



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

**Vliv zpracování medu na jeho antimikrobiální aktivitu u
bakterie *Escherichia coli***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

Autor: Kateřina Štefanová

Vedoucí práce: Ing. Marian Hýbl

České Budějovice 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „**Vliv zpracování medu na jeho antimikrobiální aktivitu u bakterie *Escherichia coli***“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2. 5. 2023

.....

Podpis

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Marianu Hýblovi za trpělivost a ochotu jak při provádění praktické části v laboratoři, tak při samotném psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat vedení Zdravotně sociální fakulty Jihočeské univerzity za poskytnutí laboratorního zázemí.

Vliv zpracování medu na jeho antimikrobiální aktivitu u bakterie *Escherichia coli*

Abstrakt

V teoretické části mé bakalářské práce pojednávám o medu, jeho chemickém složení, fyzikálních vlastnostech a využití v lékařství, kde popisuji hlavně antimikrobiální aktivitu. Dále se krátce zabývám popisem vlastností a patogenních kmenů bakterie *Escherichia coli*. Cílem práce bylo otestovat vliv manipulace a zpracování medu na jeho antimikrobiální aktivitu. Byly stanoveny dva ukazatele antimikrobiální aktivity, a to Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a Minimální baktericidní koncentrace (MBC) vůči gram-negativní bakterii *E. coli*. Tyto parametry byly testovány na 6 vzorcích stočených medů a následně po 12 hodinovém vysoušení, zahřátí ve vodní lázni při 50 °C do ztekucení (přibližně 1 hod) a po zahřátí v mikrovlnné troubě na 250 W do ztekucení. Pro stanovení MIC byla využita metoda Broth microdilution assay se spektrofotometrickým vyhodnocením. MBC bylo stanoveno přetažením a kultivací bakterie na agarovém médiu. K tomu byl navíc stanoven obsah vody a měrné elektrické vodivosti stočených a vysušených vzorků medu. Výsledky ukázaly, že všechny z uvedených metod zpracování negativně ovlivňují antimikrobiální aktivitu, přičemž nejhorší výsledky vykazovaly medy po mikrovlnném zpracování. Jelikož se med v praxi rutinně tepelně zpracovává, tyto výsledky mohou pomoci zvolit co nejšetrnější metodu zpracování.

Klíčová slova

med; *Escherichia coli*; mikrobiální kultivace; tepelné zpracování; minimální inhibiční koncentrace; minimální baktericidní koncentrace

Impact of honey processing on its antimicrobial activity on bacteria *Escherichia coli*

Abstract

In the theoretical part of my bachelor thesis, I discuss honey, its chemical composition, physical properties and use in medicine, where I mainly describe the antimicrobial activity. Next, I briefly describe the characteristics and pathogenic strains of bacteria *Escherichia coli*. The aim of the work was to test the handling and processing of honey for its antimicrobial activity. Two indicators of antimicrobial activity were determined, namely the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) against gram-negative bacteria *E. coli*. These parameters were tested on 6 samples of extracted honey and then after drying for 12 hours, heating in a water bath at 50 °C until liquefaction (approximately 1 hour) and after heating in a microwave oven at 250 W until liquefaction. The Broth microdilution assay method with spectrophotometric evaluation was used to determine the MIC. MBC was determined by streaking and culturing the bacterium on an agar medium. In addition, the water content and electrical conductivity of the dialed and dried honey samples were determined. The results showed that all of the mentioned processing methods negatively affected the antimicrobial activity, with the worst results being after microwave treatment. Since honey is routinely heat treated in practice, these results can help to choose the most gentle treatment method.

Key words

honey; *Escherichia coli*; microbial cultivation; thermal processing; minimum inhibitory concentration; minimum bactericidal concentration

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Med	9
2.1.1	Vznik medu	9
2.1.2	Základní rozdělení medu	10
2.1.3	Značení medu	11
2.2	Chemické složení medu	11
2.2.1	Cukry	12
2.2.2	Voda	12
2.2.3	Kyseliny	13
2.2.4	Aminokyseliny	13
2.2.5	Bílkoviny a peptidy	13
2.2.6	Minerální látky	14
2.2.7	Barviva	15
2.2.8	Hydroxymethylfurfural (HMF)	15
2.2.9	Látky hormonálního charakteru	15
2.2.10	Vitamíny	15
2.2.11	Přírodní toxické látky	16
2.2.12	Tukové látky	16
2.3	Fyzikální vlastnosti medu	16
2.3.1	Viskozita	16
2.3.2	Hustota	17
2.3.3	Krystalizace	17
2.3.4	Hygroskopicitá	18
2.3.5	Barva	18
2.3.6	Měrná elektrická vodivost	18
2.3.7	Povrchové napětí	19
2.3.8	Tepelné vlastnosti	19
2.3.9	Optické vlastnosti (Index lomu světla, Optická otáčivost)	19
2.3.10	Osmotický tlak	20
2.4	Význam v lékařství	20
2.4.1	Antioxidační aktivita	20
2.4.2	Antimikrobiální aktivita	21
2.4.2.1	Peroxid vodíku	21

2.4.2.2	Antimikrobiální peptidy	22
2.4.2.3	Methylglyoxal	22
2.4.3	Protinádorová, imunomodulační a protizánětlivá aktivita	22
2.5	Escherichia coli	23
2.5.1	Patogenní kmeny	23
2.5.2	Kultivace a laboratorní diagnostika	24
2.5.2.1	Biochemické vlastnosti	25
3	Cíl práce a hypotézy	26
4	Metodika	27
4.1	Laboratorní analýza	27
4.2	Materiál	27
4.3	Instrumentální metody	28
4.3.1	Stanovení vlhkosti refraktometricky	28
4.3.2	Stanovení měrné vodivosti konduktometricky	31
4.3.3	Stanovení antimikrobiální aktivity medů spektrofotometricky	33
5	Výsledky	38
5.1	Vlhkost refraktometricky	38
5.2	Měrná vodivost konduktometricky	38
5.3	Antimikrobiální aktivita	39
5.4	Výsledky a vliv zpracování u jednotlivých vzorků	41
5.5	Závislost vlhkosti a měrné vodivosti na antimikrobiální aktivitu	42
6	Diskuze	43
7	Závěr	48
8	Seznam literatury	49
9	Seznam tabulek a obrázků	56
9.1	Tabulky	56
9.2	Obrázky	56
10	Seznam použitých zkratk	57

1 Úvod

Med je přírodní sladká viskózní látka, produkovaná včelou medonosnou (*A. mellifera*) z nektarů květů nebo sladkých výměšků sajícího hmyzu – medovice. Med je znám a využíván od nepaměti především pro jeho unikátní nutriční vlastnosti. Díky svému vysokému obsahu cukrů slouží jako rychlý zdroj energie či univerzální sladidlo. Jako přísada do pečiva se podílí na prodloužení jeho čerstvosti, díky pohlcování vlhkosti. Med byl také využíván po tisíciletí pro své jedinečné zdravotní přínosy jako přírodní lék. Zevně je možné ho využít k léčbě ran, popálenin či vředů, díky jeho vysoké antimikrobiální aktivitě a současnému zabránění dehydratace infikovaného místa. Kromě antimikrobiálního účinku má med také vysoký antioxidační potenciál, protinádorové, imunomodulační a protizánětlivé účinky. S nástupem modernějších metod léčby se od používání medu na nějakou dobu upustilo. Ovšem v současné době se začíná opět diskutovat o antimikrobiální aktivitě medů vzhledem k přibývání rezistentních kmenů bakterií a neúčinnosti antibiotik způsobené jejich nadužíváním a nedodržováním nařízeného schématu léčby.

Antimikrobiální aktivita jednotlivých medů se může značně lišit jak podle botanického, tak geografického původu a souvisí s konkrétním složením medu. K nejvýznamnějším faktorům, kterým se přisuzuje antimikrobiální aktivita medů, patří nízký obsah vody, vysoký obsah cukrů, nízké pH, přítomnost antimikrobiálních peptidů a aktivita glukózooxidázy, při jejímž působení vzniká peroxid vodíku.

Při zpracování se medy běžně vystavují účinkům tepla, především kvůli snížení obsahu vody, pro jejich ztekucení před filtrací, lepší manipulaci při stáčení do nádob či k zajištění mikrobiologické bezpečnosti produktu. Ke ztekucování medu se v praxi využívají teploty přibližně 55 °C. Vysoké teploty prokazatelně ovlivňují řadu parametrů medu včetně antimikrobiální aktivity. Škodlivé je působení vysokých teplot po krátkou dobu, ale i působení nižších teplot dlouhodobě například při skladování. Enzymy, jakožto podstatné složky antimikrobiální aktivity, jsou obecně velmi náchylné na zvýšení teploty, uvádí se, že i teploty okolo 35 °C mohou přispívat k jejich degradaci. Z těchto důvodů je důležité znát dopad konkrétních metod, teplot a délek jejich působení na antimikrobiální aktivitu medu, aby mohl být zvolen nejšetrnější postup, který co nejméně ovlivňuje tyto důležité parametry.

2 Teoretická část

2.1 Med

Včelí med je nejznámější a nejdůležitější přírodní produkt produkovaný včelou medonosnou (*A. mellifera*). Definujeme ho jako sladkou hmotu vytvářenou včelami z nektaru (sladká tekutina vylučovaná nektarodárnými rostlinami a stromy) nebo z medovice (sladká tekutina produkovaná stejnokřídłym hmyzem, hlavně mšicemi a červci), které včely sbírají a přetvářejí pomocí výměšků svých hltanových žláz (Veselý et al., 2003; Zentrich, 2003). Med byl používán lidmi od starověku. Většina starověké populace ho konzumovala jak pro nutriční účely, tak pro jeho léčivé vlastnosti (Samarghandian et al., 2017).

2.1.1 Vznik medu

Vznik medu je velmi složitý proces zahrnující koordinovanou činnost včelstva jako jednotného celku (Gruna et al., 2020). Včely přinášejí sladké šťávy v medném váčku do úlu, kde je předávají úlovým včelám a tím se sladina zařazuje do potravinového koloběhu v rámci celého včelstva. Tyto donesené sladké šťávy jsou trofolaxí předávány ještě několikrát dál, než mohou být jako nezralý med uloženy do buňky plástu. Mezitím už v nich dochází k chemicko-fyzikálnímu procesu (Gruna et al., 2020).

V tomto procesu dochází k obohacení o látky pocházející z hltanových a zřejmě i pyskových žláz včel dělnic. Z nichž jsou nejdůležitější enzymy invertáza, diastáza a glukózooxidáza, dále aminokyseliny, převážně prolin, a další látky ve stopovém množství (tuky, polyfenolické látky a vitamíny) (Gruna et al., 2020; Moniruzzaman et al., 2014).

Působením enzymů invertázy a diastázy dochází k enzymatickým reakcím, kdy jsou oligosacharidy a disacharidy (sacharóza a maltóza) štěpeny na monosacharidy (glukózu a fruktózu). (Alaerjani et al., 2022).

Fyzikální část tohoto procesu zahrnuje odpaření nadměrné vlhkosti, čímž dojde k zahuštění a tím i k zakonzervování medu (Gruna et al., 2020). Shromážděný nektar obsahuje od 80 do 40 % vody. Obsah vody musí být snížen na přibližně 20 % pro skladování v hnízdě (Alaerjani et al., 2022). Odstranění nadbytečné vody může začít již při transportu do úlu. Včely létavky předávají sladinu úlovým včelám, které si ji dále předávají mezi sebou (trofolaxe). Jednotlivé včely nejprve aktivně vypařují nektar

opakovaným vyvrhnutím a polknutím kapiček nektaru, ke kterému dochází po delší dobu. Následuje pasivní odpařování, které probíhá na základě aktivní výměny vzduchu a využívání zvýšené teploty při využití velkého povrchu, kdy jsou plástvové buňky zaplněny napůl zralým medem zhruba do jedné čtvrtiny. (Alaerjani et al., 2022; Frank, 2010). Teprve po dostatečném zahuštění jsou buňky plněny medem až po okraj a zavíčovány voskovými víčky. Med zde poté úplně dozrává (Gruna et al., 2020). Tímto způsobem jsou včely schopny vysušit vodu v medu až na hodnoty kolem 15 % (Titěra, 2006).

2.1.2 Základní rozdělení medu

Podle 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, se med dělí podle původu a podle způsobu získávání nebo obchodní úpravy.

Podle původu rozlišujeme med na květový (nektarový) a med medovicový. Známe ještě medy smíšené, které jsou jak z nektaru květů, tak i z medovice. Vyhláška medy smíšené však nerozlišuje a pouze udává jaké limity medu medovicového může med květový obsahovat a naopak (Gruna et al., 2020).

Podle této vyhlášky lze med rozdělit podle způsobu získávání nebo jeho obchodní úpravy na 8 různých typů:

1. vytočený med,
2. plástečkový med,
3. lisovaný med,
4. vykapaný med,
5. med s plástečky,
6. filtrovaný med,
7. pastový med,
8. pekařský (průmyslový) med.

Při podrobnějším dělení by mohly být medy děleny podle konzistence na tekuté, krystalické a rosolovité a podle barvy na široké spektrum různých typů (Gruna et al., 2020).

Podle konkrétních rostlin nebo skupin rostlin, ze kterých je nektar získán, se může med dále rozdělovat na nepřeberné množství druhů. Například mezi nejkvalitnější patří

med lipový a med akátový. Dále bychom mohli jmenovat např. med vřesový, řepkový, slunečnicový, luční, pohankový a mnoho dalších (Frank, 2010; Giertli, 2010)

2.1.3 Značení medu

Podle Vyhlášky č. 76/2003 Sb. se med označuje podle jeho původu (květový nebo medovicový) a podle způsobu jeho získávání nebo obchodní úpravy (plástečkový med, med s plástečky, filtrovaný med, pastový med). Vytočený med, lisovaný med nebo vykapávaný med lze označit jenom jako med.

Dále se med označuje zemí původu, kde byl med získán. Pokud se jedná o směs více medů může se zvolit jedno z označení:

„směs medů ze zemí EU“,

„směs medů ze zemí mimo EU“,

„směs medů ze zemí EU a ze zemí mimo EU“.

Tato Vyhláška č. 76/2003 Sb. také udává, že označení může být také doplněno (s výjimkou medu filtrovaného a pekařského) o regionální nebo místní označení původu. Dále zda se jedná o jednodruhový nebo smíšený med, druhem rostlin, z nichž pochází, pokud splňuje odpovídající charakteristiky. A specifickými kritérii jakosti.

