEP (Machrey-Nagel)
- Mikrotitrační destičky (GAMA)
- SPRIselect magnetické kuličky (Beckman Coulter)

#### Chemikálie:

- Kultivační média
  - CHYGA – Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (Himedia)

- M17 – (Himedia)
- MH – Mueller Hinton Broth/Agar (Himedia)
- PCA – Plate Count Agar (Himedia)
- RCA – Reinforced Clostridium Agar (Himedia)
- Agaróza (Sigma-Aldrich)
- Demineralizovaná voda
- DNA Ladder 100 bp Plus pegGold (Avantor)
- Dneasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen)
- Dneasy® mericon® Food Kit (Qiagen)
- DPBS BioWhittaker™ pro kultivaci buněk (Lonza)
- DPPH – 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazil (Sigma Aldrich)
- Elektroforetický pufr TAE (1x koncentrovaný) (Sigma-Aldrich)
- EliZyme™ HS Robust MIX Red (Elisabeth Pharmacon)
- Ethanol (w = 70%) (Penta)
- Ethanol (w = 96%)(Penta)
- Fluorescenční barvivo Gel Nucleic Acid Stain (Biotium)
- Folin-Ciocalteho činidlo (Penta)
- Gelred Nucleic Acid Stain (Biotium)
- GoTag® G2 Hot Start Green Master mix (Promega)
- Chloroform (Sigma-Aldrich)
- Methanol p.a. (Lachner s.r.o.)
- Primery (East-Port) – fD1, rD1, Af, Ar, Bf, Br, Er, Ef, IOAf, IOAr, CBMLBf, CBMLBr, CBMLEf, CBMLEr, CBMLFf, i7, i5, 515f, 926r, ITS3f, ITS4r
- Proteináza K (Qiagen)
- Sterilní destilovaná voda
- Sterilní fyziologický roztok (Penta)

- Sterilní voda pro PCR
- Uhličitan sodný (w = 20%) (Penta)

### 6.3 Použité bakteriální kmeny

Kmeny použité pro účely této diplomové práce, u kterých byla testována antimikrobní aktivita vybraných medů, pocházely z České sbírky mikroorganismů (CCM) a ze Sbírký mlékařských kultur Laktoflora (CCDM).

- *Enterococcus durans* CCDM 53
- *Enterococcus faecalis* CCM 4224
- *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CCDM 141
- *Proteus mirabilis* CCM 7188
- *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium CCM 7933
- *Serratia marcescens* CCM 303
- *Staphylococcus aureus* CCM 3953

### 6.4 Metodika

#### 6.4.1 Kultivační stanovení

Kultivační stanovení bylo provedeno s novějšími vzorky (č. 13-21) dvakrát v půlročním rozestupu.

Prvním krokem byla příprava kultivačních půd. Jednotlivé navážky práškových směsí byly podle pokynů na obalu výrobce rozpuštěny v daném množství destilované vody a poté sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po zchladnutí byly za aseptických podmínek v biohazardboxu rozlity do Petriho misek a ponechány k zatuhnutí.

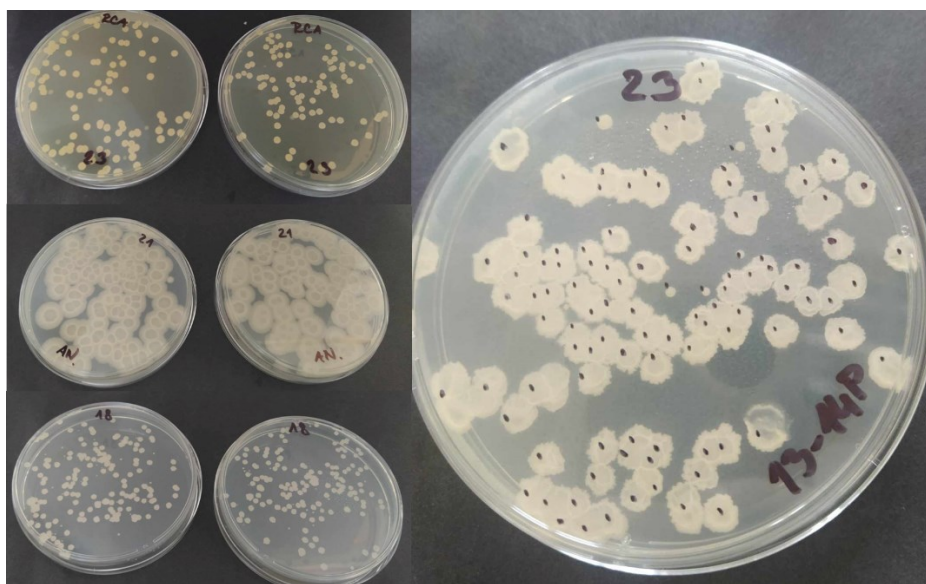
Pro stanovení byla použita navážka 10 g medu, která byla za aseptických podmínek navážena do sterilního sáčku, a ke které byl poté přidán devítinásobek sterilního fyziologického roztoku. Následovala homogenizace vzorku a zisk ředění  $10^{-1}$ , které bylo následně rozděleno. 100  $\mu$ l inokula bylo nanášeno na příslušné půdy, které bylo vyžítanou hokejkou rovnoměrně rozetřeno po povrchu agaru. Zbytek byl podroben procesu aktivace



spor, v podobě vystavení teplotě 80 °C po dobu 10 minut v předem vyhřáté vodní lázni. Poté opět následovalo nanesení na příslušné půdy s metodou roztěru. Stanovení bylo provedeno vždy paralelně na dvou miskách. Zaschlé misky byly ponechány ke kultivaci při daných podmínkách podle níže uvedené tabulky (Tabulka 2). Po uplynutí kultivační doby byly na miskách spočítány kolonie (Obrázek 8) a některé vybrané kolonie byly podrobeny identifikačním metodám.

Tabulka 2 Podmínky kultivace jednotlivých skupin mikroorganismů

Kultivační půda	Skupina stanovovaných MO	Kultivační podmínky
PCA	Celkový počet mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů	Aerobně při 30 °C 48-72 hodin
	Celkový počet aerobních sporulujících bakterií	Aerobně při 30 °C 48-72 hodin
RCA	Počet <i>Clostridium</i> spp. a dalších anaerobních bakterií	Anaerobně při 37 °C 72 hodin
CHYGA	Počet kvasinek a mikroskopických vláknitých plísní	Laboratorní teplota (cca 23 °C) 5-7 dní



Obrázek 8 Počítání kolonií (archiv autorky)

#### 6.4.2 Sekvence genu pro 16S rRNA

Vybrané kolonie získané kultivačním stanovením byly identifikovány metodou sekvenování genu pro 16S rRNA, které bylo provedeno ve spolupráci s firmou SEQme s.r.o. Postup přípravy vzorku před vlastní sekvenací se skládal z izolace DNA, která byla dále použita pro PCR, a jejíž produkty byly následně vyhodnoceny elektroforeticky a zobrazeny

pod UV světlem. Následovala purifikace a stanovení čistoty a koncentrace výsledného produktu. Jednotlivé kroky jsou podrobně popsány v následujících podkapitolách.

#### **6.4.2.1 Izolace DNA**

Izolované kolonie vybraných bakteriálních kmenů byly podrobeny izolaci DNA pomocí komerčního kitu Dneasy® Blood & Tissue Kit a podle jeho příloženého postupu (DNeasy® Blood & Tissue Kit, 2016). Prvním krokem byla resuspendace kolonií vybraných bakteriálních kmenů ve 2ml eppendorfkových mikrozkušavkách naplněných 200 µl fyziologického roztoku. K suspenzi bylo dále přidáno 200 µl pufru DPBS. Následoval přidavek 20 µl proteinázy K, promíchání na vortexu a centrifugace při 8000 rpm po dobu 5 minut. Poté bylo přidáno 200 µl AL pufru, vše důkladně promícháno na vortexu a inkubováno při 56 °C po dobu 10 minut. Následoval přidavek 200 µl 96% ethanolu, vše opět důkladně promícháno a jednotlivé směsi pipetovány do odstředivých kolonek se sběrnou zkumavkou. Poté proběhla centrifugace při 8000 rpm po dobu 1 minuty, přičemž došlo k zachycení DNA na kolonci a sběrná zkumavka s proteklým zbytkem byla odstraněna. Kolonka byla převedena do nové sběrné zkumavky a k ní bylo přidáno 500 µl AW1 pufru. Opět proběhla centrifugace při 8000 rpm po dobu 1 minuty a sběrná zkumavka byla opět odstraněna. Kolonka byla opětovně přendána do nové sběrné zkumavky a tentokrát bylo přidáno 500 µl AW2 pufru. Po centrifugaci při 14000 rpm po dobu 3 minut byla sběrná zkumavka opět odstraněna a kolonka byla převedena do 2ml centrifugační zkumavky. Následovala eluce DNA, která byla provedena přidáním 100 µl AE pufru do středu membrány kolonky a inkubací při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Konečná centrifugace byla provedena při 8000 rpm po dobu 1 minuty.

#### **6.4.2.2 Touchdown PCR**

Dalším krokem při identifikaci metodou sekvenování genu pro 16S rRNA bylo provedení touchdown PCR metody, která je využívána pro zvýšená specificty PCR. To je zajištěno teplotou annealingu, která se v následujících cyklech postupně snižuje, v tomto případě vždy o 0,5 °C.

Před zahájením tohoto kroku byl PCR box vysterilizován UV světlem po dobu 20 minut pro zabránění kontaminace vzorků. Následovala příprava 20 µl reakční směsi, jejíž složení je uvedeno níže v tabulce (Tabulka 3). Pro tuto směs byly využity primery FD1 a RD1, které ohraničují úsek DNA o velikosti 1500 bp. Jejich sekvence je znázorněna v tabulce (Tabulka 4). Směs byla připravena bez DNA hromadně pro všechny vzorky do sterilní

1,5ml zkumavky a rozpipetována po 19  $\mu$ l do sterilních mikrozkušavek spojených do stripů. Následoval přídavek DNA. Zavřené zkumavky byly promíchány na vortexu a vloženy do termocykleru, na kterém byl zvolen příslušný program pro touchdown PCR (Tabulka 5).

Tabulka 3 Složení reakční směsi pro touchdown PCR

Složení reakční směsi	Objem složky ve vzorku [ $\mu$ l]
Go Taq® G2 Hot Start Green Master Mix	10
Sterilní PCR voda	7
Primer FD1	1
Primer RD1	1
DNA	1

Tabulka 4 Sekvence primerů použitých při touchdown PCR

Primer	Sekvence ve směru 5' → 3'	Publikace
FD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(Weisburg et al., 1991)
RD1	AAGGAGGTGATCCAGCC	

Tabulka 5 Průběh touchdown PCR

Reakční krok	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Počáteční denaturace (Hot Start)	95	3	
Denaturace	95	0,5	10 – v každém cyklu snížení teploty annealingu o 0,5 °C
Připojení primerů	62	0,5	
Syntéza řetězce DNA	72	1,5	25
Denaturace	95	0,5	
Připojení primerů	57	0,5	
Syntéza řetězce DNA	72	1,5	
Závěrečná extenze	72	10	
Uchování	4	$\infty$	

#### 6.4.2.3 Elektroforéza

Výsledné produkty získané při touchdown PCR byly detekovány pomocí elektroforetického vyhodnocení v 1,5% agarózovém gelu a vizualizovány pod UV světlem v transiluminátoru za pomoci počítačového programu GeneSnap. V první řadě bylo podle objemu elektroforetické vany bylo vypočteno množství navážky, ke které bylo po odvážení přidáno



a rozpuštěno v příslušném množství 1x koncentrovaného TAE pufru. Rozpuštění bylo podpořeno zahřátím v mikrovlnné troubě do zajištění dokonale čirého roztoku. Následovalo mírné zchlazení, během kterého bylo k vytvořenému gelu přidáno fluorescenční barvivo v poměru 1 kapky na 50 ml gelu. Po sestavení aparatury s hřebínkem byl gel opatrně vlit do této aparatury tak, aby byl gel rovnoměrně rozprostřen a aby nedošlo ke vzniku bublin. Po zatuhnutí gelu byl hřebínek šetrně odstraněn tak, aby nedošlo k porušení vzniklých jamek, a aparatura s gelem byla vložena do elektroforetické vany, která byla doplněna do potřebného množství 1x koncentrovaným TAE pufrem. Do jamek byly následně napipetovány 3  $\mu$ l srovnávacího markeru DNA Ladder 100 bp Plus a poté 5  $\mu$ l PCR produktu s pomnoženou DNA. Následovalo připojení vany k elektrickému zdroji, který byl nastaven na 90 V. Po ukončení separace byl gel opatrně vyjmut a přenesen do transiluminátoru pod UV světlo. Výsledek byl zaznamenán pomocí fotodokumentačního systému GeneSnap.

#### **6.4.2.4 Purifikace**

Po kontrole průběhu PCR byla provedena purifikace výsledného produktu. K tomu bylo využito postupu doporučeného výrobcem kitu SPRIselect s využitím magnetických kuliček. Ty byly v požadovaném poměru smíchány s výslednými PCR produkty a důkladně promíchány. Pro každý produkt vznikla směs, která byla následně přepipetována do jamky mikrotitrační destičky. Ta byla poté umístěna na destičku s magnetickými výstupy, kde bylo možné pozorovat migraci kuliček k magnetu. Během tohoto procesu došlo k zachycení DNA na feromagnetické kuličky a zbylý supernatant byl opatrně odpipetován. Následně bylo ke kuličkám se zachycenou DNA přidáno 180  $\mu$ l 85% ethanolu, který se nechal působit po dobu 30 sekund. Kuličky pak byly opět odseparovány magnetem a supernatant odpipetován pryč. Pro dokonalé odstranění ethanolu byla mikrotitrační destička umístěna na blokový termostat, který byl nastaven na teplotu 60 °C a po vysušení bylo ke kuličkám přidáno 30  $\mu$ l PCR vody, čímž došlo k eluci DNA z magnetických kuliček. Ty byly opět odseparovány pomocí destičky s magnetickými výstupy a supernatant, tvořený PCR vodou s eluovanou DNA, byl opatrně přepipetován do čisté eppendorfkové zkumavky ke stanovení čistoty a koncentrace.

#### **6.4.2.5 Stanovení koncentrace a čistoty**

Čistota a koncentrace získaného DNA produktu byly stanoveny spektrofotometricky na multifunkčním modulárním readeru Tecan proměřením absorbance při vlnových délkách 260 a 280 nm. Součástí přístroje je destička NanoQuant Plate™. Ta byla před začátkem

měření vyčištěna ethanolem a poté byly do jednotlivých jamek nanесeny 2  $\mu$ l PCR vody, která byla použita při eluci DNA. Tento úkon sloužil pro kalibraci přístroje, tzv. BLANK. Následně byla destička opět vyčištěna ethanolem a do jamek byly napipetovány 2  $\mu$ l vzorku s izolovanou DNA. Nakonec byla proměřena absorbance a zjištěna čistota a koncentrace získané DNA.

Takto připravené vzorky DNA o dostatečné koncentraci a čistotě byly odeslány k identifikaci izolovaných kmenů metodou sekvenování genu pro 16S rRNA firmou SEQme s.r.o.

### **6.4.3 Detekce *Clostridium botulinum* v medech molekulárně-biologickými metodami**

Tato část práce byla provedena v návaznosti na mou bakalářskou práci (Mrázová, 2022), ve které již byly touto metodou testovány vzorky 1-12. Zbylé vzorky 13-21 byly analyzovány v této diplomové práci pomocí následujících kroků.

#### **6.4.3.1 Izolace DNA**

Prvním krokem byla izolace DNA, ke které byl použit stejný postup jako v mé bakalářské práci, který vycházel z diplomové práce Ing. Veroniky Pavlové (Pavlová, 2020). 10 g medu bylo za sterilních podmínek naváženo do 50ml centrifugační zkumavky a rozpuštěno v destilované vodě, která byla doplněna na objem 45 ml. Vzniklá směs byla inkubována na třepačce při teplotě 65 °C po dobu 30 minut. Po zchlazení vzorků na laboratorní teplotu byly tyto centrifugovány při 4500 rpm po dobu 30 minut. Vzniklý supernatant byl odstraněn a sediment, který zůstal na dně zkumavky, byl dále zpracován pomocí komerčního kitu pro izolaci DNA z potravin DNeasy® mericon® Food Kit a příloženého postupu (DNeasy® mericon® Food Kit, 2014). Do zkumavky byl k sedimentu přidán 1 ml lyzačního pufru a 2,5  $\mu$ l proteinázy K. Zkumavka byla opět umístěna na 30 minut na třepačku do termostatu o teplotě 60 °C. Po zchlazení na laboratorní teplotu následovala centrifugace při 2500 rpm po dobu 5 minut. Vzniklý supernatant byl tentokrát opatrně převeden do sterilní 2ml zkumavky a k němu bylo následně přidáno 500  $\mu$ l chloroformu. Vzniklá směs byla promíchána na vortexu a centrifugována při 14000 rpm po dobu 15 minut. V tomto kroku došlo k oddělení těžší, organické fáze a vodné, přičemž vodná fáze byla dále šetrně převedena do čisté 2ml zkumavky. Současně bylo nutno znát přesný objem této vodné fáze z důvodu následného přidavku stejného množství PB pufru v poměru 1:1. Směs byla opět krátce promíchána a poté napipetována do kolonky s křemičitanovou membránou. Ta byla centrifugována při 13000 rpm po dobu 1 minuty a přefiltrovaný roztok byl vylit.

Postup byl opakován do přefiltrování veškeré směsi a DNA zůstala zachycena na kolonce. Následovalo promytí zachycené DNA přídatkem AW2 pufru. Kolonka byla přenesena do čisté zkumavky a centrifugována při 13000 rpm po dobu 2 minut. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a centrifugace opakována pro dokonalé oddělení AW2 pufru. Po opětovném převedení kolonky do čisté zkumavky bylo na kolonku přivedeno 50  $\mu$ l elučního EB pufru. Následovala centrifugace při 13000 rpm po dobu 1 minuty, během čehož došlo k uvolnění DNA z kolonky do pufru.

#### 6.4.3.2 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Stanovení čistoty a koncentrace sloužilo k ověření úspěšnosti izolace DNA. K tomu byl použit stejný postup, jako při stanovení koncentrace a čistoty DNA připravené pro sekvenování popsaném v kapitole 6.4.2.5. Pro kalibraci přístroje, tzv. BLANK, byly do jednotlivých jamek nanášeny 2  $\mu$ l elučního EB pufru, který byl použit při izolaci DNA a její eluci v předchozí kapitole.

#### 6.4.3.3 PCR

Pro pomnožení DNA úseků, které byly izolovány postupem popsaným v přechozí kapitole 6.4.3.1, bylo využito metody PCR. Před zahájením tohoto kroku byl PCR box vysterilizován UV světlem po dobu 20 minut. Následovala příprava 20  $\mu$ l 7 reakčních směsí, jejichž složení je uvedeno níže v tabulce (Tabulka 6), a které se mezi sebou lišily obsahem použitých primerů. Jejich sekvence jsou znázorněny v tabulce (Tabulka 7). Směsi byly připraveny bez DNA hromadně pro všechny vzorky do sterilních 1,5ml zkumavek a rozpipetovány po 19  $\mu$ l do sterilních mikrozkušavek spojených do stripů. Následoval přídatvek 1  $\mu$ l DNA a zavřené zkumavky byly promíchány na vortexu a vloženy do termocykleru, na kterém byl zvolen příslušný program (Tabulka 8).

Tabulka 6 Složení PCR směsi připravené pro jednu dvojici primerů

Složení reakční směsi	Objem složky obsažené v jenom vzorku [ $\mu$ l]
Go Taq® G2 Hot Start Green Master Mix	10
Sterilní voda pro PCR	7
Forward primer	1
Reverse primer	1
DNA	1

Tabulka 7 Použité primery pro stanovení bakterií rodu *Clostridium*

Primery	Sekvence ve směru 5' → 3'	Velikost PCR produktu [bp]	Publikace
Af	GCTACGGAGGCAGCTATGTT	782 bp	(Poormontaseri et al., 2014)
Ar	CGTATTTGGAAAGCTGAAAAGG		
Bf	CAGGAGAAGTGGAGCGAAAA	205 bp	(Poormontaseri et al., 2014)
Br	CTTGCGCCTTTGTTTTCTTG		
Er	CCAAGATTTTCATCCGCCTA	389 bp	(Poormontaseri et al., 2014)
Ef	GCTATTGATCCAAAACGGTG		
IOA <sub>f</sub>	GGGCCTAGAGGTAGCGTARTA1*	101 bp	(Wojtacka et al., 2017)
IOA <sub>r</sub>	TCTTYATTTCCAGAAGCATATTT**		
CBMLB <sub>f</sub>	CAGGAGAAGTGGAGCGAAAA	205 bp	(Wojtacka et al., 2017)
CBMLB <sub>r</sub>	CTTGCGCCTTTGTTTTCTTG		
CBMLE <sub>f</sub>	CCAAGATTTTCATCCGCCTA	389 bp	(Wojtacka et al., 2017)
CBMLE <sub>r</sub>	GCTATTGATCCAAAACGGTGA		
CBMLF <sub>f</sub>	CGGCTTCATTAGAGAACGGA	543 bp	(Wojtacka et al., 2017)
CBMLF <sub>r</sub>	TAACTCCCCTAGCCCCGTAT		

\*R = A nebo G; \*\* Y = C nebo T

Tabulka 8 Schéma průběhu PCR

Reakční krok	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Počáteční denaturace (Hot Start)	95	5	
Denaturace	95	0,5	35
Připojení primerů	55	0,5	
Syntéza řetězce DNA	72	2	
Závěrečná extenze	72	10	
Uchování	4	∞	

#### 6.4.3.4 Elektroforetické vyhodnocení

Po ukončení PCR bylo provedeno elektroforetické vyhodnocení. K tomu byl použit stejný postup, jako při elektroforetickém vyhodnocení DNA produktů popsaném v kapitole 6.4.2.3.

#### 6.4.4 Celogenomová sekvenace vybraných vzorků medů (NGS)

DNA izolovaná z medů popsaná v kapitole 6.4.3.1 byla podrobena taxonomické analýze bakteriálního a houbového profilu využitím metody NGS (Next Generation Sequencing). Prvním krokem byla amplifikace vybraných úseků DNA metodou PCR. Ta byla provedena

ve dvou krocích. Následovala kontrola úspěšnosti PCR změřením čistoty a koncentrace výsledných produktů a jejich elektroforetické vyhodnocení.

#### 6.4.4.1 Primární PCR

Pro amplifikaci DNA byly vybrány variabilní oblasti V4-V5 kódující 16S rRNA bakterií a interní transkriptorový spacer ITS2 pro houby. K tomu bylo využito specifických primerů uvedených v tabulce (Tabulka 9).

Nejprve byl PCR box vysterilizován UV světlem po dobu 20 minut pro zabránění kontaminace vzorků. Následovala příprava reakční směsi o objemu 25  $\mu$ l, jejíž složení uvádí tabulka (Tabulka 10). Směsi byly připraveny bez DNA hromadně pro všechny vzorky do sterilních 1,5ml zkumavek a rozpipetovány po 24  $\mu$ l do sterilních mikrozkušavek spojených do stripů. Následoval přidavek 1  $\mu$ l DNA a zavřené zkumavky byly promíchány na vortexu a vloženy do termocykleru, na kterém byl zvolen příslušný program, přičemž amplifikace probíhala v 25 cyklech (Tabulka 11).

