

Antimikrobní účinky medů na vybrané gramnegativní bakterie

Bc. Kamila Lacinová

Diplomová práce
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kamila Lacinová**
Osobní číslo: **T19422**
Studijní program: **N0721A210004 Technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Antimikrobní účinky medů na vybrané gramnegativní bakterie**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

1. Med a včelí produkty – charakteristické vlastnosti, složení, produkce.
2. Antimikrobní a antioxidační látky vlastnosti medu a včelích produktů.

II. Praktická část:

1. Příprava medových vzorků pro testování antimikrobní aktivity.
2. Stanovení antimikrobní aktivity vzorků medů na vybrané gramnegativní bakterie.
3. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Cianciosi, D., et al. Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules*, 23: Article Number 2322. 2018
- [2] Javier Leyva-Jimenez, F., et al. Potential antimicrobial activity of honey phenolic compounds against Gram positive and Gram negative bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 101: 236-245, 2019
- [3] Hbini, A. et al. Antimicrobial activity of honey in periodontal disease: a systematic review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75: 807-826. 2020
- [4] Goslinski, M., Nowak, D., Klebukowska, L. Antioxidant properties and antimicrobial activity of manuka honey versus Polish honeys. *Journal of Food Science and Technology*, 57: 1269-1277. 2020
- [5] Grabowski, N.T., Klein, G. Microbiology and foodborne pathogens in honey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57: 1852-1862. 2017

Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně

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

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 8. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo stanovit antimikrobní působení různých medů na vybrané gramnegativní bakterie.

Teoretická část se zaměřuje na vlastnosti a složky medu související s jeho antimikrobní a antioxidační kapacitou, dále obsahuje kapitolu zabývající se mikrobiologií medu a jeho potencionálním využitím v medicíně, poslední kapitola se věnuje dalším včelím produktům a jejich využití.

V samotné praktické části byl zkoumán antimikrobní účinek několika vzorků medů na šest gramnegativních bakterií, jenž byl stanoven pomocí mikrodiluční metody a vyjádřen minimální inhibiční koncentrací. U všech vzorků medů byla potvrzena antimikrobní aktivita. Nejúčinnější byly u většiny vzorků koncentrace 500 µg/ml, medové vzorky o koncentracích 15,6 – 125 µg/ml naopak růst bakterií podpořily. Bylo zjištěno, že nejcitlivější bakterie na aplikované medové vzorky byla *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798.

Klíčová slova: med, antimikrobní účinek, gramnegativní bakterie, fenolické sloučeniny

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was to determine the antimicrobial effect of various honeys on selected gram-negative bacteria.

The theoretical part focuses on the properties and components of honey related to its antimicrobial and antioxidant capacity, thesis also contains a chapter dealing with the microbiology of honey and its potential use in medicine, the last chapter deals with other bee products and their use.

In the experimental part, the antimicrobial effect of several samples of honey on six gram-negative bacteria was investigated, which was determined by the microdilution method and expressed by the minimum inhibitory concentration. Antimicrobial activity was confirmed in all honey samples. Concentrations of 500 µg/ml were most effective in most samples, while honey samples with concentrations of 15.6 - 125 µg/ml supported the growth of bacteria. It was found that the most sensitive bacteria to the applied honey samples was *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798.

Keywords: honey, antimicrobial effect, gram-negative bacteria, phenolic compounds

Tímto bych ráda poděkovala doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a poskytnutí cenných rad při zpracování této diplomové práce. Touto cestou bych také chtěla poděkovat laborantkám Ing. Veronice Kubačové a Ing. Olze Vlčkové za pomoc a praktické rady v laboratoři.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 MED.....	11
1.1 DEFINICE MEDU.....	11
1.2 NEKTAR A MEDOVICE.....	11
1.2 DRUHY MEDU.....	12
1.2 VZNIK MEDU.....	13
2 CHEMICKO-FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI MEDU.....	14
2.1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ MEDU.....	14
2.1.1 Sacharidy.....	14
2.1.2 Dusíkaté látky.....	14
2.1.3 Organické kyseliny, vitaminy a minerální látky.....	15
2.2 FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI MEDU.....	15
2.2.1 Barva.....	15
2.2.2 Hustota.....	16
2.2.3 Viskozita.....	16
2.2.4 Hygroskopicitu.....	16
2.2.5 Krystalizace.....	16
2.2.6 Optická rotace.....	17
3 SLOŽKY MEDU SOUVISEJÍCÍ S JEHO ANTIMIKROBNÍ A ANTIOXIDAČNÍ KAPACITOU.....	18
3.1 NÍZKÁ AKTIVITA VODY.....	18
3.2 VYSOKÝ OBSAH SACHARIDŮ.....	18
3.3 KYSELOST.....	19
3.4 PEROXID VODÍKU.....	19
3.5 DEFENSIN-1.....	19
3.6 METHYLGYLOXAL.....	19
3.7 FENOLOVÉ SLOUČENINY.....	20
4 POTENCIONÁLNÍ VYUŽITÍ MEDU V MEDICÍNĚ.....	24
5 MIKROBIOLOGIE MEDU.....	26
6 DALŠÍ VČELÍ PRODUKTY A JEJICH VYUŽITÍ.....	28
6.1 VČELÍ VOSK.....	28
6.2 PROPOLIS.....	29
6.3 MATEŘÍ KAŠIČKA.....	30
6.4 PYL.....	32
6.5 VČELÍ JED.....	32

PRAKTICKÁ ČÁST	34
7 CÍL PRÁCE	35
8 POUŽITÁ ZAŘÍZENÍ A MATERIÁL	36
8.1 PŘÍSTRIJE A POMŮCKY	36
8.2 CHEMIKÁLIE.....	36
8.3 ŽIVNÁ MÉDIA	36
8.4 BAKTERIÁLNÍ KMENY	37
8.5 VZORKY MEDŮ	37
9 METODIKA PRO STANOVENÍ ANTIMIKROBNÍCH ÚČINKŮ MEDU	38
9.1 PŘÍPRAVA MEDOVÝCH VZORKŮ.....	38
9.2 PŘÍPRAVA ŽIVNÉHO MÉDIA A FYZIOLOGICKÉHO ROZTOKU	38
9.3 RESUSCITACE MIKROORGANISMŮ A PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍ SUSPENZE	38
9.4 MIKRODILUČNÍ METODA	39
10 VÝSLEDKY	40
10.1 ANTIMIKROBNÍ ÚČINEK MEDU NA RŮST BAKTERIÍ	40
10.2 VLIV VZORKŮ MEDŮ NA RŮST <i>ESCHERICHIA COLI</i> CCM 3954	40
10.3 VLIV VZORKŮ MEDŮ NA RŮST <i>ENTEROBACTER AEROGENES</i> CCM 2531	41
10.4 VLIV VZORKŮ MEDŮ NA RŮST <i>SERRATIA MARCESCENS</i> CCM 303.....	43
10.5 VLIV VZORKŮ MEDŮ NA RŮST <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SUBSP. <i>ENTERICA</i> SÉROVAT TYPHIMURIUM CCM 793.....	44
10.6 VLIV VZORKŮ MEDŮ NA RŮST <i>PROTEUS MIRABILIS</i> CCM 7188	45
10.7 VLIV VZORKŮ MEDŮ NA RŮST <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> CCM 2798.....	47
11 DISKUZE	49
ZÁVĚR	54
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	55
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	63
SEZNAM OBRÁZKŮ	64
SEZNAM TABULEK.....	65

ÚVOD

Léčivé účinky medu jsou doloženy v nejstarších lékařských publikacích a od starověku je známo, že má antimikrobiální vlastnosti a schopnost hojení ran. S příchodem antibiotik bylo v moderní západní medicíně upuštěno od klinické aplikace medu, přestože se v mnoha kulturách stále používá. Silná antimikrobní aktivita medu proti bakteriím rezistentním na antibiotika vede k opětovnému zájmu o jeho aplikaci.

Tyto účinky jsou způsobeny především fyzikálními vlastnostmi, jako je nízká aktivita vody, vysoký osmotický tlak, vysoká viskozita, kyselost, nízké pH a nízký obsah bílkovin, které zabraňují růstu mikroorganismů. Kromě těchto fyzikálních vlastností je antimikrobiální aktivita medu způsobena také glukózooxidázou, peroxidem vodíku a některými fenolovými sloučeninami. Tyto vlastnosti přímo souvisí s botanickým a geografickým původem medů.

Bylo zjištěno, že především manukový med pocházející z rostliny *Leptospermum scoparium*, má významné antibakteriální účinky, díky kterým se používá ve farmaceutickém průmyslu. Výzkumy prokázaly jeho účinnost proti několika lidským patogenům.

Cílem této diplomové práce bylo tyto antimikrobní účinky prozkoumat za využití několika vzorků medů pocházejících především ze Slovenské republiky na vybrané druhy gramnegativních bakterií.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MED

1.1 Definice medu

Med je hustá sladká a lepkavá kapalina, vytvářená včelami sběrem a zahušťováním sladkých šťáv. Medem se dle vyhlášky č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony, rozumí potravina přírodního sacharidového charakteru, složená převážně z glukózy, fruktózy, organických kyselin, enzymů a pevných částic zachycených při sběru sladkých šťáv květů rostlin (nektar), výměšků hmyzu na povrchu rostlin (medovice), nebo na živých částech rostlin včelami (*Apis mellifera*), které sbírají, přetvářejí, kombinují se svými specifickými látkami, uskladňují a nechávají dehydratovat a zrát v plástech. (Vyhláška č. 76/2003)

Existují i jiné druhy včel rodu *Apis* než včela medonosná (*Apis mellifera*), takové medy ale mají odlišné vlastnosti. Konzumují se především v orientálních oblastech nebo oblastech Střední a Jižní Ameriky. (Přidal, 2003)

1.2 Nektar a medovice

Nektar a medovice jsou sladké šťávy, ze kterých včela medonosná vytváří med. Jejich složení není totožné, a proto medy z nich vzniklé mají také odlišné složení a vlastnosti. (Přidal, 2003)

V květech je seskupení speciálních buněk nazývané nektária, které umožňují produkci nektaru. Nektar produkuje rostlina samovolně a je produkován jen po část dne, této době se říká, že rostliny medují. (Přidal, 2003; Dupal et al., 2015)

Obsah vody v nektaru poměrně dost kolísá a pohybuje se v rozmezí 15-95 %. Z cukrů se vyskytují nejvíce sacharóza, glukóza a fruktóza v různém poměru, který je charakteristický pro jednotlivé rostliny, průměrný obsah je asi 40% sacharidů. Zcela téměř v něm chybí dusíkaté látky, dále obsahují malé množství minerálních látek, kyselin, aromatických látek a barviv, pH se pohybuje v rozpětí 2,7 – 6,4. (Přidal, 2003)

Naopak medovice se na rostlinu dostane prostřednictvím dalších druhů hmyzu. Tuto hustou kapalinu vyskytující se na listech a jehličí stromů, která vytváří na rostlinách kapky, vylučují tzv. producenti medovice pomocí svých ústních orgánů a je jím stejnokřídlý hmyz, nejčastěji mšice. Zdrojem medovice je rostlinná šťáva, jenž proudí sítkovicemi rostlin,

a kterou stejnokřídlí vysávají. Šťáva prochází jejich zažívacím ústrojím, kde probíhají biochemické procesy a poté ji vylučují z výkalového vaku na rostliny, odkud je včely sbírají. Medovice má tedy stejný původ jako nektar, ale složitější cestu do úlu. Medovice obsahuje až 50 % vody, podstatnou část tvoří sacharidy jako sacharóza, glukóza, fruktóza, také maltóza, melecitóza, rafinóza a polysacharidy. Dále obsahují také aminokyseliny, z nichž lze jmenovat například alanin, arginin, histidin leucin aj., v neposlední řadě minerální látky, vitaminy a barviva, pH se pohybuje kolem 3,9-4,9. (Přidal, 2003; Titěra, 2013)

1.3 Druhy medu

Med lze členit do skupin podle několika hledisek. Jak již bylo naznačeno v předchozí podkapitole, jedním z dělení je podle tzv. snůšky neboli původu na květové a medovicové. Zdrojem medu je tedy buď nektar, medovice nebo kombinace obojího. (Hrabě et al., 2005; Dupal et al., 2015)

Nejrozšířenějšími medy v naší geografické oblasti je med řepkový, akátový, pampeliškový, slunečnicový a medovicový (lesní). Celosvětově velmi známý je například manukový med pocházející z rostliny balmín metlatý (*Leptospermum scoparium*) původem z Austrálie a Nového Zélandu. Pro množství druhů medu je rozhodující nabídka rostlin, které včela může opylovat a klimatické podmínky. Včely většinou létají na různé druhy rostlin, čímž vznikají medy smíšené. Pokud se v některé oblasti vyskytuje určitá rostlina častěji, je možné získat i jednodruhové medy. (Frank, 2010)

Dále můžeme med rozdělit podle způsobu zpracování nebo obchodní úpravy. Většina medu se získává vytáčením, což je med získaný odstředováním odvíčkových plástů v tzv. medometech. Dalším je plástečkový med zavíčkovaný a uložený včelami do bezplodových plástů, jenž je prodáván v uzavřených celých plástech nebo dílech takových plástů. Tzv. lisovaný med se získává lisováním bezplodových plástů za použití mírného ohřevu do 45 °C nebo bez použití tepla. V neposlední řadě může být med vykapaný, tedy získaný vykapaním odvíčkových bezplodových plástů. Vyhláška č. 76/2003 Sb. dále rozeznává med s plástečky obsahující jeden nebo více kusů plástečkového medu, filtrovaný med, který byl upraven odstraněním cizích anorganických nebo organických látek takovým způsobem, že dochází k významnému odstranění pylu, dále pastový med upraven po získání do pastovité konzistence. Ve vyhlášce je zaveden i pojem med pekařský, který nelze považovat za med určený k přímé spotřebě, ale je určen výhradně pro průmyslové použití nebo jako složka do jiných potravin. (Vyhláška č. 76/2003; Hrabě et al., 2005)

Dle konzistence lze medy rozdělit na tekuté, krystalické a rosolovité. (Hrabě et al., 2005)

1.4 Vznik medu

Včela medonosná je někdy označována jako sběračkou medu, což je mylné označení, jelikož včela med vyrábí. Při přelétání z květu na květ nasává sosákem cukrovou šťávu, kterou rostliny produkují. Včela zaneše do úlu při jednom letu až 60 mg sladké šťávy. Na přenášení sladkých roztoků má včela v těle tzv. medný váček, jenž je rozšířenou částí jícnu a je oddělený od žaludku česlem. Přenášený nektar či medovici v medném váčku, může včela po přiletu do úlu vyvrhnout do buňky v plástu nebo tuto sladkou tekutinu předá další včele, která se pak postará o další zpracování. (Knoller, 1996; Frank, 2010; Titěra, 2013)

Sladké šťávy nejsou v podobě, ve které ji včela donese do úlu, trvanlivé a během několika dní by zkvasily. Již při sběru, tedy nasávání roztoku, se do nektaru nebo medovice dostávají sekrety žláz s obsahem enzymů. Tyto enzymy katalyzují biochemické reakce a podílejí se rozhodujícím způsobem na zrání medu. Jedním z těchto enzymů je invertáza štěpící sacharózu na jednoduché cukry. (Frank, 2010; Titěra, 2013)

Dalším krokem je zahušťování sladiny. Díky aktivní výměně vzduchu, úpravě teploty v úlu a předávání si sladkého roztoku mezi včelami, se voda odpařuje a šťáva se zahustí. Jakmile obsah vody klesne pod 20 %, včely buňku uzavřou voskovými víčky a zrání pokračuje. (Frank, 2010; Titěra, 2013)

Med se ze včelstva odebírá v plástech. Původně se vylamovaly, rozmačkaly do nádob a obsah se precedil, pláсты se tedy včelám nevracely zpět. Dnes se již med získává za pomoci odstředivé síly. Včelař odebere pláсты, odstraní víčka a pomocí medometu se med vytočí. (Frank, 2010; Titěra, 2013)

2 CHEMICKO-FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI MEDU

Med je důležitým zdrojem makro- a mikronutrientů, obsahuje okolo 180 různých sloučenin jako je voda, cukry, volné aminokyseliny, peptidy, enzymy, pigmenty, minerální látky a vitaminy. Med také obsahuje celou řadu fenolových sloučenin pocházejících z rostlin, kterým bude věnována pozornost v následující kapitole. Průměrné množství sacharidů v medech nepřesahuje 82 %, voda tvoří 17 – 18 % a její obsah je limitující pro skladování, pokud nepřekročí 18 %, lze jej bez rizika zkvašení skladovat i několik let. Složení medu, jeho chuť a barva úzce souvisí s jeho botanickým původem a se zpracováním, dále závisí na geografickém území, klimatu a také na druhu včel, díky kterým dochází k produkci medu. (Přidal, 2003; Escuredo et al., 2013)