Pokud se med pekařský či filtrovaný přidává do jiného druhu medu, musí být celá tato směs označena jako med pekařský či filtrovaný. Pekařský med (průmyslový med) musí být dále označen viditelně na obalu, že se jedná pouze o med na vaření, pečení či jiné zpracování. Pokud se však tento pekařský med přidává do nějaké potraviny, pak může mít potravina ve svém názvu použit termín „med“, kromě seznamu složení, kde musí být opět udáno „pekařský med“ nebo „průmyslový med“.

2.2 Chemické složení medu

Chemické složení medu je odvozeno od jeho původu - jiné složení budou mít medy květové a medy medovicové. Botanický původ má na med také vliv, ale o něco menší (Gruna et al., 2020). Med se skládá převážně ze sacharidů, menšího množství vody a velkého množství minoritních složek (Bogdanov, 2009).

2.2.1 Cukry

Hlavní složkou medu jsou cukry, které zaujímají 95-99 % sušiny medu. Jsou to hlavně jednoduché cukry fruktóza a glukóza, které tvoří 85-95 % sušiny všech cukrů (Gruna et al., 2020). Téměř ve všech medech převažuje fruktóza nad glukózou (Veselý et al., 2003). Kromě toho bylo zjištěno dalších asi 25 různých cukrů jako např. disacharidy (sacharóza, maltóza, isomaltóza) a trisacharidy (melecitóza, erlóza) a (Bogdanov, 2009; Alvarez-Suarez et al., 2010). Průměrný obsah jednotlivých vybraných cukrů a porovnání hodnot v medu lučním (květovém) a medovicovém (tab. 1).

Tabulka č. 1: Průměrný obsah cukrů v medu, G = glukóza, F = fruktóza

Složka	Průměr [%]	Rozsah	Obsah v medu	
			květovém	medovicovém
Fruktóza	38,20	27,2-44,3	součet obsahu G a F bývá vyšší	součet obsahu G a F bývá nižší
Glukóza	31,3	22,0-40,7		
Sacharóza	1,3	0,2-10,1	obvykle více	obvykle méně
Maltóza (redukující disacharidy se v medu zahrnují pod maltózu)	7,3	2,7-16,0	obvykle méně	obvykle více
Melecitóza	-	0,0-15,0	chybí anebo jen stopy	vždy přítomná
Dextriny (+ ost. vyšší cukry)	1,5	0,1-12,5	nižší	vyšší

(Gruna et al., 2020).

2.2.2 Voda

Obsah vody v medech je 15-21 % a u nevyzrálých medů ještě více (Veselý et al., 2003). Obsah vody je limitující pro skladování medu. Medy s obsahem 21 % a více nejsou určeny ke skladování a je velké riziko jejich zkvašení (Gruna et al., 2020). Kvalitní med má optimální obsah vody 17-18 %, přičemž med s obsahem pod 17,1 % nekvasí za žádných okolností (Veselý et al., 2003; Gruna et al., 2020).

2.2.3 *Kyseliny*

Kyseliny jsou obsaženy ve všech druzích medu jako minoritní komponenty (Veselý et al., 2003; Gruna et al., 2020). I přes to, že je obsah kyselin v medu relativně nízký (průměrně 0,57 %), zásadním způsobem ovlivňuje pH a chuť medu. Jednou z hlavních kyselin je kyselina glukonová, která vzniká oxidací glukózy za působení enzymu glukózooxidáza (přidávanou včelami) (Bogdanov, 2009; Gruna et al., 2020). Ostatní kyseliny mají původ rostlinný (Gruna et al., 2020).

V malých množstvích se v medech nachází kyseliny: mravenčí, octová, citrónová, mléčná, maleinová, jablečná, šťavelová, pyroglutamová, jantarová a levulová. Kyselina levulová a mravenčí vzniká následným rozkladem hydroxymethylfurfuralu (Bogdanov, 2009; Gruna et al., 2020).

2.2.4 *Aminokyseliny*

Med obsahuje téměř všechny fyziologicky důležité aminokyseliny, ale jejich obsah je poměrně malý. Hlavní aminokyselinou je prolin, který také udává míru zralosti medu. Obsah prolinu v normálních medech by měl být více než 200 mg/kg (běžně 200-500 mg/kg) (Bogdanov, 2009; Veselý et al., 2003). Při skladování ve zvýšené teplotě obsah prolinu klesá, pravděpodobně reakcí s cukry či hydroxymethylfurfuralem (Veselý et al., 2003). Konkrétně z ostatních aminokyselin můžeme v medu najít fenylalanin, kys. asparagovou, kys. glutamovou, leucin, alanin, lyzin, histidin, arginin, treonin, serin, glycin, cystin, metionin, izoleucin, tyrosin, orinitn a tryptofan (Alvarez-Suarez et al., 2010).

2.2.5 *Bílkoviny a peptidy*

Proteiny zahrnují přibližně 0,21 % z celkového objemu medu a z toho největší část tvoří enzymy (Bogdanov, 2009; Gruna et al., 2020). Jak již bylo zmíněno, včely přidávají různé enzymy během procesu zrání medu. Diastáza (amyláza) štěpí škrob na maltózu. Invertáza (sacharáza, α -glukosidáza) katalyzuje především přeměnu sacharózy na glukózu a fruktózu, ale také mnoho dalších konverzí cukru. Invertáza spolu s diastázou pochází výlučně z hltanových žláz včel a jsou důležitým ukazatelem kvality medu. Dva další hlavní enzymy glukózooxidáza a kataláza regulují produkci H_2O_2 . V medu se nachází také kyselá fosfatáza a některé další enzymy (Bogdanov, 2009; Veselý et al., 2003; Gruna et al., 2020). Kromě bílkovin se v medu nachází ještě

nízkomolekulární látky, peptidy (Veselý et al., 2003). Některé peptidy byly identifikovány také jako důležité antibakteriální sloučeniny v medu (Kwakman a Zaat, 2012). Mezi tyto antimikrobiální peptidy v medu patří defensin-1, hymenoptaecin a jellein (Brudzynski, 2021).

2.2.6 Minerální látky

Minerální látky v medech jsou převážně rostlinného původu a dosahují až koncentrace 1 % (Veselý et al., 2003). Když porovnáme medy nektarové a medovicové, medovicové medy obsahují daleko více minerálních látek, a to až do zmíněné koncentrace 1 %. Oproti tomu nektarové medy obsahují běžně 0,1 až 0,3 % minerálních látek (Bogdanov, 2009). Nejvíce zastoupeným makrobiogenním prvkem v medu je draslík (Veselý et al., 2003; Bogdanov, 2009). Kromě draslíku se v medu nachází ještě další minerály (tab. 2). Pro medovicový med bývají specifické také stříbro, molybden, vanad a cín (Gruna et al., 2020).

Tabulka č. 2: Rozsah hodnot minerálních látek obsažených v běžných medech

Minerály	Množství [mg/100 g]
Sodík (Na)	1,6-17
Vápník (Ca)	3-31
Draslík (K)	40-3500
Hořčík (Mg)	0,7-13
Fosfor (P)	2-15
Selen (Se)	0,002-0,01
Měď (Cu)	0,02-0,6
Železo (Fe)	0,03-4
Mangan (Mn)	0,02-2
Chrom (Cr)	0,01-0,3
Zinek (Zn)	0,05-2

(Ajibola et al., 2012)

2.2.7 Barviva

Barviva obsažená v medu vytvářejí spolu s dalšími látkami jeho barvu (Giertli, 2010). Med obsahuje širokou škálu různých barviv, patřících mezi flavonoidy, karotenoidy, xantofyly, chlorofyly a antokyany (Veselý et al., 2003; Alqarni et al., 2016). Většina z nich je rostlinného původu (Gruna et al., 2020). Z významných flavonoidních barviv se v medu nachází např. kvercetin a jeho glykosid rutin, což je látka snižující křehkost kapilár a potlačující aterosklerózu (Veselý et al., 2003; Gruna et al., 2020).

Do medu se také dostávají barviva po zbytecích ze včelího plodu – melanoidní barviva. Barviva se mohou i kumulovat ve vosku plástů a zpětně pak přecházet do nového medu. Také mohou v medu vznikat při zahřívání Maillardovou reakcí (Veselý et al., 2003; Gruna et al., 2020).

2.2.8 Hydroxymethylfurfural (HMF)

Hydroxymethylfurfural, systematickým názvem 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd (HMF) je látka vznikající při kyselinou katalyzované dehydrataci fruktózy a méně také glukózy (Veselý et al., 2003; Gruna et al., 2020). Jeho koncentrace se při skladování a delším zahřívání medu zvyšuje. Jelikož je proces katalyzován kyselinou, závisí rychlost tvorby na pH, u kyselějších medů se HMF tvoří rychleji než u medů se zásaditějším pH (Bogdanov, 2009). HMF nám také slouží jako jeden z ukazatelů kvality medu (Gruna et al., 2020).

2.2.9 Látky hormonálního charakteru

Z hormonálních látek je v medu nejvíce zastoupen acetylcholin, který slouží jako přenašeč nervových vzruchů v periferním nervovém systému a nachází se v koncentracích 0,06-5 mg na kg medu. Dále obsahuje přibližně 20 µg volného a 20-60 µg vázaného adrenalinu na kg medu a v poslední řadě i noradrenalin, dopamin a další specifické hormonální látky z mastných kyselin (Veselý et al., 2003; Gruna et al., 2020).

2.2.10 Vitamíny

Většina vitamínů nacházejících se v medu pochází z pylu, menší množství i z nektaru nebo medovice (Veselý et al., 2003). Hlavní skupinu tvoří vitamíny

skupiny B, konkrétně se jedná o vitamíny: thiamin (B₁), riboflavin (B₂), niacin (B₃), kys. pantotenová (B₅), pyridoxin (B₆), biotin (H, B₇), kys. listová (B₉). Dále pak vitamín E, K a vitamín C, kterého je v medu nejvíce (Bogdanov, 2009; Alvarez-Suarez et al., 2010; Frank, 2010).

2.2.11 Přírodní toxické látky

Několik rostlin dává nektar obsahující toxické látky, které se pak mohou dostat i do samotného medu. Existují dvě hlavní skupiny toxinů: diterpenoidy a pyrazolidinové alkaloidy (Bogdanov, 2009). Nejvíce toxických látek se může do medu dostat z rostlin čeledi vřesovitých (*Ericaceae*), jedná se o zmíněné diterpenoidy (Bogdanov, 2009; Gruna et al., 2020). V českých medech jsou jedovaté látky výjimkou (Gruna et al., 2020).

2.2.12 Tukové látky

Med obsahuje přibližně 0,015 % lipidových látek (Gruna et al., 2020). Z toho největší část 45 % jsou estery cholesterolu, 22 % tvoří triacylglyceroly, 18 % volné mastné kyseliny a 17 % zaujímá volný cholesterol (Veselý et al., 2003).

V malém množství dále uhlovodíky, vosky, estery mastných kyselin, mastné alkoholy, steroly, dihydroxy a trihydroxy sloučeniny a některé estery polyolů (Kapoulas et al., 1977).

2.3 Fyzikální vlastnosti medu

Fyzikální vlastnosti medu se odvíjejí především od jeho chemického složení. Menší vliv také hrají vnější faktory, jako zpracování a uchovávání medu (Veselý et al., 2003; Gruna et al., 2020).

2.3.1 Viskozita

Viskozita je jednou z nejvýznamnějších fyzikálních vlastností medu pro manipulaci, zpracování, skladování a senzorickou kvalitu (Machado De-Melo et al., 2018). Viskozita medu je ovlivněna botanickým původem, teplotou, obsahem vody, poměrem glukóza/fruktóza a také přítomností krystalů a koloidů (Yanniotis et al., 2006; Machado De-Melo et al., 2018). Obecně lze říci, že čím vyšší je teplota a obsah vody a čím nižší je obsah polysacharidů, tím nižší je samotná viskozita medu (Yanniotis et al.,

2006). V porovnání s vodou má med při 20 °C asi 10 000krát větší viskozitu (Gruna et al., 2020).

Existují také medy tixotropické s rosolovitou konzistencí, které se po zatřepání či promíchání stávají na chvíli tekutými (snižuje se jejich viskozita). Bývají to nejčastěji medy vřesové. Opačná vlastnost lze pozorovat u medů z některých druhů eukalyptů, kde se po zatřepání nebo promíchání viskozita zvyšuje (Gruna et al., 2020).

2.3.2 Hustota

Další významnou fyzikální vlastností je hustota medu – tedy hmotnost medu na jednotku jeho objemu. Relativní hustota neboli specifická hmotnost medu je charakterizována jako poměr mezi hmotností stanoveného objemu medu a hmotností stejného objemu vody při stejné teplotě (Přidal, 2003). Specifická hmotnost se udává v g na cm³ (Titěra, 2006). Hustota medu závisí zásadně na obsahu vody. Dále má na hustotu medu vliv jeho složení, ale tento vliv je téměř zanedbatelný (Přidal, 2003). Specifická hmotnost medu se měří pyknometricky – vážením obsahu nádoby o známém objemu (Veselý et al., 2003).

2.3.3 Krystalizace

Ačkoliv se někteří lidé domnívají, že krystalizace medu je důkazem o jeho falšování a přidavku řepného cukru, není tomu tak (Přidal, 2003). Krystalizace je přirozený fyzikální proces a každý med dříve či později zkrystalizuje (Titěra, 2006).

Med je přesycený roztok cukrů (hlavně glukózy a fruktózy), to znamená, že obsahuje více cukrů, než kolik jich může zůstat rozpuštěných v roztoku (Přidal, 2003). Glukóza, která je méně rozpustná než fruktóza, se odděluje od vody, vysráží se z přesyceného roztoku a vznikají krystaly monohydrátu glukózy (Machado De-Melo et al., 2018).

Krystalizace probíhá ve dvou fázích:

- a) nukleace – tvoří se krystalizační centra (základem přírodní krystalky, nečistoty, pylová zrna, a další částice přirozeně obsažené v medu).
- b) vlastní krystalizace – zárodečné krystaly postupně rostou až do velikosti viditelné pouhým okem a med krystalizuje v celém svém objemu (Veselý et al., 2003; Přidal, 2020).

Krystalizaci ovlivňuje mnoho faktorů jako např. teplota, obsah vody, poměr glukóza : fruktóza (fruktóza krystalizaci zpomaluje), obsah částic sloužících jako krystalizační centra, přítomnost melecitózy a další (Conforti et al., 2006; Přidal, 2003).

