

# Mikroflóra medu a včelích produktů

Markéta Mrázová

---

Bakalářská práce  
2022

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Markéta Mrázová**  
Osobní číslo: **T19164**  
Studijní program: **B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin**  
Specializace: **Potravinářské biotechnologie a aplikovaná mikrobiologie**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Mikroflóra medu a včelích produktů**

## Zásady pro vypracování

*Teoretická část:*

Med a včelí produkty – charakteristické vlastnosti, složení, produkce

Mikroorganismy v medu a včelích produktech

Možnosti stanovení mikroorganismů v medu a včelích produktech

*Praktická část:*

Příprava vzorků pro mikrobiologickou analýzu

Stanovení přítomnosti mikroorganismů ve vzorcích medu a včelích produktů

Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

### Seznam doporučené literatury:

#### *Literature:*

Grabowski, M.T., Klein, G. Microbiology and food borne pathogens in honey. *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, 57: 1852-1862, 2017.

Corby-Harris, V., Maes, P., Anderson, K.E. The bacterial communities associated with wild honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLOS One*, 9: e95056, 2014.

Kačíniová, M., Pavličová, S., Haščík, P., et al. Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 56: 285-295, 2009.

Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně.

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Leona Buřková, Ph.D.  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: 31. prosince 2021

Termín odevzdání bakalářské práce: 20. května 2022

L.S.

---

prof. Ing. Raman Černáček, Ph.D.  
děkan

---

prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.  
ředitel Ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2022

# PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ 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

Tato bakalářská práce se zabývá mikroflórou medu se zaměřením na výskyt bakterií *Clostridium botulinum* a jejich detekci využitím metod molekulární biologie. Teoretická část popisuje základní poznatky včelařství a jeho historii, proces vzniku a charakteristiku medu a dalších včelích produktů. Část je věnována také mikrobiologii medu, jeho antimikrobiálním účinkům, a především způsobům případné kontaminace, s čímž souvisí i možný výskyt bakterií *Clostridium botulinum*. Tyto bakterie jsou ve spojení s medem nebezpečné zejména pro děti do jednoho roku z důvodu vzniku onemocnění zvaného kojenecký botulismus. Praktická část je věnována převážně molekulárním metodám, které byly využity k analýze 15 vzorků medů na výskyt výše zmíněné bakterie. V žádném z testovaných vzorků medů nebyla zjištěna přítomnost *Clostridium botulinum*. Výsledek byl ověřen také kultivačně plotnovou metodou s následnou identifikací pomocí hmotnostní spektrometrické metody MALDI-TOF. Tato metoda opět neidentifikovala žádnou z kolonií jako *Clostridium botulinum*. Z kolonií, které se identifikovat podařilo, měl převážné zastoupení sporulující *Bacillus*.

Klíčová slova: med, mikroflóra, včely, včelí produkty, *Clostridium botulinum*, botulotoxin, molekulární biologie, PCR, MALDI-TOF

## ABSTRACT

This bachelor thesis deals the microflora of honey with a focus on the occurrence of *Clostridium botulinum* bacteria and its detection using molecular biology methods. The theoretical part deals with the basic knowledge of beekeeping and its history, the process of origin and characteristics of honey and other bee products. The part is also devoted to the microbiology of honey, its antimicrobial effects, and especially the methods of possible contamination, which is related to the possible occurrence of *Clostridium botulinum* bacteria, which are associated with honey, especially for children under one year, due to a disease called infant botulism. The practical part is devoted mainly to molecular methods, which were used to analyze 15 samples of honey for the presence of the above-mentioned bacteria. *Clostridium botulinum* wasn't present in any of the samples tested. The result was also verified by a culture plate method followed by identification using the MALDI-TOF method. Again, this method did not identify any of the colonies as *Clostridium botulinum*. The sporeforming *Bacillus* was the predominant of the identified colonies.

Keywords: honey, microflora, bees, honeybee products, *Clostridium botulinum*, botulinum toxin, molecular biology, PCR, MALDI-TOF

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí prof. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za cenné rady při psaní této práce, čas, který mi věnovala, a především její trpělivost. Velký dík patří také laborantkám Ing. Veronice Kubačové a Ing. Olze Vlčkové za pomocnou ruku při měření praktické části. Dále chci poděkovat všem včelařům, kteří mi byli ochotni poskytnout vzorky medů ze svých zásob a v neposlední řadě také rodině, svému partnerovi a přátelům za jejich podporu během studia.

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

# OBSAH

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ÚVOD</b> .....                                  | <b>10</b> |
| <b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....                     | <b>11</b> |
| <b>1 HISTORIE A PŮVOD VČELÍCH PRODUKTŮ</b> .....   | <b>12</b> |
| 1.1 VČELAŘSTVÍ.....                                | 12        |
| 1.1.1 Historie .....                               | 12        |
| 1.2 ŽIVOT V ÚLU .....                              | 13        |
| 1.2.1 Matka.....                                   | 13        |
| 1.2.2 Trubec .....                                 | 14        |
| 1.2.3 Dělnice .....                                | 14        |
| <b>2 MED</b> .....                                 | <b>16</b> |
| 2.1 CHARAKTERISTIKA MEDU .....                     | 16        |
| 2.2 DĚLENÍ MEDŮ.....                               | 16        |
| 2.3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ MEDU.....                     | 17        |
| 2.3.1 Sacharidy .....                              | 17        |
| 2.3.2 Voda .....                                   | 18        |
| 2.3.3 Kyseliny .....                               | 18        |
| 2.3.4 Minerální látky .....                        | 18        |
| 2.3.5 Další látky .....                            | 18        |
| <b>3 MIKROBIOLOGIE MEDU</b> .....                  | <b>19</b> |
| 3.1 GASTROINTESTINÁLNÍ TRAKT VČEL .....            | 19        |
| 3.2 HYGIENA MEDU.....                              | 20        |
| 3.3 ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA MEDU .....            | 20        |
| <b>4 KOJENECKÝ BOTULISMUS</b> .....                | <b>21</b> |
| 4.1 <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> .....             | 21        |
| 4.2 PROJEVY ONEMOCNĚNÍ .....                       | 22        |
| 4.3 BOTULOTOXIN.....                               | 22        |
| <b>5 DALŠÍ VČELÍ PRODUKTY</b> .....                | <b>23</b> |
| 5.1 VOSK.....                                      | 23        |
| 5.2 PROPOLIS .....                                 | 23        |
| 5.3 MATEŘÍ KAŠIČKA .....                           | 23        |
| 5.4 VČELÍ JED.....                                 | 24        |
| <b>6 VYBRANÉ METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE</b> ..... | <b>25</b> |
| 6.1 IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN .....               | 25        |
| 6.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE .....             | 25        |
| 6.3 ELEKTROFORÉZA.....                             | 26        |