Tabulka 9 Primery použité v primární PCR

Primer	Sekvence ve směru 5' → 3'	Skupina	Publikace
515f	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	Bakterie	(Walters et al., 2016)
926r	CCGYCAATTYMTTTRAGTTT		
ITS3f	GCATCGATGAAGAACGCAGC	Fungi (houby)	(Op De Beeck et al., 2014)
ITS4r	TCCTCCGCTTATTGATATGC		

Tabulka 10 Složení směsi připravené pro primární PCR

Složení reakční směsi	Objem složky obsažené v jenom vzorku [ $\mu$ l]
2x EliZyme™ HS Robust Mix	12,5
Sterilní voda pro PCR	10,5
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
DNA	1

Tabulka 11 Znázornění průběhu primární (sekundární) PCR

Reakční krok	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Počáteční denaturace (Hot Start)	95	3	
Denaturace	95	0,5	25 (35 pro sekundární PCR)
Připojení primerů	55	0,5	
Syntéza řetězce DNA	72	1	
Závěrečná extenze	72	10	
Uchování	4	∞	

#### 6.4.4.2 Sekundární PCR

Výsledné produkty z primární PCR byly použity jako templát pro následnou sekundární PCR. V tomto kroku došlo k napojení primerů obsahujících indexy i7 a i5. Každý vzorek obsahoval jinou kombinaci těchto indexů.

Následovala příprava 50  $\mu$ l směsi, jejíž složení je uvedeno v tabulce (Tabulka 12). Po vysvícení PCR boxu byly připraveny mastermixy bez DNA hromadně pro všechny vzorky do sterilních 1,5ml zkumavek a rozpipetovány po 48  $\mu$ l do sterilních mikrozkušavek. Následoval přídavek 2  $\mu$ l DNA a zavřené zkumavky byly promíchány na vortexu a vloženy do termocyklu, na kterém byl zvolen stejný program jako u primární PCR s tím rozdílem, že bylo provedeno o 10 cyklů více (tedy 35 cyklů) (Tabulka 11).

Tabulka 12 Složení směsi připravené pro sekundární PCR

Složení reakční směsi	Objem složky obsažené v jenom vzorku [ $\mu$ l]
2x EliZyme™ HS Robust Mix	25
Sterilní voda pro PCR	21
Forward primer – i7	1
Reverse primer – i5	1
DNA	2

#### 6.4.4.3 Vyhodnocení úspěšnosti PCR

Následovalo elektroforetické vyhodnocení úspěšnosti PCR a kontrola čistoty a koncentrace výsledných produktů. Stanovení čistoty a koncentrace bylo stanoveno spektrometrickou metodou, při níž došlo k proměření absorbance příslušných vzorků při vlnových délkách 260 a 280 nm. K měření bylo využito multifunkčního modulárního readeru TECAN stejně jako v kapitole 6.4.2.5. Elektroforetické vyhodnocení bylo provedeno v 1,5% agarózovém

gelu, který byl připraven stejně jako v kapitole 6.4.2.3. Výsledné produkty byly zaslány ke zpracování do firmy SeQme s.r.o.

#### **6.4.5 Stanovení antimikrobní aktivity vybraných vzorků medů**

Antimikrobní aktivita byla stanovena u zvolených vzorků medů lišících se rokem stáčení, lokalitou a původem na vybrané kmeny bakterií pocházejících z České sbírky mikroorganismů a ze sbírky mlékařských kultur Laktoflora. Jednalo se o vzorky 3, 4, 6, 9, 12, 13, 15, 17, 18 a 21 (Tabulka 1). Stanovení bylo měřeno mikrodiluční metodou pomocí mikrotitrační destičky.

##### **6.4.5.1 Příprava měření**

Prvním krokem byla příprava kultivačních médií MH agaru, MH broth, M17 broth, M17 agaru a fyziologického roztoku. Bujóny byly rozděleny do zkumavek po 3 ml. Připravené roztoky a kultivační půdy byly sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po zchladnutí byl MH agar a M17 agar za aseptických podmínek v biohazardboxu rozlity do Petriho misek a ty byly ponechány k zatuhnutí.

Dalším úkolem byla resuscitace bakteriálních kmenů, které byly uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -80 °C. Jednotlivé kultury byly přeočkovány křížovým roztěrem na příslušné půdy, BMK (*Enterococcus durans* CCDM 53, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141) na M17 a ostatní na MH, a kultivovány v termostatu při 30 °C po dobu 1-2 dnů do narostení viditelných kolonií.

Pro měření na mikrotitrační destičce bylo potřeba přípravy bakteriální suspenze. Narostlé kolonie byly tedy následně zaočkovány do zkumavek s příslušným bujónem, BMK (*Enterococcus durans* CCDM 53, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141) na M17 a ostatní na MH, a kultivovány opět při 30 °C po dobu 1-2 dnů. Bakteriální suspenze byla dále zředěna fyziologickým roztokem na hodnotu zákalu 1,0 dle stupnice McFarlanda (McF), která byla změřena na denzilometru.

Posledním důležitým krokem přípravy byla příprava medových roztoků, které byly chystány vždy čerstvě před analýzou. 4 g medu byly rozpuštěny v 8 ml bujónu, čímž byl získán medový roztok o koncentraci 500 mg/ml. Následovalo přefiltrování přes sterilní stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,2 μm a dosažení sterility roztoku. Konečným krokem bylo ředění geometrickou řadou, které bylo získáno smícháním 3 ml MHB vždy s 3 ml medového

roztoku předchozí koncentrace. Byla tedy získána škála medových roztoků o koncentraci 31-500 mg/ml.

#### 6.4.5.2 Příprava mikrotitrační destičky

Pro stanovení antimikrobní aktivity byla použita diluční metoda s využitím 96 jamkových mikrotitrační destičky, která stanovuje minimální inhibiční koncentraci (MIC), tedy nejnižší koncentraci antimikrobní látky, v tomto případě medu, která je již schopna inhibovat růst příslušného kmene mikroorganismu.

Schéma rozdělení mikrotitrační destičky je znázorněno níže na obrázku (Obrázek 9). Na každou destičku byly nanášeny vždy dva vzorky medu v příslušných koncentracích a 4 bakterie, rovněž vždy paralelně ve dvou řádcích. První sloupec sloužil jako kontrola růstu příslušného mikroorganismu (KR). Do těchto jamek bylo nanášeno 10  $\mu$ l bakteriální suspenze a 200  $\mu$ l sterilního MHB bez přídavku antimikrobní látky (medu). Poslední sloupec sloužil jako kontrola sterility (KS), kde bylo nanášeno pouze 200  $\mu$ l sterilního MHB bez inokulace mikroorganismu. Do zbylých jamek bylo nanášeno vždy 10  $\mu$ l bakteriální suspenze a 200  $\mu$ l bujónu s medovým roztokem o příslušné koncentraci.

		1. med						2. med					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.bakterie	A	KR	500*	250	125	62	31	500	250	125	62	31	KS
	B	KR	500	250	125	62	31	500	250	125	62	31	KS
2.bakterie	C	KR	500	250	125	62	31	500	250	125	62	31	KS
	D	KR	500	250	125	62	31	500	250	125	62	31	KS
3.bakterie	E	KR	500	250	125	62	31	500	250	125	62	31	KS
	F	KR	500	250	125	62	31	500	250	125	62	31	KS
4.bakterie	G	KR	500	250	125	62	31	500	250	125	62	31	KS
	H	KR	500	250	125	62	31	500	250	125	62	31	KS

\*koncentrace medového roztoku v bujónu (v mg/ml)

Obrázek 9 Schéma nanášení vzorků na mikrotitrační destičku

#### 6.4.5.3 Vlastní měření

Samotné měření bylo provedeno na přístroji TECAN, kde byla pozorována změna optické denzity. Destička byla přelepena průhlednou fólií, vložena do přístroje a následně byl zvolen požadovaný program a nastaveny parametry měření. Měření bylo provedeno při vlnové délce 600 nm při teplotě 30 °C po dobu 42-48 hodin a měření zákalu (optické denzity) probíhalo v intervalu 60 minut. Zaznamenané hodnoty byly nakonec zpracovány do grafů a vyhodnoceny.



## 6.4.6 Stanovení antioxidační aktivity

### 6.4.6.1 Příprava vzorků

Ke stanovení byly vybrány vzorky, lišící se rokem stáčení, lokalitou a původem, jako při měření antimikrobní aktivity. Jednalo se o stejné vzorky, u kterých byla testována antimikrobní aktivita (vzorky 3, 4, 6, 9, 12, 13, 15, 17, 18 a 21; Tabulka 1). Prvním krokem byla příprava medových roztoků, které byly použity pro následné měření. Do kádinky bylo na analytických vahách naváženo 0,5 g vzorku medu s přesností na 0,0001 g, který byl následně rozpuštěn ve 3 ml redestilované vody. Po rozpuštění byl roztok kvantitativně doplněn na objem 10 ml. Každý vzorek byl připraven paralelně dvakrát ze dvou navážek. Takto připravené medové roztoky byly zamrazeny do následného stanovení.

### 6.4.6.2 Stanovení polyfenolů

Do 10ml odměrných baněk byly odpipetovány cca 2 ml redestilované vody, ke kterému bylo dále přidáno 400-2000  $\mu$ l medového roztoku. Množství dávkovaného roztoku záviselo na reakci, během které došlo k obarvení vzniklého vzorku. Následoval přídavek 0,5 ml Folin-Ciocalteho činidla a 1,5 ml 20% uhličitanu sodného. Vzorek byl nakonec doplněn redestilovanou vodou na objem 10 ml, promíchán a ponechán 30 minut v klidu. Po uplynutí této doby byla proměřena absorbance modře zbarvených vzorků při vlnové délce 765 nm. Pro každý vzorek medu bylo naměřeno celkem 8 hodnot a provedeno vyhodnocení, které bylo vztaženo ke kalibrační křivce, vztažené na kyselinu gallovou v koncentracích 50-250 mg/l. Kalibrační křivka tedy udávala závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové. Lineární regresi pak byla vyjádřena koncentrace celkových polyfenolů, vyjádřených v ekvivalentech kyseliny gallové na gram medu.

### 6.4.6.3 Stanovení antioxidační aktivity zhášením radikálu DPPH

Prvním krokem byla příprava zásobního roztoku DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazil). Na lodičku bylo naváženo 24 mg DPPH, které bylo následně převedeno do 100ml odměrné baňky. Radikál byl rozpouštěn v methanolu s využitím ultrazvukové lázně. Poté byl z tohoto roztoku připraven pracovní roztok, který vznikl smícháním zásobního roztoku DPPH s methanolem v poměru 10:45, tedy 100 ml zásobního roztoku a 450 ml methanolu. Následovalo nastavení spektrofotometru na nulovou absorbanci s použitím methanolu, tzn. blanku. Poté byla ještě změřena absorbance pracovního roztoku proti methanolu. Tato hodnota byla zaznamenána jako  $A_0$ . Následovala příprava vzorků. Do skleněných

zkumavek bylo napipetováno 4 ml pracovního roztoku DPPH, ke kterému bylo následně přidáno množství extraktu, potřebné k průběhu reakce s radikálem. Reakce se projevila odbarvením pracovního roztoku. Pipetovaný objem se u jednotlivých vzorků lišil. Připravené zkumavky byly umístěny v temnu, kdy proběhla reakce antioxidantů s radikály DPPH. Po uplynutí jedné hodiny byl spektrofotometricky při vlnové délce 515 nm proměřen úbytek absorbance jednotlivých vzorků  $A_i$ . Pro každý vzorek medu byly naměřeny celkem 4 hodnoty, které byly přepočteny na % inaktivace podle následujícího vzorce [1]:

$$inaktivace = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \cdot 100 [\%] \quad [1]$$

Na základě rovnice lineární regrese, která vznikla ze závislosti inaktivace na koncentraci standardu troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylové kyseliny), pro který byla sestrojena kalibrační křivka, byla vypočtena hodnota antioxidační aktivity, vyjádřené v ekvivalentech troloxu na gram medu.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této diplomové práce byla analýza 21 vzorků medů získaných v období posledních tří let z různých lokalit České republiky i zahraničí. Vzorky byly poskytnuty soukromými včelaři nebo byly zakoupeny v obchodní síti. Dvanáct vzorků bylo analyzováno na mikrobiální zastoupení a přítomnost *Clostridium botulinum* již v mé bakalářské práci (Mrázová, 2022) a účelem této práce je porovnání těchto vzorků se vzorky novějšími, které byly podrobeny obdobným analýzám, jako jsou kultivační stanovení s následnou identifikací nebo testování na přítomnost *Clostridium botulinum* s využitím molekulárně-biologických metod. Navíc byla provedena analýza vybraných vzorků (vzorky 3, 4, 6, 9, 12, 13, 15, 17, 18 a 21) lišících se rokem stáčení, lokalitou a původem stanovení antimikrobní aktivity a následně antioxidační aktivity.

### 7.1 Kultivační stanovení

Kultivační stanovení bylo provedeno pouze se vzorky 13-21 (u ostatních v bakalářské práci (Mrázová, 2022)) dvakrát v půlročním rozestupu a vypovídá o přítomnosti kultivovatelných skupin mikroorganismů, které se v jednotlivých vzorcích nacházejí. Stanovení bylo provedeno v ředění  $10^{-1}$  vždy na dvě paralelní misky příslušných kultivačních půd. Kolonie mikroorganismů narostlých na miskách byly spočítány a vyjádřeny v hodnotě CFU/g dle vzorce [2]:

$$N = \frac{\Sigma c}{V \cdot d \cdot n} \quad [2]$$

$\Sigma C$ ...je součet kolonií na všech vybraných miskách [-]

$V$ ...je objem očkovaného vzorku [ml]

$d$ ... je použité ředění [-]

$n$ ...je počet použitých misek [-]

V žádném z testovaných medů nebyl detekován růst mikroskopických vláknitých hub, resp. plísní. Výsledky pro kultivační půdu CHYGA jsou vztaženy pouze na počty kvasinek, což může ukazovat na zvýšený obsah vody v příslušných vzorcích medu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 13).

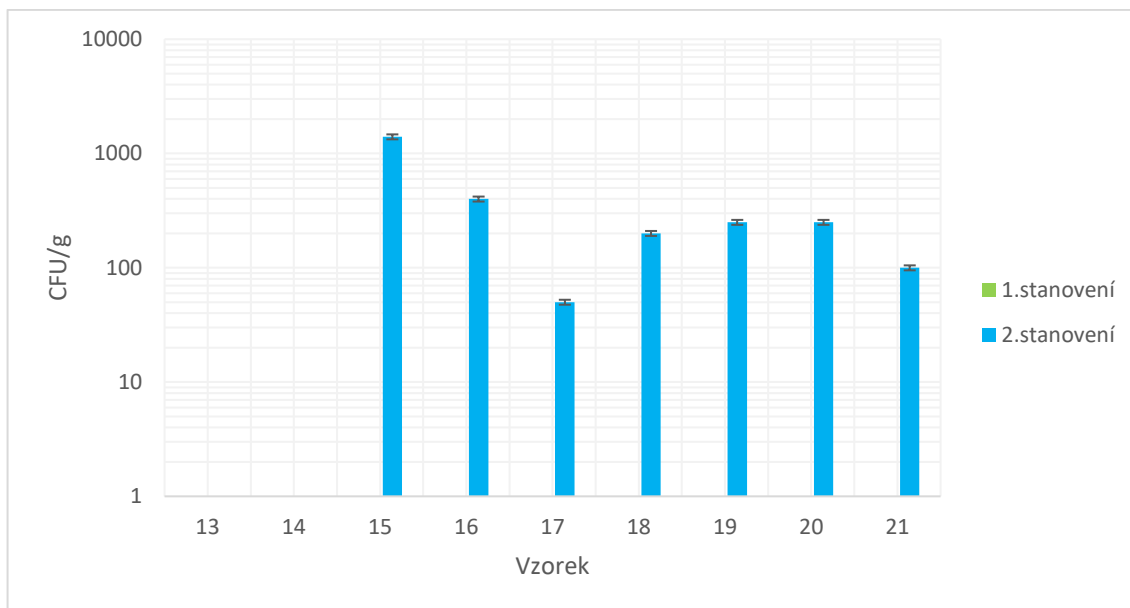
Tabulka 13 Výsledky kultivačního stanovení indikátorových skupin mikroorganismů v analyzovaných medech v rozmezí 6 měsíců v roce 2023 (výsledky udávají průměrnou hodnotu ze dvou misek)

Vzorek	1. stanovení (březen 2023) [CFU/g]			2. stanovení (září 2023) [CFU/g]			
	PCA*	PCA AN*	RCA*	K+P	PCA	PCA AN	RCA
13	ND**	ND	$1,00 \cdot 10^2 \pm 0,0$	ND	$1,50 \cdot 10^2 \pm 0,5$	ND	$1,50 \cdot 10^2 \pm 0,5$
14	ND	ND	$5,00 \cdot 10^1 \pm 0,5$	ND	$1,00 \cdot 10^2 \pm 1,0$	$1,50 \cdot 10^2 \pm 0,5$	$1,50 \cdot 10^2 \pm 1,5$
15	$2,50 \cdot 10^2 \pm 0,5$	$5,00 \cdot 10^2 \pm 1,0$	$3,00 \cdot 10^2 \pm 0,0$	$1,40 \cdot 10^3 \pm 2,0$	$1,57 \cdot 10^4 \pm 2,5$	$1,26 \cdot 10^4 \pm 7,0$	$1,37 \cdot 10^4 \pm 6,5$
16	$2,00 \cdot 10^2 \pm 0,0$	$1,00 \cdot 10^2 \pm 1,0$	$3,50 \cdot 10^2 \pm 0,5$	$4,00 \cdot 10^2 \pm 1,0$	$1,70 \cdot 10^4 \pm 3,0$	$1,58 \cdot 10^4 \pm 5,5$	$1,84 \cdot 10^4 \pm 3,0$
17	$3,50 \cdot 10^2 \pm 1,5$	$1,00 \cdot 10^2 \pm 0,0$	$5,00 \cdot 10^1 \pm 0,5$	$5,00 \cdot 10^1 \pm 0,5$	$1,44 \cdot 10^4 \pm 4,5$	$1,10 \cdot 10^4 \pm 2,0$	$1,38 \cdot 10^4 \pm 3,0$
18	$1,05 \cdot 10^3 \pm 0,5$	$6,50 \cdot 10^2 \pm 1,5$	$8,50 \cdot 10^2 \pm 3,5$	$2,00 \cdot 10^2 \pm 1,0$	$1,32 \cdot 10^4 \pm 2,5$	$1,16 \cdot 10^4 \pm 3,5$	$9,70 \cdot 10^3 \pm 4,0$
19	$9,00 \cdot 10^2 \pm 2,0$	$1,50 \cdot 10^2 \pm 0,5$	$7,50 \cdot 10^2 \pm 0,5$	$2,50 \cdot 10^2 \pm 1,5$	$1,11 \cdot 10^4 \pm 4,0$	$9,15 \cdot 10^3 \pm 6,5$	$9,15 \cdot 10^3 \pm 3,5$
20	$2,00 \cdot 10^2 \pm 1,0$	$1,50 \cdot 10^2 \pm 1,5$	$1,00 \cdot 10^2 \pm 0,0$	$2,50 \cdot 10^2 \pm 0,5$	$1,08 \cdot 10^4 \pm 6,5$	$9,55 \cdot 10^3 \pm 4,5$	$9,75 \cdot 10^3 \pm 1,5$
21	$2,00 \cdot 10^2 \pm 0,0$	$5,00 \cdot 10^2 \pm 1,0$	$1,00 \cdot 10^2 \pm 1,0$	$1,00 \cdot 10^2 \pm 1,0$	$1,49 \cdot 10^4 \pm 3,5$	$9,10 \cdot 10^3 \pm 2,0$	$1,12 \cdot 10^4 \pm 2,5$

\*Obě měření byla provedena podle postupu popsáném v kapitole 7.4.1

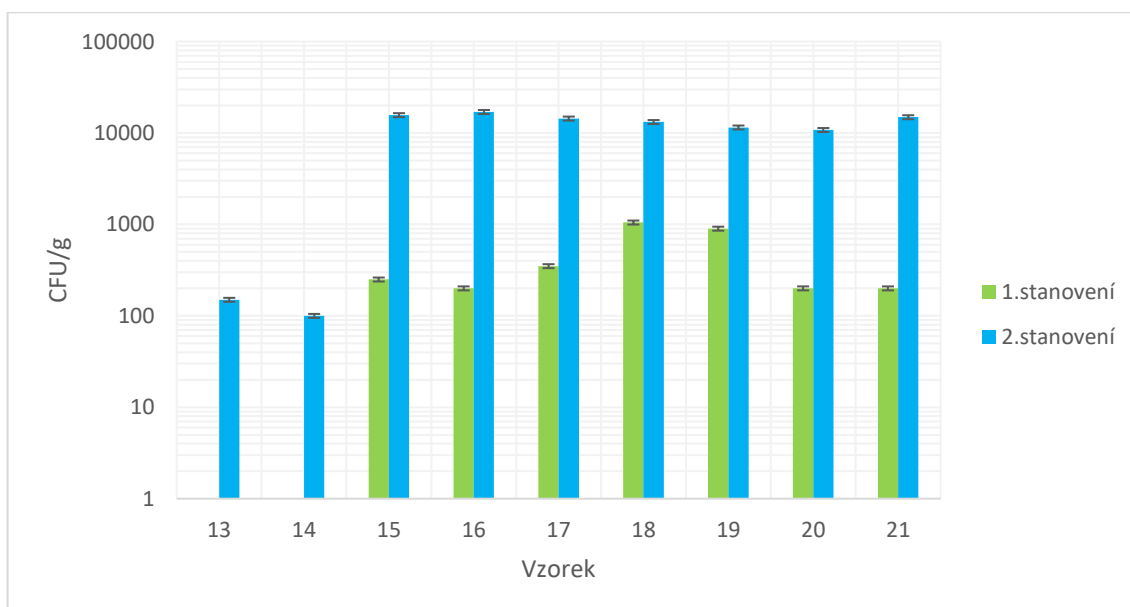
\*\*ND – nebyl detekován nárůst na žádné ze dvou paralelních misek

Z výsledků je viditelné, že u všech vzorků medů došlo při skladování za běžných podmínek (v temnu při  $30 \pm 5$  °C) k pomnožení kultivovatelných mikroorganismů v testovaných vzorcích. V případě prvního stanovení nebyl detekován žádný nárůst mikroskopických hub. Příčinou byl s největší pravděpodobností způsob skladování vzorků, které sice byly uchovávány v temnu při běžné pokojové (laboratorní) teplotě, ale vzhledem k tomu, že byly skladovány během letního období, mohla tato teplota vzrůst nad optimální podmínky pro pomnožení některých skupin mikroorganismů. Pro přehlednější vizualizaci nárůstu mikroorganismů medů v průběhu skladování mezi prvním a druhým měřením jsou výsledky znázorněny v následujících grafech (Obrázek 10-13).



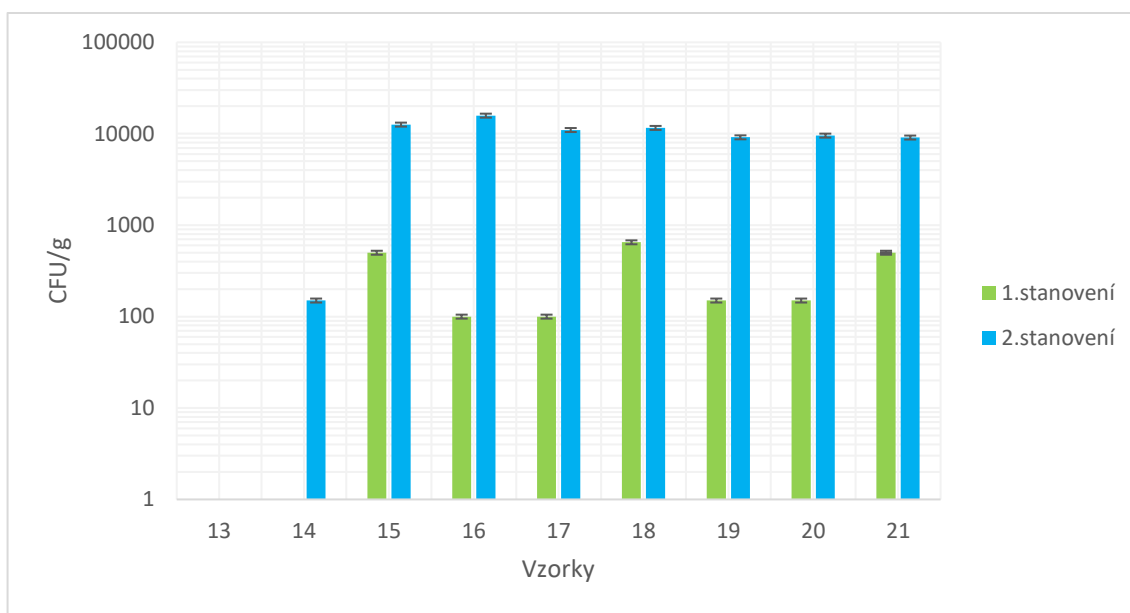
Obrázek 10 Počet stanovených mikroskopických hub v rozmezí dvou stanovení

Při prvním stanovení nebyl detekován žádný nárůst mikroorganismů kultivovatelných mikroskopických hub. I přesto došlo během skladování k pomnožení kvasinek, což mohlo být zapříčiněno nejen optimální teplotou jejich růstu, ale také možným zvýšeným obsahem vody ve vzorcích 15-21. V případě vzorků 13 a 14 nebyl detekován růst ani v případě druhého stanovení.