2.3.4 Hygroskopicitá

Med je díky vysokému obsahu cukrů silně hygroskopický. Může absorbovat a zadržovat vodu z okolí v závislosti na teplotě, obsahu vlhkosti vzduchu a relativní vlhkosti (Machado De-Melo et al., 2018). Může absorbovat vodu, pokud je vystaven vzduchu s relativní vlhkostí nad 60% (Crane a Kirk Visscher, 2009). Spolu s vlhkostí přijímá med i pachy (Přidal, 2003). Tato vlastnost musí být zohledněna při balení, skladování a průmyslovém použití. Pokud med absorbuje vlhkost, zředí se a je náchylnější ke kvašení (Machado De-Melo et al., 2018).

Vysoká hygroskopicitá medu může být ale i pozitivní vlastností, v případě přidání medu do některých produktů. Zejména při pečení pomáhá udržet měkkost a zabránit vysychání pečiva (Machado De-Melo et al., 2018; Gruna et al., 2020).

2.3.5 Barva

Barva medu souvisí s jeho botanickým původem, zpracováním, a délkou skladování (Veselý et al., 2003). Různé složky medu, ale převážně barviva, způsobují, že med může mít různou barvu – bezbarvou, různé odstíny žluté, hnědozelenou, načervenalou až skoro černou. (Giertli, 2010; Solayman et al., 2016).

Barva je jedním z důležitých atributů pro hodnocení medu. Hodnocení barvy medu může být provedeno několika metodami. Nejčastěji používané techniky jsou obvykle založeny na vizuálním porovnání vzorků, jako je stupnice Pfund, Lovibond a Jack (Bodor et al., 2021). Med časem obvykle ztrácí svou původní barvu, obvykle tmavne a při krystalizaci naopak zesvětluje (Giertli, 2010).

2.3.6 Měrná elektrická vodivost

Měrná elektrická vodivost označuje schopnost materiálu (medu) vést elektrický proud. Přímou souvisí s botanickým původem, jakož i s obsahem minerálů, iontů a dalších látek, které mohou působit jako elektrolyty (Machado De-Melo et al., 2018). Nezředěný med má velmi nízkou vodivost podobnou vodivosti destilované vody (Veselý et al., 2003). Podle evropských nařízení musí být elektrická vodivost květového

medu nižší než hodnota 0,8 mS/cm, zatímco elektrická vodivost medovicového medu musí být vyšší (Machado De-Melo et al., 2018).

2.3.7 Povrchové napětí

Ačkoliv má med vysokou viskozitu, jeho povrchové napětí je nízké a pohybuje se okolo 50–60 mJ/m² (Bormashenko, 2018). Povrchové napětí medu je ovlivněno obsaženými koloidními látkami a spolu s jeho vysokou viskozitou způsobuje pěnivý vzhled medu (Pavlova, 2018). Díky nízkému povrchovému napětí může med pronikat póry pokožky a je tak vynikajícím hydratačním médiem v kosmetických přípravcích (Titěra, 2006; Přidal, 2003).

2.3.8 Tepelné vlastnosti

Tepelné vlastnosti medů mají praktický význam pro včelaře a průmysl, protože jejich stanovení umožňuje jejich správné zpracování a kontrolu kvality (Silva et al., 2016).

Specifické teplo medu při obsahu vody 17 % je okolo 2,26 J/g. Při ředění medu se uvolňuje rozpouštěcí teplo v přibližné hodnotě 23 J/g (Veselý et al., 2003). Tepelná vodivost medu je 10krát nižší než u vody, konkrétně kolísá v závislosti na jednotlivých parametrech od 494 do 598×10^{-5} J/cm²/sec/°C (Přidal, 2003).

Průměrná energetická hodnota medu je 12 723 J/kg. Medy medovicové a smíšené mívají větší energetickou hodnotu než medy květové (Přidal, 2003).

2.3.9 Optické vlastnosti (Index lomu světla, Optická otáčivost)

Index lomu n^D je optická vlastnost, která se v medu mění většinou mezi 1,504 a 1,4815, zvyšuje ho vysoký obsah pevných látek (nebo nízký obsah vody) v závislosti na teplotě (Machado De-Melo et al., 2018).

Optická otáčivost je parametr, který je diskutován v souvislosti se stanovením botanického původu a falšování medu (Přidal a Vorlova, 2002). Květové medy stácejí rovinu polarizovaného světla zpravidla doleva, jelikož mají nadbytek levotočivé fruktózy nad pravotočivou glukózou. Naopak medovicové medy mají v převaze pravotočivé cukry (glukózu, melecitózu) a stácejí tedy rovinu polarizovaného světla doprava. Smíšené medy mají pak otáčivost různou (Přidal, 2003).

2.3.10 Osmotický tlak

Jelikož je chemické složení medu tvořeno převážně z cukrů, dělá to z něj potravinu s vysokým osmotickým tlakem. To spolu s dalšími složkami a faktory zabraňuje mikrobiálnímu růstu, zvyšuje stabilitu a trvanlivosti produktu (Machado De-Melo et al., 2018).

Tento antimikrobiální efekt spočívá v působení osmotického tlaku na bakteriální buňky. Následkem toho je bakteriím odebírána voda a dochází k nevratnému poškození jejich membrán. Buňky jsou dehydratovány a nemohou přežít, ani se reprodukovat (Almasaudi, 2021).

2.4 Význam v lékařství

Přírodní léčivé přípravky, včetně medu, byly používány po tisíciletí k léčbě mnoha nemocí. Ačkoli mnohé byly nahrazeny konvenčními farmaceutickými přístupy, v současné době dochází k oživení zájmu o používání medu a medových produktů (Adimasu Abeshu, 2015).

Význam medu v lékařství spočívá kromě jeho nutričních hodnot také v jeho biologických aktivitách. Mezi nejvýznamnější aktivity medu patří aktivita: antioxidační, antimikrobiální, antiparazitická, antihypertenzní, protizánětlivá, protinádorová a imunomodulační (Samarghandian et al., 2017; Machado De-Melo et al., 2018).

2.4.1 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita, nebo jednoduše antioxidační kapacita, je schopnost medu snižovat oxidační reakce v potravinách a lidském těle (Alvarez-Suarez et al., 2010).

V důsledku nerovnovážného poměru mezi vzniklými volnými radikály a vyrovnávací antioxidační kapacitou organismu, dochází k přebytku volných radikálů, což vede k poškození buněk a narušení genetické struktury (Adimasu Abeshu, 2015). Mohou vznikat různé nemoci, jako je rakovina, kardiovaskulární onemocnění, zánětlivé poruchy, neurologická degenerace a mohou také urychlovat stárnutí (Khalil et al., 2010).

Med má vysokou antioxidační aktivitu, protože je bohatý na antioxidanty, jako jsou fenolové kyseliny a flavonoidy, kataláza, kyselina askorbová, deriváty karotenoidů, organické kyseliny, aminokyseliny a proteiny (Khalil et al., 2010).

2.4.2 Antimikrobiální aktivita

Med začíná opět nabývat na své důležitosti jakožto antimikrobiální činidlo, hlavně v souvislosti s poklesem účinnosti antibiotik, způsobené přibýváním rezistentních kmenů bakterií a nadužíváním antibiotik (Wadi a Mehmood, 2022; Mandal a Mandal, 2011).

Všechny medy vykazují antimikrobiální účinky vůči širokému spektru gramnegativních a grampozitivních bakterií, avšak jednotlivé medy se liší silou této aktivity (Ajibola et al., 2012).

Antimikrobiální potenciál medu ovlivňují různé parametry, včetně jeho nízkého obsahu vody, vysokého obsahu cukrů, který zajišťuje vysokou osmolaritu, dále vysoká viskozita a nízké pH (obvykle 3,2-4,5) (Almasaudi, 2021; Szweda, 2017). Kromě toho jsou s antimikrobiální aktivitou medu spojeny různé sloučeniny, hlavně peroxid vodíku (vznikající působením enzymu glukózooxidáza) a neperoxidové sloučeniny. Mezi nejvýznamnější neperoxidové sloučeniny patří antimikrobiální peptidy (včelí defensin-1) a methylglyoxal (vyskytující se převážně v manukovém medu) a menší roli hrají také polyfenoly, zahrnující flavonoidy a fenolové kyseliny a další neurčené látky (Kwakman a Zaat, 2012; Almasaudi, 2021; Adimasu Abeshu, 2015).

2.4.2.1 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku (H_2O_2) je silné oxidační činidlo a uplatňuje se ve většině medů jako nejvýznamnější antimikrobiální činitel (Almasaudi, 2021). H_2O_2 vzniká po zředění medu (např. i v raně kontaktem s tělními tekutinami), působením enzymu glukózooxidáza. Glukózooxidáza je jeden z enzymů metabolizujících sacharidy, přidávaný do nektaru včelami z jejich hypofaryngeální žlázy, přeměňuje glukózu na peroxid vodíku a kyselinu glukonovou za aerobních podmínek (Kwakman a Zaat, 2012; Adimasu Abeshu, 2015). Hladiny peroxidu vodíku v medu jsou určeny rozdílem mezi rychlostí jeho produkce a jeho destrukcí katalázami. Kataláza účinně hydrolyzuje peroxid vodíku na kyslík a vodu. Celková koncentrace katalázy závisí na množství pylových zrn v medu, a proto se hladiny peroxidu vodíku v různých medech mohou značně lišit (Brudzynski et al., 2011). Baktericidní aktivita peroxidu vodíku souvisí s akumulací nevratných oxidačních poškození membrány, proteinů, enzymů a DNA buněk (Bizerra et al., 2012).

2.4.2.2 Antimikrobiální peptidy

Mezi antimikrobiální peptidy včelího původu, nacházející se v medu, patří defensin-1, hymenoptaecin a jelleiny (Brudzynski, 2021).

Nejdůležitější je však včelí defensin-1, který se do medu dostává z hypofaryngeálních žláz včel. Nalézá se také v mateří kašičce, kde je označován jako royalisin. Množství včelího defenzinu-1 v medech silně kolísá, přičemž některé medy tento peptid zcela postrádají. Má silnou aktivitu, ale pouze proti gram-pozitivním bakteriím (Kwakman a Zaat, 2012).

2.4.2.3 Methylglyoxal

Speciálním případem je však manukový med z nektaru keře Manuka (*Leptospermum scoparium*) pocházejícího z Nového Zélandu a Austrálie. Na rozdíl od většiny ostatních nektarových a medovicových medů je jeho působení založeno na neperoxidových antimikrobiálních aktivitách (Szweda, 2017). Konkrétně díky vysoké koncentraci 1,2-dikarbonylové sloučeniny methylglyoxalu (MGO) (Kwakman a Zaat, 2012). MGO vzniká díky přítomnosti dihydroxyacetonu v nektaru květů manuky. Čerstvě vyprodukovaný manuka med, obsahuje nízké hladiny methylglyoxalu a vysoké hladiny dihydroxyacetonu. Skladování těchto medů při 37 °C vede ke snížení obsahu dihydroxyacetonu a s tím související nárůst methylglyoxalu (Adams et al., 2009).

2.4.3 Protinádorová, imunomodulační a protizánětlivá aktivita

Studie ukazují, že med může mít protirakovinné účinky prostřednictvím několika mechanismů, jelikož interferuje s několika buněčnými signálními dráhami, včetně indukce apoptózy, antimutagenní, antiproliferativní a protizánětlivé dráhy (Samarghandian et al., 2017). Podílí se na tom fyzikálně-chemické působení (např. snížení dostupnosti kyslíku v prostředí nádoru – antiangiogenní účinek) a obsažené antioxidanty mohou působit jak preventivně, ještě před vznikem nádoru, tak i k zabránění šíření metastáz buňky (Alvarez-Suarez et al., 2010).

S protinádorovými účinky souvisí také imunomodulační a protizánětlivé účinky (Majtan, 2014). Bylo prokázáno, že med snižuje záněty kůže, otoky a exsudaci, podporuje hojení ran, zmenšuje velikost jizev a stimuluje regeneraci tkání (Alvarez-Suarez et al., 2010). Med a jeho složky jsou schopny buď stimulovat nebo inhibovat uvolňování určitých cytokinů (tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-6) z

lidských monocytů a makrofágů v závislosti na stavu rány. Podobně se zdá, že med buď snižuje nebo aktivuje produkci reaktivních forem kyslíku z neutrofilů. Imunomodulační aktivita medu je vysoce komplexní (Majtan, 2014).

2.5 *Escherichia coli*

Escherichia coli, patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, je snad nejznámějším mikrobem vůbec, pod názvem *Bacterium coli* je znám lidstvu už od počátků mikrobiologie (Votava et al., 2006; Goering et al., 2016). Její dnešní jméno dostala podle rakouského lékaře Theodora von Eschericha, který ji izoloval v roce 1885. Slouží také jako důležitý modelový organismus (Donnenberg, 2013; Votava et al., 2006).

Escherichia coli je tyčinkovitá, gram-negativní, fakultativně anaerobní, nesporulující bakterie. Její tyčinkovité buňky mají typicky délku asi 2 μm , tloušťku 0,5 μm a objem 0,6-0,7 μm^3 . Některé její kmeny jsou pohyblivé – mají peritrichálně uložené bičíky (Julák, 2012). Jako komenzál běžně tvoří součást střevní mikroflóry člověka a ostatních obratlovců. Avšak její patogenní kmeny mohou způsobovat řadu onemocnění, infekce zažívacího traktu a jiných orgánů, například jsou zodpovědné za více než 70 % všech infekcí močových cest (Kramář, 2007; Kolářová et al., 2020). Mimo střevo je *E. coli* téměř vždy patogenní (Votava et al., 2006).

2.5.1 *Patogenní kmeny*

Patogenních kmenů *E. coli* s faktory virulence rozlišujeme mnoho, zde jsou nejvýznamnější patotypy spolu s jejich základní patogenezí a onemocněními, které způsobují (tab. 3) (Goering et al., 2016).