|  |           |
|--|-----------|
| <b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....                               | <b>28</b> |
| <b>7 CÍL PRÁCE</b> .....                                     | <b>29</b> |
| <b>8 METODIKA A MATERIÁL</b> .....                           | <b>30</b> |
| 8.1 TESTOVANÉ DRUHY MEDU.....                                | 30        |
| 8.2 IZOLACE DNA.....   | 31        |
| 8.3 STANOVENÍ KONCENTRACE DNA .....                          | 32        |
| 8.4 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE .....                       | 33        |
| 8.4.1 Přístroje, pomůcky, chemikálie.....                    | 33        |
| 8.4.2 Postup.....  | 34        |
| 8.5 ELEKTROFORÉZA.....                                       | 35        |
| 8.5.1 Přístroje pomůcky a chemikálie .....                   | 35        |
| 8.5.2 Postup.....  | 35        |
| 8.6 KULTIVAČNÍ STANOVENÍ PLOTNOVOU METODOU .....             | 36        |
| 8.6.1 Přístroje pomůcky a chemikálie .....                   | 36        |
| 8.6.2 Příprava kultivačních půd .....                        | 37        |
| 8.6.3 Postup.....  | 37        |
| 8.7 MALDI TOF .....  | 38        |
| 8.7.1 Přístroje pomůcky a chemikálie .....                   | 38        |
| 8.7.2 Postup.....  | 38        |
| <b>9 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....                            | <b>39</b> |
| 9.1 IZOLACE DNA ZE VZORKU A STANOVENÍ JEJÍ KONCENTRACE ..... | 39        |
| 9.2 PCR S ELEKTROFORETICKÝM OVĚŘENÍM .....                   | 40        |
| 9.3 KULTIVAČNÍ STANOVENÍ.....                                | 42        |
| 9.4 IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ .....                        | 43        |
| 9.5 SOUHRNNÁ DISKUZE .....                                   | 45        |
| <b>ZÁVĚR</b> .....   | <b>47</b> |
| <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....                       | <b>48</b> |
| <b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....              | <b>50</b> |
| <b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....                                  | <b>51</b> |
| <b>SEZNAM TABULEK</b> .....                                  | <b>52</b> |

## ÚVOD

Med je produktem dokonale fungujícího společenství včel medonosných (*Apis mellifera*), který získává, řadou procesů a náročnou prací včel, svou charakteristickou podobu z nektaru nebo medovice a dalších specifických látek. Je jednou z nejstarších složek lidské potravy, na které si už od pradávna pochutnávali naši předkové. Mimo to byl vždy ceněným i pro své širokospektrální léčivé účinky. Nejen proto nachází hojné využití v potravinářství, ale také ve farmacii či kosmetickém průmyslu. Mimo med jsou dalšími produkty včelí výroby například mateří kašička, propolis, nebo včelí vosk.

Další charakteristikou medu je jeho vysoká antimikrobiální aktivita. Ta má za následek předcházení mikrobiálnímu kažení. To ovšem neznamená, že se v medu nemohou vyskytovat žádné mikroorganismy. Příkladem mohou být například sporotvorné bakterie *Clostridium botulinum*, způsobující kojenecký botulismus. Právě z tohoto důvodu není vhodné, aby děti do jednoho roku med konzumovaly.

Včely mají v přírodě významné postavení a určitým způsobem nenahraditelnou funkci. Mimo produkci medu a dalších produktů je jejich neodmyslitelnou úlohou opylování rostlin, čímž zabezpečují jejich další život. Teoreticky lze konstatovat, že bez včel by život nebyl možný.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 HISTORIE A PŮVOD VČELÍCH PRODUKTŮ

## 1.1 Včelařství

Včelaření patří mezi nejstarší obory lidské činnosti. Původním smyslem celého chovu včel byl zisk medu a vosku. Postupem času se ale ukázalo, že se nejedná jen o tyto produkty. Dnes můžeme od včel získávat také mateří kašičku, pyl, propolis, nebo i včelí jed a žihadla (Veselý, 1997).

### 1.1.1 Historie

Člověk už ve velmi dávných dobách zjistil, že mu jsou včely schopny poskytovat med. Teoreticky lze první výskyt včel datovat společně s prvními kvetoucími rostlinami. Vyvinuly se pravděpodobně z předka, kterého můžeme přirovnat k dnešním vosám. Doposud bylo popsáno přibližně 20 000 druhů včel z celého světa. Na území České a Slovenské republiky bylo doposud popsáno 609 druhů (Přidal, 2005).

Nejstarší kresba, vykreslující odnímání medu včelám, se dochovala z doby paleolitické (asi před 15 000 lety) z tzv. Pavoučí jeskyně u vesnice Bicorp ve Španělsku. Písemné zmínky o včelaření lze nalézt i v hieroglyfech starých Egypťanů. Zprávy o včelařství se objevují v řecké nebo římské literatuře. Jsou nacházeny popisy úlů nebo rozdíly mezi dělnicemi a trubci. Později začali lidé využívat i další produkty jako vosk nebo propolis (Čermáková, 2010; Med, 2010; Přidal, 2003).

Za první včelaře jsou považováni starověcí Egypťané, kteří začali vytvářet první úly. Jejich využití medu sloužilo ke konzervaci potravin, výrobě mastí a léků. Samozřejmě jej využívali i při náboženských obřadech jako oběť bohům nebo při balzamování zesnulých. Starověcí Řekové postupem času objevovali další vlastnosti medu a považovali ho za posilující lék pro dlouhověkost. Ve starověkém Římě se zase med cenil natolik, že některé daně byly vybírány formou medu (Med, 2010).