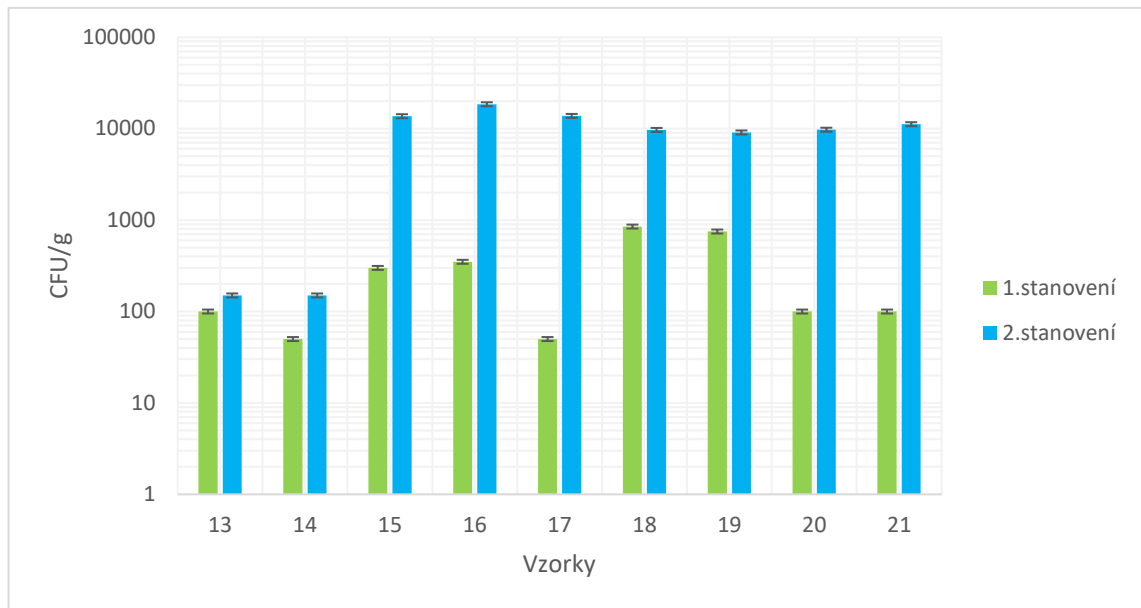
Obrázek 11 Pomnožení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů během skladování medů

V případě stanovení celkového počtu mikroorganismů na PCA byl pozorován zvýšený nárůst ve všech testovaných vzorcích. Počty byly řádově srovnatelné, kromě vzorků 13 a 14. Zpravidla došlo ve všech případech k pomnožení kultivovatelných mikroorganismů o dva řády.



Obrázek 12 Pomnožení sporulujících mikroorganismů rostoucích na PCA za aerobních podmínek

Při stanovení počtu mikroorganismů na PCA kultivovaných za anaerobních podmínek lze opět pozorovat srovnatelnost nárůstu ve vzorcích 15-21. Opět došlo k pomnožení v rozmezí jednoho až dvou řádů, s výjimkou vzorku 13, kde nebyl zaznamenán žádný nárůst ani v jednom stanovení.



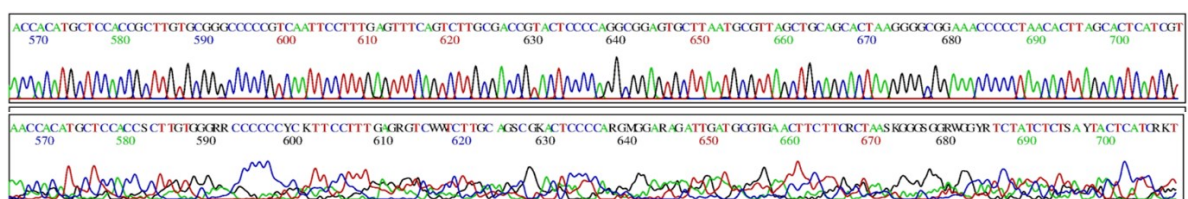
Obrázek 13 Pomnožení mikroorganismů rostoucích na RCA

Obdobně tomu bylo i při stanovení počtu *Clostridium* spp. a dalších anaerobních sporulujících bakterií. V žádném případě nebyl pozorován růst kolonií charakteristických pro klostridie. K pomnožení anaerobů ale došlo ve všech vzorcích.

Z misek s PCA a RCA bylo vybráno a izolováno 44 kolonií. Ty byly následně třikrát překřížovány na příslušné půdy a kultivovány za stejných podmínek. Následně byly kolonie nachystány do podoby vzorků určených k identifikaci příslušnými metodami.

## 7.2 Vyhodnocení sekvenace genu pro 16S rRNA

Metodou použitou k identifikaci izolovaných bakterií byla metoda sekvenace genu pro 16S rRNA. Vybrané kolonie, získané kultivačním stanovením, byly izolovány a upraveny k odeslání do firmy SEQme s.r.o na identifikaci. Výsledky byly následně upraveny a vyhodnoceny (Obrázek 14) pomocí databáze BLAST a identifikované mikroorganismy shrnuty do tabulky níže (Tabulka 14). Mezi identifikovanými mikroorganismy byly převážně bakterie rodu *Bacillus*, nejčastěji pak *Bacillus velezensis*. Pouze v jednom případě byla identifikována bakterie jiného rodu, a to rodu *Pseudomonas* sp.



Obrázek 14 Příklad porovnání vyhovující a nevhovující sekvence (archiv autorky)

Tabulka 14 Výsledky identifikace izolovaných bakterií metodou sekvenace genu pro 16S rRNA

Vzorek	Izolát	Identifikovaný MO	Procento přesnosti identifikace [%]	Vzorek	Izolát	Identifikovaný MO	Procento přesnosti identifikace [%]
13	1C	<i>Bacillus licheniformis</i>	98,83	17	8C	<i>Bacillus velezensis</i>	99,34
	1P	<i>Bacillus</i> sp.	99,46		8P	<i>Bacillus velezensis</i>	99,12
	2P	<i>Bacillus subtilis</i>	93,49	18	9A	<i>Bacillus velezensis</i>	98,68
14	1A	<i>Bacillus velezensis</i>	99,91		9C	<i>Bacillus velezensis</i>	97,81
	2C	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Natto</i>	99,73		17P	<i>Bacillus</i> sp.	99,78
	2A	<i>Bacillus velezensis</i>	99,12	10P	<i>Bacillus velezensis</i>	98,68	
15	4P	<i>Bacillus</i> sp.	99,54	19	10C	<i>Bacillus velezensis</i>	99,34
	3C	<i>Bacillus velezensis</i>	98,17		10A	<i>Bacillus velezensis</i>	99,05
	3P	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98,98		12P	<i>Bacillus velezensis</i>	99,49
	4A	<i>Bacillus velezensis</i>	99,12		15C	<i>Bacillus</i> sp.	99,34
	4C	<i>Bacillus velezensis</i>	97,66	11P	<i>Pseudomonas</i> sp.	99,64	
	5A	<i>Bacillus subtilis</i>	98,68	20	12C	<i>Bacillus</i> sp.	99,49
	5C	<i>Bacillus</i> sp.	98,68		13P	<i>Bacillus velezensis</i>	99,18
	5P	<i>Bacillus</i> sp.	99,41		14P	<i>Bacillus velezensis</i>	98,91
6A	<i>Bacillus velezensis</i>	99,20	11A		<i>Bacillus velezensis</i>	98,68	
16	6C	<i>Bacillus velezensis</i>	99,12	11C	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,34	
	6P	<i>Bacillus velezensis</i>	99,04	14C	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98,61	
	7A	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,56	13C	<i>Bacillus velezensis</i>	99,56	
	7C	<i>Bacillus</i> sp.	99,82	12A	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98,75	
	7P	<i>Bacillus velezensis</i>	99,05	15P	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99,19	
17	9P	<i>Bacillus</i> sp.	99,12	16P	<i>Bacillus velezensis</i>	99,71	
	8A	<i>Bacillus velezensis</i>	99,04	3A	<i>Bacillus velezensis</i>	99,05	

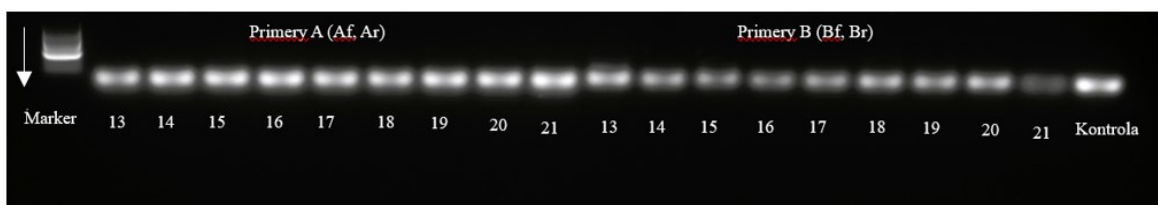
Součástí identifikace bakterií bylo skóre udávající procento přesnosti identifikace, které se v ideálních případech pohybuje minimálně na úrovni hodnoty 96 %. Tak tomu bylo vždy kromě jednoho případu, kdy byl u vzorku 13 identifikován *Bacillus subtilis* s identifikačním



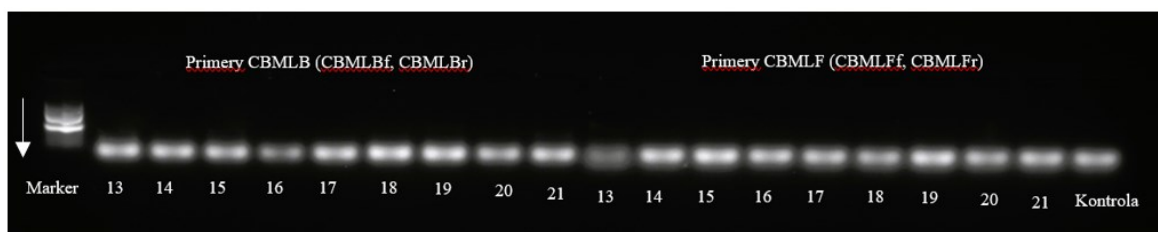
skóre 93,49 %. Ostatní vzorky byly identifikovány s poměrně vysokým skóre. Všechny identifikované bakterie se do medu dostaly pravděpodobně primární kontaminací, za niž jsou zodpovědné včely, které ji přenášejí z vnějších zdrojů.

### 7.3 Vyhodnocení přítomnosti *Clostridium botulinum*

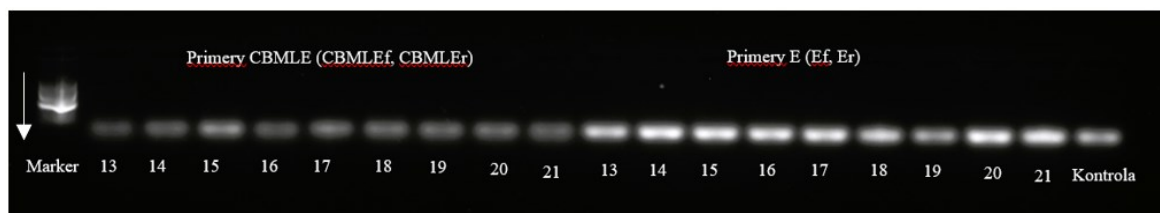
Detekce *Clostridium botulinum* byla provedena využitím molekulárně-biologických metod. Prvním krokem byla izolace DNA pomocí komerčního kitu pro potraviny Dneasy® mericon® Food Kit, jejíž úspěšnost byla ověřena spektrofotometrickým měřením absorbance při vlnových délkách 260 a 280 nm na přístroji TECAN. Na základě změřených hodnot byla vyjádřena nejen koncentrace, ale také čistota izolované DNA, která je dána poměrem změřených absorbancí. Ideální hodnota je rovna 1,8. Hodnota vyšší než 1,9 vyjadřuje, že je izolovaná DNA znečištěná RNA. V opačném případě, kdy je hodnota nižší než 1,7 je DNA znečištěna proteiny. Po této kontrole byla provedena PCR, při které byly využity specifické primery, aby došlo ke zmnožení úseku DNA, který je specifický právě pro *Clostridium botulinum*. Výsledek byl stanoven elektroforeticky, vizualizován pod UV světlem a zaznamenán pomocí fotodokumentačního programu GeneSnap (Obrázky 15-18).



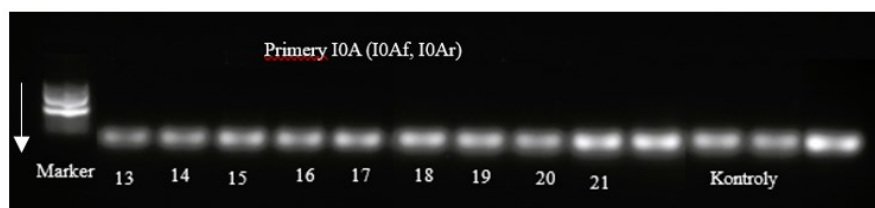
Obrázek 15 Výsledky průběhu elektroforézy 1 (získáno pomocí GeneSnap)  
Šipka znázorňuje směr průběhu elektroforézy od katody k anodě, čísla označují čísla vzorků, kontrola představovala připravenou směs jako vzorky (bez DNA)



Obrázek 16 Výsledky průběhu elektroforézy 2 (získáno pomocí GeneSnap)  
Šipka znázorňuje směr průběhu elektroforézy od katody k anodě, čísla označují čísla vzorků, kontrola představovala připravenou směs jako vzorky (bez DNA)



Obrázek 17 Výsledky průběhu elektroforézy 3 (získáno pomocí GeneSnap)  
Šipka znázorňuje směr průběhu elektroforézy od katody k anodě, čísla označují čísla vzorků, kontrola představovala připravenou směs jako vzorky (bez DNA)

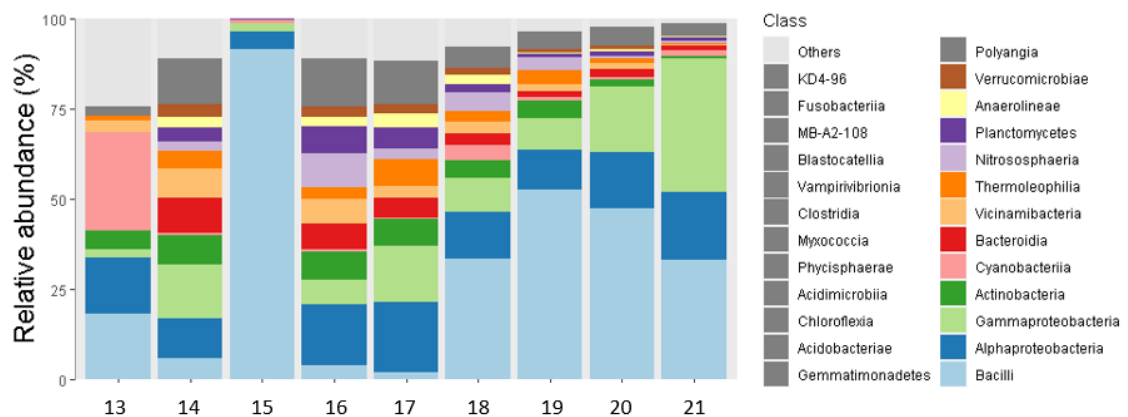


Obrázek 18 Výsledky průběhu elektroforézy 4 (získáno pomocí GeneSnap)  
Šipka znázorňuje směr průběhu elektroforézy od katody k anodě, čísla označují čísla vzorků, kontrola představovala připravenou směs jako vzorky (bez DNA)

Z výsledků elektroforetického vyhodnocení lze pozorovat přítomnost DNA amplifikované pomocí polymerázové řetězové reakce. DNA byla přítomna v dostatečné koncentraci, aby byla detekovatelná pod UV-světlem a byla porovnána s DNA markerem o známé velikosti. Ani v jednom případě se však nejednalo o výsledný PCR produkt odpovídající amplikonu *Clostridium botulinum*, protože ani jeden produkt neodpovídal velikosti PCR produktu (Tabulka 7), který by byl v případě přítomnosti této bakterie ve vzorku a využitím specifických primerů detekován. Podle vizualizovaných výsledků elektroforézy se pravděpodobně jednalo o nezreagované primery. Závěrem tohoto stanovení tedy je, že v žádném s testovaných vzorků medů (13-21) nebyla detekována přítomnost bakterie *Clostridium botulinum*.

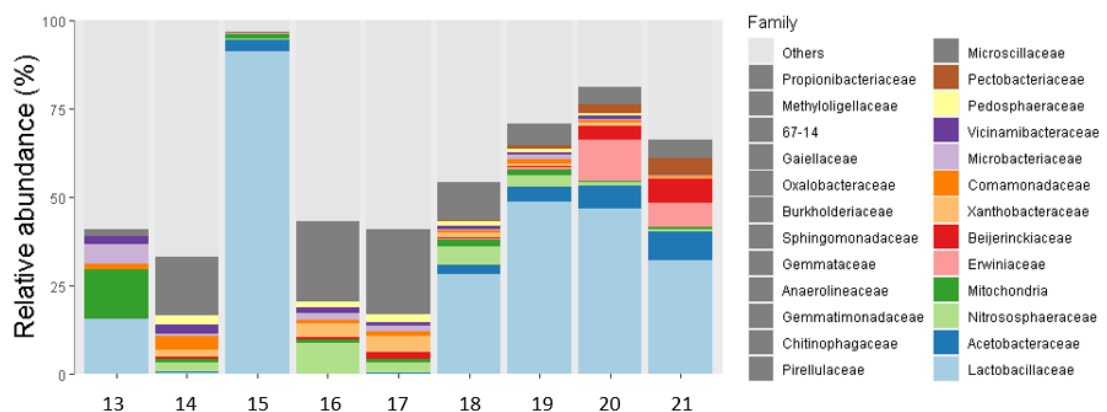
#### 7.4 Mikrobiota vybraných medů

Ve spolupráci s firmou SEQme s.r.o. byla provedena taxonomická analýza bakteriálního profilu, která byla provedena u vzorků 13-21, a houbového profilu, provedené pro vzorky 13, 15, 20 a 21, využitím metody NGS (Next Generation Sequencing). Na základě výsledků taxonomické analýzy bylo provedeno zařazení do tříd a čeledí. Jednotlivé výsledky jsou zobrazeny níže (Obrázky 19-22).



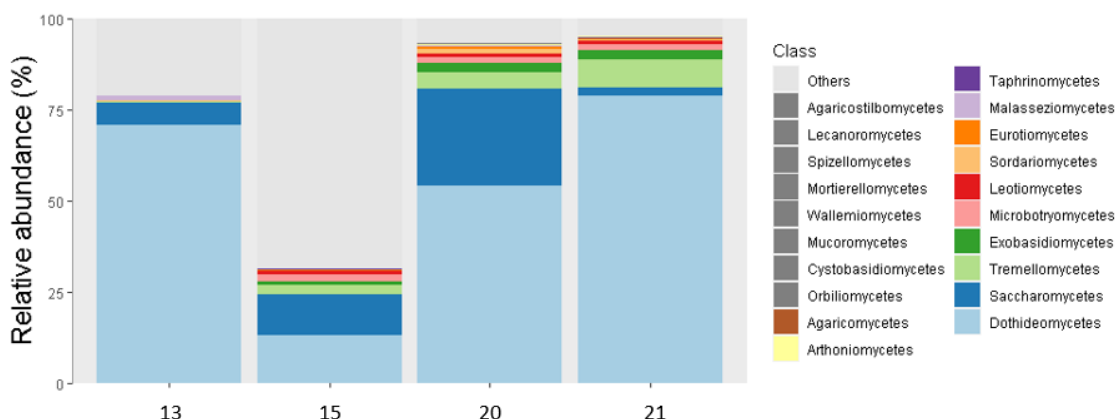
Obrázek 19 Taxonomické zařazení tříd prokaryot v analyzovaných vzorcích medů

Nejčastěji zastoupenou třídou zjištěnou z analýzy bakteriálního profilu, byla třída *Bacilli*. Ta tvořila převážné bakteriální složení vzorku 15. Významné zastoupení této třídy bylo i ve vzorcích 18, 19, 20 a 21, ve kterých tvořila více než čtvrtinu bakteriálního profilu. Dále zastoupenými třídami byly *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* a *Actinobacteria*. Ve vzorku 13 tvoří významné zastoupení i *Cyanobacteria*.



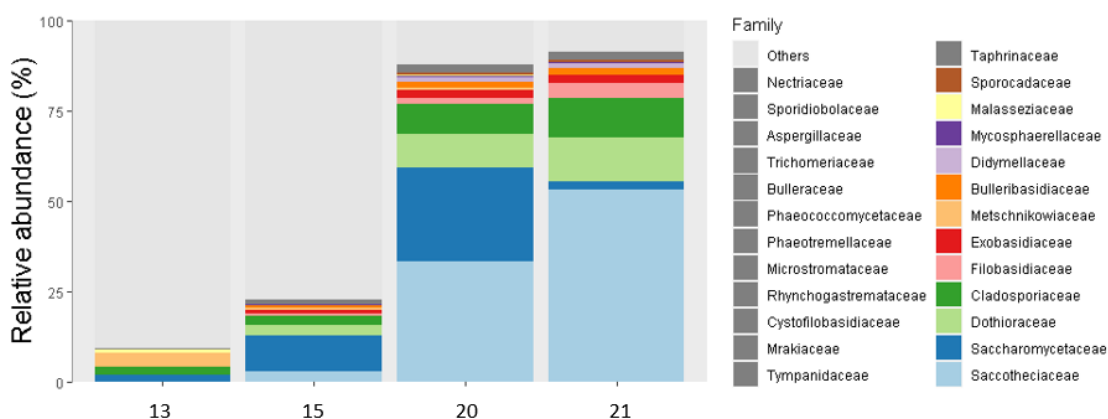
Obrázek 20 Taxonomické zařazení čeledí prokaryot v analyzovaných vzorcích medů

Nejčastěji zastoupenou čeledí zjištěnou z analýzy bakteriálního profilu byla čeleď *Lactobacillaceae*, spadající do třídy *Bacilli*. Ta tvořila, podle očekávání z přechozích výsledků, převážné bakteriální složení vzorku 15. Významné zastoupení této třídy bylo i ve vzorcích 18, 19, 20 a 21, ve kterých tvořila více než čtvrtinu bakteriálního profilu.



Obrázek 21 Taxonomické zařazení tříd eukaryot v analyzovaných vzorcích medů

Nejčastěji zastoupenou třídou zjištěnou z analýzy houbového profilu byla třída *Dothideomycetes*. Ta tvořila převážné bakteriální složení vzorků 13, 20 a 21. Tato třída byla zastoupena i ve vzorku 15. Druhou nejvíce zastoupenou byla třída *Saccharomycetes*.