Tabulka č. 3: Nejvýznamnější patogenní kmeny *E. coli*, STEC = shigatoxigenní *E. coli*

Kmen/Patotyp	Základní patogeneze	Typ onemocnění
ETEC enteropatogenní <i>E. coli</i>	adheze ke střevnímu epitelu, termolabilní (LT) a termostabilní (ST) toxin	průjmová onemocnění dětí, cestovatelské průjemy
EPEC enterotoxigenní <i>E. coli</i>	adheze ke střevnímu epitelu, enteroagregativní termostabilní enterotoxin	průjmová onemocnění (v rozvojovém světě)
EAEC enteroagregativní <i>E. coli</i>	agregativní adherence k povrchu enterocytů, zkrácení mikrokloků	průjmová onemocnění (v rozvojovém světě)
EHEC, (STEC) enterohemoragické <i>E. coli</i>	adheze ke střevnímu epitelu, shigatoxin s cytopatogenním efektem	průjem, hemoragická kolitida, hemolyticko-uremický syndrom
EIEC enteroinvazivní <i>E. coli</i>	invaze bakterií do buněk střevní sliznice, cytotoxiny a enterotoxiny	vodnatý průjem stejný jako průjem způsobený <i>Shigella spp.</i>
UPEC uropatogenní <i>E. coli</i>	adheze k epitelu moč. cest pomocí fimbrií a adhezínů, toxiny a siderofory	infekce moč. cest, ojediněle zánět ledvin → bakteriémie
DAEC difúzně adherentní <i>E. coli</i>	adherence k enterocytům nebo epitelu moč. cest, stimulace prodloužení mikrokloků	průjem a cystitida dětí, pyelonefritida, recidivující infekce močových cest

(Votava et al., 2006; Kolářová et al., 2020)

2.5.2 Kultivace a laboratorní diagnostika

Její kultivace je nenáročná a roste na většině kultivačních půd při 37°C (teplotní rozmezí 7-46°C) do druhého dne. Při ideálních podmínkách dosahuje její generační doba 20 minut (Votava et al., 2006). Jelikož se jedná o fakultativně anaerobní bakterii, je schopna růstu jak za přítomnosti, tak i nepřítomnosti kyslíku, ale účelně se kultivuje za aerobních podmínek (Julák, 2012; Kolářová et al., 2020).

K diagnostice se využívá nejčastěji kultivace na selektivně-diagnostických půdách, jako je Endův a McConkeyho agar, kde vytváří laktóza-pozitivní kolonie (Votava, 2010). Na Endově agaru má purpurově zbarvené kolonie a jejich okolí (Votava et al., 2006). Existují i jiná chromogenní média, včetně médií s obsahem antibiotik pro detekci kmenů se specifickými mechanismy rezistence. K identifikaci se používají také biochemické testy, MALDI-TOF MS, dále PCR (odlišení jednotlivých patotypů) a aglutinační metody (Kolářová et al., 2020).

2.5.2.1 Biochemické vlastnosti

Jak již bylo zmíněno, pro laboratorní diagnostiku jsou kromě kultivace také zásadní biochemické testy využívající enzymatické aktivity *E. coli* (Horáček, 2000). Je to biochemicky průměrně aktivní enterobakterie (Votava et al., 2006).

E. coli je kataláza pozitivní, oxidáza negativní, štěpí glukózu a laktózu za tvorby plynu, tvoří indol a neštěpí močovinu (Votava et al., 2006). Kromě kmenu STEC štěpí také sorbitol. Za normálních podmínek netvoří H₂S ani neštěpí ureázu, ale vzácně v případě přijetí plasmidů, může tuto schopnost získat (Schindler, 2014).

3 Cíl práce a hypotézy

Cíle práce:

1. Zjistit, jaký vliv má manipulace a zpracování medu na jeho antimikrobiální aktivitu u bakterie *E. coli*.
2. Stanovit Minimální inhibiční koncentraci (MIC) a Minimální baktericidní koncentraci (MBC) u vybraných medů v závislosti na typu manipulace s nimi.

Hypotézy:

1. Manipulace a zpracování medu ovlivňuje antimikrobiální aktivitu vůči gram-negativní bakterii *E. coli*.

4 Metodika

4.1 Laboratorní analýza

Praktická část byla prováděna v laboratoři Zemědělské a technologické fakulty a v laboratoři Zdravotně sociální fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Stanovení vlhkosti a měrné elektrické vodivosti medu bylo provedeno dle metodiky Mezinárodní komise pro med (International Honey Commission, IHC) z roku 2009.

Jako hlavní ukazatele antimikrobiální aktivity medů byly testovány: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a Minimální baktericidní koncentrace (MBC). Pro stanovení MIC byla použita metoda Broth microdilution assay se spektrofotometrickým vyhodnocením dle Patton et al. (2006) s menšími modifikacemi. Bakteriální kultura byla připravena dle Zainol et al. (2013). Příprava vzorků medu byla provedena podle Sherlock et al. (2010). Stanovení MBC bylo provedeno podle Szweda (2017) pomocí přetažení a kultivace bakterie *E. coli* na agarovém médiu. Všechny vzorky byly testovány a vyhodnoceny v tripletech.

4.2 Materiál

Celkem bylo testováno 6 různých medů od českých včelařů, a to v nativní formě, po 12 hodinách vysoušení, po zahřívání ve vodní lázni při 50 °C a v mikrovlnné troubě.

Jednotlivá včelstva byla na území České republiky, chována v souladu se standardní zootechnickou praxí a med byl získán stáčením odstředivou silou v nerezovém medometu. Vysoušení medů probíhalo v profesionálních nerezových sušičkách medu s temperací a odvětráváním.

Seznam testovaných medů a použité zkratky v práci

1-6 = označení 6 vzorků květových medů

S = stočený med

V = vysušený med (12 hod)

Z = med zahřátý ve vodní lázni při 50 °C do ztekucení

M = med zahřátý v mikrovlnné troubě do ztekucení

Přehled všech 6 medů ve 4 úpravách:

vzorek č. 1:	1S,	1V,	1Z,	1M,
vzorek č. 2:	2S,	2V,	2Z,	2M,
vzorek č. 3:	3S,	3V,	3Z,	3M,
vzorek č. 4:	4S,	4V,	4Z,	4M,
vzorek č. 5:	5S,	5V,	5Z,	5M,
vzorek č. 6:	6S,	6V,	6Z,	6M.

4.3 Instrumentální metody

4.3.1 Stanovení vlhkosti refraktometricky

PRINCIP

Metoda ke stanovení obsahu vody v medech je zaměřena na principu měření indexu lomu pomocí Abbeova refraktometru. Index lomu se zvyšuje s obsahem sušiny v medu. Naměřené hodnoty se pak odečítají z tabulky standardů, která je sestavena z grafu logaritmu indexu lomu, od kterého byla odečtena hodnota odpovídající obsahu vody. Byly testovány pouze medy stočené (S) a medy vysušené 12 hodin (V).

VYBAVENÍ

- skleněné vzorkovnice s uzávěrem
- vodní lázeň (50 °C)
- refraktometr
- destilovaná voda
- skleněná tyčinka
- buničina

POSTUP

Příprava vzorků a rozpouštění:

1. Vzorky medů byly homogenizovány důkladným promícháním (alespoň 3 minuty).
2. Poté byly vloženy do skleněných vzorkovnic s těsným uzávěrem, uzavřeny a vloženy do vodní lázně předehřáté na 50 °C dokud se nerozpustily všechny cukerné krystaly. Po vychladnutí na pokojovou teplotu byly vzorky znovu promíchány.

Stanovení:

1. Před stanovením byla změřena teplota okolní místnosti, jelikož je hodnota indexu lomu závislá i na teplotě.
2. Po homogenizaci bylo malé množství medu skleněnou tyčinkou nanášeno na čistý a suchý hranol refraktometru.
3. Po 2 minutách byl odečten a zaznamenán index lomu. Každý vzorek byl změřen ve třech opakováních, ze kterých byl následně vypočítán aritmetický průměr.
4. Mezi jednotlivými vzorky bylo políčko refraktometru očištěno pomocí destilované vody a buničiny a otřeno do sucha.
5. V případě, že se teplota odchylovala od 20 °C, byla hodnota indexu lomu přepočítána podle vztahu (viz níže). Index lomu po provedené korekci teploty byl zaokrouhlen a následně přiřazen k nejbližší hodnotě indexu lomu z tabulky (tab. 4).
6. Ke každé hodnotě byla dohledána hodnota obsahu vody v g/100 ml. K obsahu vody bylo dopočteno průměrné množství sušiny ve vzorcích podle:
$$\text{obsah sušiny} = 100 - \text{obsah vody [g/100 g]}.$$

Korekce indexu lomu na teplotu okolní místnosti:

Teploty nad 20 °C: k indexu lomu bylo připočteno 0.00023 na 1 °C.

Teploty pod 20 °C: od indexu lomu bylo odečteno 0.00023 na 1 °C.

Tabulka č. 4: Vzťah medzi obsahom vody v medu a indexem lomu

Obsah vody g/100 g	Index lomu 20 °C	Obsah vody g/100 g	Index lomu 20 °C
13,0	1,5044	19,2	1,4885
13,2	1,5038	19,4	1,4880
13,4	1,5033	19,6	1,4875
13,6	1,5028	19,8	1,4870
13,8	1,5023	20,0	1,4865
14,0	1,5018	20,2	1,4860
14,2	1,5012	20,4	1,4855
14,4	1,5007	20,6	1,4850
14,6	1,5002	20,8	1,4845
14,8	1,4997	21,0	1,4840
15,0	1,4992	21,2	1,4835
15,2	1,4987	21,4	1,4830
15,4	1,4982	21,6	1,4825
15,6	1,4976	21,8	1,4820
15,8	1,4971	22,0	1,4815
16,0	1,4966	22,2	1,4810
16,2	1,4961	22,4	1,4805
16,4	1,4956	22,6	1,4800
16,6	1,4951	22,8	1,4795
16,8	1,4946	23,0	1,4790
17,0	1,4940	23,2	1,4785
17,2	1,4935	23,4	1,4780
17,4	1,4930	23,6	1,4775
17,6	1,4925	23,8	1,4770
17,8	1,4920	24,0	1,4765
18,0	1,4915	24,2	1,4760
18,2	1,4910	24,4	1,4755
18,4	1,4905	24,6	1,4750
18,6	1,4900	24,8	1,4745
18,8	1,4895	25,0	1,4740
19,0	1,4890		

(IHC, 2009)

4.3.2 Stanovení měrné vodivosti konduktometricky

PRINCIP

Měrná vodivost medu je definována jako vodivost roztoku s 20 % obsahem sušiny medu ve vodě při teplotě 20 °C. Výsledek je vyjádřen v miliSiemens na centimetr ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$). Měří se pomocí elektrovodivého článku. Stanovení je založeno na měření elektrického odporu, jehož elektrická vodivost je reciproční. Metoda je platná pro stanovení elektrické vodivosti medu v rozsahu $0,1\text{--}3\text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Byly testovány pouze medy stočené (S) a medy vysušené 12 hodin (V).

VYBAVENÍ

- destilovaná voda
- konduktometr s platinovou dvojistou elektrodou (s dolním rozsah $10\text{--}7\text{ S}$)
- teploměr
- odměrné baňky na 50 ml
- vysoké kádinky
- skleněná tyčinka
- analytické váhy

POSTUP

Příprava roztoku vzorků medu:

1. Do kádinek na 50 ml bylo naváženo množství medu, které odpovídá 20,0 g bezvodého medu (neboli 20 % sušiny medu), vypočítaného podle výpočtů (viz níže) z hodnot získaných při refraktometrickém stanovení vlhkosti. Med byl rozpuštěn v malém množství destilované vody a následně kvantitativně převeden do odměrné baňky na 50 ml a doplněn po rysku destilovanou vodou.

Stanovení:

1. Rozpuštěné vzorky byly zpět přelity do vysokých 50 ml kádinek a dobře promíchány.
2. Měrná cela konduktometru byla ponořena do kádinek se vzorky a hodnota měrné vodivosti byla zaznamenána poté, co se ustálila její hodnota na displeji. Konduktometr zároveň zaznamenával hodnotu teploty, pro pozdější korekci výchylek od 20 °C. Mezi jednotlivými vzorky byly elektrody vždy opláchnuty destilovanou vodou a osušeny buničinou.

Výpočet navážky pro přípravu roztoku medu s 20 % obsahem sušiny:

příklad výpočtu pro med s obsahem 20 % vody:

$$\text{obsah sušiny} = 100 - 20$$

$$\text{obsah sušiny} = 80 \text{ g}$$

$$100 \text{ g medu} \dots\dots\dots 80 \text{ g sušiny}$$

$$\underline{x \text{ g medu} \dots\dots\dots 20 \text{ g sušiny}}$$

$$x = 25 \text{ g (pro 100 ml)}$$

na 50 ml:

$$25 \text{ g} / 2 = \underline{12,5 \text{ g}}$$

Korekce měrné vodivosti dle teploty vzorku:

Teploty nad 20 °C: bylo odečteno 3,2 % hodnoty na 1 °C.

Teploty pod 20 °C: bylo přičteno 3,2 % hodnoty na 1 °C.

4.3.3 Stanovení antimikrobiální aktivity medu spektrofotometricky

PRINCIP

U všech vzorků medu bylo provedeno stanovení 2 ukazatelů antimikrobiální aktivity: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a Minimální baktericidní koncentrace (MBC). MIC udává nejmenší koncentraci antimikrobiální látky (medu), která inhibuje viditelný růst mikroorganismu (*E. coli*). MBC je nejmenší koncentrace antimikrobiální látky, která je potřebná k usmrcení alespoň 99,9 % mikroorganismů.