V křesťanských dějinách nacházela včela a její produkty své ceněné místo vždy. Ve středověku se centrem chovů včel staly především kláštery, které využívaly včelí vosk na výrobu svící (Čermáková, 2010; Med, 2010).

Včely a samozřejmě i med a další produkty si vybudovaly napříč dějinami pevné místo obliby různých národů, kultur nebo i náboženských společností (Čermáková, 2010).

## 1.2 Život v úlu

Světově nejrozšířenější a hospodářsky nejvíce využívanou včelou je včela medonosná, latinsky *Apis mellifera*. České pojmenování medonosná je už zažitě. Pravdou ale je, že včela med nenosí, ale vytváří. Proto je přesnější název *Apis mellifica*, neboli včela med vytvářející. Mezinárodně se však spíše uplatňuje první způsob psaní jména (Přidal, 2005).

Včela medonosná žije ve společenství, tvořeném matkou, dělnicemi a trubci, protože mimo skupinu není schopna přežít sama déle než pár dní. Včelstvo je dokonalým společenstvím, které může být příkladem týmové práce, organizace a souhry. Každá jednotlivá včela plní funkci, která je zásadní pro zajištění chodu celého úlu (Čermáková, 2010; Med, 2010).

### 1.2.1 Matka

Matka, označována též jako královna, je jedinou samičkou s plně vyvinutými pohlavními orgány. Jejím úkolem je snášet vajíčka a tvorbou feromonů řídit chod celého úlu. Mateří feromon je směsí látek, která působí na soudržnost včelstva a brání rozvoji vaječnicků dělnic. Intenzivním kladením je schopna naklást i více než 2000 vajíček denně. Je schopna klást dva druhy vajíček – oplozená a neoplozená. Kladení oplozených vajíček je podmíněno spářením matky přibližně šestý den po vylíhnutí během tzv. snubních letů. Z nich se následně líhnou dělnice nebo matky. Z neoplozených vajíček se pak líhnou trubci. Ve výjimečných případech může nastat, že se v úlu nacházejí dvě matky – stará i mladá, avšak jen po velmi krátkou dobu. Následně je jedna z matek usmrcena nebo odlétá z úlu (Přidal, 2003; Veselý, 1997).

Na první pohled se matka od ostatních včel liší především velikostí, která se pohybuje mezi 20 – 25 mm a hmotností mezi 180 – 260 mg (Obrázek 1). Matka se dožívá přibližně 3 – 5 let, ale v praxi dochází k její výměně už kolem druhého roku. Vyvíjí se z oplozeného vajíčka v tzv. matečnicku, což jsou buňky nacházející se na okraji plástů. Matka, která se vylíhne jako první, usmrtí v matečnicích ostatní dosud nevylíhlé matky. Od dělnic se liší tím, že jí chybí voskotvorné a hltanové žlázy, na nohách nemá žádné pracovní nástroje a má velmi krátký sosák (Drašar, 1978; Přidal, 2003; Veselý, 1997)



Obrázek 1 Odlišení matky ve včelstvu (archiv autorky)

### 1.2.2 Trubec

Trubci jsou včelí samci, kteří ve včelstvu žijí jen v letních měsících. Jejich počet se pohybuje jen v řádech stovek jedinců v celém včelstvu. Stejně jako matka mají vyvinuté pohlavní orgány, přičemž jejich jedinou úlohou je oplodnění matky. Sami se líhnou z neoplozených vajíček, které matka klade do trubčích buněk tvořících tzv. trubčinu. Jejich vývoj trvá nejdéle (24 dní) a jejich délka života je naopak velmi krátká. Převážná polovina se nedožije více než 14 dní. Mají zavalitější tělo o délce kolem 16 – 17 mm a hmotnosti 200 – 260 mg. Nemají žihadlo ani pracovní nástroje (Drašar, 1978; Veselý, 1997).

### 1.2.3 Dělnice

Nejpočetnější členové včelstva, dělnice, jsou dokonale přizpůsobeny pracovním úkonům potřebným pro chod celého úlu (Obrázek 2). Jedná se o nedokonalé samičky líhnoucí se z oplozených vajíček jako matky. Rozdíl nastává v jejich rozdílné potravě, což ovlivní jejich vývoj a zakrnění pohlavních orgánů. Navíc nemají semenný váček pro uchování spermií a nemohou se spářit (Veselý, 1997).

Podle stáří a rozdělení jednotlivých úkolů v úlu se dělnice dělí na mladušky a létavky. Úlohou mladušek je zahřívání plodu, čištění buněk, plástů, údržba čistoty úlu, krmení plodu, matky a malých trubců. Mimo to vylučují vosk, k čemuž jim slouží voskové žlázy, a staví

nové plásty, zajišťují bezpečnost včelstva, odebírají od létavek nektar a medovice, které následně ukládají a zpracovávají v med. Povrch stěn a plástů pokrývají propolisem, tmelí trhliny a škvíry v úlu. Podle jednotlivých úloh mladušky rozdělujeme dále na kojičky, stavitelky a další. Létavky, už podle názvu, vylétají z úlu kvůli sběru nektaru a medovice, ale také vody a pylu. V čase, kdy přebývají v úlu, se účastní některých pochodů, jako je větrání, odpar vody ze zásob medu, stráž nebo úklid úlu (Drašar, 1978; Veselý, 1997).

Délka života dělnic se liší podle ročního období. V jarních a letních měsících žijí v rozmezí 6-8 týdnů, včely vylíhlé koncem léta a na podzim pak 7-9 měsíců. Tělo dělnic je uzpůsobeno tak, aby zvládaly všechny potřebné úkony. Jejich velikost se pohybuje mezi 12-14 mm a hmotnost kolem 100 mg. Disponují sosákem, který jim slouží k odběru tekutin a tzv. medným váčkem k jejich přenosu. K přenosu pylu mají na končetinách pylové košíčky a kartáčky. V mládí pomocí hltanových žláz vylučují mateří kašičku a později tvoří enzymy k přeměně nektaru nebo medovice v med (Drašar, 1978; Veselý, 1997).