Obrázek 22 Taxonomické zařazení čeledí eukaryot

Nejčastěji zastoupenou čeledí, zjištěnou z analýzy houbového profilu, byla čeleď *Saccotheciaceae*, spadající do třídy *Dothideomycetes*. Další zastoupenou čeledí byla *Saccharomycetaceae*, jež spadá do třídy *Saccharomycetes*.

## 7.5 Vyhodnocení antimikrobní aktivity

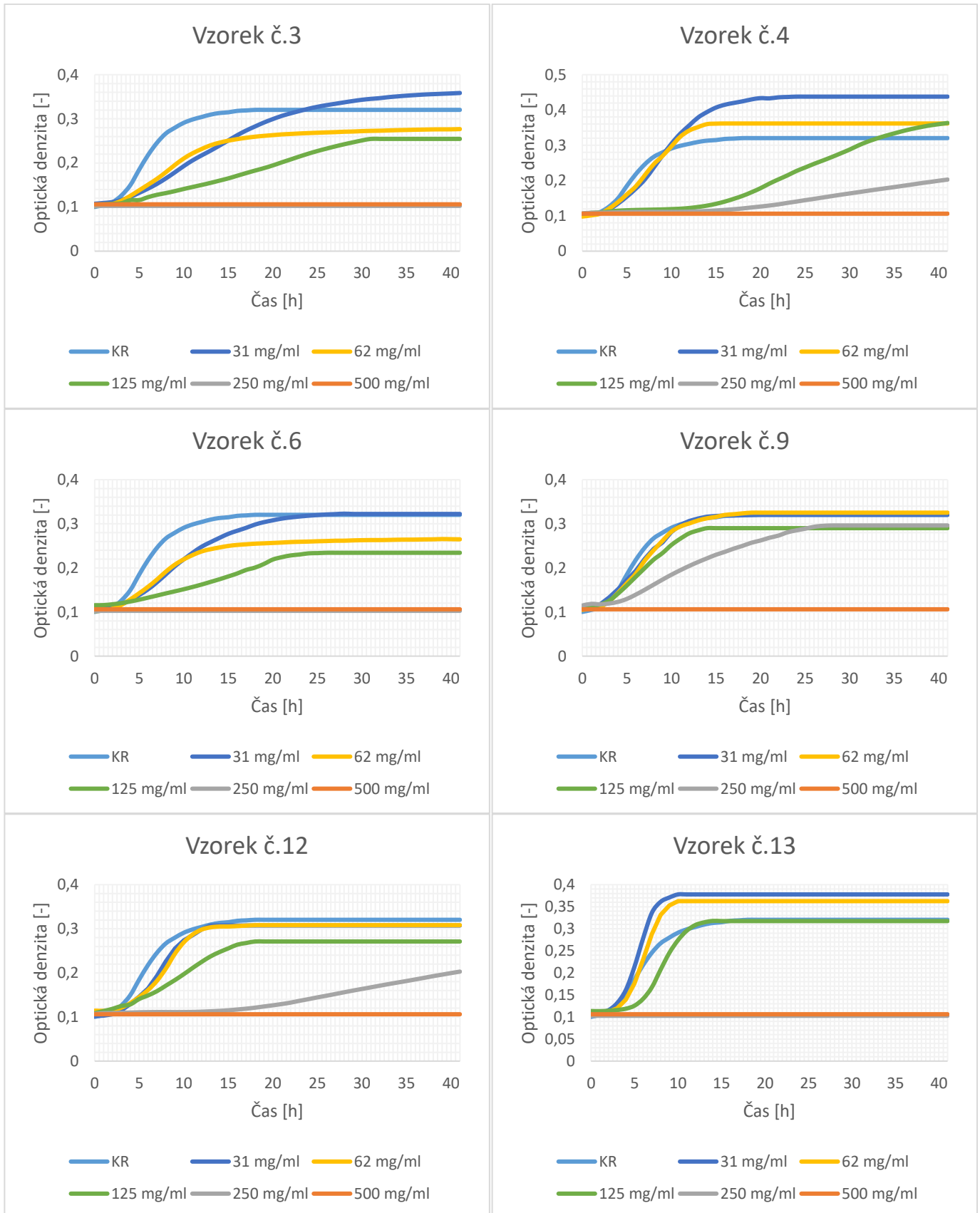
Antimikrobní aktivita byla testována u vybraných vzorků medů, lišících se rokem stáčení, lokalitou a původem. Jednalo se o vzorky 3, 4, 6, 9, 12, 13, 15, 17, 18 a 21. Pro stanovení byly využity bakteriální kmeny, které pocházely z České sbírky mikroorganismů (CCM)

a ze Sbírký mlékařských kultur Laktoflora (CCDM). Konkrétně se jednalo o *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Enterococcus durans* CCDM 53, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CCDM 141, *Proteus mirabilis* CCM 7188, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium CCM 7933, *Serratia marcescens* CCM 303 a *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115.

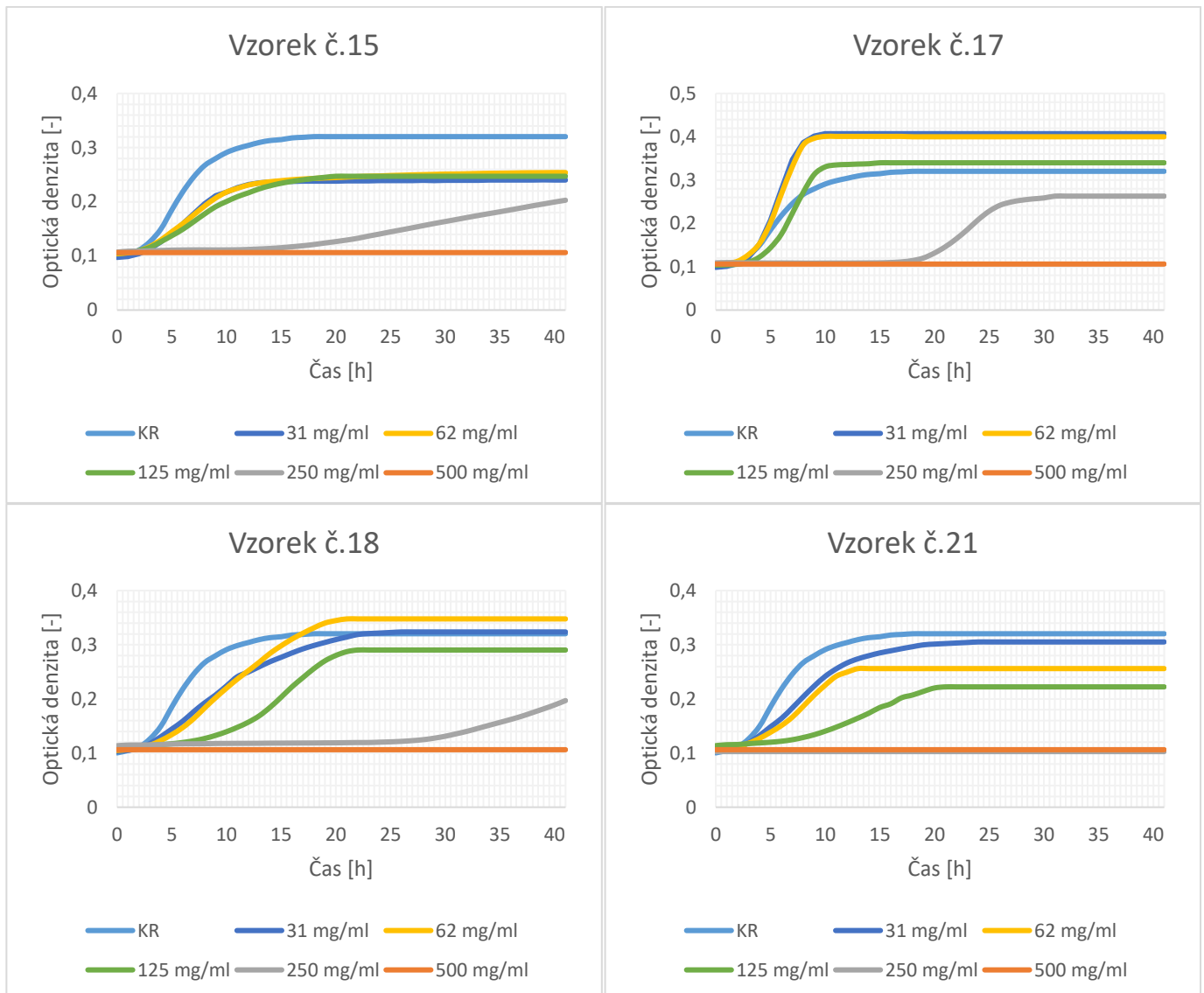
Vyhodnocení antimikrobních účinků jednotlivých vzorků a jejich koncentrací, které byly připraveny v koncentracích 31-500 mg/ml, bylo vyjádřeno pomocí růstových křivek. Jednotlivé křivky jsou rozlišeny barevně podle koncentrace medového roztoku, přičemž světle modrá křivka znázorňuje kontrolu růstu (KR), pro kterou byla použita bakteriální suspenze a sterilní bujón. Jinak lze tuto křivku označit jako koncentraci medu 0 mg/ml. Během měření byla v čase pozorována změna optické denzity (OD) buněk při vlnové délce 600 nm.

### 7.5.1 Vliv vzorků medů na růst *Staphylococcus aureus* CCM 3953

Prvním z testovaných mikroorganismů byl *Staphylococcus aureus* CCM 3953, jehož růst je znázorněn v grafech níže (Obrázek 23). Všechny medové roztoky o koncentraci 500 mg/ml zcela inhibují růst této bakterie. Vzorky 3, 6, 13 a 21 inhibují růst bakterie i při koncentraci 250 mg/ml. V případě medových roztoků 4, 12, 15, 17 a 18 této koncentrace dochází k významnému prodloužení lag-fáze. V případě vzorku 9 sice došlo k mírnému prodloužení lag-fáze, mikroorganismus se však rychle adaptoval na prostředí medového roztoku. V případě koncentrace 125 mg/ml došlo u většiny vzorků k prodloužení adaptační fáze, s výjimkou vzorků 13 a 17, u kterých byl růst bakterie srovnatelný s KR a prostředí medového roztoku tedy nemělo na růst bakterie významný vliv. Růst *S. aureus* byl stále mírně inhibován při koncentraci medových roztoků 62 mg/ml v případě vzorků 3, 6, 15 a 21. V ostatních případech byl růst srovnatelný s KR nebo byl dokonce mírně podpořen, jako tomu bylo u vzorků 4, 13, 17 nebo 18. Pouze u vzorku 15 lze pozorovat inhibici bakterie i při koncentraci 31 mg/ml. Mírnější pak i v případě vzorku 21. V ostatních medových roztocích této koncentrace došlo pouze k mírnému prodloužení lag-fáze, například u vzorků 3, 6 nebo 18, ale přes delší adaptaci byl růst nakonec srovnatelný s KR a v mnohých případech byl dokonce podpořen, jako tomu bylo u vzorků 3, 4, 13 a 17.



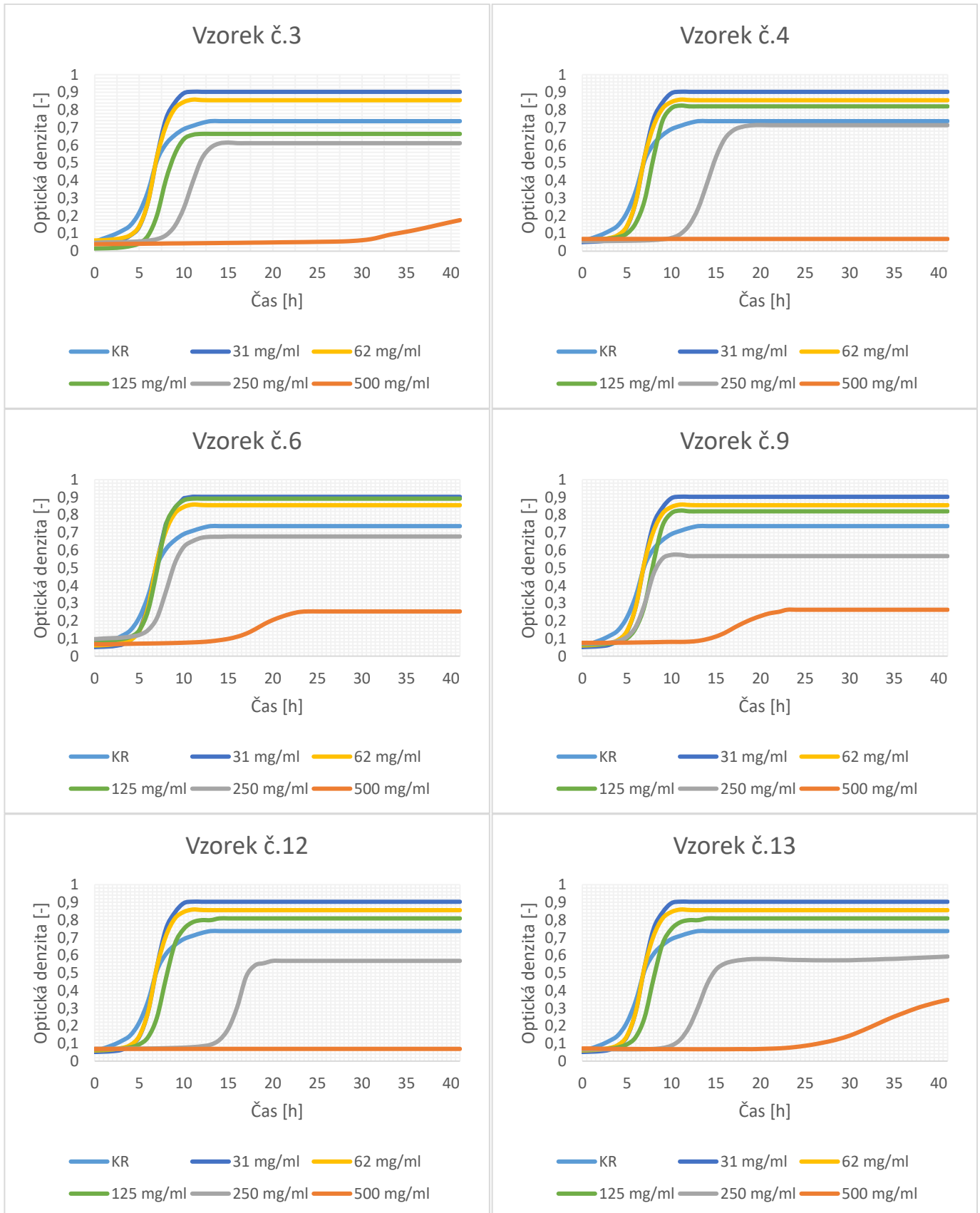
Obrázek 23 Růst *Staphylococcus aureus* CCM 3953 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l



Obrázek 23 Růst *Staphylococcus aureus* CCM 3953 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l – Pokračování

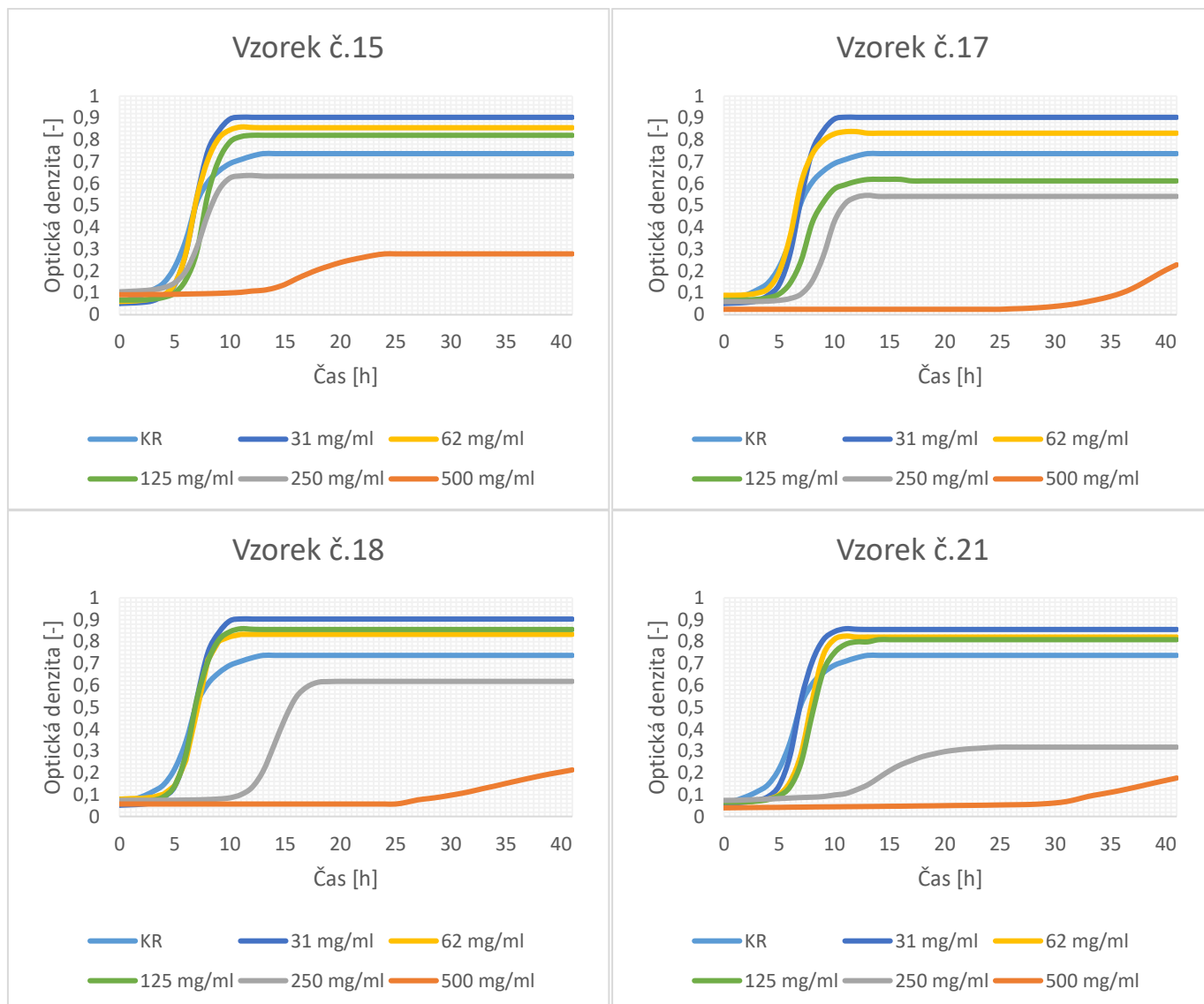
### 7.5.2 Vliv vzorků medů na růst *Enterococcus durans* CCDM 53

Dalším z testovaných kmenů byl *Enterococcus durans* CCDM 53. Nejsilnější antimikrobní účinek vykazovaly podle očekávání vzorky při koncentraci 500 mg/ml. I přes to došlo postupem času, kromě vzorků 4 a 12, ke zvýšení optické denzity v důsledku adaptace *E. durans* na dané prostředí. Mírné inhibiční účinky, s rovněž prodlouženou lag-fází oproti KR vykazovaly i vzorky o koncentraci 250 mg/ml. Nejvyšší inhibiční účinek této koncentrace byl pozorován u vzorku 21, u něhož došlo k nejnižšímu přírůstku OD. Růst bakterií při koncentraci 125 mg/ml byl z pravidla srovnatelný s růstem bakterie v čistém bujónu, tedy KR, nebo byl růst stejně jako v případě koncentrací 62-31 mg/ml nepatrně podpořen. V případě ostatních koncentrací nedošlo k žádné inhibici testované bakterie. Výsledné křivky jsou znázorněny níže (Obrázek 24).



Obrázek 24 Růst *Enterococcus durans* CCDM 53 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l

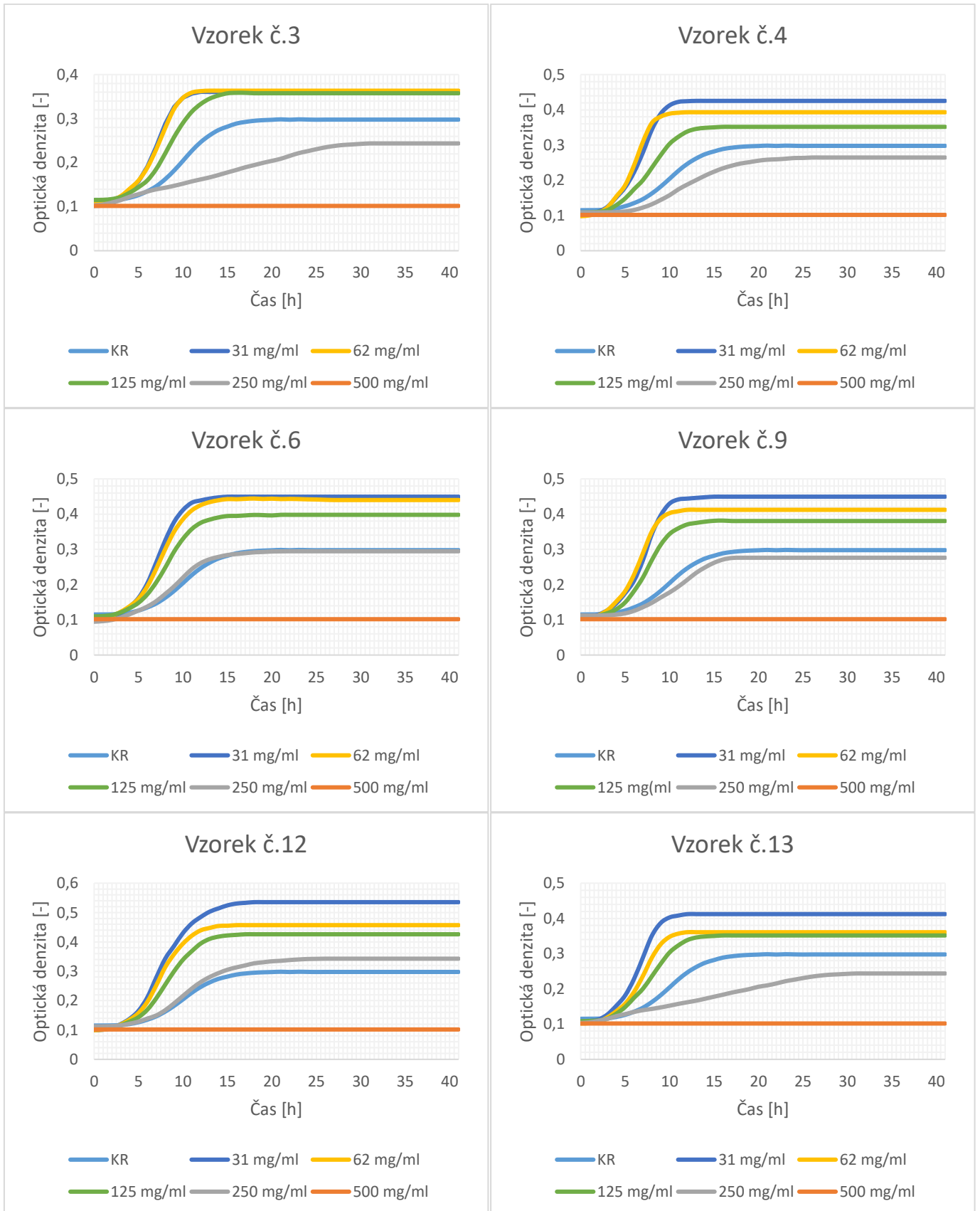




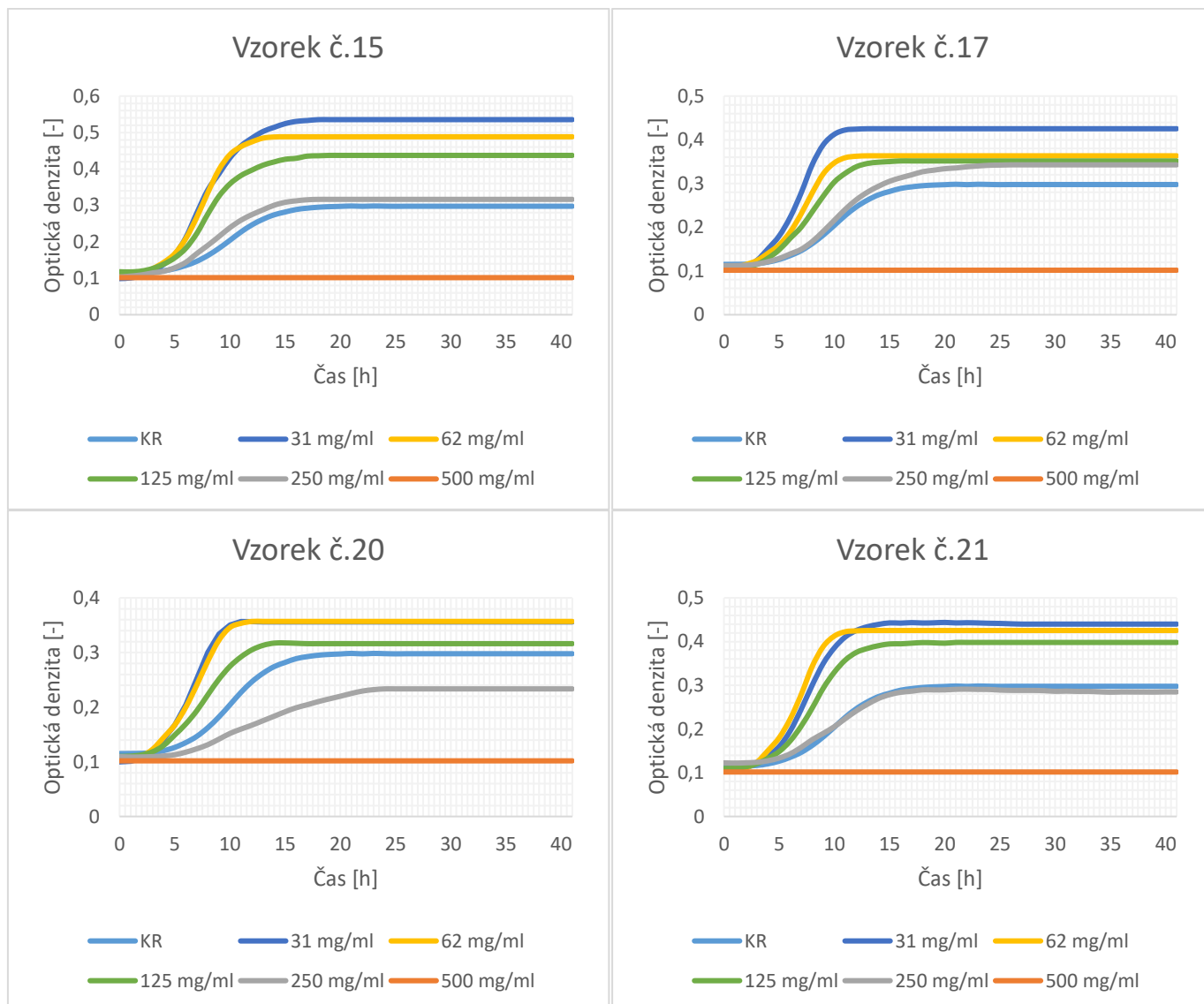
Obrázek 24 Růst *Enterococcus durans* CDDM 53 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l – Pokračování