VYBAVENÍ

- Mueller-Hinton broth (MHB)
- Mueller-Hinton agar (MHA)
- *Escherichia coli* CCM 4517
- Petriho misky
- destilovaná sterilní voda
- analytické váhy
- plastové bakteriologické kličky
- zkumavky na 20 ml (na inokulum)
- vortex
- vodní lázeň
- mikrovlnná trouba
- denzitometr
- mikrotitrační destička (96 jamková s plochým dnem)
- mikrozukavky Eppendorf 2,0 ml
- automatická pipeta
- multichannel pipeta
- uzavíratelné plastové sáčky
- laminární flow-box
- spektrofotometr

POSTUP

Příprava média:

Pro testování citlivosti bakterie *E. coli* k medu, jakožto antimikrobiální látce, byla připravena tekutá kultivační půda Mueller Hinton Broth pro použití v mikrotitračních

destičkách při stanovení MIC. A pevná kultivační půda Mueller Hinton Agar v Petriho miskách pro kultivaci bakteriálních kolonií a stanovení MBC.

a) Mueller Hinton Broth (MHB)

Na přípravu 1 l tekutého media Mueller Hinton Broth od firmy Condalab je potřeba navážit 21 g dehydratovaného prášku MHB. V našem případě bylo množství přepočítáno pro 200 ml skleněné uzavíratelné nádoby. Bylo tedy naváženo 4,2 g MHB prášku a dobře rozmícháno ve 200 ml destilované vody. Následně byla směs vařena 1 minutu do úplného rozpuštění a poté sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

b) Mueller Hinton Agar (MHA)

Na přípravu 1 l média Mueller Hinton Agar od stejné firmy je potřeba navážit 38 g dehydratovaného prášku MHA. I v tomto případě bylo množství přepočítáno na 200 ml skleněné uzavíratelné nádoby a zvoleno množství nádob podle konkrétní potřeby půd. Na 200 ml média bylo naváženo 7,6 g MHA a rozmícháno ve 200 ml destilované vody. Bylo vařeno 1 minutu do úplného rozpuštění. Před vychladnutím bylo médium nadávkováno do sterilních Petriho misek tak, aby hloubka hladiny byla $4 \pm 0,5$ mm. Takto připravené misky byly sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Příprava bakteriální kultury:

Na přípravu bakteriální kultury byla použita bakterie *E. coli* CCM 4517 získaná z České sbírky mikroorganismů (CCM) na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně.

1. Bakteriální kultura *E. coli* byla 24 hodin před pokusem naočkována na pevné medium MHA v Petriho miskách. Následně byly misky vloženy do uzavíratelných sáčků a 24 hodin inkubovány při 37 °C v termostatu.
2. Po této době byla sterilní bakteriologickou kličkou odebrána část bakteriální kultury do skleněné zkumavky se sterilní destilovanou vodou. Obsah zkumavky byl zvortexován a změřen na denzitometru.
3. V případě potřeby byla přidáním vody či bakterií upravena hodnota denzity na 0,5 McF (104 CFU).

Příprava nativních vzorků medů:

1. Na přípravu 50 % roztoku medů byl navážen 1 g medu do plastových 2 ml Eppendorfových zkumavek.

2. Následným doplněním zkumavek po rysku 2 ml médiem MHB bylo dosaženo poměru 1:1 (w/v). Před plněním destiček byl obsah zkumavek dobře promíchán pomocí Vortexu.

Příprava zahřátých vzorků medů:

a) ve vodní lázni

1. Navážený 1 g medu v Eppendorfových zkumavkách byl bez přidaného média zahříván při 50 °C ve vodní lázni do úplného ztekucení (přibližně 1 hodinu).
2. Po vychladnutí na pokojovou teplotu byly 2 ml Eppendorfovy zkumavky doplněny po rysku 2 ml médiem MHB jako při přípravě vzorků nativních.

b) v mikrovlnné troubě

1. Medy navážené do 2 ml Eppendorfových zkumavek byly narovnané do plastového stojánku. Zahřívaly se s uzavřeným víčkem zkumavek v mikrovlnné troubě na 250 W do ztekucení. Podle konzistence medu to trvalo přibližně 60-120 s.
2. Po vychladnutí byly doplněny médiem po rysku 2 ml jako předchozí vzorky.

Spektrofotometrické stanovení MIC:

1. Stanovení bylo provedeno v 96 jamkových mikrotitračních destičkách s plochým dnem (tab. 5).
2. Do první řady mikrotitrační destičky bylo napipetováno 200 µl připravených 50 % vzorků medů, vždy ve 3 opakováních, na jednu destičku se tak vešly 4 vzorky medu. Do všech zbylých jamek bylo napipetováno 100 µl MHB média.
3. Několikanásobným promísáním pipetou a přenesením poloviny 50 % medu z první řady multichannel pipetou do následující řady, došlo k naředění na 25 % koncentraci (w/w).
4. Takto se pokračovalo až k 6. řadě (řada F) a každá následující řada měla o polovinu menší koncentraci (50%, 25%, 12,5%, 6,25 % 3,125%, 1,563%). Poslední 2 řady neobsahovaly naředěný med.
5. Do všech jamek kromě poslední řady (H) bylo přidáno 10 µl bakteriálního inokula automatickou pipetou.
6. Předposlední (G) řada byla založena jako pozitivní kontrola obsahující médium a bakterie a poslední řada (H) je negativní kontrola obsahující pouze médium.

7. Destičky byly spektrofotometricky vyhodnoceny při vlnové délce 620 nm ihned po inokulaci bakteriemi a poté inkubovány v temnu při 37 °C po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách byla opět změřena optická densita (OD) a MIC vypočítána podle vzorce:

$$OD = OD \text{ jamky po inkubaci} - OD \text{ jamky před inkubací}$$

Tabulka č. 5: Rozvržení 96 jamkové mikrotitrační destičky

koncentrace medu (%)		vzorek 1			vzorek 2			vzorek 3			vzorek 4		
50	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,5	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,25	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,125	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,563	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C +	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C -	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

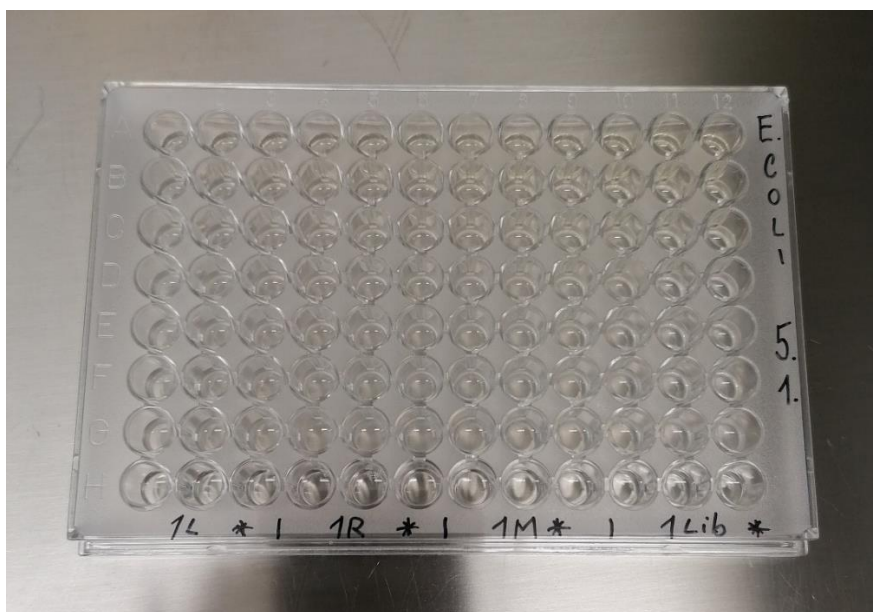
Schématicky by se plnění mikrotitrační destičky dalo vyjádřit takto:

řada **A**: 50 % vzorek medu (200 µl) + inokulum (10 µl)

řady **B – F**: médium (100 µl) + ředění medu (100 µl odebraných z předchozí řady)
+ inokulum (10 µl)

řada **G**: médium (100 µl) + inokulum (10 µl)

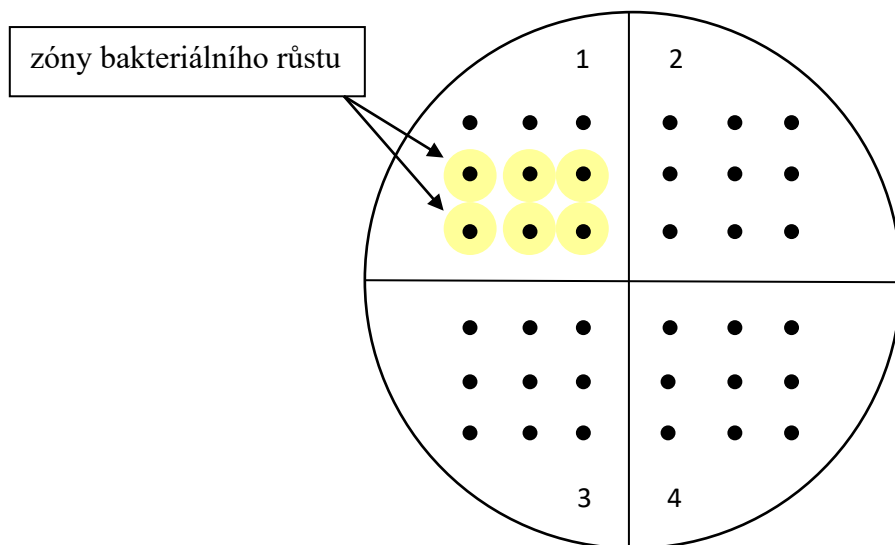
řada **H**: médium (100 µl)



Obrázek č. 1: Mikrotitrační destička

Stanovení MBC:

1. Na připravené Petriho misky s médiem MHA byly zespodu nakresleny 2 čáry lihovým fixem, kterými byly rozděleny na čtvrtiny (na každé čtvrtině jeden vzorek) a byly naznačeny tečky, kam byly později aplikovány vzorky z inkubovaných a změřených mikrotitračních destiček.
2. Z jamek, které nevykazovaly bakteriální růst se inokulační kličkou odebral vzorek odpovídající asi 1-2 μl , který byl aplikován na MHA. Každý vzorek byl opět proveden ve třech opakováních a bylo zachováno pořadí na destičce. Petriho misky byly inkubovány 24 hodin při 37 °C.
3. Po inkubaci se odečítala hodnota MBC, kterou představují zóny koncentrací bez bakteriálního růstu. Na obrázku je znázorněno rozložení Petriho misky pro stanovení MBC a bakteriální růst u prvního vzorku (obr. 2).

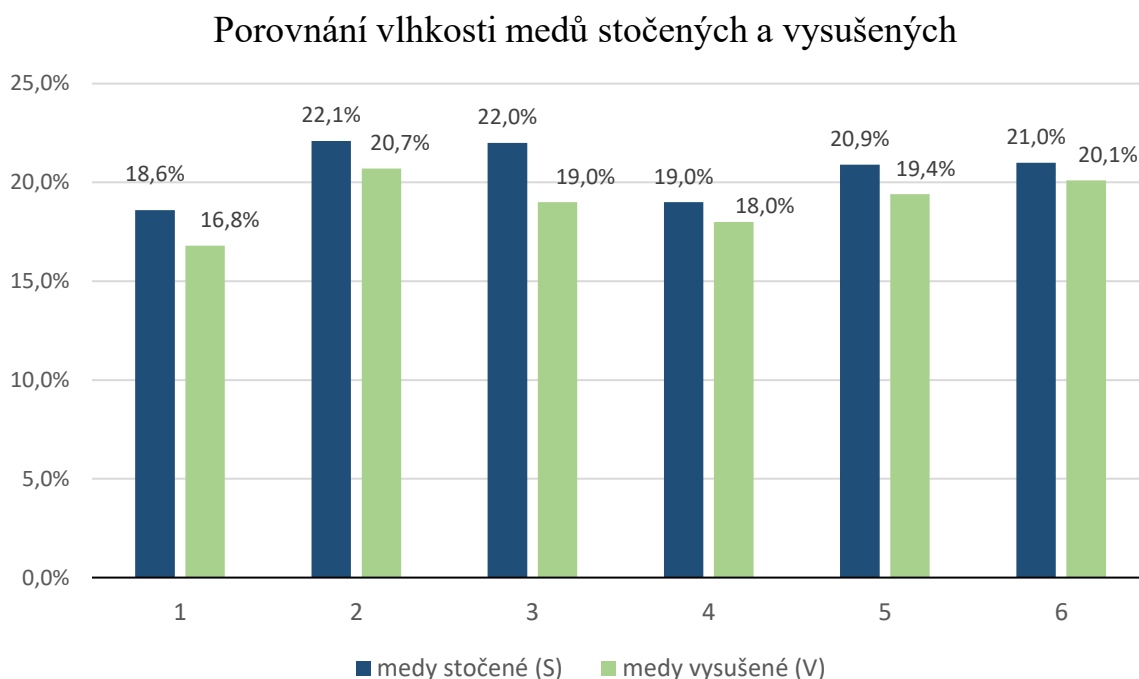


Obrázek č. 2: Schéma Petriho misky - stanovení MBC

5 Výsledky

5.1 Vlhkost refraktometricky

Vlhkost vybraných vzorků stočených medů (S) se pohybovala v rozmezí 18,6-22,1 %, průměrně byla vlhkost těchto medů 20,6 %. Vlhkost medů vysušených (V) se pohybovala v rozmezí 16,8-20,7 % a průměrná hodnota byla 19,0 %. Z těchto hodnot je patrný pokles obsahu vody medů po 12 hodinovém vysoušení o průměrně 1,7 %. V grafu jsou vyznačeny jednotlivé hodnoty vlhkosti všech 6 vzorků stočených a vysušených medů (obr. 3).

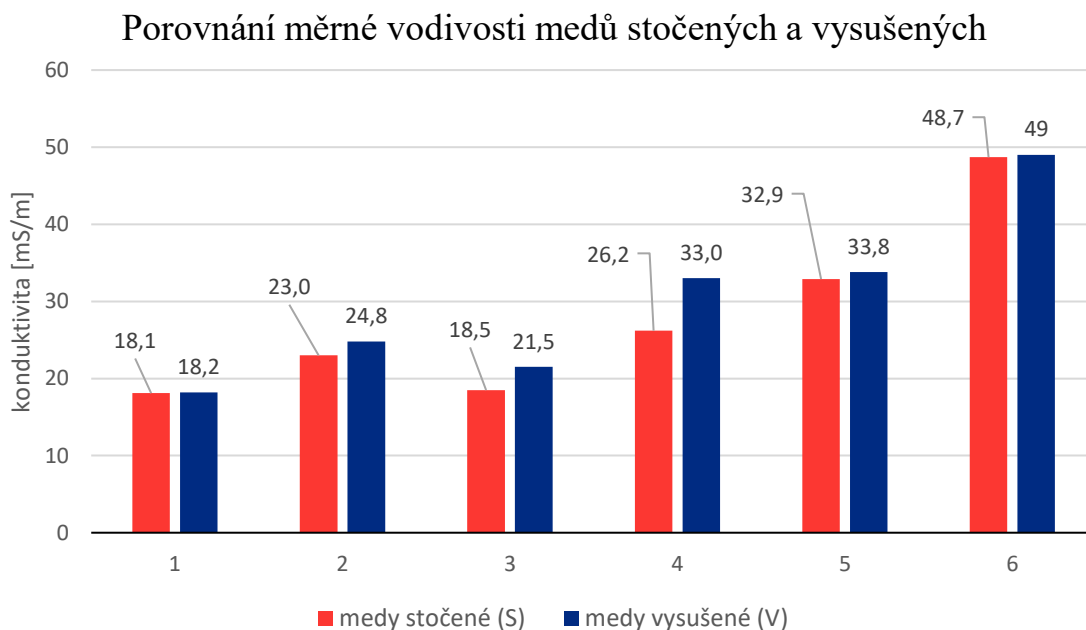


Obrázek č. 3: Graf - Porovnání vlhkosti medů stočených a vysušených

5.2 Měrná vodivost konduktometricky

Měrná vodivost vzorků stočených medů (S) se pohybovala v rozmezí 18,1-48,7 mS/m, průměrně byla 27,90 mS/m. Měrná vodivost vysušených medů (V) se pohybovala v rozmezí 18,2-49,0 mS/m a průměrně činila 30,05 mS/m. Z těchto hodnot je zřejmý vliv vysoušení na zvýšení měrné vodivosti v důsledku nižšího obsahu vody a tím větší koncentrace pevných vodivých částic. Průměrně se měrná vodivost zvýšila o 2,05 mS/m. Také můžeme pozorovat, že se hodnoty měrné vodivosti všech vzorků pohybovaly pod 80 mS/m, což je hodnota daná vyhláškou č. 76/2003 Sb., rozdělující

medy květové a medovicové. Potvrdilo nám to tedy, že se u všech testovaných vzorků opravdu jedná o medy květové. V grafu jsou znázorněny jednotlivé hodnoty měrné vodivosti všech vzorků stočených a vysušených medů (Obr. 4).