2.1 Chemické složení medu

2.1.1 Sacharidy

Sacharidy přispívají hlavně k energetické hodnotě a fyzikálním vlastnostem jako hygroskopičnost a viskozita. Až téměř 90 % celkového obsahu cukru v medu mohou představovat dva jednoduché cukry, fruktóza a glukóza. Mezi další zastoupené sacharidy v menším množství patří například maltóza, sacharóza, turanóza, izomaltóza, celobióza a jiné. Jejich koncentrace a vztah mezi nimi je jedním z hlavních klasifikačních parametrů u jednodruhových medů. Množství a podíly jednotlivých cukrů se liší v závislosti na botanickém a zeměpisném původu. (Manyi-Loh et al., 2011)

Disacharidy a trisacharidy přítomné v medu se hydrolyzují na monosacharidy díky přítomným enzymům, především invertáze a α -glukosidáze. Tyto cukry bývají podrobeny chemickým změnám během dlouhého nebo nesprávného skladování medu, což vede k tvorbě nežádoucích sloučenin odvozených od pentóz (furfural) a hexóz (5-hydroxymethylfurfural). Tyto produkty obvykle pocházejí z Maillardových reakcí a využívají se k testování kvality medu, jejich přítomnost naznačuje možné vystavení vysokým teplotám nebo delší dobu skladování. (Fallico et al., 2008; Alvarez-Suares et al., 2010)

2.1.2 Dusíkaté látky

Bílkoviny jsou přítomné v malém množství a to zejména ve formě enzymů a volných aminokyselin. Nejvíce zastoupenou aminokyselinou v medu je prolin, který pochází

primárně ze slinných sekretů včel (*Apis mellifera* L.). Dalšími aminokyselinami jsou lyzin, alanin, fenylalanin, tyrozin, kyselina glutamová, izoleucin a leucin. Hlavními enzymy jsou diastáza, glukózooxidáza a invertáza. Diastázy, původem převážně ze sekretu hltanových žláz včel, jsou amylolytické enzymy, které stejně jako α -amylázy hydrolyzují řetězce škrobu. Jeho funkce však není přesně známá, jelikož med škrob neobsahuje, díky jeho tepelné odolnosti se však využívá jako indikátor čerstvosti. Glukózooxidáza přeměňuje glukózu na δ -glukonolakton, který se hydrolyzuje na kyselinu glukonovou, což je hlavní kyselina v medu a na peroxid vodíku, který je odpovědný za antimikrobiální aktivitu medu. (Bogdanov et al., 2008; Machado De-Melo et al., 2018)

2.1.3 Organické kyseliny, vitaminy a minerální látky

Všechny druhy medu mají určitou kyselost díky obsahu organických kyselin, tyto kyseliny přispívají jak k medové příchuti, tak k její antimikrobiální aktivitě a také ke stabilitě produktu. Nejdůležitější je kyselina glukonová, následovaná kyselinou asparagovou, citrónovou, octovou, mravenčí, fumarovou, galakturonovou, malonovou, mravenčí, acetoglutarovou, máselnou, glutarovou a další. (Cianciosi et al., 2018)

V medu se také vyskytují minerální látky, jejichž množství se liší podle botanického původu, prostředí a zpracování. Mezi nejvíce zastoupenými minerálními látkami lze nalézt draslík, vápník, měď, železo, hořčík, mangan, fosfor, sodík, zinek a selen. Dále obsahuje také malé množství vitaminů, jako jsou kyselina askorbová, thiamin, riboflavin, niacin, kyselina pantothenová a pyridoxin. Všechny vitaminy komplexu B pocházejí hlavně z pylu. (Ciulu et al., 2011)

2.2 Fyzikální vlastnosti medu

2.2.1 Barva

Barva medu závisí na přítomnosti rostlinných pigmentů jako karotenů, xantofylů, antokyanů, flavonoidů, polyfenolů, jakož i aminokyselin a minerálních solí. Barva se odvíjí také od jeho původu, stáří a podmínek skladování. Přítomnost pylových zrn způsobují například jeho opalescenci. Přírozená barva medu má mnoho odstínů, od světle žluté po jantarovou až po téměř černý odstín. Například akátový med je velmi světle žlutý, zatímco medovicový med je černohnědý. Příčinou tmavnutí medu může být i zpracování a skladování způsobené Maillardovými reakcemi, karamelizací cukrů a oxidací polyfenolů. (Přidal, 2003; Terrab et al., 2004)

2.2.2 Hustota

V zásadě je hustota látky vyjádřena jako poměr mezi hmotností a objemem při konstantní teplotě. Hustota medu se pohybuje mezi 1,39 a 1,44 kg/l při 20 ° C, to znamená, že litr medu váží zhruba od 1390 do 1440 g a mění se především v závislosti na obsahu vody v medu. (Baglio, 2018)

2.2.3 Viskozita

Viskozita je vnitřní odpor kapalin proti vnější síle. Med má díky vysoké koncentraci cukru vysoké hodnoty viskozity, jedním z hlavních faktorů je obsah vody a teplota. Jedná se o důležitý technologický parametr při zpracování medu, ovlivňuje tok během medobraní, čerpání, filtraci, smíchávání medů, plnění do obalů aj. Nejjednodušší je úprava viskozity zvýšením teploty během zpracování, nicméně je důležité, aby takové zahřátí bylo šetrné a nedošlo tak ke znehodnocení medu. (Přidal 2003; Baglio, 2018)

2.2.4 Hygroskopicitá

Díky vysokému obsahu cukru je med velmi hygroskopický, což znamená, že snadno přijímá vlhkost a s vlhkostí také pachy, například při nedokonalém uzavření skladovacích nádob, proto je důležité, aby byly při skladování co nejlépe hermeticky uzavřeny. (Přidal 2003)

2.2.5 Krystalizace

Někteří konzumenti se domnívají, že zkrystalizovaný med je nekvalitní a byl do něj přidán řepný cukr. Med však zcela přirozeně krystalizuje a neztrácí tím na kvalitě. Doba krystalizace závisí na druhu medu, nejrychleji zpravidla krystalizují květové medy a nejpomaleji medy medovicové. (Dupal, 2015)

Med je přesycený roztok, jenž obsahuje více rozpuštěné látky, než odpovídá rozpustnosti. Postupem času tedy dochází k vytěsnění nerozpustitelné části cukrů, což bývá nejčastěji glukóza. (Přidal, 2003)

Krystalizace probíhá ve dvou fázích. První fáze je tzv. nukleace, kdy dochází k tvorbě krystalizačních center. Jako krystalizační jádra mohou sloužit nejen krystalky medu, ale také pylová zrna nebo nečistoty. (Přidal, 2003; Čermáková, 2010)

Druhou fází je samotná krystalizace a med krystalizuje v celém svém objemu, což je viditelné pouhým okem. Krystalizace závisí na celé řadě faktorů, zejména na viskozitě,

obsahu vody a teplotě. Zchlazením lze krystalizaci medu zpomalit nebo ji úplně zabránit, jelikož dojde ke zpomalení pohybu molekul ke krystalizačním centřům. Nejrychleji probíhá krystalizace při teplotě 14 °C. Medy s vyšším obsahem glukózy a melecitózy také urychlí krystalizaci, naopak fruktóza a maltóza ji zpomalují. (Přidal, 2003; Čermáková, 2010)

2.2.6 Optická rotace

Díky obsahu sacharidů má med schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla. Květové medy jsou zpravidla levotočivé, jelikož obsahují více fruktózy. Naopak medy medovicové mají v převaze pravotočivé sacharidy, jako je glukóza nebo melecitóza. Optická otáčivost je tedy závislá na poměru sacharidů a medy smíšené proto mohou mít různou různou polarizaci. (Přidal, 2003)

3 SLOŽKY MEDU SOUVISEJÍCÍ S JEHO ANTIMIKROBNÍ A ANTIOXIDAČNÍ KAPACITOU

Jak již bylo pojednáno v předchozí kapitole, všechny druhy medu se skládají převážně z cukrů, které tvoří asi 80 % jeho hmotnosti, necelých 20 % pak tvoří voda. Kromě toho obsahuje vitaminy, aminokyseliny, enzymy, minerální látky a v neposlední řadě fenolové sloučeniny. (Tonks et al., 2003; Swellam et al., 2003)

Med má protizánětlivé, hojící, antioxidační a antimikrobiální účinky. Tyto účinky jsou způsobeny hlavně fyzikálními vlastnostmi, jako je nízká aktivita vody, vysoký osmotický tlak, vysoká viskozita, kyselost, nízké pH a nízký obsah bílkovin, které zabraňují růstu mikroorganismů. Kromě těchto fyzikálních vlastností je antimikrobiální aktivita medu způsobena také glukózooxidázou, peroxidem vodíku a některými fenolovými sloučeninami. (Cianciosi et al., 2018)

Faktory ovlivňující antimikrobní a antioxidační aktivitu závisí na botanickém a geografickém původu medu, zdraví a druhu včely a způsobu zpracování. Bylo zjištěno, že především manukový med má významné antibakteriální účinky, díky kterým se používá ve farmaceutickém průmyslu. Manukový med pochází z Nového Zélandu a Austrálie, kde jej vyrábějí včely medonosné, které sbírají nektar z rostliny *Leptospermum scoparium* neboli balmín metlatý, domorodým názvem manuka. (Cokcetin et al., 2016)

3.1 Nízká aktivita vody

Množství vody dostupné pro mikroorganismy v potravině se označuje jako aktivita vody (a_w). Aktivita vody v medu se pohybuje od 0,562 do 0,62, což je koncentrace dostatečně nízká, aby zabránila růstu bakterií nebo jiných mikroorganismů. Minimální a_w pro bakterie je 0,90-0,91, pro kvasinky 0,87-0,94 a pro plísně 0,70-0,80. (Molan, 2015)

3.2 Vysoký obsah sacharidů

Čistý, neředěný med zpomaluje růst bakterií díky vysokému obsahu cukru, který vyvíjí osmotický tlak na buňky a způsobuje, že bakteriálních buňky vypouští vodu do svého okolí a smršťují se, tento jev se nazývá osmóza. Výsledkem je, že zmenšující se buňky v důsledku dehydratace nemohou přežít v hypertonickém roztoku cukru. Takový antibakteriální potenciál bude nižší, když se med smísí s tělními tekutinami v místech infekce. (Molan, 2015)

3.3 Kyselost

Optimální růst většiny mikroorganismů nastává při neutrálním pH, které se pohybuje od 6,5 do 7,5. Med má pH mezi 3,2 a 4,5, jedná se tedy o velmi výraznou charakteristiku přispívající k jeho antibakteriální účinnosti. Tato kyselost je způsobena přítomností určitých kyselin, zejména kyseliny glukonové, zjištěné v koncentraci 0,5 % (obj.). Kyselina glykogenová se vytváří oxidací glukózy endogenním enzymem glukózooxidázy a je mimořádně účinným antibakteriálním činidlem. V neředěném čistém medu může nízké pH přispívat k jeho antimikrobním vlastnostem, avšak samotné pH není dostatečné k inhibici růstu mnoha druhů bakterií, zvláště pokud je naředěn. (Molan, 2015)

3.4 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku (H_2O_2) je dezinfekční prostředek a silné oxidační činidlo. Poskytuje medu antibakteriální účinek a vyrábí se enzymaticky pomocí glukózooxidázy. Glukózooxidáza je přirozeně se vyskytující enzym v medu metabolizující glukózu za vzniku peroxidu vodíku (H_2O_2) a kyseliny glukonové. Předpokládanou funkcí H_2O_2 je prevence zkažení nezralého medu, když koncentrace cukru ještě nedosáhla úrovně schopné zabránit mikrobiálnímu růstu. Během zrání medu je glukózooxidáza inaktivována, ale znovu získává aktivitu při ředění medu. Ve skutečnosti lze maximální hladiny peroxidu vodíku dosáhnout zředěním medu o 30 % - 50 %, a to na 5 až 100 $\mu g H_2O_2$ na gram medu. (Brudzynski, 2006)

3.5 Defensin-1

Peptid defensin-1 (Def-1) izolovaný z včel a mateří kašičky vykazuje silnou antibakteriální aktivitu. Jedná se o peptid složený z 51 aminokyselin vylučovaný z hltanových žláz včel, který jim slouží pro ochranu proti mikroorganismům. Studie s rekombinantním Def-1 odhalily jeho účinnost proti především proti grampozitivním a některým gramnegativním bakteriím, včetně *Pseudomonas aeruginosa* a *Salmonella enterica* sérotyp Choleraesuis, dále je účinný proti původci choroby včelích larev *Paenibacillus larvae*. (Tseng et al., 2011)

3.6 Methylglyoxal

Methylglyoxal (MGO) obsahuje především manukový med, jelikož se vyskytuje ve vysokých koncentracích v nektaru rostliny *Leptospermum scoparium*. MGO je obsažen v různých potravinách v rozmezí 3-47 mg/kg, nicméně manukový med obsahuje až

1541 mg/kg. MGO je přítomen také v medech jiného botanického původu, ale jeho koncentrace ze 106 vzorků medu nepřesáhla 24 mg/kg. Byl prokázán velmi dobrý antibakteriální účinek MGO proti *Staphylococcus aureus*. (Kwakman a Zaat, 2012)

3.7 Fenolové sloučeniny

Polyfenoly jsou heterogenní skupinou chemických sloučenin, které lze rozdělit na flavonoidy (flavonoly, flavony, flavanoly, flavanony, antokyanidiny, chalkony a isoflavony) a neflavonoidy (fenolové kyseliny). Tyto sloučeniny jsou často produktem sekundárního metabolismu rostlin a jsou charakterizovány přítomností několika fenolových skupin, které jsou spojeny s více či méně složitými strukturami. Sekundární metabolity se liší od primárních, jako jsou například chlorofyl, aminokyseliny nebo sacharidy tím, že se nezapojují v procesech asimilace, dýchání, transportu a diferenciaci rostlin. Fenolové složení v medu závisí hlavně na jeho botanickém původu a mohou být využity jako nástroj pro klasifikaci a autentizaci, a to zejména v případě jednodruhových medů. (Cianciosi et al., 2018).

Tyto biologické sloučeniny se přenášejí z nektaru na med a nacházejí se v medu ve vysokých koncentracích, čímž přispívají k jeho antibakteriální aktivitě. Antibakteriální účinnost kyseliny fenolové i flavonoidů byla dokumentována od počátku 90. let. (Gunes et al., 2017).

Fenolové sloučeniny jsou také známé pro své antioxidační působení, které je spojeno hlavně se schopností zachytávat volné radikály prostřednictvím tvorby stabilnějších a méně toxických molekul. Volné radikály a reaktivní formy kyslíku jsou hlavními oxidačními činidly v buněčných systémech a podílejí se na stárnutí a na vzniku mnoha druhů nemocí. Tyto antioxidanty jsou rostlinami produkovány, aby je ochránily před biotickými a abiotickými vlivy. Sekundárně mohou ovlivňovat zdraví lidí, kteří je konzumují, tedy i konzumace včelích produktů produkováných včelami z květového nektaru. Rostlinné antioxidanty jsou vysoce bioaktivní a představují velkou molekulární rozmanitost, nicméně fenolické látky jsou v rostlinách nejhojněji přítomny a mají nejvyšší antioxidační kapacitu. (Martinello a Mutinelli, 2021)

Nejběžnější fenolové kyseliny v medu jsou kyselina kávová, vanilová, gallová, chlorogenová, p-kumarová, syringová a 4-dimethylbenzoová. Mezi flavonoidy se nečastěji vyskytují apigenin, genistein, pinocembrin, luteolin, chrysin, galangin a quercetin. V tabulce 1 je možné porovnat fenolové sloučeniny identifikované v různých druzích medu.