Obrázek 2 Dělnice tvořící zásoby (archiv autorky)

## 2 MED

### 2.1 Charakteristika medu

Z pohledu včelaře se jedná o nejdůležitější produkt chovu včel a je prvním, který se začal využívat. Med je charakterizován podle vyhlášky č.76/2003 aktuálního znění jako potravinu přírodního sacharidového charakteru, jejíž složení tvoří převážně glukóza, fruktóza, organické kyseliny, enzymy a pevné částice, které jsou zachycovány při sběru nektaru nebo medovice (Česko, 2003; Přidal, 2003).

Med je tekutina bohatá na cukr vyráběná namáhavou prací včel, přičemž aby vznikl 1 kg medu, musejí včely navštívit více než 5 milionů květů během více než 40 000 letů. Nasbíraný nektar pak smíchají se svými výměšky a nechají zrát v plástech (Grabowski, 2015; Med, 2010).

### 2.2 Dělení medů

Podle původu med rozdělujeme na květový a medovicový, podle způsobu získávání nebo obchodní úpravy pak na med vytočený, plástečkový, lisovaný, vykapávaný, med s plástečky, filtrovaný med, pastový med a pekařský med (Česko, 2003).

- Květový med – jedná se o med pocházející především z nektaru květů, výrazně sladké až škrablavé chuti. Jeho barva by měla být vodově čistá až s nazelenalým nádechem, slabě až zlatavě žlutá.
- Medovicový med – jedná se o med pocházející ze sekretů živých částí rostlin nebo z výměšků hmyzu, který tyto šťávy saje. Měl by být sladké, popřípadě kořeněné až mírně škrablavé chuti, tmavohnědé barvy a nádechem do červenohněda.
- Vytočený med – jedná se o med, který se získává odstředováním odvíčkovaných plástů, které musí být bezplodé.
- Plástečkový med – jedná se o med, který je uložený a zavíčkovaný včelami do bezplodých plástů, které jsou čerstvě postavené na mezistěnách vyrobených ze včelího vosku nebo bez nich a prodávány v celých uzavřených plástech nebo jejich dílech.
- Lisovaný med – jedná se o med, který je získáván lisováním bezplodových plástů za použití ohřevu do 45 °C nebo bez použití tepla.



Vykapávaný med – jedná se o med, který se získává vykapáváním odvíčkových bezplodových plástů.

- Med s plástečky – jedná se o med, který ve své konečné podobě obsahuje jeden nebo více kusů plástečkového medu.
- Filtrovaný med – jedná se o med, který je po získání upraven odstraněním cizích anorganických i organických látek za účelem odstranění pylu.
- Pastový med – jedná se o med, který byl po získání upraven do pastovité konzistence. Je tvořen směsí jemných krystalků.
- Pekařský med – jedná se o med, který se používá výhradně k průmyslovému použití nebo jako složka do jiných potravin. Z toho důvodu bývá nazýván i jako průmyslový med. Jedná se o jediný med, který může obsahovat cizí příchuť nebo pach, počínající kvašení nebo u něj mohlo dojít k zahřátí.

Příslušné člení medu je uvedeno ve vyhlášce č.76/2003 aktuálního znění (Česko, 2003).

## 2.3 Chemické složení medu

Jedná se o přírodní surovinu obsahující velké množství chemických látek. Složení medu se od sebe v jednotlivých případech liší. Významným faktorem je například samotný původ medu. Z chemického hlediska lze na med pohlížet jako na přesycený roztok různých druhů cukrů rozpuštěných ve vodě, ve kterém jsou přítomné rostlinné látky společně se specifickými látkami včelí produkce (Čermáková, 2010; Frank, 2010).

### 2.3.1 Sacharidy

Nejvíce zastoupenou složkou medu jsou sacharidy, které tvoří 95 – 99 % sušiny medu. Především se jedná o jednoduché cukry, monosacharidy – glukózu a fruktózu, jejichž zastoupení a poměr ovlivňuje rychlost krystalizace. Medy, které mají velmi vysoké zastoupení glukózy, podléhají krystalizaci již po několika dnech po vytočení. Vyšší obsah fruktózy v medu naopak způsobuje dlouhodobou tekutost. Dále pak jsou v medu obsaženy disacharidy – sacharóza a maltóza, nebo také oligosacharidy nebo vyšší cukry – dextriny, které jsou tvořeny především molekulami glukózy a ojedinele molekulami fruktózy (Čermáková, 2010; Přidal, 2003).

### 2.3.2 Voda

Další kvantitativně nejvíce zastoupenou složkou je voda, jejíž obsah se pohybuje mezi 13 – 20 %. Je významným ukazatelem samotné kvality. Čím nižší je množství vody obsažené v medu, tím vyšší je jeho kvalita. Takový med lze déle skladovat bez rizika zkvašení. Medy, které mají obsah vody vyšší než 21 %, už nejsou vhodné ke skladování. Často se jedná o medy nezralé (Čermáková, 2010; Přidal, 2003).

### 2.3.3 Kyseliny

Z organických kyselin je nejvíce zastoupenou kyselina glukonová, vznikající působením enzymu glukooxidázy na glukózu. Další přítomné kyseliny jsou například kyselina mravenčí, šťavelová nebo citronová. Z aminokyselin lze uvést kyselinu asparagovou, prolin nebo leucin (Čermáková, 2010; Přidal, 2003).

### 2.3.4 Minerální látky

Minerální látky obsažené v medu nacházíme jen v malém množství, ale širokém spektru, přičemž nejvíce obsaženým je draslík. Vedle něj pak můžeme sledovat přítomnost sodíku, vápníku nebo hořčíku a ze stopových prvků například železo nebo zinek. V porovnání medu medovicového a květového má vyšší obsah minerálních látek med medovicový, ve kterém se obsah pohybuje v rozmezí 400-1000 mg na 1 kg medu. V nektarových medech je to pouze 100 mg na 1 kilogram medu (Frank, 2010; Přidal, 2003).