### 7.5.3 Vliv vzorků medů na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224

Další bakterii spadající do rodu *Enterococcus*, na které byly zkoumány účinky medů byl *Enterococcus faecalis* CCM 4224. Z výsledných grafů (Obrázek 25) lze podle hodnoty OD dojít k závěru, že se jedná o kmen, který je citlivější než předchozí *E. durans* CDDM 53. Inhibiční účinek v koncentraci 500 mg/ml vykazují všechny z testovaných vzorků medů. V případě koncentrace 250 mg/ml dochází u vzorků 3,4, 13 a 20 k mírnému prodloužení lag-fáze, tedy k prodloužení adaptace bakterie na prostředí medového roztoku. Ostatní vzorky vykazovaly při této koncentraci schopnost růstu bakterie srovnatelnou s KR, tedy se schopností růstu *E. faecalis* v bujónu. V případě ostatních koncentrací naopak dochází u všech vzorků k podpoře růstu bakterií. Dochází ke zkrácení lag-fáze a růst se projevuje vyššími hodnotami nebo srovnatelnými hodnotami OD oproti KR.



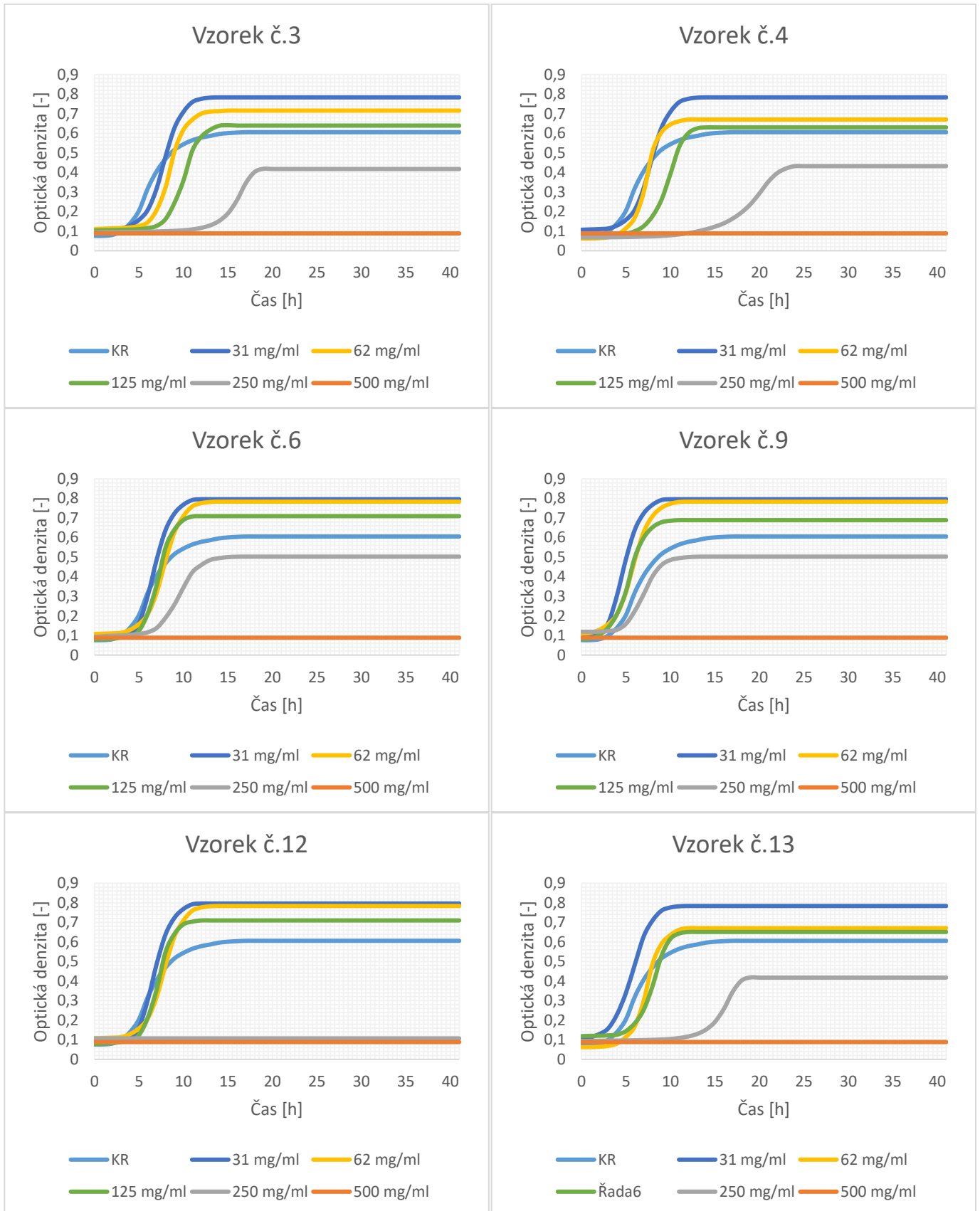
Obrázek 25 Růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l



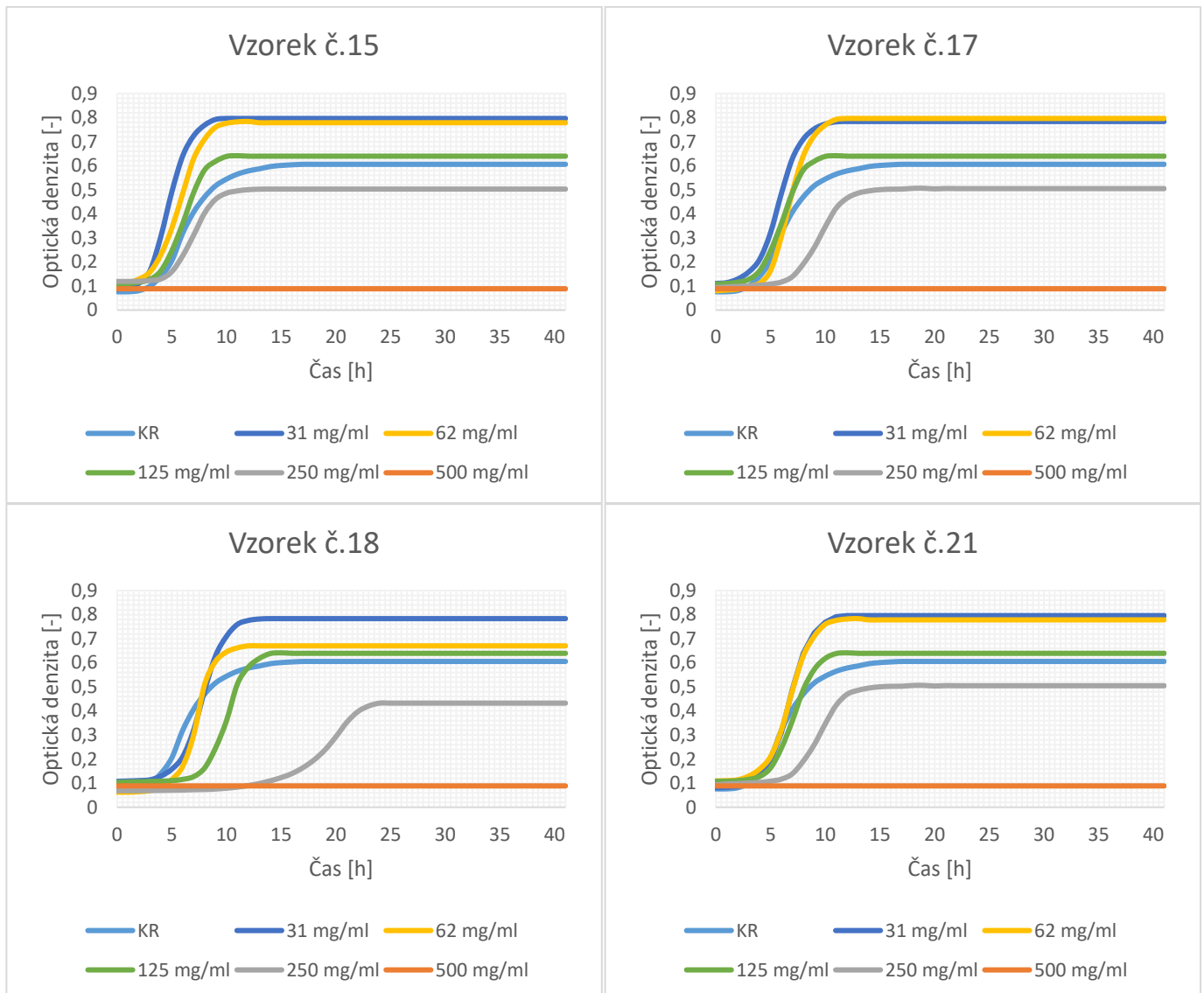
Obrázek 25 Růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l – Pokračování

#### 7.5.4 Vliv vzorků medů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CCDM 141

V případě vyhodnocení růstu *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CCDM 141 v přítomnosti medů o různé koncentraci můžeme z výsledných grafů (Obrázek 26) vysledovat jen drobné rozdíly. Ve všech případech došlo k inhibici růstu bakterie při koncentraci medu 500 mg/ml. Ovšem pouze u vzorku 12 dochází k inhibici i při koncentraci 250 mg/ml. U zbylých vzorků došlo pouze k prodloužení lag-fáze, tedy fáze, během které dochází k adaptaci bakterií na podmínky vnějšího prostředí. Koncentrace 125 mg/ml byla srovnatelná s kontrolou růstu, kdy nedošlo k žádnému ovlivnění růstu příslušné bakterie. Při zbylých dvou koncentracích, 62-31 mg/ml lze konstatovat, že naopak došlo k podpoření růstu této bakterie, které se projevilo zkrácením lag-fáze a vyššími hodnotami OD oproti KR.



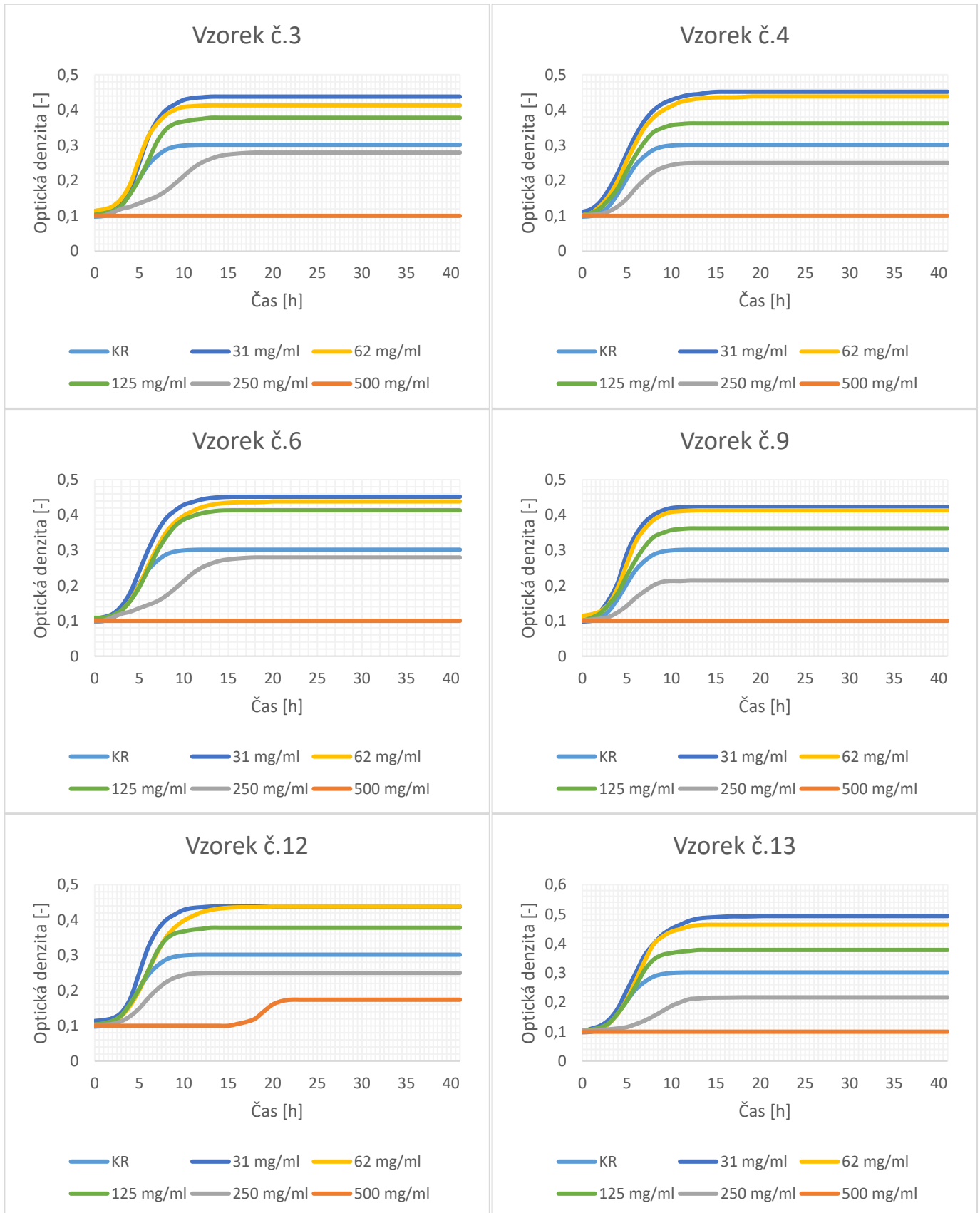
Obrázek 26 Růst *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CCDM 141 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l



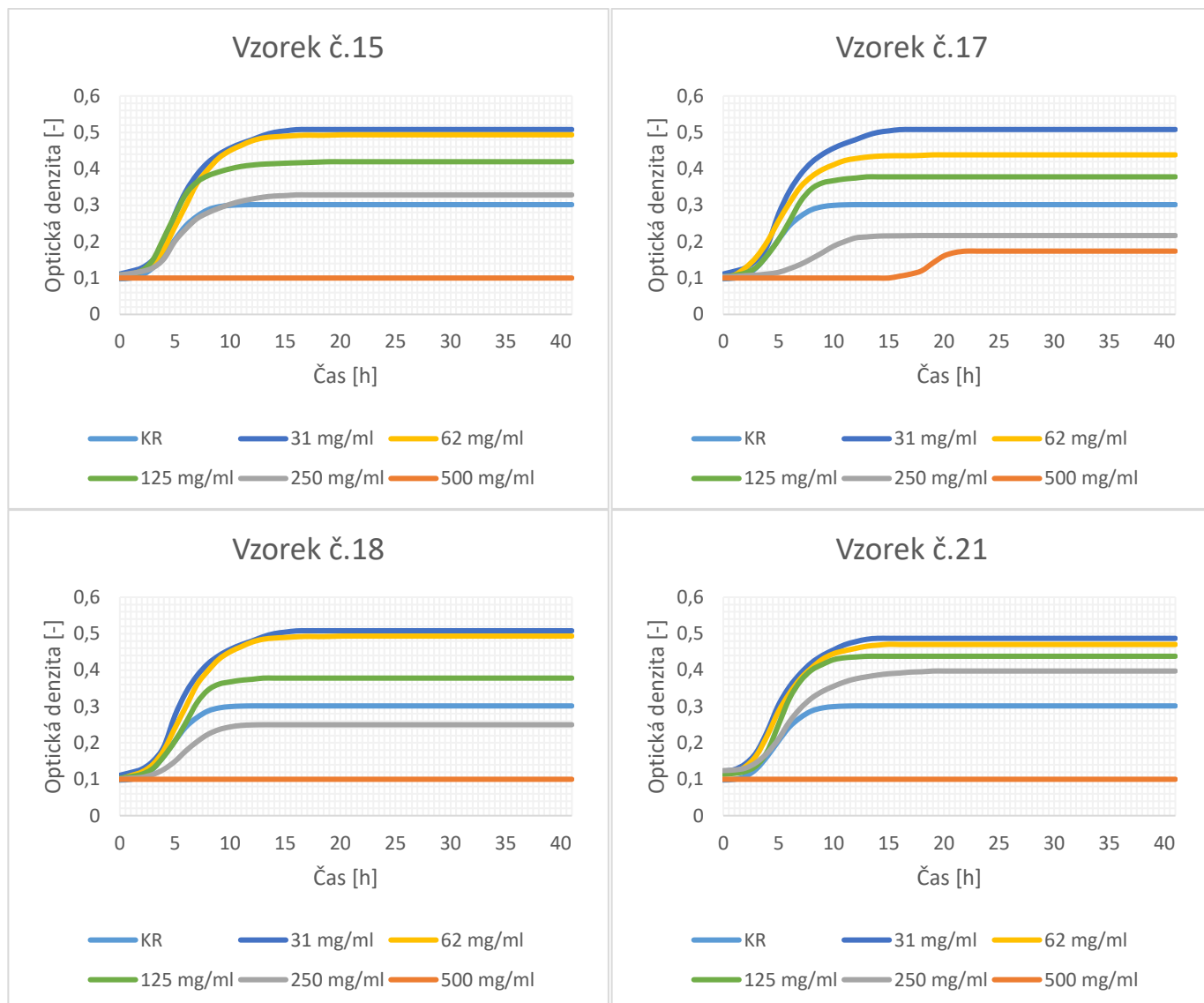
Obrázek 26 Růst *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CCDM 141 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l – Pokračování

### 7.5.5 Vliv vzorků medů na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188

Dalším z testovaných mikroorganismů byl *Proteus mirabilis* CCM 7188, jehož růst zobrazují grafy níže (Obrázek 27). Jako v ostatních případech došlo k nejvyšší inhibici při přidavku medu o koncentraci 500 mg/ml. Většina vzorků medů způsobila úplnou inhibici růstu uvedeného kmene. Avšak v případě vzorků 12 a 17 došlo k mírnému pomnožení, které se projevilo zvýšením OD a bylo doprovázeno prodlouženým obdobím lag-fáze. Stejně tomu bylo i v případě koncentrace 250 mg/ml. Růst při této koncentraci byl u většiny vzorků srovnatelný s koncentrací 0 mg/ml. Výjimkou byl vzorek 21, u kterého došlo k podpoře růstu stejně jako u koncentrací 125-31 mg/ml. Tyto koncentrace podporovaly růst *P. mirabilis* i v případě ostatních vzorků.