Tabulka 1: Fenolové sloučeniny identifikované v různých druzích medu (převzato z Cianciosi et al., 2018)

Flavonoidy	
Apigenin	akátový med, tualangový med,
Katechin	tualangový med, borovicový med
Chrysin	akátový med, tualangový med, manukový med, tymiánový med, rozmarýnový med, med vřesový
Galangin	manukový med, akátový med, tymiánový med
Genistein	akátový med
Luteolin	akátový med, tualangový med, manukový med, tymiánový med, rozmarýnový med
Pinocembrin	manukový med, akátový med, rozmarýnový med
Quercetin	manukový med, akátový med, jetelový med, tymiánový med
Fenolové kyseliny	
Kyselina kávová	manukový med, akátový med, tymiánový med, tualangový med
Kyselina chlorogenová	akátový med, tymiánový med, med vřesový
Kyselina skořicová	tualangový med, jetelový med, med vřesový, tymiánový med
Kyselina ellagová	med vřesový
Kyselina gallová	manukový med, akátový med, tualangový med, med vřesový, tymiánový med, borovicový med
Kyselina p-kumarová	manukový med, akátový med, tualangový med, med vřesový, tymiánový med, borovicový med, rozmarýnový med
Kyselina p-hydroxybenzoová	jetelový med, med vřesový
Kyselina sinapová	med vřesový
Kyselina syringová	manukový med, akátový med, tualangový med, med vřesový, tymiánový med
Kyselina vanilová	akátový med, med vřesový

Množství kyseliny fenolové v medu je ovlivněno geografickou polohou a botanickým původem. Kromě toho také roční období významně ovlivňuje celkový obsah kyseliny fenolové. Lachman et al. ve své studii z roku 2010 stanovovali celkový obsah polyfenolů v různých odrůdách medu získaného mezi květnem a srpnem 2006 a zjistili, že vzorky s nejvyššími hladinami polyfenolů byly odebrány počátkem června, průměrně obsahovaly 170,21 mg/kg flavonoidů a fenolových kyselin. (Lachman et al., 2010)

Jak již bylo řečeno, také druh medu ovlivňuje obsah fenolových sloučenin. Manukový med má obsah kyseliny fenolové 430 až 2 706 mg/kg, kanukový med neboli med z bílého čajovníku (*Kunzea ericoides*) obsahuje 424 až 1 575 mg/kg této kyseliny, oba vzorky byly odebrané ze stejné geografické oblasti ve stejnou dobu. (Stephens et al., 2010) Jiné druhy medu, jako med z hadince obecného (*Echium vulgare*) nebo vřesový med, mají mnohem nižší obsah kyseliny fenolové, pohybující se mezi 132,17 a 727,77 mg/kg. (Ferreira et al., 2009; Biesaga and Pyrzynska, 2009)

Ve studii z roku 2020 byly porovnány antioxidační a antimikrobiální vlastnosti manukového medu a vybraných polských medů. Získané výsledky prokázaly, že manukové medy mají ve srovnání s ostatními polskými medy relativně vysokou antioxidační kapacitu. Pouze medovicový med dosáhl srovnatelných antioxidačních vlastností jako manukové medy, nejnižší hodnota byla získána pro květový vícedruhový med. Analýza celkového množství polyfenolických sloučenin odhalila, že manukové medy měly celkové množství těchto sloučenin podobné jako polské tmavé medy (pohankový a medovicový). Zatímco světlé medy (květové a lipové) obsahovaly statisticky významně nižší celkový obsah polyfenolů. Manukové medy vykazovaly antimikrobiální účinek na všechny testované kmeny při nejnižší koncentraci 30–40 % a stejně jako polské medovicové medy měly silnější antimikrobiální aktivitu proti kmenům grampozitivních bakterií, jako *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis* než proti gramnegativním, jako *Pseudomonas aeruginosa*. (Gośliński et al., 2020)

Jiná studie se zaměřila na potenciální antimikrobiální aktivitu medových fenolických extraktů získaných z medů proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Cílem této studie bylo poskytnout lepší pochopení vztahu mezi medovými fenolickými sloučeninami a antimikrobiální aktivitou. Za tímto účelem byly izolovány fenolické sloučeniny z 33 íránských medů různého botanického a geografického původu. Z medů bylo identifikováno asi 50 různých sloučenin, které byly klasifikovány do pěti chemických skupin – fenolové kyseliny, flavonoidy, organické kyseliny, terpenoidy a ostatní sloučeniny. Z fenolových

kyselin byla izolována především kyselina benzoová a kyselina skořicová a jejich deriváty, z flavonoidů pak hlavně pinobanksin, dále luteolin, chrysin, acacetin, galangin a jiné. Pro stanovení jejich antimikrobiálních účinků byla použita minimální inhibiční koncentrace (MIC) a inhibiční zóna medových fenolických extraktů. Výsledky ukázaly, že nejcitlivější bakterií byla *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* naopak nejodolnější kmen, následovaný *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus*. Kromě toho pět fenolických extraktů vykazovalo nižší hodnoty MIC než celý med, což poukazuje na to, že fenolická frakce medu může sama o sobě vyvíjet antimikrobiální aktivitu a být zdrojem bioaktivních sloučenin pro vývoj funkčních složek. (Leyva-Jimenez et al., 2019)

4 POTENCIONÁLNÍ VYUŽITÍ MEDU V MEDICÍNĚ

Léčivé účinky medu jsou doloženy v nejstarších lékařských literaturách a od starověku je známo, že má antimikrobiální vlastnosti a schopnost hojení ran. Léčivá vlastnost medu je způsobena skutečností, že obsahuje sloučeniny s antimikrobiální aktivitou, udržuje vlhký stav rány a jeho vysoká viskozita pomáhá vytvářet ochrannou bariéru, aby se zabránilo infekci. Med si získává uznání jako prostředek k léčbě vředů, proleženin a jiných kožních infekcí způsobených popáleninami a ranami. Aplikace medu může podporovat hojení infikovaných ran, které nereagují na konvenční terapii, tj. antibiotika a antiseptika. Výzkumy prokázaly účinnost manukového medu proti několika lidským patogenům, včetně *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Typhimurium* a *Staphylococcus aureus*. Laboratorní studie odhalily, že med je účinný proti methicilin rezistentnímu *S. aureus* (MRSA), β -hemolytickým streptokokům a vankomycin rezistentním enterokokům (VRE). (Mandal, 2011)

S příchodem antibiotik bylo v moderní západní medicíně upuštěno od klinické aplikace medu, přestože se v mnoha kulturách stále používá. U všech tříd antibiotik se celosvětově zvyšuje rezistence a ještě více alarmující je, že se vyvíjí velmi málo nových antibiotik. Silná antimikrobiální aktivita medu proti bakteriím rezistentním na antibiotika vede k opětovnému zájmu o jeho aplikaci. (Kwakman a Zaat, 2012)

Byl zaznamenán případ, kdy se u imunosuprimovaného pacienta vyvinul hydroxyureou indukovaný bércový vřed se subklinickou infekcí methicilin rezistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA). Pacient byl následně léčen lokálními obklady z manukového medu, MRSA byl z vředu odstraněn a bylo úspěšně dosaženo rychlého hojení, aniž by přestala být podávána hydroxyurea, která může až u 10 % pacientů vyvolávat při dlouhodobé léčbě chronických onemocnění nežádoucí kožní změny. (Natarajan et al., 2009)

Studie z roku 2002 zkoumala antibakteriální účinek medu proti patogenní *Escherichia coli*. V kapalně kultuře inkubované 48 hodin při 37 ° C se rychlost růstu bakteriálních buněk snížila za přítomnosti medu ($9,6 \times 10^5$ CFU/ml) ve srovnání se sacharózou ($2,87 \times 10^8$ CFU/ml). Potkani krmení medem a orálně inokulovaní *E. coli* vylučovali významně méně bakteriálních buněk ve stolici ve srovnání s potkany, kteří nebyli krmeni medem. Konzumace medu také zvýšila koncentraci mastných kyselin s krátkým řetězcem ve střevě potkanů ve srovnání s kontrolní skupinou. Výsledky ukazují, že med vykazoval

významnou antibakteriální aktivitu proti *E. coli* za podmínek *in vitro* a *in vivo*, a ukazují potenciální přínos pravidelné konzumace medu. (Shamala et al., 2002)

Jiná studie z roku 2020 se zabývá zdravotními přínosy medu při léčbě průjmů způsobených bakterií *Shigella sonnei*. Cílem studie bylo zjistit, zda med odolá lidským gastrointestinálním podmínkám a zabrání tak růstu této bakterie. V simulovaných žaludečních a střevních podmínkách bylo hodnoceno přežití *Shigella sonnei* a poté byla za těchto simulovaných podmínek stanovena citlivost bakterie na manukový a akátový med. Bakterie nebyla schopna přežít v kyselém prostředí žaludku bez živin a přežila pouze po naočkování potravinovým zdrojem. V intestinálních podmínkách přežila bakterie s potravinovou maticí i bez ní. Růst *Shigella sonnei* nebyl pozorován v simulovaných žaludečních podmínkách v přítomnosti ani jednoho medu v různých koncentracích bez zdroje potravy. V přítomnosti zdroje potravy v simulovaných žaludečních podmínkách inhiboval manukový med růst *Shigella sonnei* při 10 % (obj.) a akátový med při 20 % (obj.). V simulovaných intestinálních podmínkách bez i se zdrojem potravy inhiboval manukový med růst bakterie při 15% a 20 % (obj.) a akátový med při 20 % a 25 % (obj.). Kyselé pH a pepsin neměly degradující účinky na antibakteriální schopnost medu, žluč však snížila antibakteriální aktivitu medu ve střevním prostředí. (Al-Masaudi et al., 2020)

Včelí med má také velký potenciál být používán jako doplněk k parodontální léčbě a ke kontrole orálních infekcí. Několik studií se věnovalo účinkům medu u periodontálních onemocnění, které se shodují, že existuje pozitivní antimikrobiální účinek na vybrané parodontopatogenní bakterie. Tento účinek se týkal zejména *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus gordonii*, *Campylobacter* sp. a *Eubacterium nodatum*. (Schmidlin et al., 2014; Hbibi et al., 2020)

5 MIKROBIOLOGIE MEDU

Med je považován za relativně bezpečnou potravinu, navzdory nepříznivým podmínkám jako je nízká aktivita vody, vysoký osmotický tlak, nízký obsah proteinů, přítomnost peroxidu vodíku, fenolových sloučenin a dalších faktorů však mají některé mikroorganismy schopnost přežít v prostředí jako je med. Tyto mikroorganismy pocházejí z primárních nebo sekundárních zdrojů kontaminace. (Grabowski a Klein, 2015)

Primárně se do medu mohou dostávat mikroorganismy přes trávicí trakt včel nebo z povrchu jejich těl, na kterém mohou nést pyl, prach či jiné nečistoty. Mikroorganismy *Bacillus*, *Micrococcus* a *Saccharomyces* lze izolovat z plástěček a dospělých včel. Z výkalů včelích larev byla izolována řada mikrobiálních druhů. (Olaitan et al., 2007)

Bylo zjištěno, že trávicí trakt včel obsahuje asi 1 % kvasinek, 27 % grampozitivních bakterií včetně *Bacillus*, *Bacteridium*, *Streptococcus* a *Clostridium* spp, 70 % gramnegativních nebo gram-variabilních bakterií včetně *Achromobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus* a *Pseudomonas*. (Olaitan et al., 2007)

Sekundárními zdroji mikrobiální kontaminace v medu může být člověk, zařízení pro vytáčení medu, nádoby a jiné kontaminované zařízení, jenž může zavést mikroorganismy do čistého medu. (Olaitan et al., 2007)

V medu byly identifikované různé druhy bakterií, kvasinek i plísní, většina z nich však v medu nemůže růst ani se množit. Vzhledem k přítomnosti antibakteriálních složek se v medu mají schopnost udržet pouze bakterie schopné sporulace, zatímco plísně a kvasinky dokáží přežít i ve vegetativní formě. (Silva et al., 2017)

Ve výzkumu prováděném se vzorky medu různého botanického původu byly izolovány různé druhy plísní produkující mykotoxiny, například rodu *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium* a *Cladosporium*. Přítomnost plísní však neznámá přítomnost mykotoxinu, podmínky pro růst plísní nejsou vždy nezbytnými podmínkami pro produkci mykotoxinů. Jako příklad lze uvést patulin produkovaný rody *Penicillium*, *Aspergillus* a *Byssochlamys*, jejichž optimální teplota pro produkci mykotoxinů je 23–25 °C s minimální aktivitou vody 0,82–0,83. (Silva et al., 2017)

Na rozdíl od plísní představují kvasinky pro medový průmysl zásadní problém. Zejména ty, které jsou tolerantní k cukru, jsou schopné kvasit med. Jakmile převládnu příznivé podmínky, cukry se přemění na oxid uhličitý a alkohol, které lze reakcí s okolním kyslíkem syntetizovat na kyselinu octovou. *Saccharomyces* spp. jsou nejrozšířenější kvasinky v medu. (Grabowski a Klein, 2015)

Klasickým bakteriálním patogenem spojeným s medem je *Clostridium botulinum* odpovědný za rozvoj botulismu u lidí, zejména u dětí nebo lidí s oslabeným imunitním systémem, jenž může vést ke smrti. Toxiny typu A a B (produkované *C. botulinum* typu D) jsou nejvýznamnější toxiny, které způsobují dětský botulismus. Spory klíčí, množí se a mohou se vyvíjet a zahájit toxikogenezi u kojenců kvůli jejich špatně vyvinuté střevní flóře. Toxiny pak vstupují do krevního řečiště a připojují se k neuromuskulárním zakončením, přičemž toxin A k nim vykazuje největší afinitu. (Grabowski a Klein, 2015)

6 DALŠÍ VČELÍ PRODUKTY A JEJICH VYUŽITÍ

6.1 Včelí vosk

Vosk je tvořen včelami ve voskotvorných žlázkách umístěných na sternitu zadečku dělnic, na tzv. voskových zrcátkách. Vyloučený sekret rychle tuhne do tvaru šupinky, včela si je pak zadníma nohama posune ke kusadlům, kde ji rozmělní na vláčnou a plastickou hmotu vhodnou ke stavbě plástů. (Přidal, 2003)

Včelí vosk se skládá ze směsi uhlovodíků, esterů, vyšších mastných kyselin s vyššími alkoholy, volných mastných kyselin, sterolů, barviv a aromatických látek. Hlavními složkami jsou alkylestery mastných kyselin, především myricylester kyseliny palmitové, hlavními kyselinami jsou kyselina ceritová a neoceritová, hlavními alkoholy pak myricylalkohol a cerylalkohol. Aromatické látky jsou obsaženy jen v nepatrném množství. (Přidal, 2003; Titěra, 2006)

Barva vosku je dána druhem včel a botanickým původem. Panenský plást je bílý až mírně žlutý, časem však tmavne díky chryzinu, který se do vosku dostává se zrnky pylu. Vosk je při pokojové teplotě plastický a při nízkých teplotách křehne a láme se. (Demeter, 2017)

Včelí vosk se využívá zejména na výrobu mezistěn do úlů, v kosmetice, ve farmacii, k impregnaci a leštění dřeva a kožené obuvi, k výrobě svíček aj. Je označen jako nezávadný pro lidskou konzumaci a je zařazen mezi povolené potravinové doplňky. Nejznámější je forma plástečkového medu, kdy se vosk žvýká. Používá se jako součást leštidel při výrobě čokoládových figurek, do žvýkaček, bonbonů, dražé, v kosmetice k výrobě emulzí, balzámů, gelů, přípravků pro péči o vlasy, do mýdel a krémů zabezpečující naši pokožce ochranu a pružnost, používá se také do známé zinkové masti. V medicíně se vosk využívá jako vehikulum do některých injekčních aplikací, na obalování kapslí a pilulek. (Titěra, 2006; Demeter, 2017)

V lidovém léčitelství se teplé obklady z plátů doporučují při chronických stavech revmatického původu, při artróze, bolestech kloubů a zad, také jsou vhodné na zvýšení lokálního prokrvení. (Demeter, 2017)

6.2 Propolis

Propolis je pryskyřičná žlutá až tmavě hnědá látka voskovitého vzhledu, kterou včely sbírají zejména z květních a listových pupenů, jenž rostliny chrání před poškozením. Včely pomocí kusadel odkusují lepkavou hmotu a přidávají do ní výměšky žláz, poté si propolis pomocí středních nohou nalepí do pylového sáčku. V úlu se dále smíchá s voskem, kde slouží k jeho opravě. (Přidal, 2003; Demeter, 2017)

Tento produkt je také včelami užíván k mumifikaci usmrčených vetřelců, kteří vnikli do úlu a nemohou být vzhledem k jejich hmotnosti odneseni z úlu ven. Zabrání se tak jejich rozkladu a šíření chorob. Účinky propolisu jsou totiž antibakteriální a včely si jím dezinfikují úl, čímž se inspiroval i člověk k léčení hnisavých ran. (Přidal, 2003; Demeter, 2017)

Propolis je komplexní směs různých molekul a jeho chemická analýza je obtížná. Navíc je jeho složení velmi proměnlivé v závislosti na dostupné flóře a na druhu včel, proto zatím nebylo možné, aby byl zařazen do seznamu povolených léčiv jako například mateří kašička. (Přidal, 2003, Santos et al., 2019)

Obecně se propolis skládá z 30 % vosku, 50 % pryskyřice a rostlinného balzámu, 10 % esenciálních a aromatických olejů, 5 % pylu a dalších látek jako minerální látky a vitaminy. Celkově již bylo izolováno a/nebo identifikováno přes 300 molekul. Z těchto 300 složek byla identifikována přítomnost mastných a fenolových kyselin, esterů, fenolových esterů, flavonoidů, terpenů, β -steroidů, aromatických aldehydů a alkoholů, seskviterpenů a naftalenu. Hlavními složkami patřící k látkám pryskyřičnaté povahy jsou flavonoidy a fenolové kyseliny a jejich estery, které jsou odpovědné za antibakteriální účinky. Jako příklad lze uvést chrysin, galangin, kempferol, luteolin, pinocembrin, kyselina kumarová, kyselina ferulová, kyselina kávová, eugenol a jiné. Tato skupina komponentů je opravdu rozmanitá, nejvíce látek a nejvyšší obsah flavonoidů obsahuje brazilský propolis. Kromě toho obsahuje také důležité vitaminy, jako jsou vitaminy B₁, B₂, B₆, C a E a užitečné minerální látky, jako hořčík, vápník, draslík, sodík, měď, zinek, mangan a železo. Několik enzymů, jako sukcinátdehydrogenáza, glukóza-6-fosfatáza, adenosin trifosfatáza a fosfatáza jsou také přítomny. (Přidal, 2003; Santos et al., 2019; Khalil, 2006)