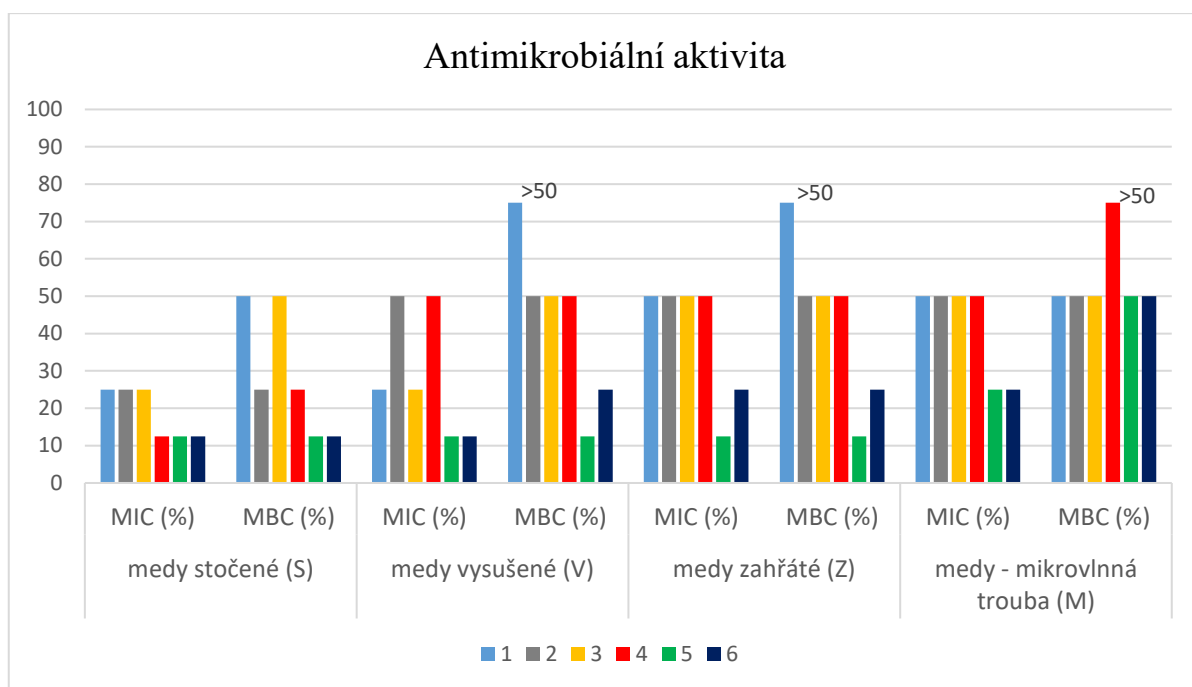


Obrázek č. 4: Graf – Porovnání měrné vodivosti medů stočených a vysušených

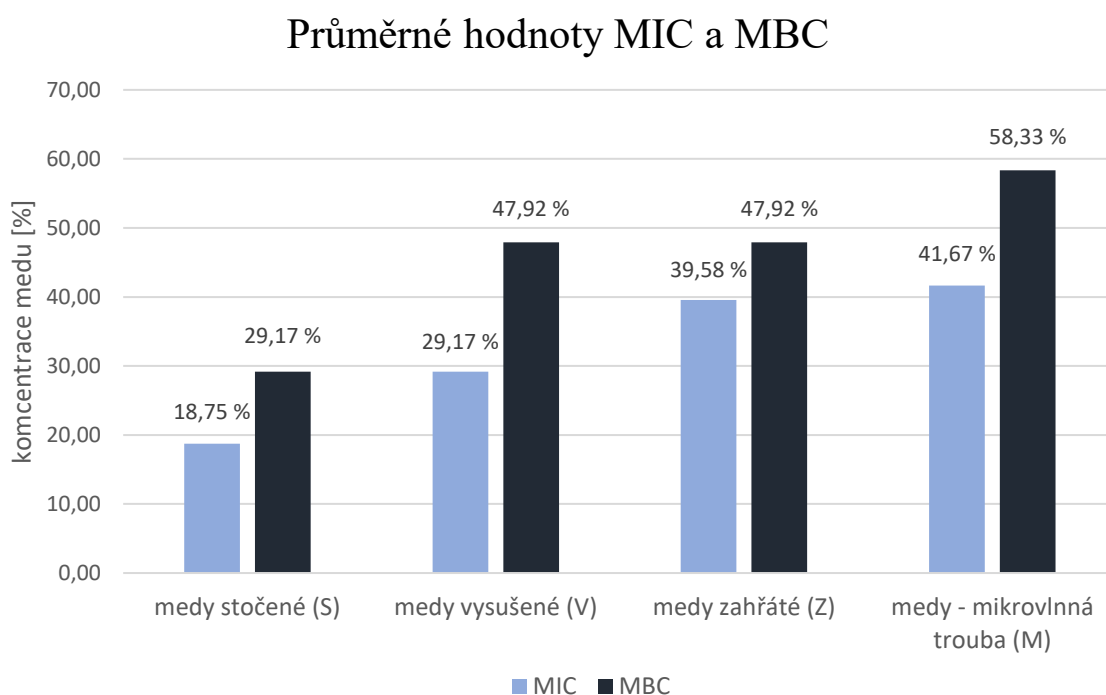
5.3 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita medů vůči bakterii *E. coli*, konkrétně antimikrobiální ukazatele MIC a MBC byly narozdíl od měření vlhkosti a měrné vodivosti, měřeny i u medů po zahřátí ve vodní lázni při 50 °C (Z) a u medů zahřátých v mikrovlnné troubě (M). Získali jsme tak hodnoty MIC a MBC 6 vzorků medů ve 4 různých úpravách. Jednotlivé hodnoty jsou znázorněny v grafu (obr. 5). U třech vzorků medů (1V, 1Z a 4M) vyšla hodnota MBC >50 %, což znamená, že se přesná hodnota MBC pohybuje někde mezi 50-100 %, jelikož nejvyšší možná testovaná hodnota byla 50 % a byla připravená ředěním medu 1:1 s médiem. Na druhou stranu žádný z testovaných vzorků nevykázal nižší MIC a MBC než 12,5 %.

Nejlépe lze vliv zpracování a zahřívání medů pozorovat v grafu sestaveném z průměrných hodnot MIC a MBC jednotlivých skupin medů (obr. 6). Je tam patrné, že největší antimikrobiální aktivita je u medů stočených, následně medů vysušených, pak zahřátých ve vodní lázni a nejmenší antimikrobiální aktivitu vykazují medy po zahřátí v mikrovlnné troubě.



Obrázek č. 5: Graf – Antimikrobiální aktivita



Obrázek č. 6: Graf – průměrné hodnoty MIC a MBC

5.4 Výsledky a vliv zpracování u jednotlivých vzorků

Vzorek č. 1 měl ze všech testovaných vzorků nejnižší obsah vody (ve stočené formě 18,6 % a po vysušení 16,8 %). Zároveň měl tento vzorek i nejnižší hodnotu měrné vodivosti (ve stočené formě 18,1 mS/m a ve vysušené formě 18,2 mS/m). Antimikrobiální aktivita tohoto vzorku patřila vzhledem k ostatním testovaným vzorkům k těm nižším, hodnota MIC se ani v nativním stočeném stavu nedostala pod 25 % a hodnoty MBC byly dokonce po vysušení i zahřátí ve vodní lázni >50 %.

Vzorek č. 2 měl nejvyšší obsah vody ze všech vzorků a to 22,1 % ve stočené formě a po vysušení se snížil na 20,7 %. Měrná vodivost byla před vysušením 23,0 mS/m a po vysušení 24,8 mS/m. Antimikrobiální aktivita i tohoto medu nepatřila mezi ty nejlepší. MIC a MBC 25 % vykazoval jen v nativním stočeném stavu a ve všech dalších úpravách měl MIC i MBC vždy 50 %.

Vzorek č. 3 měl obsah vody 22,0 % ve stočené a 19,0 % ve vysušené formě. Měrná vodivost byla 18,5 mS/m a po vysušení 21,5 mS/m. Tento med vzhledem k ostatním vzorkům také vykazoval nižší antimikrobiální aktivitu, MIC v nativní formě 25 % a MBC dokonce 50 %. Po dalších zpracováních byly obě hodnoty převážně 50 %.

Vzorek č. 4 měl obsah vody 19,0 % a po vysušení 18,0 %. Měrná vodivost 26,2 mS/m se po vysušení zvýšila na 33,0 mS/m. Tento vzorek vykazoval ve stočeném stavu poměrně velkou antimikrobiální aktivitu, ale po vysušení a zahřátí ve vodní lázni měl hodnotu MIC a MBC 50 % a po zahřátí v mikrovlnné troubě byla hodnota MBC dokonce >50 %.

Vzorek č. 5 měl obsah vody 20,9 %, po vysušení 19,4 %. Měrná vodivost 32,9 mS/m se po vysušení zvýšila na 33,8 mS/m. Tento vzorek vykazoval nejlepší antimikrobiální aktivitu i po všech zpracováních. Hodnotu MIC i MBC 12,5 % si udržel i po vysušení a zahřátí ve vodní lázni. Jen po zpracování v mikrovlnné troubě vystoupala hodnota MIC na 25 % a MBC na 50 %.

Vzorek č. 6 s vlhkostí 21,0 % před vysušením a 20,1 % po vysušení měl nejvyšší měrnou vodivost. Konkrétně 48,7 mS/m a 49,0 mS/m po vysušení. Tento vzorek vykazoval hned po vzorku č. 5 nejvyšší antimikrobiální aktivitu. Hodnoty MIC a MBC se pohybovaly ve všech úpravách kromě zahřátí v mikrovlnné troubě 12,5 % nebo 25 % a po zpracování v mikrovlnné troubě bylo MIC 25 % a MBC 50 %.

5.5 *Závislost vlhkosti a měrné vodivosti na antimikrobiální aktivitě*

V tabulce (tab. 6) je porovnáváno, jakou závislost má vlhkost medu na jeho antimikrobiální aktivitě. Je uveden obsah vody, MIC a MBC u vzorků stočených a vysušených medů. Vzorek s nejnižším obsahem vody (č. 1) měl jednu z nejnižších hodnot antimikrobiální aktivity stejně tak jako vzorky č. 2 a 3, které mají naopak jedny z nejvyšších obsahů vody. A ani ostatní vzorky neprokázaly žádnou souvislost mezi obsahem vody a následnou antimikrobiální aktivitou.

Tabulka č. 6: Závislost vlhkosti na antimikrobiální aktivitě

vzorek	obsah vody [%]		MIC [%]		MBC [%]	
	stočené	vysušené	stočené	vysušené	stočené	vysušené
1	18,6	16,8	25	25	50	>50
2	22,1	20,7	25	50	25	50
3	22,0	19,0	25	25	50	50
4	19,0	18,0	12,5	25	25	50
5	20,9	19,4	12,5	12,5	12,5	12,5
6	21,0	20,1	12,5	12,5	12,5	25

V tabulce (tab. 7) je uvedena závislost mezi měrnou vodivostí (konduktivitou) a antimikrobiální aktivitou. Opět jsou uvedeny parametry MIC, MBC a konduktivita stočených a vysušených vzorků medů. Vzorky č. 5 a 6 jsou vzorky s největší měrnou vodivostí a zároveň vykazují nejvyšší antimikrobiální aktivitu. Naopak vzorek č. 1 s nejnižší měrnou vodivostí vykazuje jednu z nejnižších antimikrobiálních aktivit.

Tabulka č. 7: Závislost konduktivity na antimikrobiální aktivitě

vzorek	konduktivita [mS/m]		MIC [%]		MBC [%]	
	stočené	vysušené	stočené	vysušené	stočené	vysušené
1	18,1	18,2	25	25	50	>50
2	23,0	24,8	25	50	25	50
3	18,5	21,5	25	25	50	50
4	26,2	33,0	12,5	25	25	50
5	32,9	33,8	12,5	12,5	12,5	12,5
6	48,7	49,0	12,5	12,5	12,5	25

6 Diskuze

Vlhkost vzorků byla stanovena metodikou vydanou IHC (2009) s menšími úpravami. Vlhkost medu je kritériem kvality, které určuje schopnost medu zůstat stabilní a odolávat kvašení, čím vyšší vlhkost, tím vyšší pravděpodobnost, že med při skladování kvasí, proto je žádoucí, aby měl med určený k dlouhodobému skladování co nejmenší obsah vody. Vlhkost 4 ze 6 vzorků stočených medů a 2 vzorků medů vysušených byla větší než 20 %, což je v Česku maximální povolená hodnota pro medovicové a květové medy daná vyhláškou č. 76/2003 Sb., kterou se stanovují požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. A na označení „Český med“ by musel být obsah vody podle normy jakosti č. ČSV 1/1999 vydané Českým svazem včelařů dokonce maximálně 18 %. 3 vzorky testovaných medů měly obsah vody dokonce ≥ 21 %, což je hranice pro kvašení medu a tyto medy by byly při delším skladování velmi náchylné ke zkvašení. Výsledky ukázaly, že po 12 hodinovém vysoušení klesl obsah vody u medů průměrně o 1,7 %, ale u výše zmíněných 2 vzorků to ani tak nebylo dostatečné, aby se dostaly pod 20 % a byly tak vhodné k dlouhodobému skladování.