### 2.3.5 Další látky

Z dalších látek obsažených v medu můžeme zmínit vitaminy. Z vitaminů ve vodě rozpustných jsou v medu obsaženy B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, niacin nebo vitamin C. Lipofilní vitaminy v medu téměř nenajdeme. Z hormonů jsou v medu přítomné například acetylcholin, noradrenalin, adrenalin nebo dopamin. Za typickou chuť a vůni medu jsou zodpovědné také chuťové a aromatické látky, které vznikají chemickými přeměnami některých kyselin. Barvu pak med získává z různých rostlinných barviv, jako jsou flavonoidy nebo karotenoidy (Frank, 2010; Přidal, 2003).

### 3 MIKROBIOLOGIE MEDU

Med se vyznačuje schopností inhibice růstu, či úplného usmrcení většiny mikroorganismů. I přes tento fakt lze v medu pozorovat mikroorganismy, které jsou schopny odolávat vysoké koncentraci sacharidů, kyselému prostředí i jeho antimikrobiálnímu charakteru. Mikroorganismy vyskytující se v medu mohou ovlivnit jeho kvalitu a bezpečnost (Snowdon, 1996; Vorlová, 2002).

Mikroorganismy se do medu mohou dostávat primárně, sekundárně a terciárně. Primárními zdroji, které zajišťují přítomnost mikrobiální kontaminace, jsou pyl a gastrointestinální trakt včely, který mohou osídlovat například anaerobní bakterie. Dalším zdrojem kontaminace může být prach nebo vzduch. Sekundární kontaminace bývá způsobena při medobraní, použitím znečištěných nádob a nástrojů. Terciární kontaminace pak bývá způsobena při následném zpracování medu. Mezi hlavní zástupce mohou patřit koliformní bakterie, enterokoky, stafylokoky, bacily, pseudomonády, kvasinky nebo plísně (Kačániová, 2009; Přidal, 2003).

Mikrobiologii medu mohou ovlivnit i jeho jednotlivé složky. Mikrobiologické zastoupení v nektaru se může pohybovat od téměř nulového (sterilního) po výskyt řady mikroorganismů. Mikroflóra pylu je zase ovlivněna druhem rostlin a lze tedy pozorovat různorodé spektrum bakterií, kvasinek i plísní. V případě medovice je možno opět sledovat rozdíly, a to například v závislosti na trávicím traktu hmyzu, který medovici vylučuje. Mikrobiologická kontaminace zdrojů následně přestupuje do těla včely (Grabowski, 2015).

Ve zralém medu se mikroorganismy nepomnožují v důsledku vysokého obsahu cukru, čímž dochází ke zvýšení osmotického tlaku. V případě, že dojde ke zředění medu, může med začít kvasit, což bude mít za následek pomnožení osmofilních kvasinek. Příkladem mohou být *Zygosaccharomyces*, které se nacházejí u povrchu z důvodu potřeby přítomnosti kyslíku. Kvašení v celém objemu je charakteristické pro rody *Torula* a *Torulopsis* (Přidal, 2003).

#### 3.1 Gastrointestinální trakt včel

Gastrointestinální trakt včel, stejně jako u jiných živočišných druhů, je vyvážený ekosystém mikroorganismů žijících v symbiotickém vztahu. Mikrobiota je závislá především na potravě, která se odvíjí také od ročního období a kontaktu s ostatními včelami. Nejčastěji bývají střeva včel kolonizována probiotickými bakteriemi *Lactobacillus* (případně nových rodů vyčleněných z rodu *Lactobacillus*), *Bifidobacterium* a *Bacillus* (Kačániová, 2009).

### 3.2 Hygiena medu

Mikroorganismy se do medu mohou dostat především z plástu, pylu, trávicího traktu včel, prachu, vzduchu, půdy nebo nektaru. Podobně jako u každé jiné potraviny je hygienický stav medu důsledkem podmínek životního prostředí kolem potravinového řetězce a vlastnostmi přidanými produktu samotnými živočichy. Pod tím si lze představit prostředí frekventované včelami, kterým je úl nebo zdravotní stav každé jednotlivé včely, která med sklízí, přenáší a upravuje (Grabowski, 2015; Kačániová, 2009).

### 3.3 Antimikrobiální aktivita medu

Antimikrobiální aktivita se může u jednotlivých medů lišit a záviset na zdroji a zpracování. Samotný květový zdroj může podléhat změnám vlivem ročního období nebo své lokalizace. Chemické látky, které do medu přidává samotná včela, jsou jeden z důvodů, proč je zralý med tak odolný vůči mikrobiálním vlivům. Dalším faktorem jsou fyzikálně-chemické vlastnosti, kterými jsou nízké pH, vysoký osmotický tlak, a tedy nízká aktivita vody, nízký redoxní potenciál, a nakonec vysoká viskozita (Grabowski, 2015).

Vznik látek, které brání růstu bakterií, je zapříčiněn chemickými přeměnami, kterých se účastní enzymy štěpící cukry (glukozooxidáza štěpící glukózu. Med je proto svým složením vhodný k potlačení původců střevních infekcí, onemocnění horních cest dýchacích nebo při ošetřování ran. Příkladem bakterií, kterým med brání jejich množení, jsou *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* nebo *Salmonella* (Frank, 2010).

Antimikrobiální aktivita se odvíjí od druhu medu a klesá při jeho vystavení slunečnímu záření, vystavení teplotě vyšší než 50 °C nebo může klesat s rostoucí dobou skladování (Přidal, 2003).

## 4 KOJENECKÝ BOTULISMUS

Díky svým vlastnostem a složení byl med považován za jednu z mála potravin živočišného původu, která není výrazně spojována s výskytem mikrobiologických alimentárních onemocnění, s jedinou výjimkou, kterou je kojenecký botulismus (Grabowski, 2015). Jedná se o vzácné infekční onemocnění způsobené bakterií *Clostridium botulinum*. Právě med je nejvýznamnějším potravinovým rizikem způsobujícím toto onemocnění, které je způsobeno absorpcí toxinu (Freiman, 2004; Přidal, 2003; Špačková, 2017).