Antimikrobiální aktivita propolisu byla popsána v několika vědeckých studiích a je charakterizována jeho bakteriostatickými a baktericidními účinky u různých druhů bakterií. Bakteriostatické a někdy až baktericidní účinky byly například pozorovány proti bakteriím *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. bovis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* a jiné. Potencionálně by mohl být propolis využit při léčbě salmonelózy. Propolis je považován za účinnější proti grampozitivním bakteriím než gramnegativním. (Santos et al. 2019, Marcucci 1995)

Antivirové účinky byly prokázány například u viru chřipky nebo herpes viru. Antifungálně působí například proti *Candida albicans*, *Trichophyton verrucosum*, *Mycrosporium* a *Aspergillus niger*. Dále je propolis známý pro svůj protizánětlivý a protinádorový účinek. V lidovém léčitelství se používá proti chřipce, prochlazení, při zánětech v krku, zánětu plic, k léčbě popálenin a při lokálním tlumení bolesti, dále při léčbě kožních chorob jako akné a ekzémy. Je třeba však počítat s tím, že u citlivějších jedinců může propolis vyvolat alergickou reakci a to především díky přítomnosti pylu nebo esterů kyseliny kávové (Přidal, 2003; Marcucci, 1995; Demeter, 2017; Sforcin, 2016)

6.3 Mateří kašička

Mateří kašička je jednou z nejatraktivnějších funkčních potravin, která je v mnoha zemích již komerčním produktem. Jedná se o hustý smetanově zbarvený sekret z hltanových žláz mladých včel dělnic a používá se ke krmení larev a královny. Schopnost tvořit mateří kašičku mají šest až čtrnáct dní staré včely tzv. mladušky. Základem produkce mateří kašičky je pyl a nektar. (Demeter, 2017)

Bylo provedeno mnoho studií biologické aktivity a chemického složení mateří kašičky. Vzhledem k výjimečným biologickým vlastnostem, které jí jsou přisuzovány, má mateří kašička značnou komerční přitažlivost a dnes se používá v mnoha odvětvích, od farmaceutického a potravinářského průmyslu po kosmetický průmysl. (Sabatini et al., 2009)

Chemicky obsahuje mateří kašička především vodu (50–70 %), proteiny (9–18 %), sacharidy (7–18 %), tuky (3–8 %), minerální látky a vitaminy (cca 1,5 %) a malé množství polyfenolů. Jednotlivé komponenty jsou kvalitativně vysoce konstantní, z kvantitativního hlediska existuje značná variabilita. Stejně jako v medu jsou hlavními cukry monosacharidy fruktóza a glukóza. Sacharóza je vždy přítomna, ale často ve velmi proměnlivých koncentracích. V malých koncentracích je také možné najít oligosacharidy, jako je trehalóza, maltóza, isomaltóza, rafinóza, erulóza a melezitóza. (Sabatini et al., 2009; Přidal, 2003)

Bylo zjištěno, že mateří kašička obsahuje proteiny spadající do jedné proteinové „rodiny“ označené jako MRJP (Major Royal Jelly Proteins), skládá se z pěti hlavních složek - MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4, MRJP5. MRJP tvoří 82 až 90% z celkového množství

bílkovin a obsahují relativně vysoké množství esenciálních aminokyselin. V mateří kašičce byly identifikovány všechny esenciální aminokyseliny, s největším procentuálním zastoupením prolinu, lyzinu, kyseliny glutamové, β -alaninu, fenylalaninu, kyseliny asparagové a serinu. Antimikrobiální aktivitu zajišťují peptidy, tzv. jelleine, jejichž účinky byly prokázány proti kvasinkám a některým bakteriím jako například *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* a *Pseudomonas aeruginosa*. Bylo identifikováno i velké spektrum enzymů, hlavně glukózooxidáza, fostáza a cholinesteráza, jenž katalyzuje hydrolyzu neurotransmiteru acetylcholinu. Poměrně nedávno byla objevena jedna z hlavních bílkovin apalbumin, kterého se využívá zejména v kosmetickém průmyslu, jeví se jako zlatožlutý gel zajišťující zjemnění pleti. (Sabatini et al., 2008, Přidal, 2003; Schmitzová a kol., 1998; Fontana, 2004)

Tuková frakce sestává především z volných mastných kyselin. Nejvýznamnější mastnou kyselinou je kyselina 10-hydroxy-2-decenová, odpovědná za antibiotické účinky, a 10-hydroxydecenová, obě tyto kyseliny mají feromonální funkci ve včelstvu. (Přidal, 2003; Sabatini et al., 2008)

Hlavními minerálními prvky jsou v sestupném pořadí: draslík, vápník, sodík, zinek, železo, měď, hliník a mangan. Mateří kašička obsahuje především vitaminy rozpustné ve vodě, zvláště bohatá je na vitaminy skupiny B. Ve stopové koncentraci se vyskytují nukleotidy ve formě volných bází purinů a pyrimidinů, fosfáty adenosinmonofosfát, adenosindifosfát a adenosintrifosfát. Hlavní flavonoidy přítomné v mateří kašičce zahrnují flavonoly (např. kvercetin, kaempferol, galangin a fisetin), flavanony (např. pinocembrin, naringin a hesperidin) a flavony (např. apigenin, acacetin, chrysin a luteolin), které jsou dobře známé pro své antioxidační účinky. (Ramadan, 2012; Sabatini et al., 2008)

Mateří kašička se využívá k léčbě bronchiálního astmatu, nespavosti, anémii, proti depresím, na léčení vředů, při léčbě akné, pro snížení hladiny cholesterolu, při klimakterických potížích, při nechutenství a mnoho dalšího. Podporuje růst buněk, bohužel i rakovinných, proto se při onkologických onemocněních nepodává. Některé účinky jsou vědecky ověřené, některé nikoli. Prokázány jsou její antimikrobiální, antivirální a protizánětlivé účinky. Mateří kašička se přidává do kosmetických přípravků pro podporu růstu a regeneraci kožních tkání. (Demeter, 2017; Přidal, 2003)

6.4 Pyl

Pyl se řadí mezi včelí produkty, jedná se však o produkt rostlin. Pylová zrna jsou samčí pohlavní buňky tvořící se v prašnicích vyšších rostlin. Pro včely je zdrojem proteinů, minerálních látek a vitaminů. Pyl je kromě medu druhou hlavní složkou výživy včel. Včely posbíraný pyl zpracovávají výměšky čelistních žláz, vytváří tzv. pylové rousky a na nohách takto upravený pyl nosí do úlu, kde ho ukládají do plástů a zalévají medem a voskem, kde fermentuje. (Přidal, 2003; Titěra, 2006)

Pokročilé analytické techniky umožnili identifikaci přibližně 200 chemických sloučenin včelího pylu, složení je přímo závislé na botanické původu. Mezi hlavní složky patří bílkoviny (5–60 %), esenciální aminokyseliny, redukující cukry (13–55 %), lipidy (4–7 %), nukleové kyseliny (zejména RNA) a vláknina (0,3–20 %). Podstatnými složkami jsou minerální prvky jako Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, K a Na, vitaminy jako provitamin A (β -karoten), tokoferol, niacin, thiamin, biotin a kyselina listová. Obsahuje fytosteroly jako například β -sitosterol, P-sitosterol a terpeny. Kromě toho je relevantní obsah polyfenolů, zejména flavonoidy (3–8 % sušiny), z nichž nejčastějšími jsou katechiny, kaempferol, kvercetin a isorhamnetin. Včelí pyl je také bohatý na organické karotenoidové pigmenty (např. lykopen, zeaxanthin). Vzhledem k nutričnímu složení se doporučuje jako cenný doplněk stravy. (Denisow, 2016)

Pyl má řadu terapeutických vlastností. Působí pozitivně při nechutenství, únavě, depresi, podporuje plodnost, potenci, růst vlasů a nehtů. Mírní záněty močových cest a problémy spojené s hyperplazií prostaty. Doporučuje se při rekonvalescenci po operacích a snižuje nebezpečí infarktu. Některým jedincům je však kvůli alergii užívání pylu znemožněno. (Přidal, 2003; Demeter, 2015)

6.5 Včelí jed

Včelí jed je výměškem žlázy samic včely medonosné a je skladován v jedovém vaku, odkud je při obraně pomocí žihadlového aparátu vpraven do těla jiných živočichů. V malých dávkách může být lékem, ve velkém množství však působí toxicky. Použití včelího jedu do konkrétních bodů je široce používána jako doplňková a alternativní terapie po 3000 let. (Zhang et al., 2018)

Jedná se o velmi složitou směs přírodních produktů extrahovaných z včely medonosné, která obsahuje různé farmakologicky účinné látky, jako jsou peptidy, enzymy, biologicky

aktivní aminy a nepeptidové složky. Asi 60 % sušiny jedu tvoří bílkoviny, z nichž má největší zastoupení melittin, složený z 26 aminokyselin, který má cytotoxický a hemolytický efekt, z poškozeným buněk pak uvolňuje histamin a serotonin. Jiným významným polypeptidem je apamin obsahující cystin, jenž může ve velkém množství způsobit až nekrózy mozkové tkáně. Dále obsahuje toxické enzymy fosfolipázy A a B a hyaluronidázu, jenž mají hemolytický efekt. Ze sacharidů obsahuje glukózu a fruktózu, z lipidů hlavně fosfolipidy podobající se lecitinu. Ve včelím jedu byly identifikovány i neurotransmitery noradrenalin a dopamin. (Přidal, 2003)

Pro člověka je včelí jed zejména neurotoxický. Průměrná smrtelná dávka LD₅₀ pro dospělého je asi 2,8 mg, tedy pro člověka vážícího 70 kg je 50 % smrtelné riziko při bodnutí zhruba 700 žihadly. To však platí pro zdravé jedince, kteří nejsou alergičtí. (Přidal, 2003; Titěra, 2006)

Nejprve byl včelí jed široce využíván k léčbě zánětlivých a bolestivých onemocnění v orientální tradiční medicíně. Rostoucí množství důkazů prokázalo především jeho protizánětlivé vlastnosti. V posledních letech několik studií také naznačuje terapeutické účinky při léčbě neurologických onemocnění, jako je amyotrofická laterální skleróza a Parkinsonova choroba, při epilepsii a také nemocích oběhového systému. (Zhang et al., 2018)

Studie na zvířatech prokázaly, že melittin a apamin zvyšují hladiny kortizolu v krevní plazmě. Kortizol a jeho deriváty se ve farmakologii používají především lokálně jako protizánětlivé léky, mají však nežádoucí vedlejší účinky. (Přidal, 2003; Titěra, 2006)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo stanovit antimikrobní účinky několika vzorků medů na šest vybraných druhů gramnegativních bakterií. Tyto vlastnosti byly hodnoceny u devíti vzorků medů získaných od malých včelařů ze Slovenské republiky a jednoho komerčního medu.

8 POUŽITÁ ZAŘÍZENÍ A MATERIÁL

8.1 Přístroje a pomůcky

- Laboratorní sklo a běžně používané laboratorní pomůcky (Petriho misky, kádinky, zkumavky, odměrné válce, plastová injekční stříkačka, lžice, špičky pro automatické pipety, stojan na zkumavky)
- Mikrotitrační destičky
- Biohazard box Bio II Advance Telstar
- Automatické mikropipety
- Laboratorní váhy Adventurer Pro 500
- Filtr stříkačkový AHLSTROM ReliaPrep™ CA 0.20 µm
- Bakteriologické kličky
- Třepačka Vortex Mixer VX-200
- Spektrofotometr destičkový TECAN Infinite 200 Pro
- Autokláv Systec 2540 EL
- Densi-la-meter
- Biologický termostat Memmert INE 600
- Plynový kahan

8.2 Chemikálie

- Demineralizovaná voda
- Etanol 70 %
- NaCl

8.3 Živná média

- Kultivační médium Mueller-Hinton Broth (MH) se složením - hovězí masová infuze 300 g/l, enzymatický hydrolyzát kaseinu 17,5 g/l a škrob 1,5 g/l

8.4 Bakteriální kmeny

Pro potřeby této diplomové práce bylo použito šest kmenů gramnegativních bakterií získaných z České sbírky mikroorganismů (CCM).

- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Enterobacter aerogenes* CCM 2531
- *Serratia marcescens* CCM 303
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium CCM 7933
- *Proteus mirabilis* CCM 7188
- *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798

8.5 Vzorky medů

Pro stanovení antimikrobních účinků na gramnegativní bakterie bylo celkem použito 10 vzorků medů. Jedná se o medy květové, medovicové nebo smíšené. Devět vzorků bylo získáno od včelařů ze Slovenské republiky a jeden vzorek tvoří komerčně dostupný med zakoupený v obchodní síti původem z Řecka. Každý vzorek pochází z jiného úlu a jejich lokalizace s přiřazeným číslem vzorku je zobrazena v Tabulce 2.

Tabulka 2 Lokalizace úlu

Číslo vzorku	Lokalizace úlu
1.	Horná Poruba (SR)
2.	Zubák (SR)
3.	Salaš, Nimnica (SR)
4.	Zubák (SR)
5.	Zubák (SR)
6.	Salaš, Nimnica (SR)
7.	Podhorie (SR)
8.	Beluša (SR)
9.	Lysá pod Makytou (SR)
10.	Řecko *

*komerční vzorek

9 METODIKA PRO STANOVENÍ ANTIMIKROBNÍCH ÚČINKŮ MEDU

9.1 Příprava medových roztoků

Medové roztoky byly připraveny rozpuštěním a důkladným promícháním 4 g vzorku medu v 8 ml sterilního kultivačního média Mueller-Hinton (MH), tedy tak aby byl roztok v koncentraci 50 % (w/v). Pro zajištění sterility medového roztoku, byl takto připravený vzorek vždy přefiltrován přes stříkačkový filtr o velikosti pórů 0.20 μm do sterilní plastové zkumavky. Následně byly medové roztoky ředěny geometrickou řadou na nižší koncentrace s kultivačním médiem MH. Roztoky byly před každou analýzou čerstvě připraveny.

9.2 Příprava živného média a fyziologického roztoku

Živné médium Mueller-Hinton Broth bylo připraveno rozpuštěním 21,0 g této půdy v 1 l destilované vody. Následně bylo médium sterilováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Fyziologický roztok byl připraven smícháním 8,5 g NaCl a 1 l demineralizované vody. Takto připravený roztok byl autoklávován při teplotě 121 °C po dobu 20 min.

9.3 Resuscitace mikroorganismů a příprava bakteriální suspenze

Bakteriální kmeny jsou uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -80 °C. Pro jejich resuscitaci byly mražené kultury přeočkovány křížovým roztěrem na pevnou agarovou půdu a následně kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C (30 °C pro *Pseudomonas fluorescens*) po dobu 24 hodin.

K vlastnímu experimentu byly využity bakteriální suspenze, jenž byly připraveny zočkováním kolonie příslušné bakterie z Petriho misky do zkumavek s 5,0 ml sterilního bujónu MH. Poté byla suspenze kultivována v termostatu při teplotě 37 °C (30 °C pro *Pseudomonas fluorescens*) po dobu 24 hodin.

Po kultivaci byla suspenze v jiné sterilní zkumavce naředěna fyziologickým roztokem na hodnotu zákalu 1,0 dle stupnice McFarlanda.

9.4 Mikrodiluční metoda

V této diplomové práci byla použita tzv. mikrodiluční metoda, která se řadí mezi kvantitativní metody a používá se ke stanovení minimální inhibiční koncentrace antimikrobní látky.

Antimikrobní účinek medových vzorků byl sledován pomocí fotometru TECAN Sunrise TW/TC. Byla měřena optická denzita suspenze buněk v 96 jamkových mikrotitračních destičkách při teplotě 30 °C a vlnové délce 600 nm po dobu 24 hodin v 30ti minutových intervalech.

Růst bakterií byl sledován v několika koncentracích medových roztoků – 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml a 15,63 µg/ml. Jedna mikrotitrační destička vždy sloužila pro jeden vzorek medu a šest mikroorganismů. První řádek mikrotitrační destičky sloužil pro kontrolu sterility roztoku a aseptické práce bez přidání mikroorganismů.