Měrná vodivost byla stanovena podle metodiky IHC (2009) s menšími úpravami. Místo přípravy vzorku medu s 20 % obsahem sušiny do 100 ml odměrných baněk bylo množství přepočítáno a naváženo pro 50 ml odměrné baňky. Byla zvolena metoda korekce měrné vodivosti na konkrétní naměřenou teplotu, místo měření ve vodní lázni vytemperované na 20 °C. Všechny testované vzorky medu měly hodnotu měrné vodivosti nižší než 80 mS/m, což je přesná hodnota daná vyhláškou č. 76/2003 Sb., která rozděluje medy květové a medovicové. Laboratorně nám to potvrdilo tedy, že se opravdu jedná o medy květové. U všech vzorků byl patrný mírný nárůst hodnoty měrné vodivosti u vzorků vysušených medů.

Z mých výsledků vyplývá, že obsah vody mezi různými vzorky medů nekoreluje s měrnou vodivostí, ale že je měrná vodivost způsobena složením jednotlivých medů, konkrétně obsahem jejich minerálních látek a organických kyselin, které mají ve vodném roztoku schopnost disociovat na ionty nebo vést elektrickou energii (Živkov Baloš et al., 2018). Obsah vody hrál roli pouze u totožných vzorků po vysoušení, čímž se snížil obsah vody a pevné vodivé částice byly tak o trochu více koncentrované. Dva vzorky s největší měrnou vodivostí (vzorek č. 5 a 6) byly zároveň i vzorky s nejvyšší

antimikrobiální aktivitou. Vzorek č. 1, který měl nejnižší měrnou vodivost, měl zároveň i jednu z nejnižších antimikrobiálních aktivit. Tento fakt potvrzuje například i práce Vorlová et al. (2005), ve které bylo zjištěno, že čím vyšší je vodivost medu, tím vyšší je antimikrobiální aktivita. Potvrzuje to také, že české medy disponují peroxidázovou antimikrobiální aktivitou.

Výsledky studií potvrdily antibakteriální účinky medu proti širokému spektru aerobních, anaerobních, gram-pozitivních i gram-negativních bakterií. K testování antimikrobiální aktivity medů je možno podle Balouiri et al., (2016) použít mnoho metod, například difuzní diskové metody na agaru, Antimicrobial gradient method (Etest), jiné difuzní metody (Agar well diffusion method, Agar plug diffusion method,...) a různé ředící metody jako Broth dilution method, Agar dilution method a další. V našem případě byla pro testování antimikrobiálního potenciálu medu využita metoda sériového ředění, jelikož tato metoda umožňuje kvantitativní stanovení jak bakteriostatických, tak baktericidních účinků testovaných vzorků medu. Bakteriostatická aktivita je charakterizována parametrem MIC, zatímco baktericidní aktivita je charakterizována parametrem MBC. Pro stanovení MIC byla použita konkrétně metoda Broth microdilution assay v 96 jamkových mikrotitračních destičkách s plochým dnem a vyhodnocením spektrofotometricky dle Patton et al. (2006) s menšími modifikacemi. Výhodou mikro ředění bujónu je jeho vysoká přesnost, komerční dostupnost destiček, snadné testování a skladování destiček a možnost čtení výsledků přístrojově. Bakteriální kultura pro inokulaci destiček byla připravena dle Zainol et al. (2013). Příprava vzorků medu byla provedena podle Sherlock et al. (2010). Sherlock et al. (2010) ve své práci používá 12 sériové ředění 1:1 od koncentrace 50 % až do koncentrace $\cong$ 0,02 %. My jsme využili 6 sériové ředění s nejmenší koncentrací 1,563 %, což bylo v našem případě dostačující, jelikož žádný ze vzorků nevykazoval antimikrobiální aktivitu v nižší koncentraci než 12,5 %. Stanovení MBC bylo provedeno podle Szveda (2017) pomocí přetažení a kultivace bakterie *E. coli* na agarovém médiu.

Antimikrobiální aktivita medu je přisuzována několika nejdůležitějším faktorům, jako je nízký obsah vody, vysoký obsah cukrů, nízké pH – vysoký obsah organických kyselin, včelí peptidy, methylglyoxal, ale v českých medech převážně H₂O₂ tvořený enzymem glukózooxidáza. Studie ukazují, že tepelné zpracování medu má škodlivé účinky na antimikrobiální aktivitu.

V mé práci byl testován vliv vysoušení po dobu 12 hodin, zahřívání ve vodní lázni při 50 °C do ztekucení (přibližně 1 hod), zahřívání v mikrovlnné troubě na 250 W do ztekucení a porovnání těchto hodnot s původním medem stočeným. Antimikrobiální aktivita byla testována u bakterie *E. coli*, jakožto modelového organismu pro gram-negativní bakterie. Má práce tedy nepopisuje antimikrobiální účinky medu vůči gram-pozitivním bakteriím, na které může působit kromě nejdůležitějšího faktoru H₂O₂ i např. antimikrobiální peptidy, jako je defensin-1 (Kwakman a Zaat, 2012).

Mé výsledky ukázaly, že nejvyšší antimikrobiální aktivitu měly medy v nativní stočené formě, kde se hodnota MIC pohybovala mezi 12,5 až 25 %, hodnota MBC se pohybovala od 12,5-50 %. Po 12 hodinovém vysušení vykazovaly všechny medy o něco vyšší hodnoty MIC i MBC. Konkrétně se hodnota MIC vysoušením zvýšila průměrně o 10,42 % a hodnota MBC o průměrně 18,75 %.

Další významný nárůst průměrné koncentrace MIC a MBC vykazovaly medy zahřáté ve vodní lázni na 50 °C, které byly zahřívány 1 hodinu. Antimikrobiální aktivita se snížila jak v porovnání s medy stočenými, tak i vysušenými. Oproti nativním vzorkům se hodnota MIC průměrně zvýšila o 20,83 % a hodnota MBC průměrně o 18,75 %, což je totožné zvýšení MBC jako u vysušených vzorků medů. Podobné výsledky uvádí ve své práci např. Stojković et al. (2021), kteří uvedli, že tepelné zpracování medu při 30, 45 a 60 °C po dobu 1, 5 a 10 minut snížilo antibakteriální aktivitu medu mimo jiných bakterií i vůči bakterii *E. coli*, o čemž svědčí zvýšené hodnoty MIC a MBC. Ovšem testovaly medy medovicové, které se od květových medů liší různými parametry. Snížení antibakteriální aktivity tepelně zpracovaných květových medů vůči několika gram-negativním kmenům včetně *E. coli* potvrdili také Pimentel-González et al. (2017). Testovaly čtyři druhy medů pocházejících z různých geografických oblastí státu Hidalgo v Mexiku, které byly tepelně zpracovány při 40, 50, 60, 70 a 80 °C po dobu 45 minut. Pozorovali snížení antimikrobiální aktivity u všech vzorků medů zahřátých na 60 °C a výše. Oproti mým výsledkům však nepotvrdili významné snížení antimikrobiální aktivity po zahřívání na 50 °C.

Vzhledem k poměrně podobné zeměpisné poloze, by mohly být mé výsledky dobře porovnatelné s prací Majkut et al. (2021), kteří testovali baktericidní účinky polských květových medů pomocí ukazatele MBC proti 6 bakteriálním kmenům včetně *E. coli*. Medy byly podrobeny tepelnému ošetření při 22, 42, 62, 82 a 100 °C po dvě doby expozice. Jejich výsledky ukázaly významné snížení antimikrobiálních vlastností (MBC) při 82 °C a 62 °C po 15 a 120 minutách expozice u většiny vzorků. Jahan et al.

(2015) také testovali antimikrobiální aktivitu květových medů vůči gram-negativním bakteriím (včetně *E. coli*). Prokázali snížení antimikrobiální aktivity po zahřívání na 50, 70 a 90 °C. Oproti mé práci, ale zahřívali medy po mnohem delší dobu, konkrétně po 12 hodin. Mé výsledky ukazují, že i 12krát nižší čas zahřívání vede k těmto změnám. V rozporu s mými výsledky je však práce Bucekova et al. (2018a). Jejich výsledky ukázali, že tepelné zkapalňování při teplotách 45, 55 a 65 °C, které se běžně v praxi využívá, neovlivňuje celkovou antibakteriální aktivitu medu. Netestovali však účinky proti bakterii *E. coli*, ale proti gram-negativní bakterii *Pseudomonas aeruginosa*.

Největší hodnoty MIC a MBC (tedy nejnižší antimikrobiální aktivitu) vykazovaly medy po zahřátí v mikrovlnné troubě na 250 W do ztekucení. Jednotlivé medy se lišily svou konzistencí, proto byly zahřívány po odlišnou dobu, aby se zamezilo přehřívání a karamelizaci některých ze vzorků. Zahřívány byly v časovém rozmezí 60-120 s. Mikrovlnné ztekucení prokázalo zvýšení hodnoty MIC vůči nativním stočeným vzorkům o průměrně 22,92 %. MBC se zvýšilo průměrně o 29,16 %. Došlo tedy ke dvojnásobnému nárůstu těchto hodnot oproti vzorkům nativním. Mé výsledky negativního vlivu mikrovlnného zahřívání na antimikrobiální aktivitu potvrzuje např. Bucekova et al. (2018b). Jejich vzorky byly ošetřeny v mikrovlnné troubě při 800, 400 a 80 W po dobu 10, 30, 50, 60, 120 a 180 s. Antimikrobiální aktivita byla studována jako MIC, ale pouze proti *Pseudomonas Aeruginosa* a *Staphylococcus Aureus*. Mikrovlnné zpracování snížilo antibakteriální aktivitu medu. Negativní vliv mikrovlnného zpracování na antimikrobiální aktivitu proti bakterii *E. coli* potvrzuje také studie Jaradat et al. (2022).

Obecně jako nejlepší z hodnocených vzorků se ukázal vzorek č. 5, který si udržel nejvyšší antimikrobiální aktivitu i po všech zmíněných zpracováních. Hodnota MIC a MBC zůstala 12,5 % i po vysušení a zahřívání ve vodní lázni. Jen po ztekucení v mikrovlnné troubě stoupla hodnota MIC na 25 % a MBC na 50 %. Tento vzorek je sice v nativní formě nevyhovující vzhledem k vyššímu obsahu vody nad 20 %, ale ve vysušené formě s obsahem vody 19,4 % se jedná o med s vysokou antimikrobiální aktivitou a dobrou stálostí vzhledem ke kvašení. Jen o něco málo nižší antimikrobiální aktivitu měl vzorek č. 6, který opět jako ostatní vzorky potvrdil, že mikrovlnné zahřívání má nejvýznamnější negativní dopad na antimikrobiální aktivitu medů. Naopak nejnižší antimikrobiální aktivitu vykazoval vzorek č. 1 s nejmenším obsahem vody 18,6 % a 16,8 % po vysušení. Nebylo tedy ani prokázáno, že nízký obsah vody sám o

sobě hraje velkou roli pro antimikrobiální aktivitu, ale že závisí na celkovém složení medu a co nejšetrnějším tepelném zpracování.

7 Závěr

Byl stanoven obsah vody a měrné vodivosti u 6 vzorků květových stočených medů a těchto medů po vysoušení (12 hod). Ukázalo se, že 12 hodinové vysoušení medů snížilo obsah vody o průměrně 1,7 %. Naopak vysušené vzorky medů vykazovaly zvýšení hodnoty měrné vodivosti, a to o průměrně 2,05 mS/m. Dále se ukázalo, že vlhkost 4 ze 6 vzorků stočených medů a 2 vzorků medů vysušených přesáhla hodnotu 20 %, která je dána vyhláškou č. 76/2003 Sb. a nejsou tak určeny k dlouhodobému skladování. Všechny testované vzorky medu měly hodnotu měrné vodivosti nižší než 80 mS/m, což je podle vyhlášky č. 76/2003 Sb. hodnota, která rozděluje medy květové a medovicové. Laboratorně jsme tedy potvrdili, že se jedná opravdu o medy květové.

Cílem mé bakalářské práce bylo zjistit, jaký vliv má manipulace a zpracování medu na jeho antimikrobiální aktivitu u bakterie *E. coli*. Byly stanoveny 2 její ukazatele: Minimální inhibiční koncentrace, která udává bakteriostatické účinky a Minimální baktericidní koncentrace, která udává baktericidní účinky medu. Testoval se konkrétně vliv vysoušení (12 hod), zahřívání ve vodní lázni při 50 °C do ztekucení a zahřívání v mikrovlnné troubě při 250 W do ztekucení. Ukázalo se, že všechny tyto tepelné úpravy výrazně snížily antimikrobiální aktivitu u všech medů. Nejmenší vliv se projevil po 12 hodinovém vysoušení, o něco větší snížení antimikrobiální aktivity nastalo po zahřívání ve vodní lázni. A největší nárůst hodnoty ukazatelů MIC i MBC, tedy nejnižší antimikrobiální aktivitu, vykazovaly medy po mikrovlnném zahřívání.

Získané výsledky tedy potvrdily mou hypotézu, že manipulace a zpracování medů ovlivňuje antimikrobiální aktivitu vůči bakterii *E. coli* a to negativně. V praxi je proto vhodné ověřit obsah vlhkosti medu ještě před stáčením a stáčet jen zralé medy, čímž se vyhneme nutnosti jejich následného vysoušení. Dále dát přednost zahřívání bez využití mikrovlnného záření s co nejnižší možnou teplotou po co nejkratší dobu.