### 4.1 *Clostridium botulinum*

*Clostridium botulinum* je heterogenní skupina bakterií. Jedná se o grampozitivní tyčinkovité bakterie, které jsou obvykle považovány za striktně anaerobní. Vykazují schopnost sporulace za vzniku oválných subterminálních spor. Společným znakem těchto bakterií je produkce toxinu stejného biologického účinku, ale rozdílné antigenní struktury, podle které se dělí na typy A-G, z nichž se v klinických případech lze setkat převážně se subtypy A a B nebo E (Klinicky významné bakterie, 2012; Nováková, 2017; Špačková, 2017; Votava, 2003).

Jedná se o bakterii, která se na základě vnějších podmínek vyskytuje ve dvou různých formách. Ve vegetativní formě se bakterie vyskytuje za anaerobních podmínek, přičemž je schopna rozmnožování a metabolismu. V této formě je však velmi citlivá a lze ji eliminovat změnou vnějších podmínek, například varem nebo přítomností kyslíku. Přirozeně se nachází i ve formě spor, které zabezpečují jejich přežití za nepříznivých podmínek. V této formě se může nacházet v půdě, prachu nebo sedimentu vod. Právě tyto zdroje mohou být důvodem následné kontaminace vodních nádrží a potravin. V nízkém počtu se mohou vyskytovat i v gastrointestinálním traktu některých ptáků, ryb nebo savců (Klinicky významné bakterie, 2012; Nováková, 2017; Wojtacka, 2016).

Významnou potravinou, ve které se může vyskytovat *Clostridium botulinum*, je med. Právě ten je možnou cestou průniku spor do těla a vzniku infekce. Zdrojem kontaminace medu jsou velmi pravděpodobně samotné včely, které mohou přistávat na kontaminovaném povrchu a uskutečnit přenos do úlu. Med není vhodné tepelně upravovat tak, aby došlo ke zničení spor (Špačková, 2017).

## 4.2 Projevy onemocnění

Onemocnění způsobené *Clostridium botulinum* je způsobeno převážně účinkem toxinu zvaného botulotoxin. Ten vzniká procesem, kdy se spory přítomné v kontaminované potravine mění za anaerobních podmínek ve vegetativní formy produkující právě zmíněný toxin. Po požití se toxin dostává do gastrointestinálního traktu, kde se velmi dobře vstřebává. Následně jeho enzymatickou aktivitou dochází k uvolňování acetylcholinu a blokaci přenosu nervového vzruchu do svalů (Špačková, 2017; Votava, 2003).

Riziko výskytu botulismu u kojenců (do jednoho roku života) je zvýšeno v důsledku jejich neúplně vyvinuté střevní mikroflóry. Ta totiž ještě není zralá k bránění infekce a dochází tak k rozvoji toxické zánětlivé infekce (Špačková, 2017; Votava, 2003).

Infekce může mít mírný nebo velmi rychlý průběh. V případech, kdy není infekce rozpoznána, může skončit náhlým úmrtím kojence. Prvními projevy, které nejsou nijak specifické a nelze z nich tudíž určit přesnou diagnostiku, bývají hypotonie, nechutenství a snížení motility střev. Později se může objevit slabost, problémy příjmu potravin nebo i chabé ochrnutí hlavových nervů, které se projevuje například špatným polykáním. Průběh není doprovázen zvýšenou teplotou a ke smrti dochází důsledkem ochrnutí dýchacích svalů vedoucí k zástavě dechu (Špačková, 2017).

## 4.3 Botulotoxin

Botulotoxin tvoří dva bílkovinné řetězce, které spojuje disulfidická vazba. Všechny botulotoxiny mají podobný mechanismus účinku. Botulotoxin je svou enzymatickou aktivitou přizpůsoben tak, že inhibuje uvolňování acetylcholinového neurotransmiteru z nervových zakončení na presynaptické membráně nervosvalové ploténky, čímž dochází k blokaci přenosu nervového vzruchu do svalových vláken. Botulotoxin je dodnes považován za jednu z nejjedovatějších látek na světě. Smrtelná dávka pro člověka je přibližně 1 ng na kilogram živé váhy. Jeho snadná příprava a získávání vedly k pokusům o jeho zneužití jako biologické zbraně. K jeho inaktivaci je potřeba zahřátí na teplotu 100 °C po dobu 10 minut. Botulotoxin, který produkují bakterie *Clostridium botulinum*, je také využíván v řadě léčebných preparátů, známých jako Botox, k uvolnění paralýzy svalstva a dočasnému obnovení jeho funkcí (Freiman, 2004; Klinicky významné bakterie, 2012; Špačková, 2017; Votava, 2003).

## 5 DALŠÍ VČELÍ PRODUKTY

Včely kromě medu vyrábějí ještě další produkty, mezi které řadíme vosk, propolis, včelí jed nebo mateří kašičku. Každý z nich má neodmyslitelnou roli pro chod úlu a člověk se je postupem času naučil jednotlivě využívat (Čermáková, 2010).

### 5.1 Vosk

Je vytvářen dělnicemi pomocí voskotvorných žláz, které se nacházejí na spodní straně zadečku. Jedná se o tvárnou chemicky inertní látku, jejíž vlastnosti jsou závislé na teplotě. Při nízkých teplotách je velmi křehký. Barva vosku je obvykle žlutá až tmavohnědá, což je způsobeno hromadícími se nečistotami a barvivy pocházejícími převážně z pylu. Včely využívají vosk k tvorbě plástů pro uložení medu, pylu nebo plodu. Včelí vosk nachází velmi široké spektrum využití. Člověkem je vosk využíván už od pradávna především k tvorbě svíček. Dnes nachází své využití také v potravinářství, kde je uváděn na obalu pod kódem E901. Využívá se například jako ochranný film povrchu ovoce nebo při výrobě sladkostí na bázi želatiny. Dále je hojně využíván v kosmetickém průmyslu, kdy je přidáván do různých krémů a balzámů, depilačních vosků, masek, rtěnek a dalších přípravků. V medicíně našel své uplatnění při potahování tablet či jiných forem léků (Čermáková, 2010; Přidal, 2003).