Do dalších řádků destičky bylo postupně napipetováno 200 µl medového roztoku příslušné koncentrace a do každé jamky 10 µl příslušné bakteriální suspenze, každý mikroorganismus byl vždy napipetován do dvou sloupců destičky. Poslední řádek sloužil pro kontrolu růstu bakterií bez přidaného medového roztoku. Schéma zaočkování mikrotitrační destičky je znázorněno v Tabulce

Tabulka 3 Schéma zaočkování mikrotitrační destičky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS
B	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
C	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
D	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
E	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
F	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3
G	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6
H	KR	KR	KR	KR	KR	KR	KR	KR	KR	KR	KR	KR

1 mikroorganismus ve 2 sloupcích, 1 vzorek medu v dilučním v rozpětí 500 – 15,6 µg/ml

KS – kontrola sterility média, roztoku a aseptické práce bez přidání mikroorganismů

KR – kontrola růstu mikroorganismů bez přidání medového roztoku

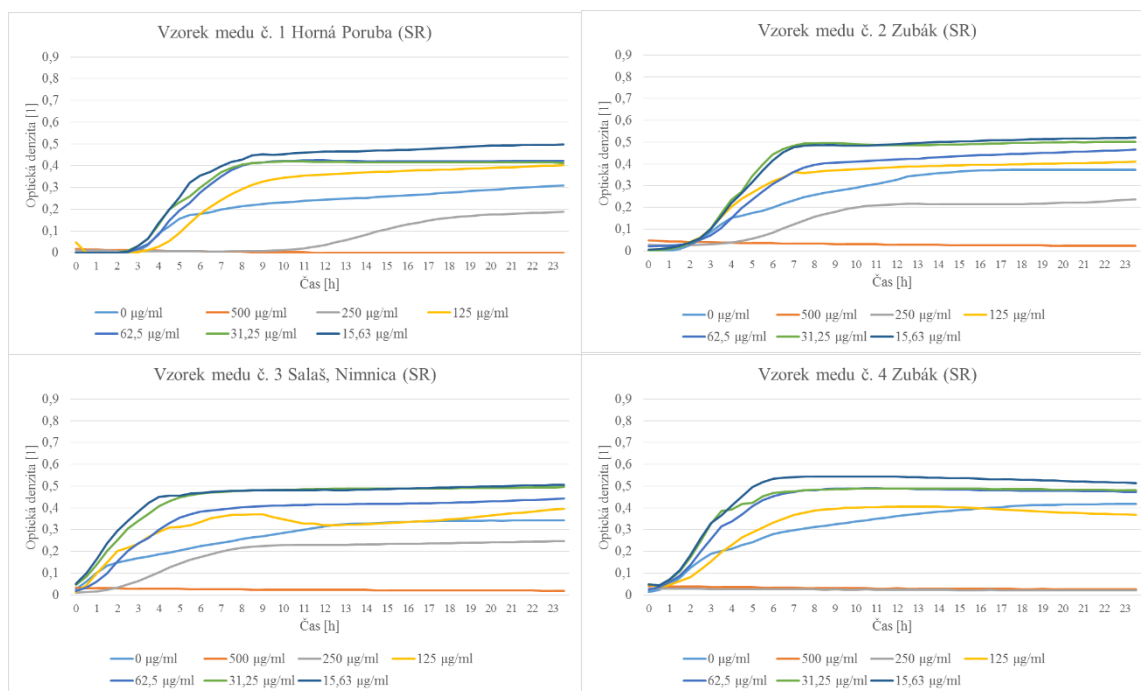
10 VÝSLEDKY

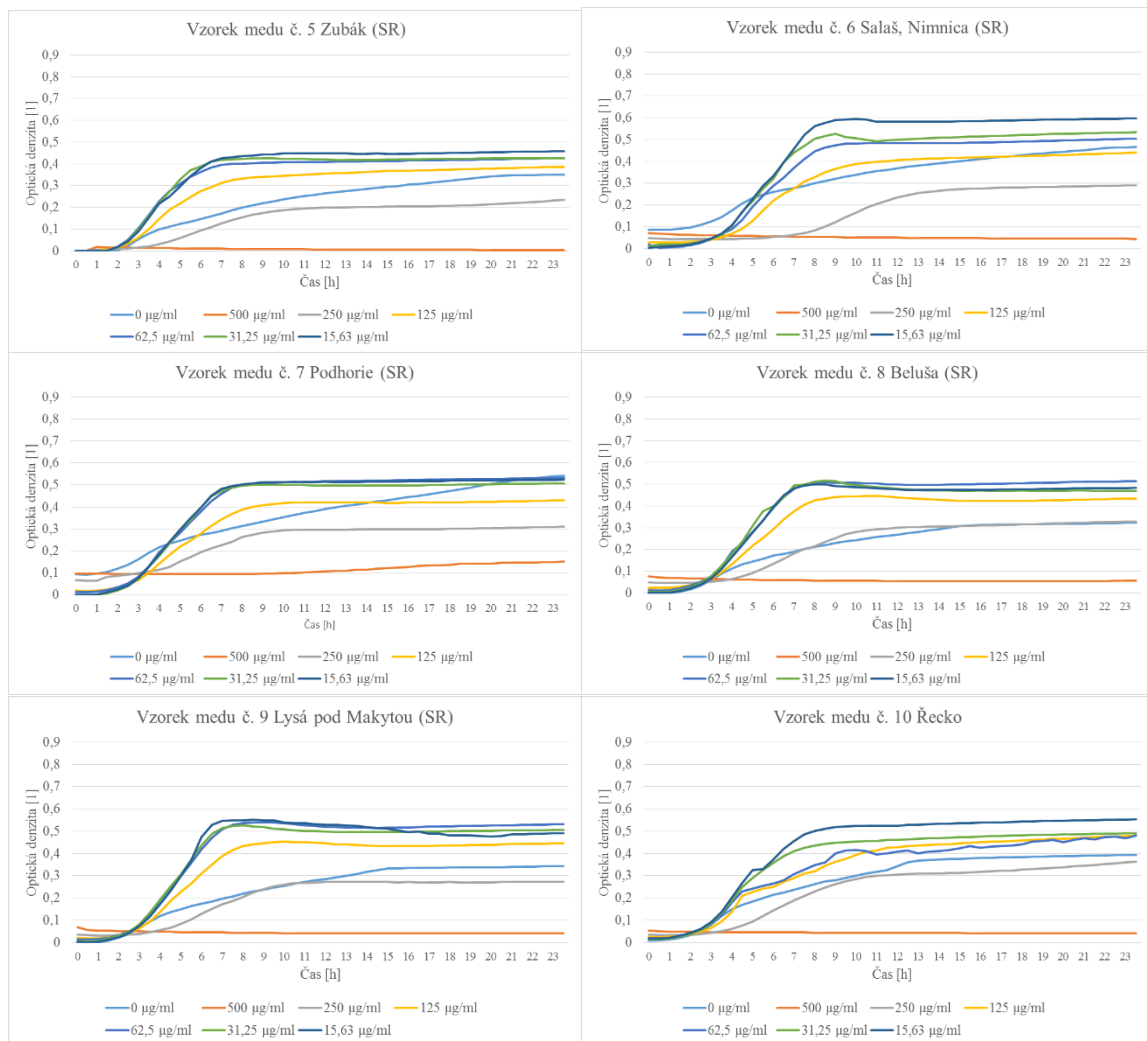
10.1 Antimikrobní účinek medu na růst bakterií

Růst bakterií byl sledován po dobu 24 hodin pomocí fotometru TECAN Sunrise TW/TC měřící optickou densitu suspenze buněk v čase. Všechny medové vzorky byly použity v koncentracích 15,63 $\mu\text{g/ml}$ až 500 $\mu\text{g/ml}$. Antimikrobní účinky byly hodnoceny u šesti gramnegativních bakterií - *Escherichia coli* CCM 3954, *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, *Serratia marcescens* CCM 303, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium CCM 7933, *Proteus mirabilis* CCM 7188 a *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798. Z naměřených dat byly vytvořeny grafy znázorňující růstové křivky.

10.2 Vliv vzorků medů na růst *Escherichia coli* CCM 3954

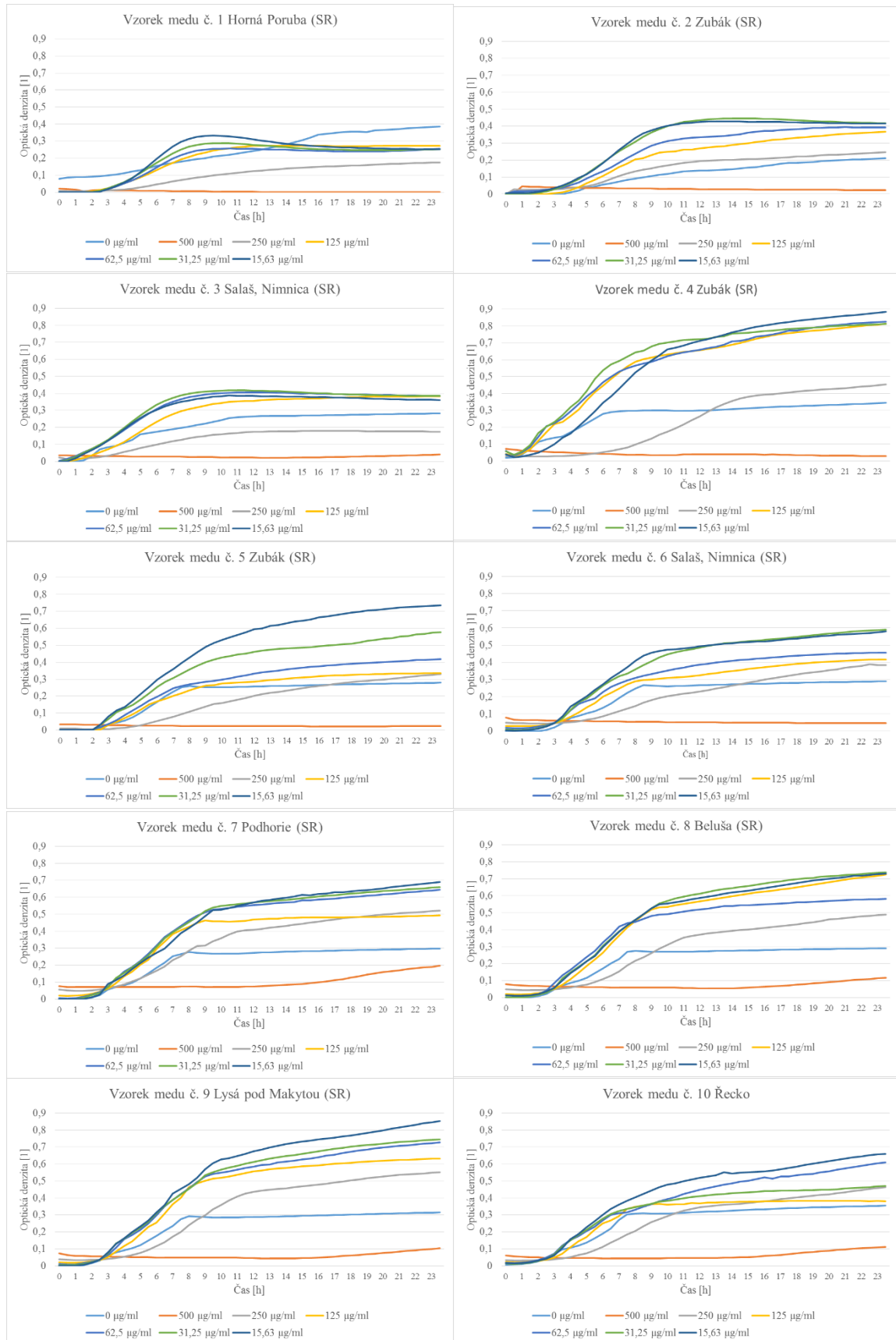
Jak je patrné z Obrázku 1, nejlepší inhibiční účinek vykazovaly medy při nejvyšší koncentraci, tedy 500 $\mu\text{g/ml}$. Medový vzorek č. 7 Podhorie (SK) zcela neinhiboval růst *Escherichia coli* CCM 3954 ani při koncentraci 500 $\mu\text{g/ml}$, kde je patrný mírný nárůst optické denzity. Medové roztoky o koncentraci 250 $\mu\text{g/ml}$ pouze prodloužily dobu lag fáze a koncentrace 15,6 – 125 $\mu\text{g/ml}$ naopak růst bakterie ještě podpořily. Jedinou výjimkou je vzorek medu č. 4 Zubák (SR), který byl shledán jako med s nejsilnějším antimikrobním účinkem, jelikož růst bakterie byl inhibován i při koncentraci 250 $\mu\text{g/ml}$.



Obrázek 1 Vliv vzorků medů na růst *Escherichia coli* CCM 3954

10.3 Vliv vzorků medů na růst *Enterobacter aerogenes* CCM 2531

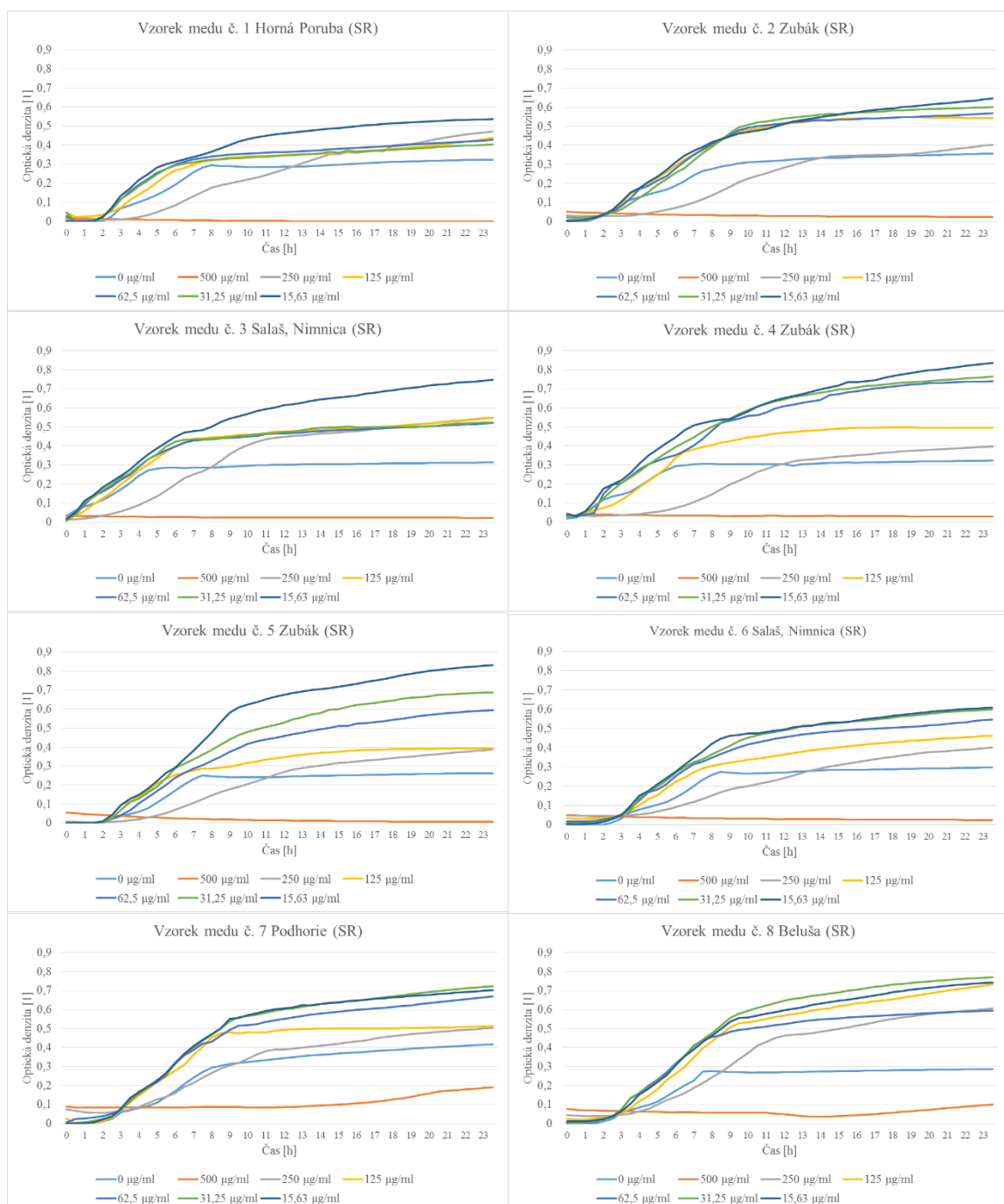
Dále byl sledován inhibiční účinek medů na kmen *Enterobacter aerogenes* CCM 2531. Bylo zjištěno, že největší inhibiční účinek měly medové vzorky při koncentraci 500 µg/ml, koncentrace 15,6 – 125 µg/ml růst bakterie podpořily. Vzorky medu č. 7 Podhorie (SK), č. 8 Beluša (SR), č. 9 Lysá pod Makytou (SR) a č. 10 (Řecko) zcela neomezily růst bakterie ani při nejvyšší koncentraci a tyto vzorky zároveň vykazovaly nejvyšší nárůst optické denzity ve všech koncentracích. Nejnižší nárůst optické denzity ve všech koncentracích lze pozorovat u vzorku medu č. 1 Horná Poruba (SK), č. 2 Zubák (SK) a č. 3 Salaš, Nimnica (SK).