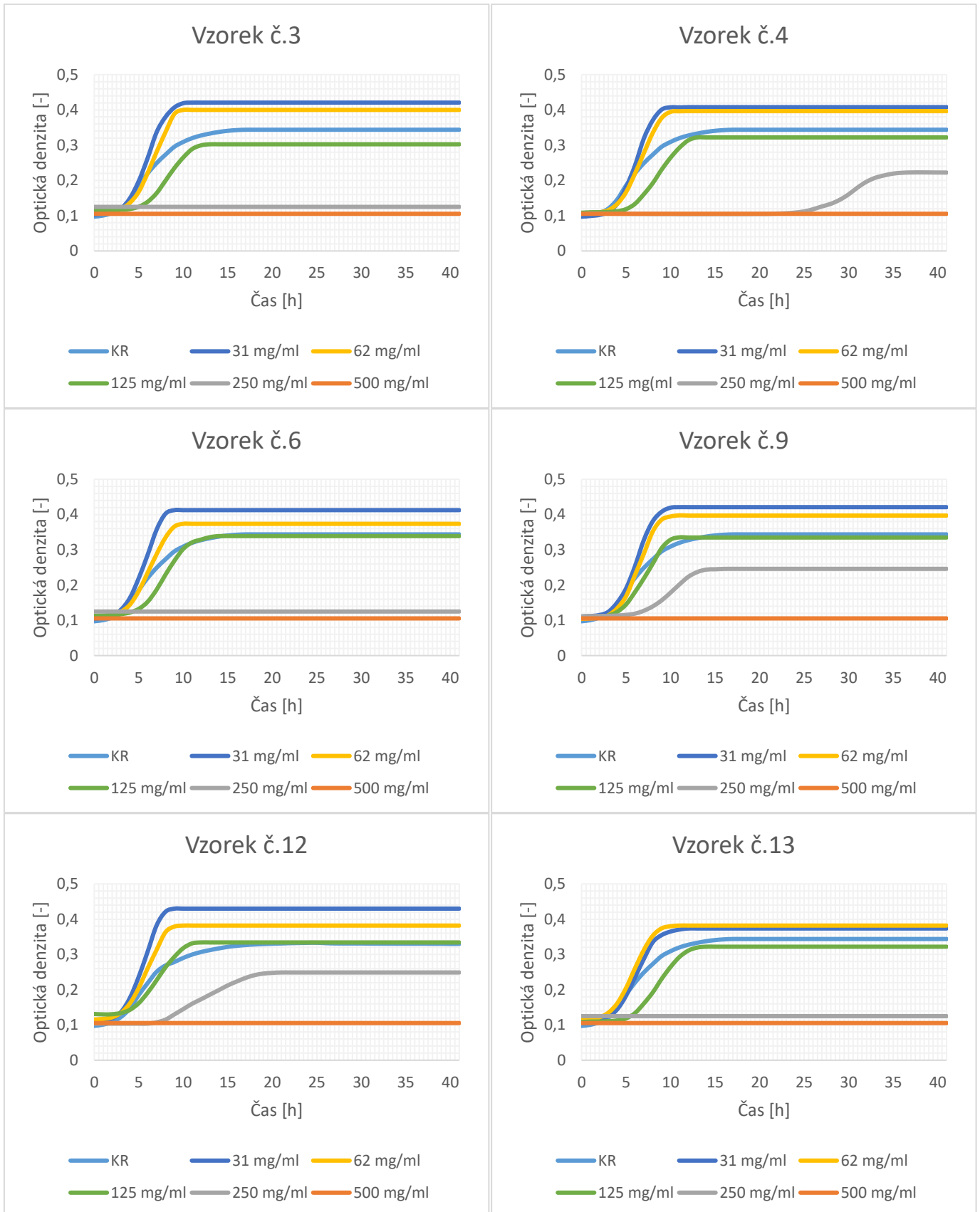
Obrázek 27 Růst *Proteus mirabilis* CCM 7188 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l



Obrázek 27 Růst *Proteus mirabilis* CCM 7188 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l – Pokračování

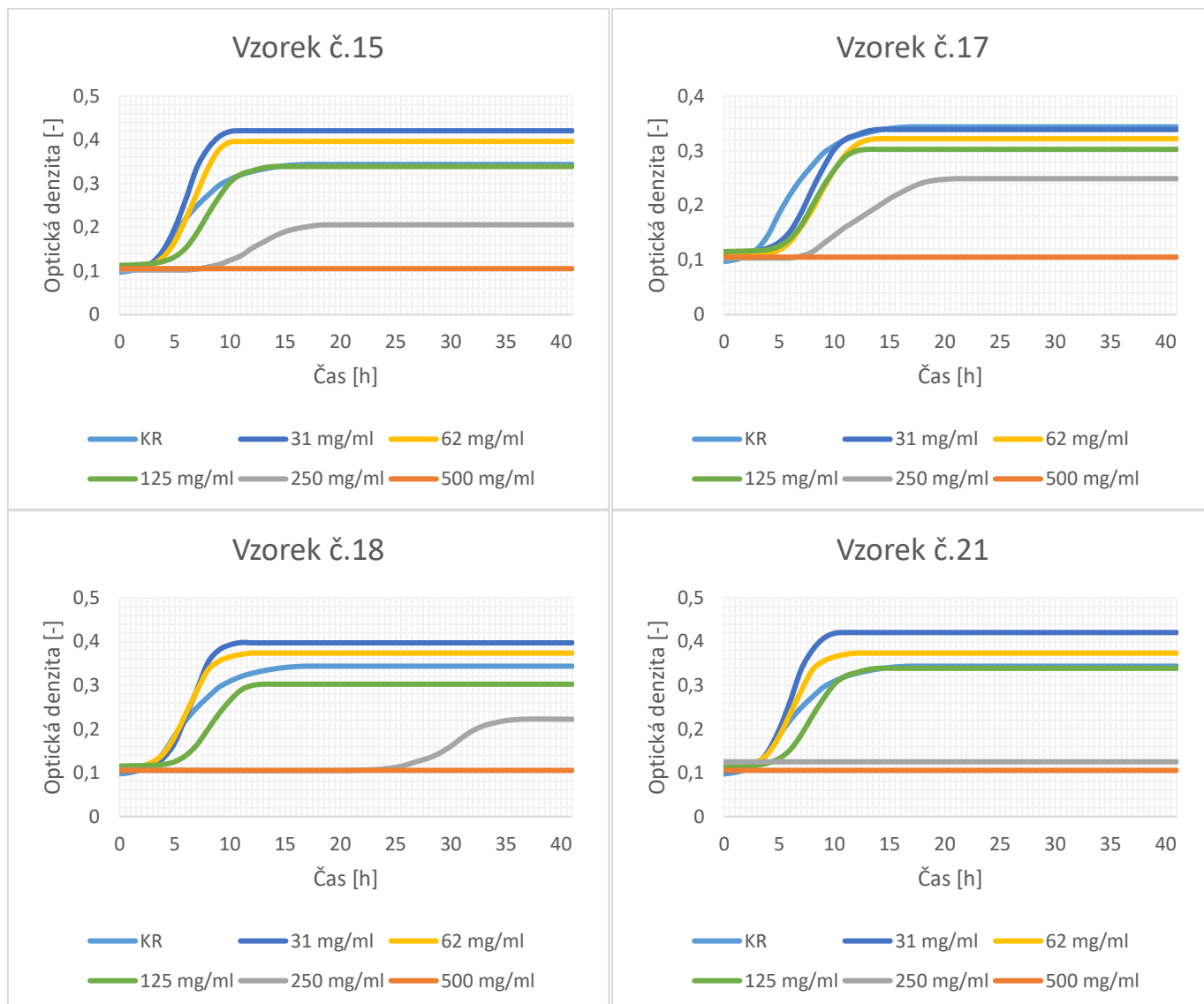
### 7.5.6 Vliv vzorků medů na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium CCM 7933

V případě růstu *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium CCM 7933 nebylo při koncentraci 500 mg/ml pozorováno zvýšení optické denzity a tedy ani u jednoho z testovaných vzorků nedošlo k pomnožení daného mikroorganismu. U poloviční koncentrace, 250 mg/ml, nebyl pozorován růst v přítomnosti vzorků 3, 6, 13 a 21. U zbylých vzorků k pomnožení nakonec došlo, ovšem bylo zde viditelné prodloužení lag-fáze, nejdelší pak u vzorku 4 a 18. Ostatní koncentrace 125-31 mg/ml nevykazovaly na *Salmonella* Typhimurium výrazné inhibiční účinky. U roztoků o koncentraci 125 mg/ml bylo většinou pozorováno jen prodloužení lag-fáze. Jinak došlo u těchto roztoků naopak k podpoře růstu. Grafy zobrazující růst *Salmonella* Typhimurium jsou uvedeny níže (Obrázek 28).



Obrázek 28 Růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium CCM 7933 s přidavkem testovaných meďů v koncentracích 0-500 mg/l

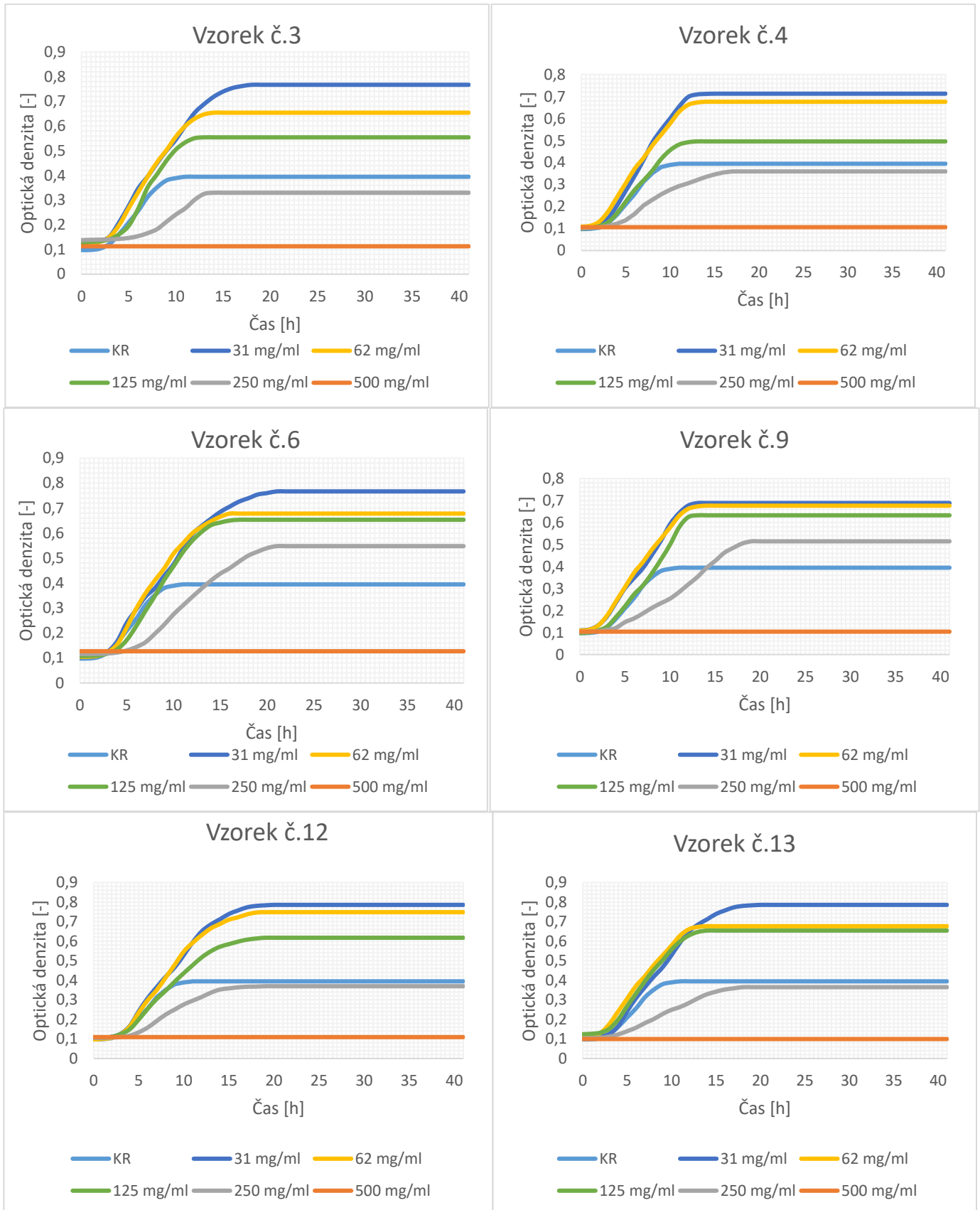




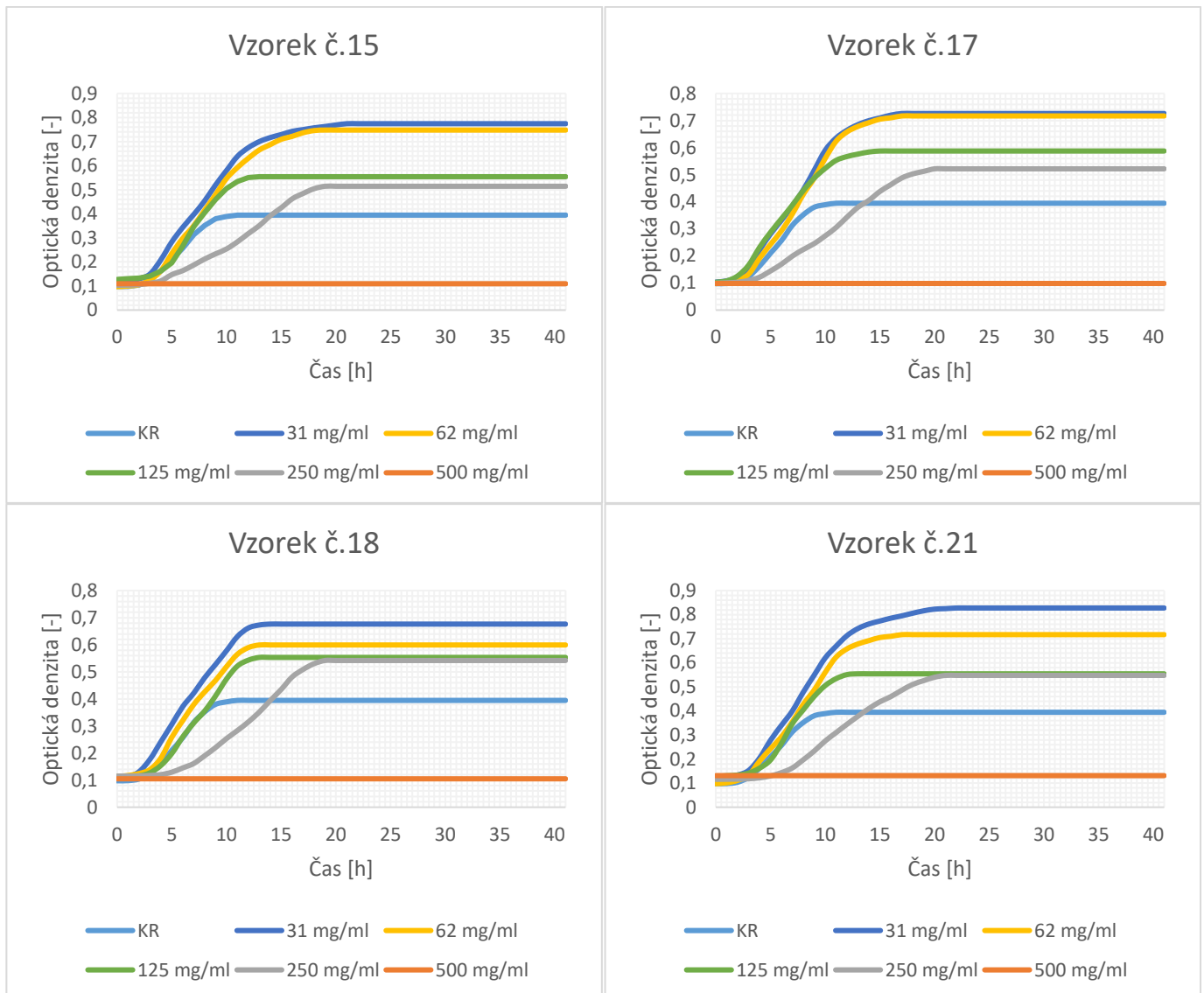
Obrázek 28 Růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium CCM 7933 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l – Pokračování

### 7.5.7 Vliv vzorků medů na růst *Serratia marcescens* CCM 303

Další sledovanou bakterií byla *Serratia marcescens* CCM 303 (Obrázek 29), jejíž růst byl plně inhibován všemi vzorky o koncentraci 500 mg/ml. Koncentrace 250 mg/ml měla u všech vzorků za následek mírné prodloužení lag-fáze testované bakterie. V případě vzorků 6, 9, 15, 17, 18 a 21 došlo sice k prodloužení adaptace bakterie na dané prostředí, její růst byl však nakonec významně podpořen. U ostatních vzorků byl růst *S. marcescens* srovnatelný s jejím růstem v čistém bujónu. U ostatních koncentrací nebyla pozorována žádná inhibice růstu bakterií, naopak byl růst příslušné bakterie významně podpořen.



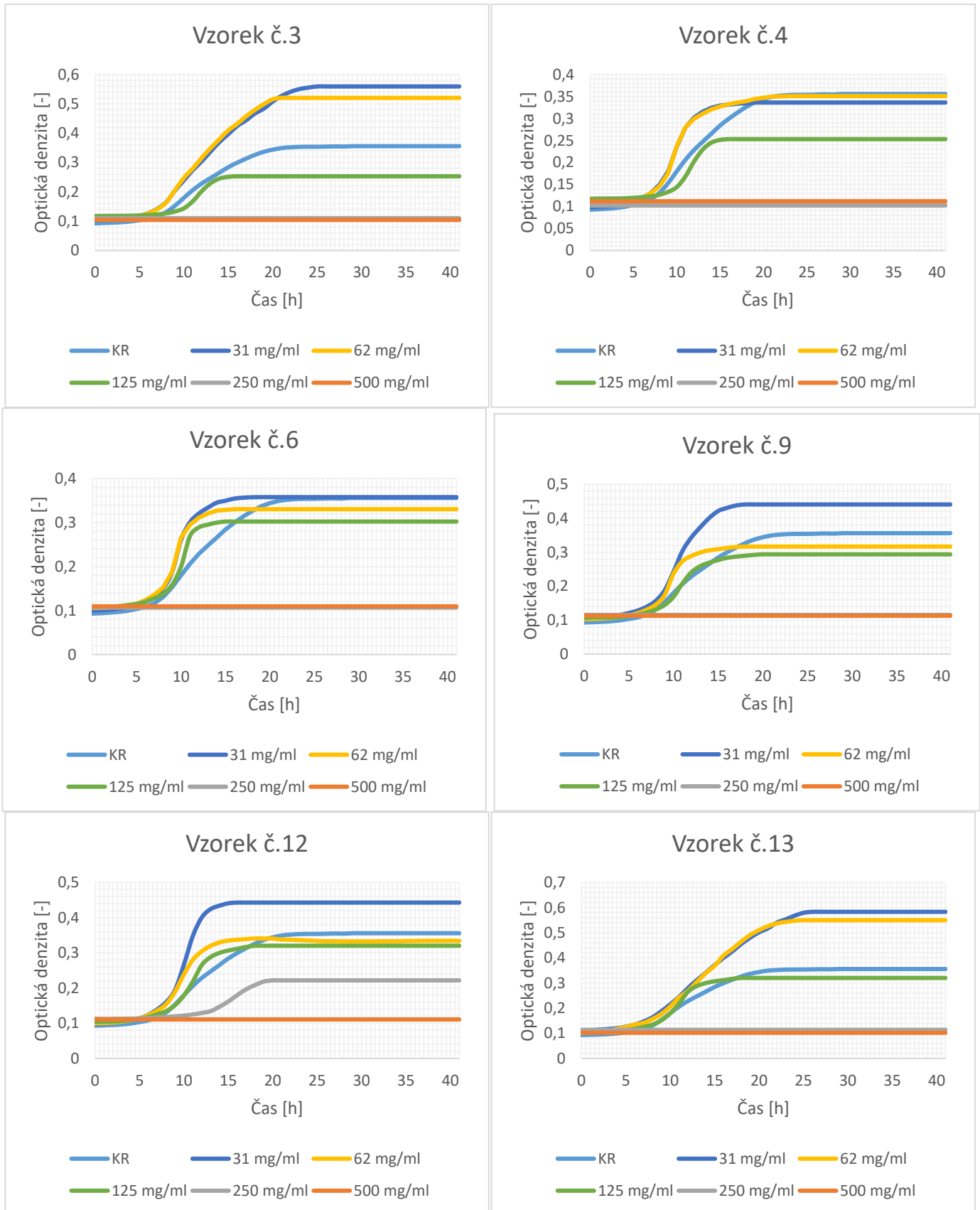
Obrázek 29 Růst *Serratia marcescens* CCM 303 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l



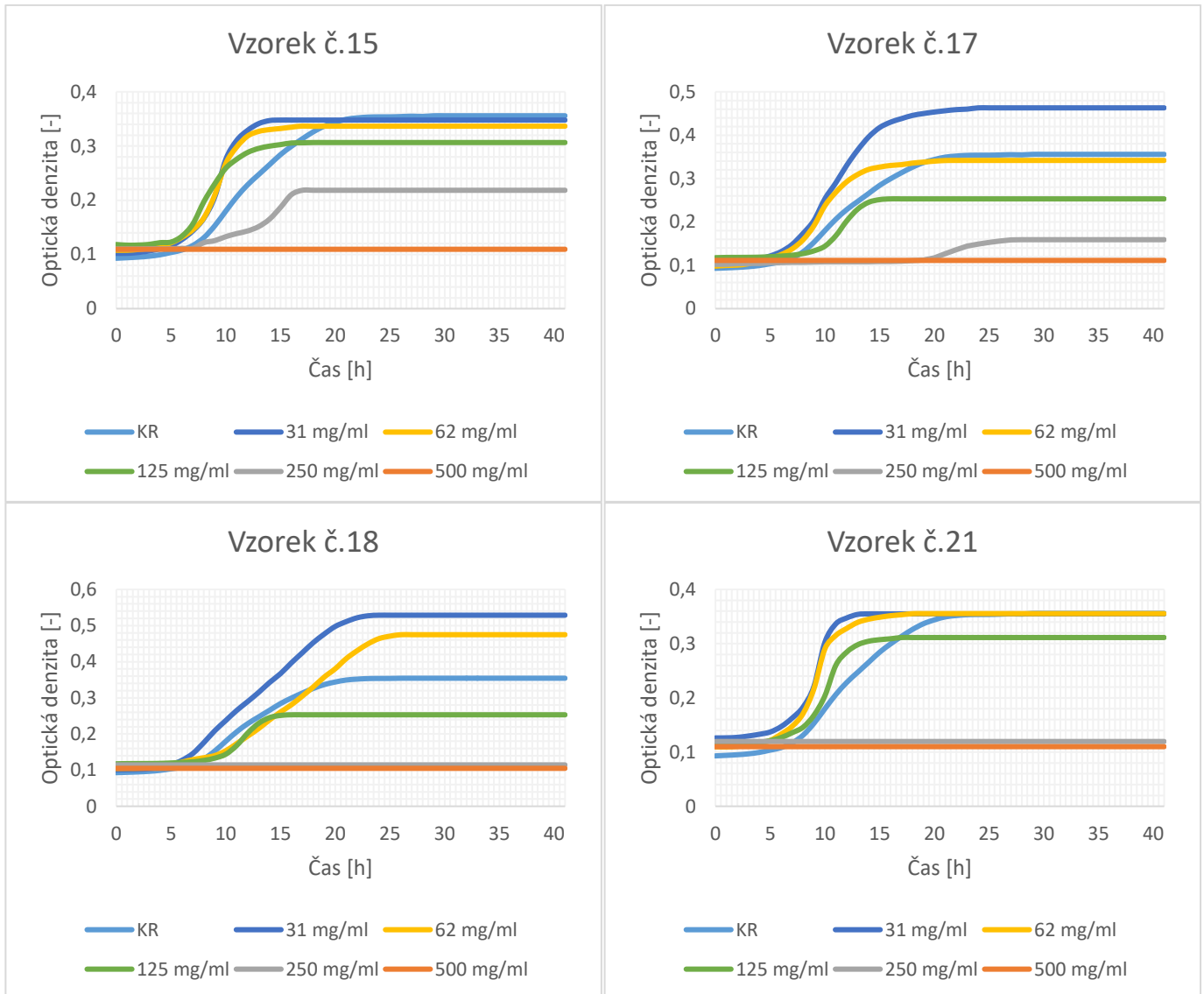
Obrázek 29 Růst *Serratia marcescens* CCM 303 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l – Pokračování

### 7.5.8 Vliv vzorků medů na růst *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115

Růst *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115 lze vyhodnotit z grafů (Obrázek 30). Při koncentraci medového roztoku 500 mg/ml byl růst této bakterie zcela inhibován u všech testovaných vzorků. Stejně tomu bylo i u koncentrace 250 mg/ml u vzorků 3, 4, 6, 13, 18 a 21. U ostatních vzorků došlo k prodloužení lag-fáze, během které docházelo k adaptaci *Pseudomonas* na prostředí medového roztoku dané koncentrace. V případě koncentrace 125 mg/ml již k výraznému potlačení růstu nedocházelo. Ve většině případů byl růst jen mírně inhibován nebo byl růst srovnatelný s kontrolou růstu (KR) jako v případě vzorku 13. Stejně tomu bylo i u koncentrací 62-31 mg/ml. Výjimkou byly vzorky 3, 13 a 18, u kterých došlo při těchto koncentracích k podpoře růstu testované bakterie. V případě koncentrace 31 mg/ml podporovaly růst bakterie i vzorky 9, 12, 17.



Obrázek 30 Růst *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l



Obrázek 30 Růst *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l – Pokračování

Všechny výsledky MIC medových roztoků na testované mikroorganismy jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 15).