### 5.2 Propolis

Propolis, nazývaný též včelí tmel, je žlutá až hnědá příjemně vonící látka, ceněná především pro své léčivé účinky, které znali už starověcí Egypťané. Jedná se o směs včelího vosku a pryskyřic, především flavonoidů, které jsou sbírány z rostlin, převážně z pupenů. Včelami je propolis využíván jako stavební a ochranná látka. Slouží jim k uzavírání otvorů a trhlin, ale také k dezinfekci úlu a ochraně před chorobami a parazity. Má totiž významné antibakteriální vlastnosti, které byly prokázány i proti obávané bakterii *Paenibacillus larvae* způsobující včelí mor. Člověk využívá propolis ve farmacii a medicíně při léčbě různých kožních onemocnění, anémie, rakovině, k podpoře imunitního systému a dalších. V kosmetice je využíván pro své regenerační schopnosti v krémech proti stárnutí (Čermáková, 2010; Med, 2010; Přidal, 2003).

### 5.3 Mateří kašička

Mateří kašička je vyměšována hltanovými žlázami dělnic. Je krmnou směsí určenou k výživě plodu a matky, která obsahuje všechny potřebné živiny. Její složení se liší podle

toho, komu je určena. Společným základem pro její tvorbu je pyl. Jedná se o bílou až smetanově žlutou homogenní směs s lehce nakyslou chutí, která je tvořena ze 2/3 vodou. Zbytek je tvořen převážně bílkovinami. Dále pak tuky, cukry, minerálními látkami, vitaminy, hormony puriny a aminokyselinami. Své využití našla v kosmetickém průmyslu jako příměs různých krémů, masek a mlék, ve farmacii je využívána jako psychofarmakum nebo při léčbě dermatóz a dalších (Čermáková, 2010; Přidal, 2003).

#### **5.4 Včelí jed**

Jedná se o bezbarvý sekret jedové žlázy. Má příjemnou vůni, hořkosladkou chuť a na vzduchu rychle krystalizuje ve formě šedobílých krystalků. K jeho shromažďování dochází v jedovém váčku, odkud je přes žihadlo vpravována do nepřítele. Při vpichu dochází k sevření žihadla kůží, v důsledku čehož se při snaze žihadlo odtrhnout, vytrhne i celý žihadlový aparát a včela posléze zahyne. Účinky včelího jedu na lidský organismus nejsou jednotné. Obecně je pro člověka včelí jed toxický. Především brání přenosu nervového vzruchu. Včelí jed je využíván v lékařství ve formě mastí při léčbě zánětlivých revmatických onemocnění, při léčbě zánětů kloubů, svalů nebo šlach, k léčbě chronických bolestí nebo při poruchách pohybového aparátu. Výjimku však tvoří alergičtí pacienti nebo diabetici (Čermáková, 2010; Přidal, 2003).



## 6 VYBRANÉ METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

### 6.1 Izolace nukleových kyselin

Izolace nukleových kyselin bývá většinou první fází řady různých metod, přičemž kvalita získaného produktu následně ovlivňuje úspěšnost návazných postupů. Cílem je získat v dostatečné čistotě a množství nukleovou kyselinu v nativním stavu. Výběr metody izolace závisí i na následné analýze (Šmarda, 2005).

Prvním krokem bývá lyze buněk, kdy dochází k uvolnění vnitřního obsahu buněk. K tomu slouží řada technik, které lze jednoduše rozdělit na metody fyzikální, při nichž jsou buňky narušovány mechanickými silami, nebo metody chemické, při nichž je buňka vystavena chemickým činidlům. Nejčastěji se pro narušení buněčné stěny bakterií používá lysozym. Jedná se o enzym obsažený ve vaječném bílku nebo sekretech, jako jsou slzy nebo sliny. Obvyklé je i použití detergentu pro odstranění molekul lipidů z buněčných membrán (např. dodecylsulfát sodný – SDS) a chelatačních činidel, která vážou dvojmocné ionty, čímž destabilizují strukturu buněčného obalu, a navíc inhibují buněčné enzymy, které by mohly buněčnou DNA degradovat (Brown, 2016; Šmarda, 2005).

Kromě DNA obsahuje vzniklý extrakt bakteriálních buněk také významné množství proteinů a RNA. Přečištění purifikované nukleové kyseliny lze snadno dosáhnout pomocí enzymu. Pro odstranění proteinů se využívají proteinázy. Příkladem může být proteináza K. Mezi další využívané metody purifikace patří fenol-chloroformová extrakce. Jedná se o odstranění nežádoucích příměsí v podobě denaturace proteinů a jejich vysrážení. Centrifugací pak lze získat fázové rozhraní organické a vodné fáze, které jsou odděleny právě denaturovanými bílkovinami. Vodná fáze obsahující nukleovou kyselinu je lehčí a tvoří tedy horní podíl. Mezi další metody izolace patří například srážení nukleových kyselin alkoholem nebo purifikace nukleových kyselin chromatografií, která je využívána v komerčních soupravách pro izolaci DNA, které používají afinitní membrány místo sloupcových nosičů (Brown, 2016; Šmarda, 2005).

### 6.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce, zkráceně PCR, vede k selektivní amplifikaci vybrané molekuly DNA. Jinak řečeno umožňuje reprodukovat řetězec DNA na identické kopie. K namnožení je zapotřebí několika komponentů. Jsou jimi templátová DNA, která má být amplifikována, dále krátké řetězce oligonukleotidů, tzv. primery, které označí úsek, který

chceme amplifikovat a poskytnou základ pro zahájení procesu, termostabilní DNA-polymerázu, což je enzym potřebný k amplifikaci DNA řetězce, a nakonec jednotlivé nukleotidy, které slouží jako stavební jednotky pro sestavení nově syntetizované DNA. Syntéza nových úseků DNA probíhá ve směru 5' → 3' (Alcamo, 2001; Šmarda, 2005).