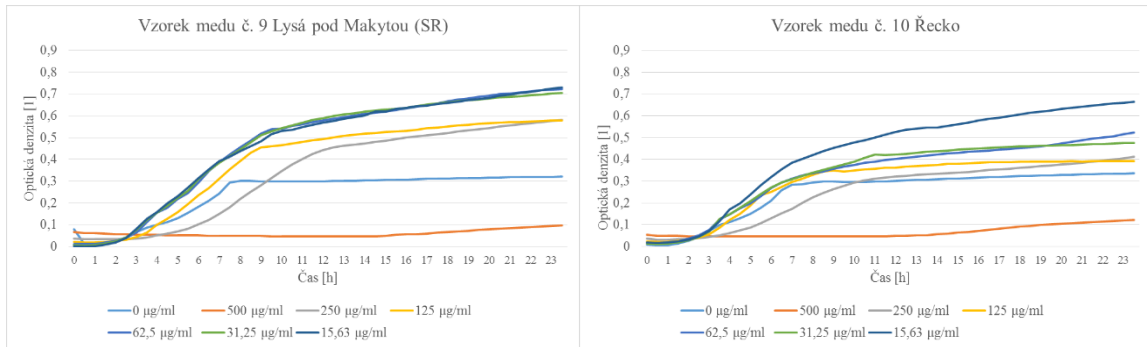


Obrázek 2 Vliv vzorků medů na růst *Enterobacter aerogenes* CCM 2531

10.4 Vliv vzorků medů na růst *Serratia marcescens* CCM 303

Dalším sledovaným mikroorganizmem byla *Serratia marcescens* CCM 303. Výsledky byly podobné jako u předchozího sledovaného mikroorganismu. Největší inhibiční účinek měly medové vzorky při koncentraci 500 $\mu\text{g/ml}$ a koncentrace 15,6 – 125 $\mu\text{g/ml}$ naopak růst bakterie podpořily. Vzorky medů č. 7 Podhorie (SK), č. 8 Beluša (SR), č. 9 Lysá pod Makytou (SR) a č. 10 (Řecko) zcela neomezily růst bakterie ani při nejvyšší koncentraci. Medové roztoky o koncentraci 250 $\mu\text{g/ml}$ pouze prodloužily dobu lag fáze. Nejnižší nárůst optické denzity ve všech koncentracích lze pozorovat u vzorku medu č. 1 Horná Poruba (SK)

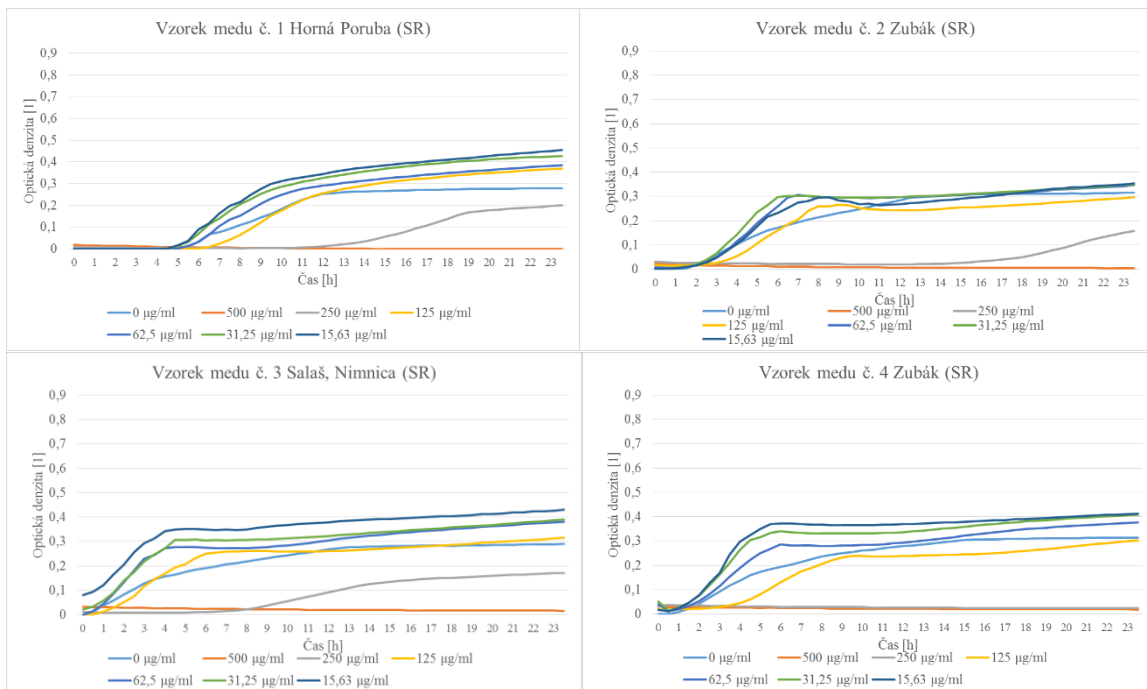


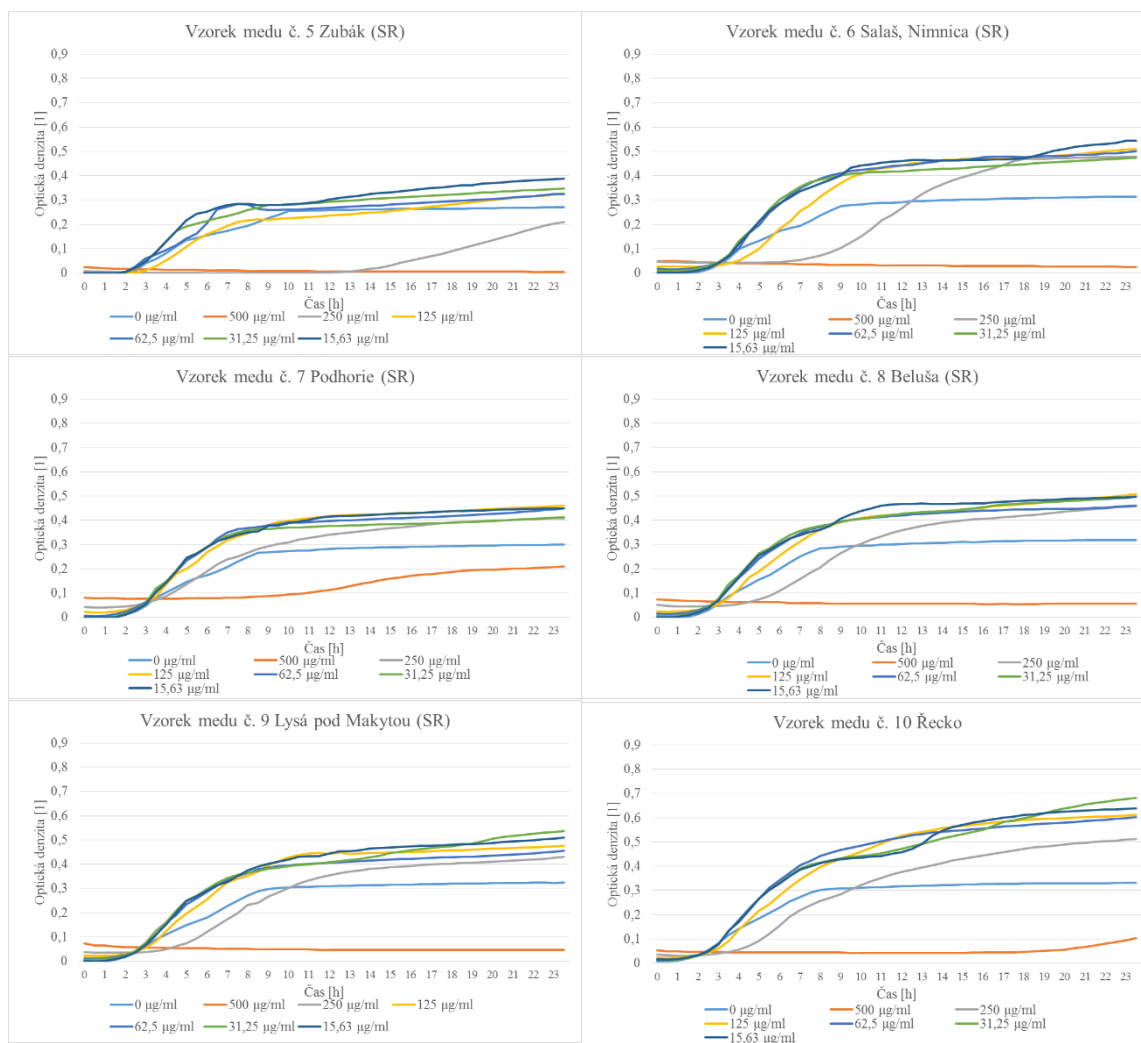


Obrázek 3: Vliv vzorků medů na růst *Serratia marcescens* CCM 303

10.5 Vliv vzorků medů na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium CCM 793

U bakterie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium CCM 793 bylo pozorováno, že největší inhibiční účinek měly medové vzorky při koncentraci 500 µg/ml. Vzorek medu č. 4 Zubák (SR) inhiboval růst i při koncentraci 250 µg/ml, zatímco u ostatních medové roztoky o koncentraci 250 µg/ml pouze prodloužily dobu lag fáze. Vzorky medu č. 7 Podhorie (SR) a č. 10 Řecko se jeví jako medy s nejnižším antimikrobním účinkem, jelikož ani koncentrace 500 µg/ml nebyla u těchto vzorků inhibiční. U vzorku č. 1 Horná Poruba (SK) byla oproti ostatním medům značně prodloužena lag fáze, bakterie se začaly množit po uplynutí zhruba 5 hodin.

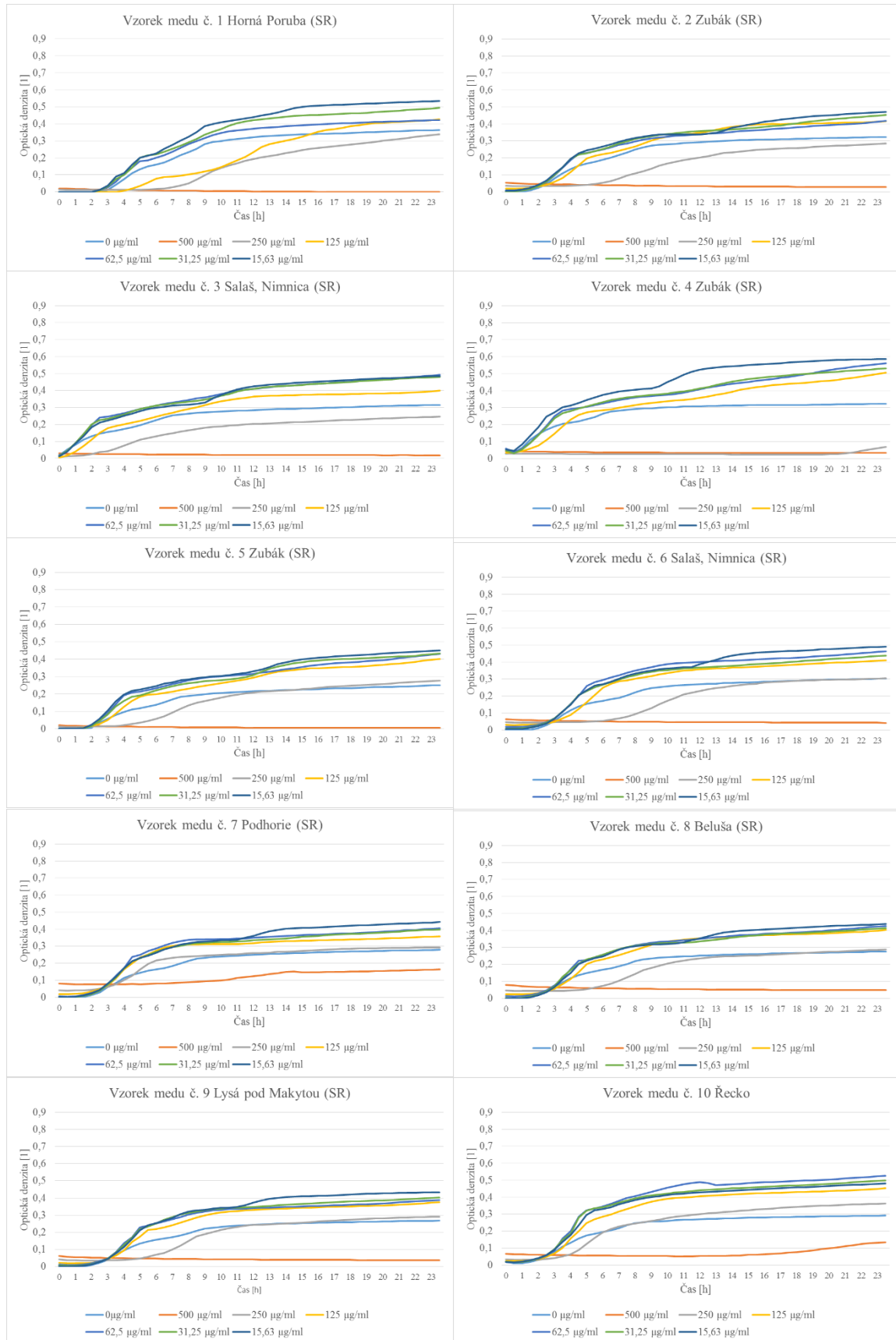




Obrázek 4 Vliv vzorků medu na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium CCM 793

10.6 Vliv vzorků medů na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188

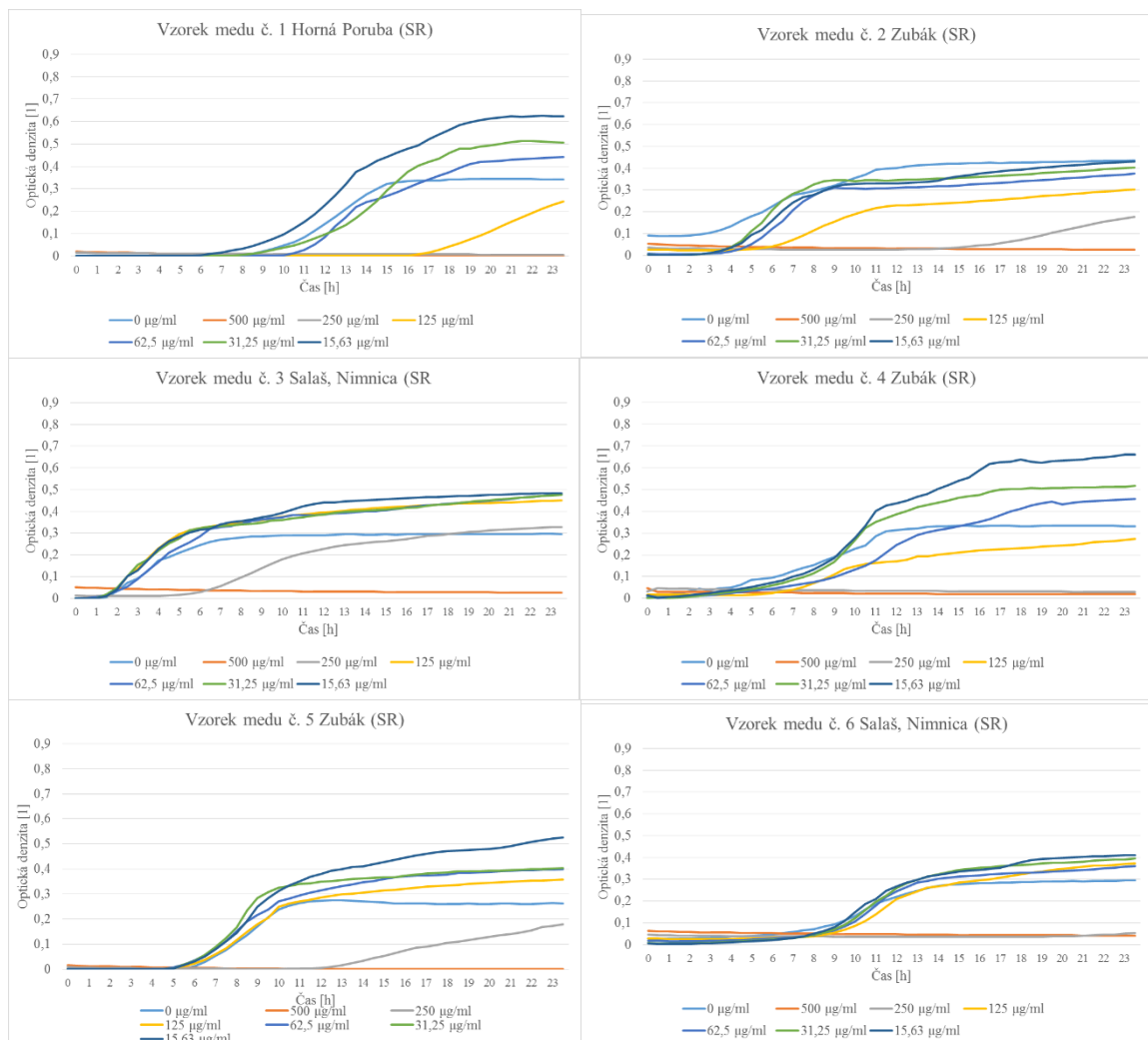
Stejně jako u předešlých mikroorganismů byla u *Proteus mirabilis* CCM 7188 nejnižší inhibiční koncentrace 500 µg/ml. Obdobně jako u předešlé bakterie bylo pozorováno, že vzorek medu č. 4 Zubák (SR) inhiboval růst i při koncentraci 250 µg/ml, mírný nárůst byl u tohoto vzorku při zmíněné koncentraci pozorován až po uplynutí zhruba 21 hodin. U ostatních medových roztoků o koncentraci 250 µg/ml pouze prodloužily dobu lag fáze. Vzorky medu č. 7 Podhorie (SR) a č. 10 Řecko se opět jeví jako medy s nejnižším antimikrobním účinkem, jelikož ani koncentrace 500 µg/ml nebyla u těchto vzorků medu inhibiční.