Tabulka 15 Výsledné hodnocení antimikrobní aktivity vybraných medů na testované bakterie

MO	MIC [mg/ml]									
	3	4	6	9	12	13	15	17	18	21
ED	N	500	N	N	500	N	N	N	N	N
EF	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
LL	500	500	500	500	250	500	500	500	500	500
PM	500	500	500	500	N	500	500	N	500	500
PF	250	250	250	500	500	250	500	500	250	250
ST	250	500	250	500	500	250	500	500	500	250
SM	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
SA	250	500	250	500	500	250	500	500	500	250

Legenda: MO – mikroorganismus, MIC – minimální inhibiční koncentrace, N – inhibice nezaznamenána v žádné z testovaných koncentrací, *Enterococcus durans* CCDM 53, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Lactococcus lactis* supsp. *Lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 141, *Proteus mirabilis* CCM 7188, *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium CCM 7933, *Serratia marcescens* CCM 303 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953.

Z výsledků lze pozorovat, že nejslabší antimikrobiální účinek měly medové roztoky na bakterii *Enterococcus durans*, jejíž růst byly schopny inhibovat pouze dva medové roztoky o koncentraci 500 mg/ml. Další bakterií spadající do rodu *Enterococcus*, na které byly zkoumány antimikrobiální účinky medů, byl *E. faecalis*. Z výsledků lze dojít k závěru, že se jedná o citlivější kmen než *E. durans*, jelikož růst této bakterie byl inhibován všemi medovými roztoky o koncentraci 500 mg/ml. Naopak nejsilnější antimikrobiální účinek vykazovaly medové roztoky proti bakterii *Pseudomonas fluorescens*. Následně pak proti *Staphylococcus aureus* a *Salmonella* Typhimurium. Z výsledků MIC také můžeme pozorovat, že nejsilnější antimikrobiální účinky vykazovaly medy 3, 6, 13 a 21, jejichž hodnoty MIC byly srovnatelné. Nejslabší antimikrobní účinky pak lze přiřadit vzorku 17, který nevykazoval inhibiční účinky na dva z testovaných kmenů, *Enterococcus durans* a *Proteus mirabilis*.

## 7.6 Vyhodnocení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita byla opět testována u vybraných vzorků medů, lišících se rokem stáčení, lokalitou a původem. Jednalo se o vzorky 3, 4, 6, 9, 12, 13, 15, 17, 18 a 21. Prvním krokem bylo stanovení obsahu polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuho činidla s následným měřením absorbance při vlnové délce 765 nm a samotná antioxidační aktivita pak byla stanovena metodou DPPH spektrofotometrickým měřením absorbance při vlnové délce 515 nm.

### 7.6.1 Folin-Ciocalteuho metoda

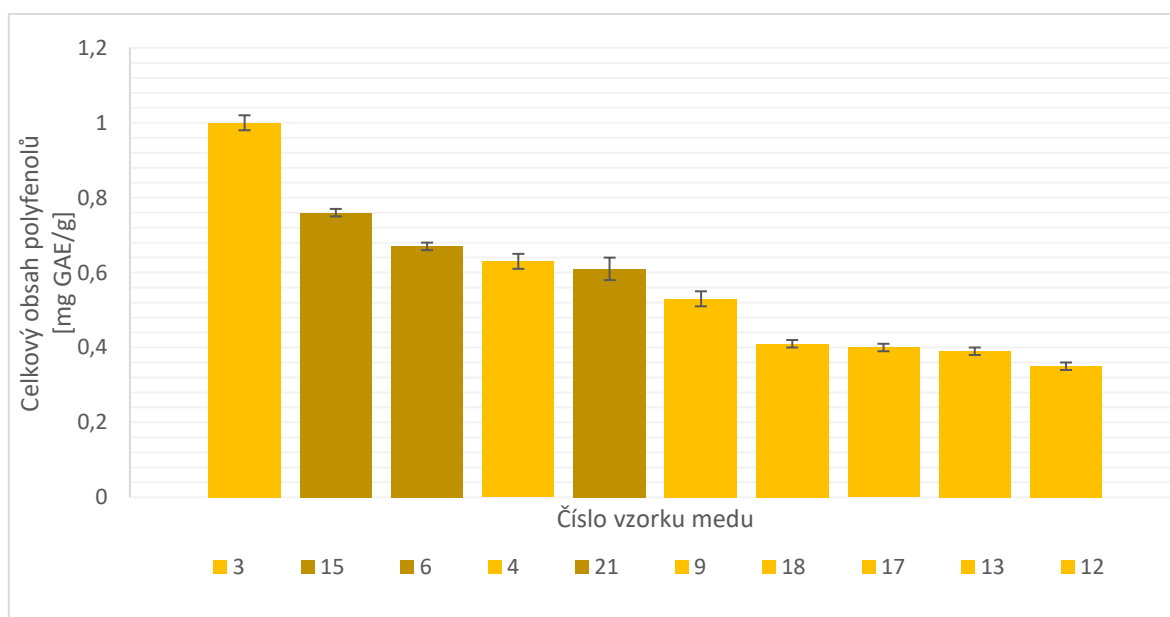
Při vyhodnocení celkového obsahu polyfenolů se vycházelo z již připravené kalibrační křivky standardu kyseliny gallové, resp. její rovnice lineární regrese ve tvaru:

$$y = 0,0012x + 0,0016$$

$y$ ...je absorbance [-]

$x$ ...je koncentrace kyseliny gallové [ $\mu\text{g/ml}$ ]

Pro každý vzorek medu bylo naměřeno celkem 8 hodnot a provedeno vyhodnocení, které bylo vztaženo ke kalibrační křivce kyseliny gallové. Lineární regresi pak byla vyjádřena koncentrace celkových polyfenolů, vyjádřených v ekvivalentech kyseliny gallové na gram medu.



Obrázek 31 Celkový obsah polyfenolů testovaných vzorků medů

Nejnižší stanovená hodnota celkového obsahu polyfenolů byla zjištěna u vzorku 12, která byla 0,35 mg GAE/g medu. Jednalo se o med zakoupený v obchodní síti v zahraničí v roce 2021. Konkrétně tento med pocházel z Řecka. Naopak nejvyšší zjištěná hodnota byla 1,00 mg GAE/g medu, která byla stanovena u vzorku 3. V tomto případě se rovněž jednalo o med z roku 2021, ovšem pocházel z území České republiky ze zásob soukromého včelaře a jednalo se o med smíšeného květového původu. Průměrná hodnota všech vzorků byla 0,58 mg TE/g medu. Pro přehlednější vizualizaci byly hodnoty obsahu polyfenolů zaneseny v sestupném pořadí do grafu (Obrázek 31).

Obecně vykazovaly vyšší obsah polyfenolů medy medovicového původu, které jsou v grafu znázorněny tmavší barvou. V tomto případě se jedná o vzorky 6, 15 a 21. Všechny tyto vzorky pocházely od soukromých včelařů. Vzorky 6 a 21 pocházely ze stejné oblasti. Rozdíl mezi nimi spočíval v roce stáčení, kdy vzorek 6 pocházel z roku 2021 a vzorek 21 z roku 2022. U těchto vzorků byly stanovené hodnoty obsahu polyfenolů velice blízké.

### 7.6.2 Metoda DPPH

Při vyhodnocení antioxidační aktivity stanovené metodou DPPH bylo vycházeno z již připravené kalibrační křivky Troloxu, resp. její rovnice lineární regrese ve tvaru:

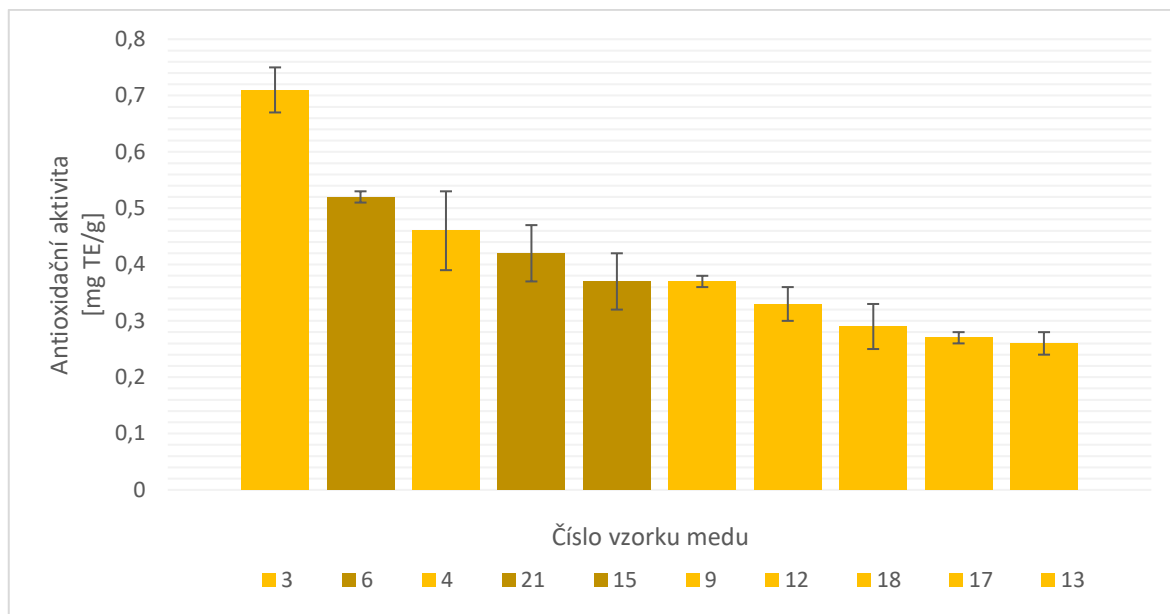
$$y = 0,4436x + 1,9673$$

$y$ ...je inaktivace [%]

$x$ ...je koncentrace Troloxu [ $\mu\text{g/ml}$ ]

Pro každý vzorek medu byly naměřeny celkem 4 hodnoty, které byly přepočteny na % inaktivace a na základě rovnice lineární regrese, která vznikla ze závislosti inaktivace na koncentraci standardu troloxu, byla vypočtena hodnota antioxidační aktivity, vyjádřené v ekvivalentech troloxu na gram medu.





Obrázek 32 Antioxidační aktivita testovaných vzorků v sestupném pořadí

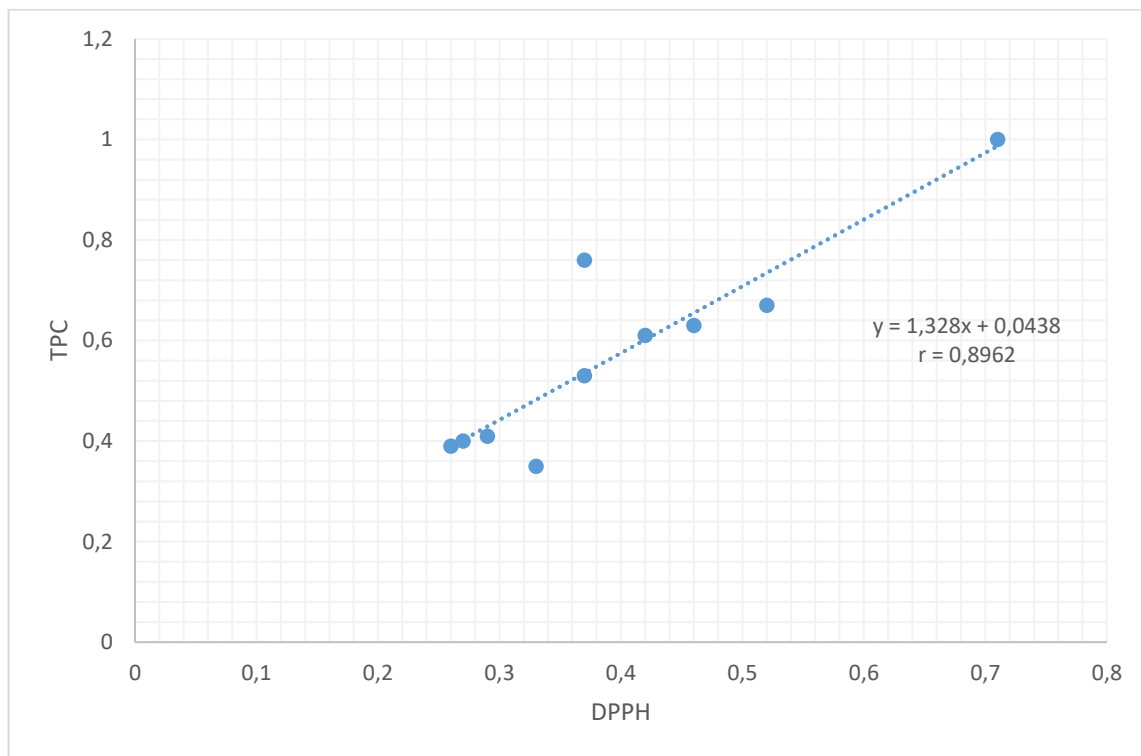
Nejnižší stanovená hodnota antioxidační aktivity byla zjištěna u vzorku 13, která byla 0,26 mg TE/g medu. Tento vzorek byl smíšeného květového původu a pocházel od soukromého včelaře z oblasti Ostravska, který byl stáčen v roce 2022. Naopak nejvyšší naměřená hodnota 0,71 mg TE/g medu byla opět stanovena u vzorku 3. Průměrná hodnota všech vzorků byla 0,40 mg TE/g medu. Vyšších hodnot, stejně jako v případě stanovení celkového obsahu polyfenolů, dosahovaly vzorky medovicového původu, jejichž hodnoty byly vyšší než stanovený průměr. Pro přehlednější vizualizaci byly hodnoty antioxidační aktivity jednotlivých vzorků zaneseny v sestupném pořadí do grafu (Obrázek 32).

Stejně jako při stanovení celkového obsahu polyfenolů, vykazovaly vyšší antioxidační aktivitu medy medovicového původu, vzorky 6, 15 a 21, které jsou v grafu znázorněny tmavší barvou.

### 7.6.3 Korelační analýza

Za pomoci korelace lze vyjádřit lineární vztah mezi dvěma veličinami X a Y, v tomto případě mezi výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH a výsledky stanovení polyfenolů. Tyto výsledky byly vyneseny do grafu (Obrázek 33). Proměnné jsou korelované, jestliže hodnoty jedné proměnné mají tendenci vyskytovat se společně s hodnotami proměnné druhé. Míra korelace může sahát od neexistující až po absolutní korelaci. Ta je vyjádřena Pearsonovým korelačním koeficientem  $r$ , který nabývá hodnot od -1 do +1. Jestliže je hodnota rovna +1 nebo -1, pak je možné souřadnici Y přesně spočítat

podle lineárního vztahu ze souřadnice X. Jestliže je hodnota korelačního koeficientu rovna 0 jsou X a Y nekorelované proměnné. Čím více se hodnota  $r$  blíží k číslům +1 nebo -1, tím více jsou proměnné korelovány (Hendl, 2015).



Obrázek 33 Korelační analýza TPC a DPPH

Z výsledků korelační analýzy mezi hodnotami celkového obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity metodou DPPH byl získán Pearsonův korelační koeficient. Jeho hodnota byla 0,8962, která se blížila +1. Z toho lze dojít k závěru, že výsledky obou stanovení vykazují silnou závislost. S rostoucím obsahem polyfenolů tedy roste i antioxidační aktivita testovaných vzorků medů.

## 8 SOUHRNÁ DISKUZE

Med obsahuje rozmanitou mikrobiotu pocházející z včel, rostlin a půdy (Xiong et al., 2022). Jedná se mikroorganismy schopné odolávat nepříznivému prostředí medu, související s vysokou koncentrací sacharidů, kyselým prostředím, nízkou aktivitou vody, ale také s jeho antimikrobiální aktivitou, která rovněž souvisí s vnitřními vlastnostmi medu nebo přítomností antimikrobiálních sloučenin (Snowdon, Cliver, 1996; Combarros-Fuertes et al., 2019). Med je mimo to považován za bohatý zdroj enzymatických i neenzymatických antioxidantů (Dezmirean et al., 2012). S antioxidační aktivitou medu souvisí mnohé látky, jako např. fenolické látky, flavonoidy nebo některé enzymy (Combarros-Fuertes et al., 2019). Tmavé medy obsahují zpravidla vyšší obsah fenolických sloučenin a vykazují vyšší antioxidační aktivitu (Škrovánková et al., 2019).

Cílem této práce byla analýza 21 vzorků medů lišících se rokem stáčení, lokalitou a původem, které byly zakoupeny v obchodní síti nebo pocházely ze zásob soukromých včelařů z Česka i zahraničí. Výsledky získané v této diplomové práci byly porovnány s dostupnými literárními zdroji zaměřujícími se na mikrobiotu medu, antimikrobiální účinky a antioxidační vlastnosti medů. Práce navazuje na mou bakalářskou práci (Mrázová, 2022), se kterou byly výsledky měření rovněž porovnány.

Z výsledků kultivačního stanovení bylo během půlročního skladování zjištěno pomnožení mikrobioty u všech vzorků medů. Vzorky byly sice uchovávány v temnu při laboratorní teplotě ( $30 \pm 5$  °C), ale vzhledem ke skladování během letních měsíců, mohla tato teplota vzrůst a vytvořit tak ideální podmínky pro pomnožení některých skupin kultivovatelných mikroorganismů. V žádném z testovaných medů nebyl detekován růst plísní. Během skladování však došlo k pomnožení kvasinek, což mohlo být zapříčiněno nejen optimální teplotou jejich růstu, ale také zvýšeným obsahem vody ve vzorcích. Zpravidla došlo ve všech případech k pomnožení kultivovatelných mikroorganismů o jeden až dva řády. Kultivací nebyl pozorován růst kolonií charakteristických pro *Clostridium botulinum*, která je jedním z největších rizik spojených s konzumací medu u malých dětí (Wojtacka et al., 2016).

Identifikací metodou sekvenace genu pro 16S rRNA vybraných kolonií, které byly izolovány ze selektivních půd, bylo zjištěno převážné zastoupení bakterií rodu *Bacillus*, nejčastěji pak *Bacillus velezensis*. Pouze v jednom případě byla identifikována bakterie jiného rodu, a to rodu *Pseudomonas*. Všechny identifikované bakterie se do medu dostaly pravděpodobně primární kontaminací, za niž jsou zodpovědné včely, které je přenášejí z vnějších zdrojů.

Konkrétně *Bacillus velezensis* je aerobní bakterie tvořící spory. Jedná se o bakterii podporující růst rostlin a mimo to potlačuje růst mikrobiálních patogenů (Rabbee et al., 2019). Některé grampozitivní bakterie vyskytující se v medu se vyznačují schopností produkovat sekundární metabolity, které mají potenciální antimikrobiální účinky (Xiong et al., 2022). V mé bakalářské práci (Mrázová, 2022) byly mikroorganismy získané z kultivačního stanovení identifikovány pomocí spektrofotometrické metody MALDI-TOF. Ta nedetekovala přítomnost bakterie *Clostridium botulinum*, naopak největší zastoupení tvořily rovněž bakterie rodu *Bacillus*.

Diplomová práce Ing. Pavlové (Pavlová, 2020), která byla zaměřena na sledování diverzity mikrobioty 70 vzorků medů pocházejících z území Slovenské republiky, odhalila metodou NGS přítomnost většinového zastoupení rodu *Lactobacillus*. Tomu odpovídá i výsledek NGS stanovený v této práci, kde bylo taxonomické zařazení provedeno na úrovni tříd a čeledí, přičemž nejčastěji zastoupenou třídou bakteriálního profilu byla třída *Bacilli* a čeleď *Lactobacilaceae*, do které spadá i rod *Lactobacillus*. Ing. Pavlová se rovněž ve své práci zaměřila na detekci sporulující bakterie *Clostridium botulinum*, spojovanou s alimentárním onemocněním u kojenců, která stejně jako v této diplomové práci nebyla v žádném z testovaných vzorků prokázána. Její přítomnost nebyla detekována ani v mé bakalářské práci, ve které byly testovány vzorky 1-12 (Mrázová, 2022).

Dalším srovnáním k této práci byla studie (Olaitan et al., 2007), která se zaměřovala na mikroorganismy vyskytující se v medu, a na to, jak se tyto mikroorganismy do medu dostaly. Nalezenými mikroorganismy byly především bakterie a kvasinky, které byly do medu zaneseny od samotných včel, z nektaru a dalších vnějších zdrojů. Mezi identifikovanými bakteriemi byly *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Citrobacter*, *Enterobacter* nebo *Pseudomonas*. Z kvasinek zde měly zastoupení *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* nebo *Torula*. Tato diplomová práce identifikovala převážné zastoupení rodu *Bacillus*. Současně však identifikovala i přítomnost bakterie *Pseudomonas* sp.

Významnou vlastností medů jsou i jeho antimikrobiální účinky, které byly testovány na bakteriích *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Typhimurium, *Serratia marcescens* a *Staphylococcus aureus*. Nejslabší antimikrobiální účinek měly medové roztoky na bakterii *E. durans*, jejíž růst byly schopny inhibovat pouze dva medové roztoky o koncentraci 500 mg/ml. Naopak nejsilnější antimikrobiální účinek vykazovaly medové roztoky proti bakterii *Ps. Fluorescens*, následně pak proti *Staphylococcus aureus* a *Salmonella*

Typhimurium. Nejsilnější antimikrobiální účinky vykazovaly medy 3, 6, 13 a 21. Nejslabší antimikrobiální účinky pak lze přiřadit vzorku 17, který nevykazoval inhibiční účinky na dva z testovaných kmenů, *Enterococcus durans* a *Proteus mirabilis*.

Antimikrobiální aktivita byla rovněž popsána ve studii (Combarros-Fuertes et al., 2019) zkoumající mimo antibakteriální aktivity i bioaktivní složky a antioxidační aktivitu různých odrůd medů. Všechny 16 vzorků medů vykazovalo antibakteriální aktivitu proti referenčním klinickým kmenům (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*). Inhibiční koncentrace se pohybovaly mezi 50-400 mg/ml. Nejcitlivějším kmenem byl *Staphylococcus aureus*, proti kterému vykazovaly silné antimikrobiální účinky i medy testované v této práci. V další studii (Skadiňš et al., 2023) byly zkoumány rovněž antimikrobiální a antibiofilmové vlastnosti 40 lotyšských medů proti původcům infekcí ran (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a další). 11 z těchto vzorků vykazovalo antibakteriální účinky vůči všem zkoumaným bakteriím, přičemž nejvýznamnější účinky byly pozorovány u grampozitivních bakterií. 4 vzorky naopak vykazovaly účinek pouze proti růstu *Pseudomonas aeruginosa*.

Hodnoty celkového obsahu polyfenolů naměřených v této diplomové práci se pohybovaly v rozmezí 0,35-1,00 mg GAE/g medu. Průměrná hodnota všech vzorků byla 0,58 mg TE/g medu. V případě stanovení antioxidační aktivity se hodnoty pohybovaly mezi 0,26-0,71 mg TE/g medu. Průměrná hodnota všech vzorků byla 0,40 mg TE/g medu. Vyšších hodnot v obou případech dosahovaly, s výjimkou vzorku 3, vzorky medovicového původu, jejichž hodnoty byly vyšší než stanovený průměr. Jednalo se o vzorky 6, 15 a 21. Všechny tyto vzorky pocházely od soukromých včelařů. Vzorky 6 a 21 pocházely ze stejné oblasti (obec Vlčková). Rozdíl mezi nimi spočíval v roce stáčení, kdy vzorek 6 pocházel z roku 2021 a vzorek 21 z roku 2022. U těchto vzorků byly stanovené hodnoty obsahu polyfenolů velice blízké.