8 Seznam literatury

1. ADAMS, C.J., MANLEY-HARRIS, M., MOLAN, P.C., 2009. The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. Carbohydrate Research. 344(8), 1050-1053. DOI: 10.1016/j.carres.2009.03.020. ISSN 00086215.
2. ADIMASU ABESHU, M., 2015. Medicinal Uses of Honey. Biology and Medicine. 08(02). DOI: 10.4172/0974-8369.1000276. ISSN 09748369.
3. AJIBOLA, A., CHAMUNORWA, J.P., ERLWANGER, K.H., 2012. Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. Nutrition & Metabolism. 9(1). DOI: 10.1186/1743-7075-9-61. ISSN 1743-7075.
4. ALAERJANI, W.M.A. et al., 2022. Biochemical Reactions and Their Biological Contributions in Honey. Molecules. 27(15). DOI: 10.3390/molecules27154719. ISSN 1420-3049.
5. ALMASAUDI, S., 2021. The antibacterial activities of honey. Saudi Journal of Biological Sciences. 28(4), 2188-2196. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.10.017. ISSN 1319562X.
6. ALVAREZ-SUAREZ, J.M., TULIPANI, S., ROMANDINI, S., BERTOLI, E., BATTINO, M., 2010. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism. 3(1), 15-23. DOI: 10.1007/s12349-009-0051-6. ISSN 1973-798X.
7. ALQARNI, A.S., OWAYSS, A.A., MAHMOUD, A.A., 2016. Physicochemical characteristics, total phenols and pigments of national and international honeys in Saudi Arabia. Arabian Journal of Chemistry. 9(1), 114-120. DOI: 10.1016/j.arabjc.2012.11.013. ISSN 18785352.
8. BALOUIRI, M., SADIKI, M., IBNSOUDA, S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. 6(2), 71-79. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005. ISSN 20951779.

9. BIZERRA, F.C., DA SILVA, P.I., HAYASHI, M.A.F., 2012. Exploring the antibacterial properties of honey and its potential. *Frontiers in Microbiology*. 3. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00398. ISSN 1664-302X.
10. BODOR, Z., BENEDEK, C., URBIN, Á., SZABÓ, D., SIPOS, L., 2021. Colour of honey: can we trust the Pfund scale? – An alternative graphical tool covering the whole visible spectra. *LWT*. 149. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111859. ISSN 00236438.
11. BOGDANOV, S., 2009. Honey composition. *The honey book: Bee Product Science*. 1(9).
12. BORMASHENKO, E.Y., 2018. *Wetting of Real Surfaces*. Second. De Gruyter Studies in Mathematical Physics, 19. ISBN 311058106X.
13. BRUDZYNSKI, K., ABUBAKER, K., LAURENT, M., CASTLE, A., 2011. Re-Examining the Role of Hydrogen Peroxide in Bacteriostatic and Bactericidal Activities of Honey. *Frontiers in Microbiology*. 2. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00213. ISSN 1664-302X.
14. BRUDZYNSKI, K., 2021. Honey as an Ecological Reservoir of Antibacterial Compounds Produced by Antagonistic Microbial Interactions in Plant Nectars, Honey and Honey Bee. *Antibiotics*. 10(5). DOI: 10.3390/antibiotics10050551. ISSN 2079-6382.
15. BUCEKOVA, M. et al., 2018a. Effect of thermal liquefying of crystallised honeys on their antibacterial activities. *Food Chemistry*. 269, 335-341. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.07.012. ISSN 03088146.
16. BUCEKOVA, M. et al., 2018b. Microwave processing of honey negatively affects honey antibacterial activity by inactivation of bee-derived glucose oxidase and defensin-1. *Food Chemistry*. 240, 1131-1136. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.08.054. ISSN 03088146.
17. CONFORTI, P.A., LUPANO, C.E., MALACALZA, N.H., ARIAS, V., CASTELLS, C.B., 2006. Crystallization of Honey at -20°C . *International Journal of Food Properties*. 9(1), 99-107. DOI: 10.1080/10942910500473962. ISSN 1094-2912.

18. CRANE, E., KIRK VISSCHER, P., 2009. Honey. Encyclopedia of Insects. Elsevier, 2009, 459-461. DOI: 10.1016/B978-0-12-374144-8.00130-2. ISBN 9780123741448.
19. 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. 2003. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-76#oddil2>
20. DONNENBERG, M.S., 2013. Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis. Second edition. Academic Press. ISBN 978-0-12-397048-0.
21. FRANK, R., 2010. Zázračný med. [Líbeznice]: Víkend. ISBN 978-80-7433-024-7.
22. GIERTLI, A., 2010. Med - zázračný lék. Bratislava: Eugenika. ISBN 978-80-8100-182-6.
23. GOERING, R.V., DOCKRELL, H.M., ZUCKERMAN, M., ROITT, I.M., CHIODINI, P.L., 2016. Mimsova lékařská mikrobiologie. 5. vydání. Triton. ISBN 9788073879280.
24. GRUNA, B., 2020. Včelí pastva a její zdroje, s. 7-77. In: GRUNA B. et al.: Včelařství svazek 3. Vydání 1. Praha: Pracovní společnost nástavkových včelařů CZ, z.s. 193 s. ISBN: 978-80-907079-3-1.
25. HORÁČEK, J., 2000. Základy lékařské mikrobiologie. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0006-4.
26. IHC, 2009. Harmonised methods of the international honey commission [online]. bee-hexagon.net [cit. 2023-44]. Dostupné z: <https://www.ihcplatform.net/ihcmethods2009.pdf>
27. JAHAN, N., ISLAM, M.A., ALAM, F., GAN, S.H., KHALIL, M.I., 2015. Prolonged heating of honey increases its antioxidant potential but decreases its antimicrobial activity. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 12(4), 134-144. DOI: 10.4314/ajtcam.v12i4.20. ISSN 0189-6016.
28. JARADAT, Z., KHATAYBEH, B., GHZAWI, A.M.A., ABABNEH, Q., AL NABUSLI, A., 2022. Molecular identification of major bacteria in honey and the

- effect of microwave treatment on its microbial quality and antibacterial activity. *AIMS Agriculture and Food*. 7(3), 594-613. DOI: 10.3934/agrfood.2022037. ISSN 2471-2086.
29. JULÁK, J., 2012. *Klinicky významné bakterie*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-588-6.
 30. KAPOULAS, V.M., MASTRONICOLIS, S.K., GALANOS, D.S., 1977. Identification of the lipid components of honey. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 163(2), 96-99. DOI: 10.1007/BF01126025. ISSN 0044-3026.
 31. KHALIL, M.I., SULAIMAN, S.A., BOUKRAA, L., 2010. Antioxidant Properties of Honey and Its Role in Preventing Health Disorder. *The Open Nutraceuticals Journal*. 3(1), 6-16. DOI: 10.2174/1876396001003010006. ISSN 18763960.
 32. KOLÁŘOVÁ, L. et al., 2020. *Obecná a klinická mikrobiologie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-477-4.
 33. KRAMÁŘ, R., 2007. *Lékařská mikrobiologie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta. ISBN 978-80-7394-021-8.
 34. KWAKMAN, P.H.S., ZAAT, S.A.J., 2012. Antibacterial components of honey. *IUBMB Life*. 64(1), 48-55. DOI: 10.1002/iub.578. ISSN 15216543.
 35. MACHADO DE-MELO, A.A., ALMEIDA-MURADIAN, L.B. de, SANCHÓ, M.T., PASCUAL-MATÉ, A., 2018. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*. 57(1), 5-37. DOI: 10.1080/00218839.2017.1338444. ISSN 0021-8839.
 36. MAJKUT, M. et al., 2021. Antimicrobial activity of heat-treated Polish honeys. *Food Chemistry*. 343. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128561. ISSN 03088146.
 37. MAJTAN, J., 2014. Honey: An immunomodulator in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 22(2), 187-192. DOI: 10.1111/wrr.12117. ISSN 10671927.

38. MANDAL, M.D., MANDAL, S., 2011. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1(2), 154-160. DOI: 10.1016/S2221-1691(11)60016-6. ISSN 22211691.
39. MONIRUZZAMAN, M. et al., 2014. Identification of Phenolic Acids and Flavonoids in Monofloral Honey from Bangladesh by High Performance Liquid Chromatography: Determination of Antioxidant Capacity. *BioMed Research International*. 2014, 1-11. DOI: 10.1155/2014/737490. ISSN 2314-6133.
40. PAPA, G. et al., 2022. The Honey Bee *Apis mellifera*: An Insect at the Interface between Human and Ecosystem Health. *Biology*. 11(2). DOI: 10.3390/biology11020233. ISSN 2079-7737.
41. PATTON, T., BARRETT, J., BRENNAN, J., MORAN, N., 2006. Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *Journal of Microbiological methods*, 64(1), 84-95.
42. PAVLOVA, T. et al., 2018. Quality characteristics of honey: a review. *Proc. Of University Of Ruse*, 57, 31-35.
43. PIMENTEL-GONZÁLEZ, D.J. et al., 2017. Effect of Thermal Processing on Antibacterial Activity of Multifloral Honeys. *Journal of Food Process Engineering*. 40(1). DOI: 10.1111/jfpe.12279. ISSN 01458876.
44. PŘIDAL, A., 2003. *Včelí produkty*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-715-7717-0.
45. PŘIDAL, A., 2020. *Včelí produkty*. In: GRUNA B. et al. *Včelařství svazek 3*. Vydání 1. Praha: Pracovní společnost nástavkových včelařů CZ z.s. ISBN: 978-80-907079-3-1.
46. PŘIDAL, A., VORLOVA, L., 2002. Honey and its physical parameters. *Czech Journal of Animal Science*. 47(10), 439-444.
47. SAMARGHANDIAN, S., FARKHONDEH, T., SAMINI, F., 2017. Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research. *Pharmacognosy Research*. 9(2), 121–127.

48. SCHINDLER, J., 2014. Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4771-2.
49. SHERLOCK, O., DOLAN, A., ATHMAN, R., POWER, A., GETHIN, G., COWMAN, S., HUMPHREYS, H., 2010. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC complementary and alternative medicine*, 10(1), 1-5.
50. SILVA, V.M.D., CARVALHO, L.A.D., OLIVEIRA, N.L.D., TORRES FILHO, R.D.A., RESENDE, J.V.D., 2016. Rheological and Thermal Properties of Selected Brazilian Honeys from Various Floral Origins. *Journal of Texture Studies*. 47(3), 208-219. DOI: 10.1111/jtxs.12174. ISSN 00224901.
51. SOLAYMAN, M. et al., 2016. Physicochemical Properties, Minerals, Trace Elements, and Heavy Metals in Honey of Different Origins: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15(1), 219-233. DOI: 10.1111/1541-4337.12182. ISSN 15414337.
52. STOJKOVIĆ, M. et al., 2021. Changes in the physicochemical, antioxidant and antibacterial properties of honeydew honey subjected to heat and ultrasound pretreatments. *Journal of Food Science and Technology*. 58(7), 2555-2566. DOI: 10.1007/s13197-020-04762-2. ISSN 0022-1155.
53. SZWEDA, P., 2017. Antimicrobial activity of honey. *Honey analysis*, 1, 215-232.
54. TITĚRA, D., 2006. Včelí produkty mýtů zbavené: med, vosk, pyl, mateří kašička, propolis, včelí jed. Praha: Ve spolupráci s Českým svazem včelařů vyd. nakl. Brázda. ISBN 80-209-0347-X.
55. VESELÝ, V. et al., 2003. Včelařství. Vydání druhé. Praha: Brázda. ISBN 80-209-0320-8.
56. VORLOVÁ, L., KARPÍŠKOVÁ, R., CHABINIOKOVÁ, I., KALÁBOVÁ, K., BRÁZDOVÁ, Z., 2005. The antimicrobial activity of honeys produced in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*. 50(8), 376-384. DOI: 10.17221/4180-CJAS. ISSN 12121819.

57. VOTAVA, M. at al., 2006. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: Neptun. ISBN 80-902-8966-5.
58. VOTAVA, M., 2010. Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody. Brno: Neptun. ISBN ISBN978-80-86850-04-8.
59. WADI, M.A., MEHMOOD, K., 2022. In Vitro Antibacterial Activity of Different Honey Samples against Clinical Isolates. BioMed Research International. 2022, 1-8. DOI: 10.1155/2022/1560050. ISSN 2314-6141.
60. YANNIOTIS, S., SKALTSI, S., KARABURNIOTI, S., 2006. Effect of moisture content on the viscosity of honey at different temperatures. Journal of Food Engineering. 72(4), 372-377. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2004.12.017. ISSN 02608774.
61. ZAINOL, M. I., YUSOFF, K. M., & YUSOF, M. Y. M., 2013. Antibacterial activity of selected Malaysian honey. BMC complementary and alternative medicine, 13(1), 1-10.
62. ZENTRICH, J.A., 2003. Apiterapie: přírodní léčba včelími produkty. Praha: Eminent. ISBN 80-728-1104-5.
63. ŽIVKOV BALOŠ, M. et al., 2018. Electrical conductivity and acidity of honey. Archives of Veterinary Medicine. 11(1), 91-101. DOI: 10.46784/e-avm.v11i1.20. ISSN 2683-4138.

9 Seznam tabulek a obrázků

9.1 Tabulky

Tabulka č. 1:	Průměrný obsah cukrů v medu
Tabulka č. 2:	Rozsah hodnot minerálních látek obsažených v běžných medech
Tabulka č. 3:	Nejvýznamnější patogenní kmeny <i>E. coli</i>
Tabulka č. 4:	Vztah mezi obsahem vody v medu a indexem lomu
Tabulka č. 5:	Rozvržení 96 jamkové mikrotitrační destičky
Tabulka č. 6:	Závislost vlhkosti na antimikrobiální aktivitě
Tabulka č. 7:	Závislost konduktivity na antimikrobiální aktivitě

9.2 Obrázky

Obrázek č. 1:	Mikrotitrační destička
Obrázek č. 2:	Schéma Petriho misky - stanovení MBC
Obrázek č. 3:	Graf - Porovnání vlhkosti medů stočených a vysušených
Obrázek č. 4:	Graf – Porovnání měrné vodivosti medů stočených a vysušených
Obrázek č. 5:	Graf – Antimikrobiální aktivita
Obrázek č. 6:	Graf – průměrné hodnoty MIC a MBC

10 Seznam použitých zkratk

CCM	Czech Collection of Microorganisms (Česká sbírka mikroorganismů)
DAEC	difúzně adherentní <i>E. coli</i>
EAEC	enteroagregativní <i>E. coli</i>
EHEC	enterohemoragické <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvazivní <i>E. coli</i>
EPEC	enterotoxigenní <i>E. coli</i>
ETEC	enteropatogenní <i>E. coli</i>
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HMF	hydroxymethylfurfural
IMC	infekce močových cest
MBC	minimální baktericidní koncentrace
McF	McFarland
MGO	methylglyoxal
MIC	minimální inhibiční koncentrace
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
STEC	shigatoxigenní <i>E. coli</i>
UPEC	uropatogenní <i>E. coli</i>