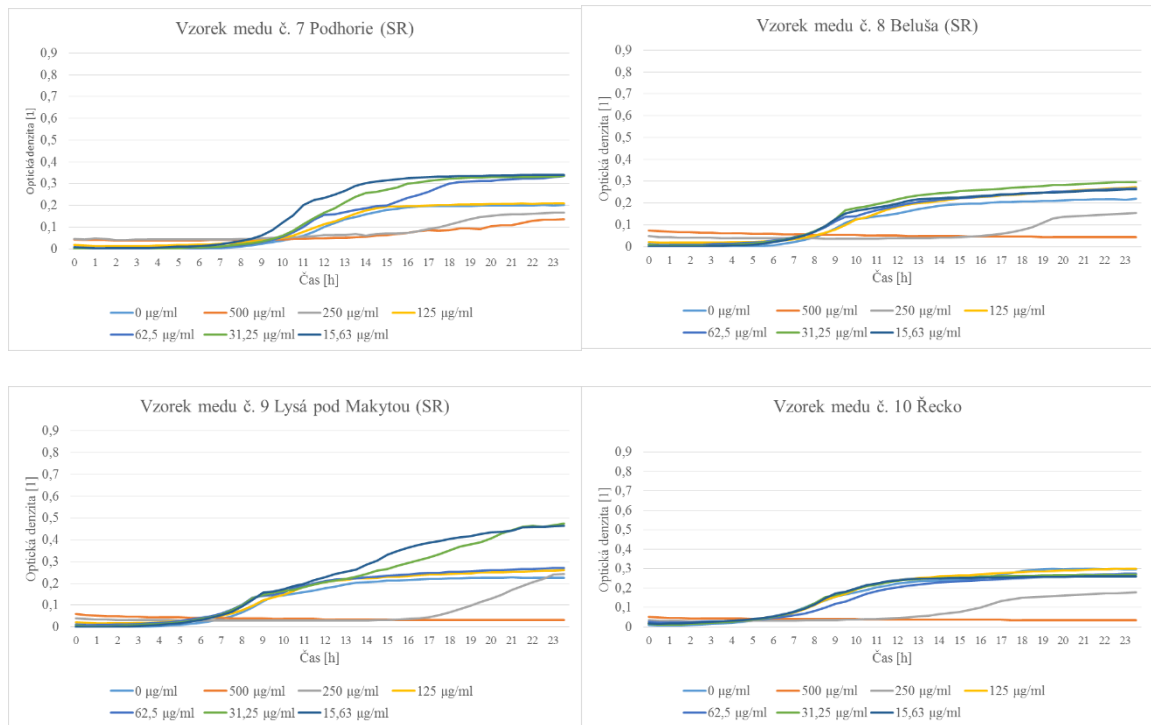


Obrázek 5 Vliv vzorků medů na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188

10.7 Vliv vzorků medů na růst *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798

Posledním pozorovaným mikroorganizmem byl *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798. Z Obrázku 6 je zjevné, že bakterie rodu *Pseudomonas* je nejcitlivější na aplikované medové vzorky. Nejúčinnější byly u většiny vzorků medu opět koncentrace 500 $\mu\text{g/ml}$, pouze u vzorku č. 7 Podhorie, stejně jako u jiných sledovaných mikroorganizmů, je tato koncentrace jako inhibiční nedostačující. U vzorku medu č. 1 Horná Poruba (SR), č. 4 Zubák (SR), č. 6 Salaš, Nimnica (SR) došlo k inhibici i při koncentraci 250 $\mu\text{g/ml}$. U většiny vzorků medů také lze pozorovat výrazné prodloužení lag fáze. Vzorek medu č. 1 Horná Poruba (SR), jako jediný ze vzorků také vykazuje inhibiční účinek i při koncentraci medového roztoku 125 $\mu\text{g/ml}$, zhruba po 17 hodinách však křivka začíná růst. Medové vzorky o koncentracích 15,6 – 125 $\mu\text{g/ml}$ naopak růst bakterie podpořily.





Obrázek 6 Vliv vzorků medů na růst *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798

11 DISKUZE

Med je v lidovém léčitelství užíván od nepaměti, v moderní západní medicíně však bylo upuštěno od jeho klinické aplikace. Nicméně jeho antimikrobní aktivita proti bakteriím vede k opětovnému zájmu o jeho aplikaci. (Kwakman a Zaat, 2011; Demeter, 2015)

Med je přírodní produkt, který má díky obsahu bioaktivních sloučenin značné terapeutické účinky. Známý je pro svoje antibakteriální, antioxidační a protizánětlivé účinky. Tyto účinky jsou způsobeny hlavně fyzikálními vlastnostmi, jako je nízká aktivita vody, vysoký osmotický tlak, vysoká viskozita, kyselost, nízké pH a nízký obsah bílkovin, které zabraňují růstu mikroorganismů. Kromě těchto fyzikálních vlastností je antimikrobiální aktivita medu způsobena také glukózooxidázou, peroxidem vodíku a některými fenolovými sloučeninami. Dále tyto účinky závisí na druhu medu, jeho původu, sezóně a podmínkách sklizně, zpracování a skladování. Současné studie ukazují, že tmavé medy jsou zdravější než světlé medy, respektive obsahují více bioaktivních látek. (Cianciosi et al., 2018; Gośliński et al., 2020)

Cílem experimentální části této diplomové práce bylo stanovení antimikrobní kapacity na vybrané gramnegativní bakterie pomocí mikrodiluční metody a stanovení minimální inhibiční koncentrace.

V experimentální části této diplomové práce byly zkoumány účinky medu na bakterie jako *Escherichia coli* a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium. Antimikrobním účinkům medu na tyto bakterie je věnována pozornost v několika studiích.

Escherichia coli je běžným komenzálem tlustého a tenkého střeva, nicméně zůstává jednou z nejčastějších příčin několika běžných bakteriálních infekcí u lidí a zvířat. *E. coli* je hlavní příčinou enteritidy, infekce močových cest, septikémie a dalších klinických infekcí, jako je neonatální meningitida. *E. coli* je také prominentně spojena s průjmem u domácích a hospodářských zvířat. Terapeutická léčba infekcí touto bakterií je ohrožena vznikem antimikrobiální rezistence, a proto je v evropských zemích rostoucím problémem veřejného zdraví. (Allocati et al., 2013)

Salmonella enterica je důležitým alimentárním patogenem ve všech oblastech světa, přičemž *Salmonella* Typhimurium je jeden z nejčastějších sérovarů způsobujících onemocnění přenášené potravinami a je častou příčinou akutního průjmu. (Herrero-Fresno, 2018)

Účinky medu na *E. coli* a *Salmonella* Typhimurium jsou demonstrovány v mnoha publikacích. Například v jedné ze studií byly zkoumány terapeutické a antibakteriální účinky různých vzorků medů (skladovaných po různou dobu) na *Escherichia coli* O157: H7 a *Salmonella* Typhimurium. Účinky byly zkoumány *in vivo* s pomocí experimentálně infikovaných myši a *in vitro* za použití izolátů odebraných ze vzorků stolice a výtěrů z fekálií telat a dětí v Egyptě. Bylo zjištěno, že čím delší je doba skladování, tím větší je pokles antimikrobiální aktivity proti bakteriím. U nejdéle skladovaného medu byla minimální inhibiční koncentrace 100 mg/ml pro obě bakterie, zatímco u medu, který byl skladován nejkratší dobu byla minimální inhibiční koncentrace pro *E. coli* O157: H7 1,5 mg/ml a pro *S. Typhimurium* 3,1mg/ml, což potvrzuje, že dlouhé skladování a zvýšené teploty snižují antibakteriální aktivitu medu. Nicméně závěrem lze konstatovat, že v této studii byl antibakteriální účinek medu výraznější na *E. coli* O157: H7 než na *S. Typhimurium* a zároveň byla pozorována nižší mortalita u myši léčených medem. (Badawy et al., 2004)

Jiná studie z roku 2002 zkoumala antibakteriální účinek medu proti patogenní *Escherichia coli* na potkanech, jenž byly orálně inokulovány *E. coli*. Bylo zjištěno, že potkani krmení medem vylučovali významně méně bakteriálních buněk ve stolici ve srovnání s potkany, kteří nebyli krmení medem, čímž se potvrdila antibakteriální aktivita proti *E. coli* a potenciální přínos konzumace medu. (Shamala et al., 2002)

V roce 2020 byla publikována studie, ve které byly sledovány antioxidační a antibakteriální vlastnosti manukového medu v porovnání s několika polskými medy na vybrané gramnegativní i grampozitivní bakterie. Výsledky ukázaly, že pouze manukové medy a jeden polský medovicový med vykazovaly antimikrobní aktivitu. Bylo zjištěno, že antimikrobní účinek byl mírně vyšší vůči grampozitivním než gramnegativním bakteriím, což potvrdily i jiné publikace. Analyzované medy vykazovaly nejvyšší antibiotickou aktivitu vůči kmenům *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. Naopak nejodolnější byl shledán kmen *Pseudomonas aeruginosa*. Pro kmeny *Escherichia coli* a *Salmonella* Typhimurium byly pro inhibici zapotřebí koncentrace mezi 20 – 25%, (Gośliński et al., 2020)

V našem experimentu byl kmen *Escherichia coli* CCM 3954 inhibován většinou vzorků testovaných medů při nejvyšší koncentraci, tedy 500 µg/ml. Výjimkou byl vzorek medu č. 4 Zubák, který inhiboval růst bakterie i při koncentraci 250 µg/ml. Jeden z medových vzorků (č. 7 Podhorie) nevykazoval inhibiční účinek ani při 500 µg/ml.

U kmenu *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium CCM 793 byl sledován inhibiční účinek při nejvyšší koncentraci 500 µg/ml. Stejně jako u *E. coli* inhiboval růst bakterie vzorek medu č. 4 Zubák při koncentraci 250 µg/ml. U dvou medových vzorků (č. 7 Podhorie (SR) a č. 10 Řecko) nebyl růst buněk inhibován ani při nevyšší koncentraci.

Dalšími sledovanými mikroorganismy v našem experimentu byly kmeny *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, *Serratia marcescens* CCM303, *Proteus mirabilis* CCM 7188 a *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798. Nebylo nalezeno příliš publikací, které by se věnovaly inhibičním účinkům medu na tyto bakterie.

Je známo, že více druhů rodu *Enterobacter* působí jako oportunistické patogeny včetně *E. aerogenes*. Patogenní *Enterobacter* může způsobit různá onemocnění, včetně očních a kožních infekcí, meningitidy, bakteriémie, pneumonie a infekce močových cest. V mnoha případech je onemocnění způsobené *E. cloacae* nebo *E. aerogenes* spojeno s expozicí v nozokomiálních podmínkách, jako jsou nemocnice nebo pečovatelské domy. (Rogers, 2020)

Serratia marcescens se běžně vyskytuje ve vodě, půdě, zvířatech, hmyzu a rostlinách. Přestože *S. marcescens* vykazuje relativně nízkou virulenci, způsobuje nozokomiální infekce u pacientů s nízkou imunitou, zejména v prostředí, jako jsou jednotky intenzivní péče, zejména novorozenecké jednotky. Tento mikroorganismus může vyvolat širokou škálu klinických projevů jako infekce močových cest, zápal plic, sepse a infekce krevního řečiště. Nejčastějším místem infekce je krevní oběh, následovaný dýchacím aparátem a gastrointestinálním traktem. Často také bývají rezistentní proti antibiotikům. (Khanna, 2013)

V jedné studii byly testovány různé grampozitivní a gramnegativní mikroorganismy včetně *E. aerogenes* a *S. marcescens*. Bylo zjištěno, že *S. marcescens* nebyla inhibována ani při nejvyšší použité koncentraci 20 % (obj.). Inhibiční aktivita proti *E. aerogenes* byla pozorována především u manukového medu, nicméně byla nižší než například u *E. coli.*, ani u jednoho mikroorganismu však nedošlo k úplné inhibici. (Lusby et al., 2005)

V našem experimentu byly výsledky u *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 a *Serratia marcescens* CCM 303 podobné. Čtyři medové vzorky (č. 7 Podhorie, č. 8 Beluša, č. 9 Lysá pod Makytou a č. 10 Řecko) zcela neomezily růst ani při nejvyšší koncentraci.

Rod *Proteus* je velmi rozšířen v prostředí a nachází se také v gastrointestinálním traktu člověka. *Proteus mirabilis* je nejčastěji patogenem močových cest, zejména u pacientů podstupujících dlouhodobou katetrizaci. Jeho schopnost způsobovat takové infekce většinou souvisí s tvorbou biofilmu. (Schaffer a Pearson, 2015)

Majtan et al. se ve své studii zabývali účinky medu proti tvorbě biofilmu u bakterií *Proteus mirabilis* a *Enterobacter cloacae*. Žádný z testovaných medů nezpůsobil statisticky významnou redukci biofilmu *E. cloacae*. Akátové medy spíše podporovaly produkci biomasy z biofilmu. Oproti tomu všechny medy při koncentraci 50 % (hm.) způsobily významnou redukci biofilmu *P. mirabilis*. Z testovaných medů měl manukový med nejsilnější anti-biofilmové vlastnosti. Methylglyoxal, antibakteriální sloučenina manukového medu, byla schopna difundovat do matrice biofilmu *P. mirabilis* a usmrtit bakteriální buňky. Tato vlastnost podporuje potenciální rozšíření využití medu. (Majtan et al., 2014)

Inhibice kmenu *Proteus mirabilis* CCM 7188 byla v této diplomové práci pozorována pouze při nejvyšší koncentraci medových roztoků, kromě vzorků č. 7 Podhorie a č. 10 Řecko, kdy koncentrace 500 µg/ml zcela neinhibovaly růst.

Posledním sledovaným mikroorganismem byl kmen *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798. Bohužel nebyly nalezeny žádné studie, které by se věnovaly účinkům medu na tuto bakterii. Tato bakterie je členem skupiny fluorescenčních pseudomonád a na rozdíl od *P. aeruginosa*, obecně není považována za patogenní. (Scales et al., 2014)

V našem experimentu byl *Pseudomonas fluorescens* shledán jako nejcitlivější na aplikované medové vzorky. U všech vzorků byla oproti ostatním testovaným bakteriím značně prodloužena lag fáze a nárůst optické hustoty nebyl tak výrazný. Nicméně, stejně jako u ostatních sledovaných bakterií, medové vzorky o koncentracích 15,6 – 125 µg/ml naopak růst ještě podpořily.

Klinické studie naznačují, že aplikace medu na infikované kožní rány je schopna odstranit infekci z rány a zlepšit hojení, doba hojení po ošetření ran medem je ve srovnání s konvenční léčbou zkrácena. Značná pozornost je věnována především manukovému medu pocházející z rostliny *Leptospermum scoparium*, který má významné antibakteriální účinky, které jsou dány především obsahem methylglyoxalu a různých polyfenolů. Výzkumy prokázaly jeho účinnost proti několika lidským patogenům. Studie odhalily, že med je účinný proti několika mikroorganismům rezistentních na antibiotika, jako například methicilin rezistentní *S. aureus* (MRSA) a vankomycin rezistentní enterokok (VRE). Med lze tedy vnímat jako produkt s velkým potenciálem při využití v medicíně nebo jako konzervační prostředek pro potraviny a nápoje. Nicméně mnoho studií odkazuje na fakt, že ne všechny medy mají stejný antimikrobní účinek. Jejich aktivita proti mikroorganismům závisí na mnoha faktorech, a proto je třeba pokračovat ve výzkumu antioxidačních a

antimikrobiálních vlastností medů. (Visavadia et al., 2008; Mandal, 2011; Kwakman a Zaat, 2012; Cokcetin et al., 2016; Góslinski et al., 2020)

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se v teoretické části zabývá antioxidačními a antimikrobními vlastnostmi medu. V praktické části byla sledována antimikrobní aktivita devíti vzorků medů od včelařů ze Slovenské republiky a jednoho komerčního vzorku na vybrané gramnegativní bakterie. Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že:

- u všech vzorků medů byla potvrzena antimikrobní aktivita,
- nejdolnějšími mikroorganismy proti účinkům medů byly shledány *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 a *Serratia marcescens* CCM 303, u kterých čtyři vzorky medů zcela neomezily růst ani při nejvyšších koncentracích,
- nejcitlivější bakterie na aplikované medové vzorky byla *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798, jelikož u třech vzorků medů došlo k inhibici i při koncentraci 250 µg/ml a u většiny vzorků aplikovaných medů také lze pozorovat výrazné prodloužení lag fáze,
- medové vzorky o koncentracích 15,6 – 125 µg/ml naopak růst bakterií podpořily,
- vzorek medu č. 4 Zubák (SK) prokázal inhibiční účinek u čtyřech ze šesti testovaných gramnegativních mikroorganismů i při koncentraci 250 µg/ml, a proto byl vyhodnocen jako med s nejsilnější antimikrobní aktivitou.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALLOCATI, Nerino, Michele MASULLI, Mikhail ALEXEYEV a Carmine DI ILIO. Escherichia coli in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2013, 10(12), 6235-6254 [cit. 2021-5-4]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph10126235

AL-MASAUDI, Saad B., Muhammad Barkaat HUSSAIN, Saleh M. AL-MAAQAR, Soad AL JAOUNI a Steve HARAKEH. In vitro antibacterial activity of honey against multidrug-resistant *Shigella sonnei*. *Complementary Therapies in Clinical Practice* [online]. 2020, 41 [cit. 2021-5-7]. ISSN 17443881. Dostupné z: doi:10.1016/j.ctcp.2020.101257

ALVAREZ-SUAREZ, Jose Miguel, Sara TULIPANI, Stefania ROMANDINI, Enrico BERTOLI a Maurizio BATTINO. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* [online]. 2010, 3(1), 15-23 [cit. 2021-5-7]. ISSN 1973-798X. Dostupné z: doi:10.1007/s12349-009-0051-6

ALVAREZ-SUAREZ, José, Massimiliano GASPARRINI, Tamara FORBES-HERNÁNDEZ, Luca MAZZONI a Francesca GIAMPIERI. The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods* [online]. 2014, 3(3), 420-432 [cit. 2021-4-24]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods3030420

BADAWY, O.F.H., S.S.A. SHAFII, E.E. THARWAT a A.M. KAMAL. Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness against *Escherichia coli* 0157: H7 and *Salmonella typhimurium* infection. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* [online]. 2004, 23(3), 1011-1022 [cit. 2021-5-5]. ISSN 0253-1933. Dostupné z: doi:10.20506/rst.23.3.1543

BAGLIO, Ettore. *Chemistry and technology of honey production*. Cham: Springer, [2018]. SpringerBriefs in molecular science. ISBN 978-3-319-65749-3.