Jednou ze studií zaměřených na antioxidační vlastnosti medů je práce (Škrovánková et al., 2019) zaměřená na stanovení celkového obsahu polyfenolů metodou s Folin-Ciocalteuho činidlem a antioxidační aktivitu vzorků medů různého původu pocházejících z území České a Slovenské republiky. Při stanovení polyfenolů byly nejvyšší hodnoty naměřeny u medů medovicového původu, a naopak nejnižší u medů květových (řepkového a akátového). Rozmezí hodnot se pohybovalo od 0,540 do 2,542 mg GAE/g medu s průměrem 1,500 mg GAE/g. Folin-Ciocalteuho metoda byla využita i v rumunské studii (Dezmirean et al., 2012) zaměřené na změny nutričního profilu a antioxidační aktivity medu

a fermentovaných medových produktů v závislosti na jejich botanickém původu. Výsledkem měření bylo, že vyšší množství polyfenolů bylo stanoveno v tmavších medech. Celkový obsah polyfenolů ve vzorcích medu použitých v této studii se pohyboval v rozmezí 0,148 až 0,435 mg GAE/g.

V případě stanovení antioxidační aktivity byly ve studii (Škrovánková et al., 2019) naměřeny opět vyšší hodnoty v případě medovicových medů. Zaměříme-li se na hodnoty stanovené metodou DPPH, pohybovaly se v rozmezí od 0,113 do 1,187 mg TE/g. V tomto rozmezí se pohybovaly i námi stanovené hodnoty. Závěrem studie je tvrzení, že tmavší vzorky medů, medy medovicového původu, vykazují nejen vyšší obsah fenolických sloučenin, ale i vyšší antioxidační aktivitu než vzorky původu květového. S tímto tvrzením se ztotožňují i výsledky této práce.

Hodnoty naměřené v této diplomové práci jsou v porovnání s odbornými články mírně odlišné. Důvodem je různorodé zpracování, modifikace použitých metod v podobě množství použitých činidel nebo času jejich působení, či variabilita samotných vzorků. Další rozdíly se mohou projevit ve využití jiných koncentrací standardů nebo v samotné interpretaci výsledků v různých jednotkách. I když jsou jednotlivé výsledky rozdílné, lze dojít vždy ke stejnému závěru, který říká, že vyšší hodnoty obsahu polyfenolů jakožto i antioxidační aktivity, vykazují vzorky medů tmavších barev, tedy medů medovicových.

Z výsledků korelační analýzy mezi hodnotami celkového obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity metodou DPPH lze dojít k závěru, že výsledky obou stanovení vykazují silnou závislost. S rostoucím obsahem polyfenolů tedy roste i antioxidační aktivita testovaných vzorků medů, která je vyšší u medů medovicového původu.

## ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na mikrobiologické, molekulárně-biologické a chemické metody zkoumající vybrané charakteristiky medu. Cílem práce byla analýza 21 vzorků medů lišících se rokem stáčení, lokalitou a původem, které byly zakoupeny v obchodní síti nebo pocházely ze zásob soukromých včelařů z Česka i zahraničí.

Tyto vzorky byly podrobeny mikrobiologické analýze provedením kultivačního stanovení s následnou identifikací vybraných izolátů metodou sekvenování genu pro 16S rRNA. Další stanovení bylo zaměřeno na výskyt bakterie *Clostridium botulinum* využitím molekulárně-biologických metod. Následně byla provedena taxonomická analýza bakteriálního a houbového profilu využitím metody NGS. Vybrané vzorky byly podrobeny stanovení antimikrobní aktivity mikrodiluční metodou. U stejných vzorků byla nakonec stanovena i antioxidační aktivita, jejíž součástí bylo i stanovení celkového obsahu polyfenolů. Na základě získaných výsledků byly vyjádřeny následující závěry.

Výsledkem mikrobiologické analýzy bylo převážné zastoupení sporulujících bakterií rodu *Bacillus*, konkrétně pak *Bacillus velezensis*. Všechny identifikované bakterie se do medu dostaly pravděpodobně primární kontaminací způsobenou samotnými včelami, které dosedají na přírodní materiály, ze kterých identifikované bakterie pocházejí.

Dalším závěrem, vyplývajícím z této práce je, že v žádném z testovaných vzorků nebyla detekována sporulující bakterie *Clostridium botulinum*, způsobující alimentární onemocnění u dětí do 1 roku, kojenecký botulismus.

Metodu NGS bylo zjištěno zastoupení bakteriálního a houbového společenství vybraných vzorků. Nejčastěji zastoupenou třídou bakteriálního profilu byla třída *Bacilli* a čeleď *Lactobacillaceae*, spadající do této třídy. Z analýzy houbového profilu to pak byly třídy *Dothideomycetes* a *Saccharomycetes*. Nejčastěji zastoupenou čeledí *Sacchotheciaceae*, spadající do třídy *Dothideomycetes* a *Saccharomycetae*, jež spadá do třídy *Saccharomycetes*.

Antimikrobní aktivita byla potvrzena u všech vzorků medů. Nejslabší antimikrobní účinek vykazovaly medové roztoky proti bakterii *Enterococcus durans*. Naopak nejsilnější antimikrobiální účinek vykazovaly proti bakterii *Pseudomonas fluorescens* a následně pak proti *Staphylococcus aureus* a *Salmonella Typhimurium*. Nejsilnější antimikrobiální účinky byly pozorovány u medů 3, 6, 13 a 21, jejichž hodnoty MIC byly srovnatelné. Nižší koncentrace medových roztoků v mnoha případech růst testovaných bakterií podporovaly.

Antioxidační účinky vykazovaly rovněž všechny testované vzorky. Nejvyšší hodnoty, společně s celkovým obsahem polyfenolů, vykazovaly zpravidla vzorky medovicového původu. Z korelační analýzy mezi obsahem polyfenolů a antioxidační aktivitou byla zjištěna přímo úměrná závislost, tedy že s rostoucím obsahem polyfenolů roste z antioxidační aktivita medů.



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ANSORGE, Wilhelm J., 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. online. *New Biotechnology*. roč. 25, č. 4, s. 195-203. ISSN 18716784. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2008.12.009>. [cit. 2024-04-29].
- BRUDZYNSKI, Katrina, 2021. Honey as an Ecological Reservoir of Antibacterial Compounds Produced by Antagonistic Microbial Interactions in Plant Nectars, Honey and Honey Bee. online. *Antibiotics*. roč. 10, č. 5. ISSN 2079-6382. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050551>. [cit. 2024-04-21].
- Codex Alimentarius: Standard for Honey, 2001. In: . s. 19-26. Dostupné také z: [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandard%252FCXS%2B12-1981%252FCXS\\_012e.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandard%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012e.pdf).
- COMBARROS-FUERTES, Patricia; ESTEVINHO, Leticia; DIAS, Luis; CASTRO, José; TOMÁS-BARBERÁN, Francisco et al., 2019. Bioactive Components and Antioxidant and Antibacterial Activities of Different Varieties of Honey: A Screening Prior to Clinical Application. online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. roč. 67, č. 2, s. 688-698. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05436>. [cit. 2024-03-21].
- ČERMÁKOVÁ, Tatiana; CHLEBO, Róbert a HUSÁRIKOVÁ, Milena, 2010. *Knih o medu*. Bratislava: Estone Books. ISBN 978-80-8109-132-2.
- ČESKO, 2003. Vyhláška č. 76/2003 Sb. Vyhláška, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. In: *Sbírka zákonů České republiky*. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-76>.
- ČESKÝ SVAZ VČELAŘŮ, 1999. *Svazová norma ČESKÝ MED: Norma jakosti č. ČSV 1/1999*. -. Dostupné také z: [https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/prilohy/smernice\\_med\\_CSV.pdf](https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/prilohy/smernice_med_CSV.pdf).
- DEZMIREAN, Grația; MĂRGHITAȘ, Liviu; BOBIȘ, Otilia; DEZMIREAN, Daniel; BONTA, Victorița et al., 2012. Botanical Origin Causes Changes in Nutritional Profile and Antioxidant Activity of Fermented Products Obtained from Honey. online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. roč. 60, č. 32, s. 8028-8035. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf3022282>. [cit. 2024-04-25].
- *DNeasy® Blood & Tissue Kit: Handbook*, 2016. QIAGEN®.
- *DNeasy® mericon® Food Kit: Handbook*, 2014. QIAGEN®.
- DRAŠAR, Jan, 1978. *Včelařství*. 1. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. ISBN 07-079-78.
- FAURE, Denis a JOLY, Dominique, 2015. Next-generation sequencing as a powerful motor for advances in the biological and environmental sciences. online. *Genetica*. roč. 143, č. 2, s. 129-132. ISSN 0016-6707. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10709-015-9831-8>. [cit. 2024-04-29].
- FRANK, Renate, 2010. *Zázračný med*. [Libeznice]: Víkend. ISBN 978-80-7433-024-7.
- GIAMPIERI, Francesca; QUILES, Jose; CIANCIOSI, Danila; FORBES-HERNÁNDEZ, Tamara; ORANTES-BERMEJO, Francisco et al., 2022. Bee Products: An Emblematic Example of Underutilized Sources of Bioactive Compounds. online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. roč. 70, č. 23, s. 6833-6848. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05822>. [cit. 2024-03-23].
- GRABOWSKI, N.T. a KLEIN, G, 2015. Microbiology and Food-borne Pathogens in Honey. online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. roč. 57, č. 9, s. 1852-1862. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1029041>. [cit. 2024-03-29].
- HANKE, Eva, 2001. *Med: sladký pomocník, ideální léčitel, přírodní kosmetikum*. Vyd. 1. Knížky dostupné každému. Praha: I. Železný. ISBN 8024018462.
- HENDL, Jan, 2015. *Přehled statistických metod: analýza a metaanalýza dat*. Páté, rozšířené vydání. Praha: Portál. ISBN 978-80-262-0981-2.
- CHAVAN, Dimple; ADOLACION, Jay; CRUM, Mary; NANDY, Suman; LEE, Kyung et al., 2022. Isolation and Barcoding of Trace Pollen-free DNA for Authentication of Honey. online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. roč. 70, č. 43, s. 14084-14095. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c04309>. [cit. 2024-03-21].
- KAČÁNIOVÁ, Miroslava; PAVLIČOVÁ, Simona; HAŠČÍK, P.; KOCIUBINSKI, G.; KŮAZOVICKÁ, Vladimíra et al., 2009. Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. online. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. roč. 56, č. 3, s. 285-295. ISSN 1217-8950. Dostupné z: <https://doi.org/10.1556/AMicr.56.2009.3.7>. [cit. 2024-04-13].
- KAMLER, František; TITĚRA, Dalibor a VESELÝ, Vladimír, 1999. *Získávání a zpracování včelích produktů*. Vyd. 1. Živočišná výroba (Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR). V Praze: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR. ISBN 80-7105-196-9.
- KNOLLER, Rasso, 1996. *Knížka o medu*. Vyd. 1. Praha: Granit. ISBN 80-85805-43-x.
- *Med*, 2010. 1. vyd. Přeložil Kateřina BLAHOVÁ. Užitečné rady. Praha: Sun. ISBN 978-80-7371-342-3.

- MRÁZOVÁ, Markéta, 2022. *Mikrofóra medu a včelích produktů*. Bakalářská práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- NOVÁKOVÁ, Elena, 2017. Clostridium botulinum. online. *REVUE MÉDICÍNY V PRAXI*. roč. 15, č. 3, s. 1-4. Dostupné z: [https://www.vzbb.sk/sk/aktuality/spravy/2017/clostridium\\_revue\\_3\\_2017.pdf](https://www.vzbb.sk/sk/aktuality/spravy/2017/clostridium_revue_3_2017.pdf). [cit. 2024-03-15].
- OLAITAN, PB; ADELEKE, OE a OLA, IO, 2007. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. online. *African Health Sciences*. roč. 7, č. 3, s. 159-165. Dostupné z: <https://doi.org/10.5555/afhs.2007.7.3.159>. [cit. 2024-03-28].
- OP DE BEECK, Michiel; LIEVENS, Bart; BUSSCHAERT, Pieter; DECLERCK, Stéphan; VANGRONSVELD, Jaco et al., 2014. Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. online. *PLoS ONE*. roč. 9, č. 6. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097629>. [cit. 2024-02-27].
- PAVLOVÁ, Veronika, 2020. *Sledování diverzity mikrobioty v medu*. Diplomová práce, vedoucí Leona Buňková. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin.
- POORMONTASERI, M.; HOSSEINZADEH, S. a SHEKARFOROUSH, S.S., 2014. Characterization of clostridium botulinum spores and its toxin in honey. online. *Iranian Journal of Veterinary Research*. roč. 15, č. 1, s. 36-39. ISSN 17281997. Dostupné z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edselc&an=edselc.2-52.0-84901620699&scope=site>. [cit. 2024-02-15].
- PŘIDAL, Antonín, 2003. *Včelí produkty*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 8071577170.
- PŘIDAL, Antonín, 2005. *Včelařství - cvičení*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-7157-852-5.
- PŘIDAL, Antonín a ČERMÁK, Květoslav, 2005. *Včelařství*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-7157-850-9.
- RABBEH, Muhammad; ALI, Md.; CHOI, Jinhee; HWANG, Buyng; JEONG, Sang et al., 2019. Bacillus velezensis: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. online. *Molecules*. roč. 24, č. 6. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>. [cit. 2024-05-06].
- RAYMANN, Kasie a MORAN, Nancy, 2018. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. online. *Current Opinion in Insect Science*. roč. 26, s. 97-104. ISSN 22145745. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.012>. [cit. 2024-03-29].
- SKADIŇŠ, Ingus; LABSVĀRDS, Krišs; GRAVA, Andra; AMIRIAN, Jhaleh; TOMSONE, Laura et al., 2023. Antimicrobial and Antibiofilm Properties of Latvian Honey against Causative Agents of Wound Infections. online. *Antibiotics*. roč. 12, č. 5. ISSN 2079-6382. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050816>. [cit. 2024-04-07].
- SMĚRNICE RADY 2001/110/ES: o medu, 2002. In: *Úřední věstník Evropské unie*. s. 179-184. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001L0110>.
- SNOWDON, J.A. a CLIVER, D.O., 1996. Microorganisms in Honey: a review. online. *International Journal of Food Microbiology (Netherlands)*. roč. 31, č. 1-3, s. 1-26. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsagr&an=edsagr.NL9701220&scope=site>. [cit. 2024-03-29].
- ŠEFČÍK, Jozef, 2014. *Začínáme včelařit*. 1. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4857-3.
- ŠKROVÁNKOVÁ, Soňa; SNOPEK, Lukáš; MLČEK, Jirí a VOLAŘÍKOVÁ, Eva, 2019. Bioactive compounds evaluation in different types of Czech and Slovak honeys. online. *Potravinářstvo Slovak Journal of Food Sciences*. roč. 13, č. 1, s. 94-99. ISSN 1337-0960. Dostupné z: <https://doi.org/10.5219/1025>. [cit. 2024-04-25].
- ŠPAČKOVÁ, Michaela a MANĎÁKOVÁ, Zdenka, 2017. Kojenecký botulismus – med jako rizikový faktor. online. *ZPRÁVY CENTRA EPIDEMIOLOGIE A MIKROBIOLOGE*. roč. 26, č. 4, s. 152–156. ISSN 1804 – 8676. 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). [cit. 2024-03-15].
- ŠVAMBERK, Václav, 2003. *Záhadné včely: tajemný svět včel II. 2., upr. a dopl. vyd.* [Líbeznice]: Víkend. ISBN 8072222856.
- TITĚRA, Dalibor, 2006. *Včelí produkty mýtů zbavené: med, vosk, pyl, mateří kašička, propolis, včelí jed*. Vyd. 1. Praha: Ve spolupráci s Českým svazem včelařů vyd. nakl. Brázda. ISBN 802090347x.
- TSOURKAS, Philippos K., 2020. Paenibacillus larvae bacteriophages: obscure past, promising future. online. *Microbial Genomics*. roč. 6, č. 2. ISSN 2057-5858. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000329>. [cit. 2024-04-29].

- *Včelařství*, 2020. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. ISSN 0042-2924.
- *Včelařství*, 2021. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. ISSN 0042-2924.
- VESELÝ, Vladimír; TITĚRA, Dalibor a KAMLER, František, 1997. *Základy včelaření. Živočišná výroba* (Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR). Praha: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR. ISBN 80-710-5139-X.
- VORLOVÁ, Lenka, 2002. *Med: souborná analýza*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, Fakulta veterinární hygieny a ekologie. ISBN 8073054507.
- VOTAVA, Miroslav, 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 80-902896-6-5.
- WALTERS, William; HYDE, Embriette; BERG-LYONS, Donna; ACKERMANN, Gail; HUMPHREY, Greg et al., 2016. Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. online. *MSystems*. roč. 1, č. 1, s. 00009-15. ISSN 2379-5077. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00009-15>. [cit. 2024-02-27].
- WEISBURG, W; BARNS, S; PELLETIER, D a LANE, D, 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. online. *Journal of Bacteriology*. roč. 173, č. 2, s. 697-703. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>. [cit. 2024-02-19].
- WOJTACKA, Joanna; WYSOK, Beata; KABAŠINSKIENĖ, Aistė; WISZNIEWSKA, Agnieszka; GOMÓŹKA-PAWLICKA, Małgorzata et al., 2017. Prevalence of Clostridium botulinum Type A, B, E and F Isolated From Directly Sold Honey in Lithuania. online. *Journal of Agricultural Science and Technology*. roč. 19, s. 335-343. ISSN 1680-7073. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/314101019\\_Prevalence\\_of\\_Clostridium\\_botulinum\\_Type\\_A\\_B\\_E\\_and\\_F\\_Isolated\\_From\\_Directly\\_Sold\\_Honey\\_in\\_Lithuania](https://www.researchgate.net/publication/314101019_Prevalence_of_Clostridium_botulinum_Type_A_B_E_and_F_Isolated_From_Directly_Sold_Honey_in_Lithuania). [cit. 2024-02-16].
- WOJTACKA, Joanna; WYSOK, Beata; LIPIŃSKI, Zbigniew; GOMÓŹKA-PAWLICKA, Małgorzata; RYBAK-CHMIELEWSKA, Helena et al., 2016. Clostridium botulinum Spores Found in Honey from Small Apiaries in Poland. online. *Journal of Apicultural Science*. roč. 60, č. 2, s. 89-100. ISSN 2299-4831. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/jas-2016-0020>. [cit. 2024-02-15].
- XIONG, Zirui; COBO, Mario; WHITTAL, Randy; SNYDER, Abigail; WOROBO, Randy et al., 2022. Purification and characterization of antifungal lipopeptide produced by Bacillus velezensis isolated from raw honey. online. *PLOS ONE*. roč. 17, č. 4. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266470>. [cit. 2024-05-06].
- XIONG, Zirui; SOGIN, Jonathan a WOROBO, Randy, 2023. Microbiome analysis of raw honey reveals important factors influencing the bacterial and fungal communities. online. *Frontiers in Microbiology*. roč. 13. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1099522>. [cit. 2024-03-28].

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

bp	base pairs (párů bází)
CPM	celkový počet mikroorganismů
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazil
EFSA	The European Food Safety Authority
GAE	kyselina gallová
CHYGA	Chloramphenicol Yeast Glucose Agar
KR	kontrola růstu
KS	kontrola sterility
McF	McFarland
MH	Mueller-Hinton
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NGS	Next Generation Sequencing
OD	optická denzita
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
pH	power of hydrogen
RCA	Reinforced Clostridial Agar
RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
rpm	revolutions per minute (otáčky za minutu)
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
SDS	sodium dodecyl sulfate (dodecylsulfát sodný)
spp.	species (druh)

subsp.	subspecies (poddruh)
TAE	tris-acetát-EDTA
TE	trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina)
UV	ultrafialové záření

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Odlišení matky ve včelstvu (archiv autorky) .....	15
Obrázek 2 Dělnice shromažďující zásoby pylu (archiv autorky) .....	16
Obrázek 3 Uložení rámků s plásty v úlu (archiv autorky) .....	17
Obrázek 4 Geografické zobrazení původu testovaných vzorků medu (vytvořeno pomocí <a href="http://detske.napady.net">detske.napady.net</a> a <a href="http://ucebnicemapy.cz">ucebnicemapy.cz</a> ) .....	40
Obrázek 5 Odvíčkovávání plástů (archiv autorky) .....	41
Obrázek 6 Umístění rámků s medem v medometu (archiv autorky) .....	41
Obrázek 7 Odtok medu z medometu (archiv autorky) .....	42
Obrázek 8 Počítání kolonií (archiv autorky) .....	46
Obrázek 9 Schéma nanesení vzorků na mikrotitrační destičku .....	56
Obrázek 10 Počet stanovených mikroskopických hub v rozmezí dvou stanovení .....	61
Obrázek 11 Pomnožení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů během skladování medů .....	61
Obrázek 12 Pomnožení sporulujících mikroorganismů rostoucích na PCA za aerobních podmínek .....	62
Obrázek 13 Pomnožení mikroorganismů rostoucích na RCA .....	63
Obrázek 14 Příklad porovnání vyhovující a nevyhovující sekvence (archiv autorky) .....	63
Obrázek 15 Výsledky průběhu elektroforézy 1 (získáno pomocí GeneSnap) .....	65
Obrázek 16 Výsledky průběhu elektroforézy 2 (získáno pomocí GeneSnap) .....	65
Obrázek 17 Výsledky průběhu elektroforézy 3 (získáno pomocí GeneSnap) .....	66
Obrázek 18 Výsledky průběhu elektroforézy 4 (získáno pomocí GeneSnap) .....	66
Obrázek 19 Taxonomické zařazení tříd prokaryot v analyzovaných vzorcích medů .....	67
Obrázek 20 Taxonomické zařazení čeledí prokaryot v analyzovaných vzorcích medů .....	67
Obrázek 21 Taxonomické zařazení tříd eukaryot v analyzovaných vzorcích medů .....	68
Obrázek 22 Taxonomické zařazení čeledí eukaryot .....	68
Obrázek 23 Růst <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l .....	70
Obrázek 24 Růst <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l .....	72
Obrázek 25 Růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l .....	74
Obrázek 26 Růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> CCDM 141 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l .....	76
Obrázek 27 Růst <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188 s přidavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l .....	78

---

Obrázek 28 Růst <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Typhimurium CCM 7933 s přídavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l .....	80
Obrázek 29 Růst <i>Serratia marcescens</i> CCM 303 s přídavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l .....	82
Obrázek 30 Růst <i>Pseudomonas fluorescens</i> CCM 2115 s přídavkem testovaných medů v koncentracích 0-500 mg/l .....	84
Obrázek 31 Celkový obsah polyfenolů testovaných vzorků medů.....	87
Obrázek 32 Antioxidační aktivita testovaných vzorků v sestupném pořadí.....	89
Obrázek 33 Korelační analýza TPC a DPPH.....	90

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Analyzované vzorky medu, rok stáčení a jejich původ .....	39
Tabulka 2 Podmínky kultivace jednotlivých skupin mikroorganismů .....	46
Tabulka 3 Složení reakční směsi pro touchdown PCR.....	48
Tabulka 4 Sekvence primerů použitých při touchdown PCR.....	48
Tabulka 5 Průběh touchdown PCR.....	48
Tabulka 6 Složení PCR směsi připravené pro jednu dvojici primerů.....	51
Tabulka 7 Použité primery pro stanovení bakterií rodu <i>Clostridium</i> .....	52
Tabulka 8 Schéma průběhu PCR .....	52
Tabulka 9 Primery použité v primární PCR .....	53
Tabulka 10 Složení směsi připravené pro primární PCR .....	53
Tabulka 11 Znázornění průběhu primární (sekundární) PCR .....	54
Tabulka 12 Složení směsi připravené pro sekundární PCR.....	54
Tabulka 13 Výsledky kultivačního stanovení indikátorových skupin mikroorganismů v analyzovaných medech v rozmezí 6 měsíců v roce 2023 .....	60
Tabulka 14 Výsledky identifikace izolovaných bakterií metodou sekvenace genu pro 16S rRNA.....	64
Tabulka 15 Výsledné hodnocení antimikrobní aktivity vybraných medů na testované bakterie.....	86