BIESAGA, Magdalena a Krystyna PYRZYNSKA. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, 1216(38), 6620-6626 [cit. 2021-5-7]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2009.07.066

BOGDANOV, Stefan, Tomislav JURENDIC, Robert SIEBER a Peter GALLMANN. Honey for Nutrition and Health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition* [online]. 2008, 27(6), 677-689 [cit. 2021-4-24]. ISSN 0731-5724. Dostupné z: doi:10.1080/07315724.2008.10719745

BRUDZYNSKI, Katrina. Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 2006, 52(12), 1228-1237 [cit. 2021-4-24]. ISSN 0008-4166. Dostupné z: doi:10.1139/w06-086

CIANCIOSI, Danila, Tamara FORBES-HERNÁNDEZ, Sadia AFRIN, et al. Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules* [online]. 2018, 23(9) [cit. 2021-4-24]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23092322

CIULU, Marco, Silvia SOLINAS, Ignazio FLORIS, Angelo PANZANELLI, Maria I. PILO, Paola C. PIU, Nadia SPANO a Gavino SANNA. RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta* [online]. 2011, 83(3), 924-929 [cit. 2021-4-24]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2010.10.059

COKCETIN, Nural N., Matthew PAPPALARDO, Leona T. CAMPBELL, Peter BROOKS, Dee A. CARTER, Shona E. BLAIR, Elizabeth J. HARRY a Siew Hua GAN. The Antibacterial Activity of Australian Leptospermum Honey Correlates with Methylglyoxal Levels. *PLOS ONE* [online]. 2016, 11(12) [cit. 2021-4-24]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0167780

ČERMÁKOVÁ, Tatiana, Róbert CHLEBO a Milena HUSÁRIKOVÁ. *Kniha o medu: historie, léčitelství, kosmetika, gastronomie, tradice, produkty*. Bratislava: Eastone, 2010, 278 s. ISBN 9788081091322.

DENISOW, Božena a Marta DENISOW-PIETRZYK. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2016, 96(13), 4303-4309 [cit. 2021-5-7]. ISSN 00225142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.7729

DUPAL, Libor, František KAMLER, Dalibor TITĚRA, Marcela VOŘECHOVSKÁ a Hana VINŠOVÁ. *Med*. Praha: Sdružení českých spotřebitelů, z.ú., v rámci priority pracovní skupiny Potraviny a spotřebitel při České technologické platformě pro potraviny, 2015. Jak poznáme kvalitu? ISBN 978-80-87719-29-9.

ESCUREDO, Olga, Montserrat MÍGUEZ, Maria FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ a M. CARMEN SEIJO. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry* [online]. 2013, 138(2-3), 851-856 [cit. 2021-4-24]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.015

FALLICO, B., E. ARENA a M. ZAPPALA. Degradation of 5-Hydroxymethylfurfural in Honey. *Journal of Food Science* [online]. 2008, 73(9), C625-C631 [cit. 2021-4-24]. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00946.x

FERREIRA, Isabel C.F.R., Edmur AIRES, João C.M. BARREIRA a Leticia M. ESTEVINHO. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry* [online]. 2009, 114(4), 1438-1443 [cit. 2021-5-7]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.028

FONTANA, Renato, Maria Anita MENDES, Bibiana Monson de SOUZA, Katsuhiko KONNO, Lílian Mari Marcondes CÉSAR, Osmar MALASPINA a Mario Sergio PALMA. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides* [online]. 2004, 25(6), 919-928 [cit. 2021-5-7]. ISSN 01969781. Dostupné z: doi:10.1016/j.peptides.2004.03.016

FRANK, Renate. *Zázračný med*. [Líbeznice]: Víkend, 2010. ISBN 978-80-7433-024-7.

GOŚLIŃSKI, Michał, Dariusz NOWAK a Lucyna KŁĘBUKOWSKA. Antioxidant properties and antimicrobial activity of manuka honey versus Polish honeys. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2020, 57(4), 1269-1277 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-019-04159-w

GRABOWSKI, N.T. a G KLEIN. Microbiology and Food-borne Pathogens in Honey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2015, , 00-00 [cit. 2021-4-27]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2015.1029041

GUNES, Nazmiye, Levent AYDIN, Deniz BELENLI, John M. HRANITZ, Sami MENGILIG a Semih SELOVA. Stress responses of honey bees to organic acid and essential oil treatments against varroa mites. *Journal of Apicultural Research* [online]. 2017, 56(2), 175-181 [cit. 2021-5-7]. ISSN 0021-8839. Dostupné z: doi:10.1080/00218839.2017.1291229

HRABĚ, Jan, Otakar ROP a Ignác HOZA. *Technologie výroby potravin rostlinného původu: bakalářský stupeň*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005 [i.e. 2006]. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-7318-372-2.

HERRERO-FRESNO, Ana a John Elmerdhahl OLSEN. Salmonella Typhimurium metabolism affects virulence in the host – A mini-review. *Food Microbiology* [online]. 2018, 71, 98-110 [cit. 2021-5-5]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2017.04.016

HBIBI, Abdelhadi, Khadija SIKKOU, Khadija KHEDID, Sakina EL HAMZA OUI, Amal BOUZIANE a Driss BENAZZA. Antimicrobial activity of honey in periodontal disease: a systematic review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2020, **75**(4), 807-826 [cit. 2021-5-7]. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkz527

KHALIL, Mahmoud L. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2006 Jan-Mar; **7**(1):22-31. PMID: 16629510.

KHANNA, Ashish. *Serratia Marcescens* - A Rare Opportunistic Nosocomial Pathogen and Measures to Limit its Spread in Hospitalized Patients. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH* [online]. 2013 [cit. 2021-5-5]. ISSN 2249782X. Dostupné z: doi:10.7860/JCDR/2013/5010.2737

KNOLLER, Rasso. *Knížka o medu*. Praha: Granit, 1996. ISBN 80-85805-43-X.

KWAKMAN, Paulus H. S. a Sebastian A. J. ZAAT. Antibacterial components of honey. *IUBMB Life* [online]. 2012, **64**(1), 48-55 [cit. 2021-4-24]. ISSN 15216543. Dostupné z: doi:10.1002/iub.578

LACHMAN, Jaromír, Matyáš ORSÁK, Alena HEJTMÁNKOVÁ a Eva KOVÁŘOVÁ. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2010, **43**(1), 52-58 [cit. 2021-5-7]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2009.06.008

LEYVA-JIMENEZ, Francisco Javier, Jesus LOZANO-SANCHEZ, Isabel BORRAS-LINARES, María de la Luz CADIZ-GURREA a Elaheh MAHMOODI-KHALEDI. Potential antimicrobial activity of honey phenolic compounds against Gram positive and Gram negative bacteria. *LWT* [online]. 2019, **101**, 236-245 [cit. 2021-5-7]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2018.11.015

LUSBY, Patricia E., Alexandra L. COOMBES a Jenny M. WILKINSON. Bactericidal Activity of Different Honeys against Pathogenic Bacteria. *Archives of Medical Research* [online]. 2005, **36**(5), 464-467 [cit. 2021-5-7]. ISSN 01884409. Dostupné z: doi:10.1016/j.arcmed.2005.03.038

MACHADO DE-MELO, Adriane Alexandre, Ligia Bicudo de ALMEIDA-MURADIAN, María Teresa SANCHO a Ana PASCUAL-MATÉ. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research* [online]. 2018, **57**(1), 5-37 [cit. 2021-5-7]. ISSN 0021-8839. Dostupné z: doi:10.1080/00218839.2017.1338444

MAJTAN, Juraj, Jana BOHOVA, Miroslava HORNIACKOVA, Jaroslav KLAUDINY a Viktor MAJTAN. Anti-biofilm Effects of Honey Against Wound Pathogens *Proteus mirabilis* and *Enterobacter cloacae*. *Phytotherapy Research* [online]. 2014, 28(1), 69-75 [cit. 2021-5-5]. ISSN 0951418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.4957

MANDAL, Manisha Deb a Shyamapada MANDAL. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [online]. 2011, 1(2), 154-160 [cit. 2021-5-7]. ISSN 22211691. Dostupné z: doi:10.1016/S2221-1691(11)60016-6

MANYI-LOH C.E., CLARKE A.M., NDIP R.N. Identification of volatile compounds in solvent extracts of honey produced in South Africa. *African Journal of Agricultural Research* Vol. 6(18), pp. 4327-4334, 12 September, 2011. doi: 10.5897/AJAR11.754

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* [online]. 1995, 26(2), 83-99 [cit. 2021-5-7]. ISSN 0044-8435. Dostupné z: doi:10.1051/apido:19950202

MARTINELLO, Marianna a Franco MUTINELLI. Antioxidant Activity in Bee Products: A Review. *Antioxidants* [online]. 2021, 10(1) [cit. 2021-4-24]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox10010071

MOLAN, Peter C. The Antibacterial Activity of Honey. *Bee World* [online]. 2015, 73(1), 5-28 [cit. 2021-4-24]. ISSN 0005-772X. Dostupné z: doi:10.1080/0005772X.1992.11099109

NATARAJAN, S, D WILLIAMSON, J GREY, KG HARDING a RA COOPER. Healing of an MRSA-colonized, hydroxyurea-induced leg ulcer with honey. *Journal of Dermatological Treatment* [online]. 2009, 12(1), 33-36 [cit. 2021-5-7]. ISSN 0954-6634. Dostupné z: doi:10.1080/095466301750163563

OLAITAN, Peter B, ADELEKE Olufemi E, OLA, Iyabo O. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African health sciences* [online]. 2007, 7(3), 159–165. [cit. 2021-4-24] Dostupné z: <https://doi.org/10.5555/afhs.2007.7.3.159>

PŘIDAL, Antonín. *Včelí produkty*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-7157-717-0.

RAMADAN, Mohamed Fawzy a Ahmed AL-GHAMDI. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods* [online].

2012, 4(1), 39-52 [cit. 2021-5-7]. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2011.12.007

ROGERS, Kara. "Enterobacter". *Encyclopedia Britannica*, 7 May. 2020, [online] Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/Enterobacter>.

SABATINI, Anna Gloria. Quality and standardisation of Royal Jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* [online]. 2009, 1(1), 16-21 [cit. 2021-5-7]. ISSN 17597986. Dostupné z: doi:10.3896/IBRA.4.01.1.04

SANTOS, L. M., M. S. FONSECA, A. R. SOKOLONSKI, et al. Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *Journal of the science of food and agriculture* [online]. 2020, 100(4), 1369-1382 [cit. 2021-03-28]. ISSN 10970010. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.10024

SCALES, Brittan S., Robert P. DICKSON, John J. LIPUMA a Gary B. HUFFNAGLE. Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2014, 27(4), 927-948 [cit. 2021-5-5]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00044-14

SCHAFFER, Jessica N. a Melanie M. PEARSON. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. *Microbiology Spectrum* [online]. 2015, 3(5) [cit. 2021-5-5]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013

SCHMIDLIN PR, ENGLISH H, DUNCAN W, BELIBASAKIS GN, THURNHEER T. Antibacterial potential of Manuka honey against three oral bacteria in vitro. *Swiss Dent J*. 2014;124(9):922-4. PMID: 25253413.

SCHMITZOVÁ, J., J. KLAUDINY, Š. ALBERT, W. SCHRÖDER, W. SCHRECKENGOST, J. HANES, J. JÚDOVÁ a J. ŠIMÚTH. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* [online]. 1998, 54(9), 1020-1030 [cit. 2021-5-7]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s000180050229

SFORCIN, José M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytotherapy Research* [online]. 2016, 30(6), 894-905 [cit. 2021-5-7]. ISSN 0951418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.5605

SILVA, Mayara Salgado, Yavor RABADZHIEV, Monique Renon ELLER, Ilia ILIEV, Iskra IVANOVA a Weyder Cristiano SANTANA. Microorganisms in Honey. TOLEDO, Vagner de Alencar Arnaut de, ed. *Honey Analysis* [online]. InTech, 2017, 15. 3. 2017 [cit. 2021-4-27]. ISBN 978-953-51-2879-3. Dostupné z: doi:10.5772/67262

SHAMALA, Tumkur Ramachandriah, Yeleswarapu Pattabhiram SHRI JYOTHI a Palle SAIBABA. Antibacterial effect of honey on the *in vitro* and *in vivo* growth of *Escherichia coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2002, **18**(9), 863-865 [cit. 2021-5-7]. ISSN 09593993. Dostupné z: doi:10.1023/A:1021210825345

STEPHENS, Jonathan M., Ralf C. SCHLOTHAUER, Bruce D. MORRIS, Derek YANG, Liam FEARNLEY, David R. GREENWOOD a Kerry M. LOOMES. Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys. *Food Chemistry* [online]. 2010, **120**(1), 78-86 [cit. 2021-5-7]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.074

SWELLAM, TAREK, NAOTO MIYANAGA, MIZUKI ONOZAWA, KAZUNORI HATTORI, KOJI KAWAI, TORU SHIMAZUI a HIDEYUKI AKAZA. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: In vivo and in vitro studies. *International Journal of Urology* [online]. 2003, 10(4), 213-219 [cit. 2021-4-24]. ISSN 0919-8172. Dostupné z: doi:10.1046/j.0919-8172.2003.00602.x

TITĚRA, Dalibor. *Včelí produkty mýtů zbavené: med, vosk, pyl, materiří kašička, propolis, včelí jed*. Vyd. 2. Praha: Brázda, 2013. ISBN 978-80-209-0398-3.

TERRAB, Anass, M Luisa ESCUDERO, M Lourdes GONZÁLEZ-MIRET a Francisco J HEREDIA. Colour characteristics of honeys as influenced by pollen grain content: a multivariate study. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2004, 84(4), 380-386 [cit. 2021-4-24]. ISSN 0022-5142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.1668

TONKS, A. Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine* [online]. 2003, 21(5), 242-247 [cit. 2021-4-24]. ISSN 10434666. Dostupné z: doi:10.1016/S1043-4666(03)00092-9

TSENG, Jun-Ming, Jun-Ru HUANG, Hsiou-Chen HUANG, Jason T. C. TZEN, Wing-Ming CHOU a Chi-Chung PENG. Facilitative production of an antimicrobial peptide royalisin and its antibody via an artificial oil-body system. *Biotechnology Progress* [online]. 2011, 27(1), 153-161 [cit. 2021-4-24]. ISSN 87567938. Dostupné z: doi:10.1002/btpr.528

Vyhláška č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. Zákony pro lidi – Sběrka zákonů ČR v aktuálním konsolidovaném znění [online]. Copyright © Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-76>

VISAVADIA, Bhavin G., Jan HONEYSETT a Martin H. DANFORD. Manuka honey dressing: An effective treatment for chronic wound infections. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* [online]. 2008, 46(1), 55-56 [cit. 2021-5-9]. ISSN 02664356. Dostupné z: doi:10.1016/j.bjoms.2006.09.013

ZHANG, Shuai, Yi LIU, Yang YE, et al. Bee venom therapy: Potential mechanisms and therapeutic applications. *Toxicon* [online]. 2018, **148**, 64-73 [cit. 2021-5-7]. ISSN 00410101. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxicon.2018.04.012

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

a_w	aktivita vody
MGO	methylglyoxal
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methilcilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MH	Mueller-Hinton Broth

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Vliv vzorků medů na růst <i>Escherichia coli</i> CCM 3954.....	40
Obrázek 2 Vliv vzorků medů na růst <i>Enterobacter aerogenes</i> CCM 2531.....	42
Obrázek 3 Vliv vzorků medů na růst <i>Serratia marcescens</i> CCM 303	43
Obrázek 4 Vliv vzorků medů na růst <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Typhimurium CCM793	44
Obrázek 5 Vliv vzorků medů na růst <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188	46
Obrázek 6 Vliv vzorků medů na růst <i>Pseudomonas fluorescens</i> CCM 2798.....	47

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Fenolové sloučeniny identifikované v různých druzích medu (převzato z Cianciosi et al., 2018)	21
Tabulka 2 Lokalizace úlu.....	37
Tabulka 3 Schéma zaočkování mikrotitrační destičky	39