Po namíchání reakční směsi je provedena PCR pomocí termocykleru, v němž se automaticky mění teplota podle naprogramovaných časových intervalů. Postupným opakováním jednotlivých cyklů počet amplifikovaných molekul exponenciálně stoupá v závislosti  $2^n$ , kde  $n$  je počet proběhlých cyklů. Počet cyklů se zpravidla pohybuje mezi 25-35 cykly, složených z následujících opakujících se kroků:

- Denaturace – v tomto kroku dochází po dobu 1 minuty k zahřátí směsi na 95 °C, čímž dojde k narušení vodíkových vazeb spojujících dvě vlákna molekuly a vzniku jejich samostatných jednotek.
- Připojení primerů (annealing) – v tomto kroku dochází ke snížení teploty v termocykleru na 50-60 °C po dobu 1 minuty, čímž dojde k navázání primerů na specifická místa molekuly.
- Polymerace (vlastní syntéza) – následuje syntéza způsobena zvýšením teploty na cca 72 – 74 °C, což je optimální teplota pro zahájení aktivity *Taq* polymerázy, enzymu izolovaného z *Thermus aquaticus*, a nasyntetizování nového vlákna DNA, které je komplementární k templátové molekule.

Následuje opětovné zvýšení teploty a zahájení procesu denaturace v novém cyklu. Po ukončení PCR jsou vzorky obvykle analyzovány pomocí elektroforézy, aby bylo zjištěno, zda bylo dosaženo namnožení dostatečného množství DNA či zda je cílená sekvence vůbec přítomna (Alcamo, 2001; Brown, 2016; Jelínek, 2021).

### 6.3 Elektroforéza

Elektroforéza, je separační technika, která je často využívána při izolaci a analýze nukleových kyselin a bílkovin. Využívá separace molekul v elektrickém poli na základě jejich náboje. Molekuly DNA mají záporně nabitou fosfátovou skupinu, což má za následek, že se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují ke kladně nabitě elektrodě – anodě (Brown, 2016).

Jedním z vhodných nosičů je gel, který je využíván v gelové elektroforéze. Tyto gely bývají nejčastěji tvořeny polyakrylamidem nebo agarózou. Ty mají schopnost vytvářet strukturu

polymerních molekul s póry, jejichž velikost je ovlivněna složením roztoku a koncentrací polymeru. Velikost jednotlivých fragmentů lze stanovit srovnáním s fragmenty o známé velikosti, které nazýváme standardy velikosti. K vizualizaci jednotlivých fragmentů se využívají barviva navazující se na strukturu nukleové kyseliny, tzv. interkalační barviva. Detekci pak lze provést pod UV světlem. Příkladem takových barviv jsou etidiumbromid, který je mutagenem a postupně je nahrazován barvivy, jako jsou například fluorescenční barviva (Brown, 2016; Šmarda, 2005).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 7 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce byla analýza 15 vzorků medů, získaných od soukromých včelařů, případně z obchodní sítě. Cíle práce byly stanoveny následovně:

- testovat medy na možnou přítomnost *Clostridium botulinum* použitím molekulárních metod,
- kultivační stanovení přítomnosti mikroorganismů v testovaných medech a jejich následná identifikace metodou MALDI-TOF.

## 8 METODIKA A MATERIÁL

### 8.1 Testované druhy medu

Praktická část byla zaměřena na testování 15 vzorků smíšených medů. Převážně se jednalo o medy pocházející od soukromých včelařů z České republiky. Tři vzorky, které pocházely ze zahraničí, konkrétně z Maďarska, Řecka a Chorvatska, byly zakoupeny v obchodní síti v ČR (Obrázek 3).

Tabulka 1 Testované druhy medu a jejich původ

| Číslo vzorku | Lokalita              | Číslo vzorku | Lokalita   | Číslo vzorku | Lokalita      |
|--------------|-----------------------|--------------|------------|--------------|---------------|
| 1            | Vlčková               | 6            | Vlčková    | 11           | Havířov       |
| 2            | Ludkovice             | 7            | Maďarsko   | 12           | Havířov       |
| 3            | Ludkovice             | 8            | Prostějov  | 13           | Havířov       |
| 4            | Bystřice pod Hostýnem | 9            | Žeranovice | 14           | Lukov         |
| 5            | Bystřice pod Hostýnem | 10           | Chorvatsko | 15           | Řecko (Kréta) |



Obrázek 3 Geografické zobrazení původu testovaných vzorků medu (vytvořeno pomocí [detske.napady.net](http://detske.napady.net) a [ucebnicemapy.cz](http://ucebnicemapy.cz))

## 8.2 Izolace DNA

### 8.2.1 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy (KERN)
- Vortex-Genie®2 (Mo Bio Laboratories)
- Mechanická třepačka PSU-10i (Biosan)
- Termostat BT 120 (TME)
- Centrifuga Z 300 K (HERMLE)
- Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf)
- Mikropipety, sterilní špičky, laboratorní sklo – kádinky, odměrné válce, centrifugační zkumavky (50 ml), mikrozukavky (2 a 1,5 ml), lžička, stojan na zkumavky, kahan.
- DNeasy® mericon® Food Kit (QIAGEN)
- Etanol (70%) (LachNer)
- Sterilní destilovaná voda
- Chloroform (Sigma)

### 8.2.2 Postup

Pro izolaci DNA byla využita neoptimálnější metoda, vycházející z diplomové práce Ing. Veroniky Pavlové (Pavlová, 2020). V prvním kroku byl sterilně navážen vzorek 10 g medu do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml, jejíž obsah byl doplněn sterilní destilovanou vodou na 45 ml. Vzniklá suspenze byla inkubována na třepačce při 65 °C po dobu 30 minut. Poté byly vzorky schlazeny na laboratorní teplotu a centrifugovány 30 minut při 4500 rpm. Vzniklý supernatant byl opatrně odlit a zbylý sediment byl dále zpracován pomocí komerčního kitu pro potraviny - DNeasy® mericon® Food Kit (QIAGEN) (DNeasy® mericon® Food Kit, 2014).

K sedimentu byl do zkumavky přidán 1 ml lyzačního pufru a 2,5 µl proteinázy K. Takto připravená směs byla opět umístěna do termostatu na třepačku, tentokrát při 60 °C po dobu 30 minut. Následně byly vzorky zchlazeny na pokojovou teplotu a posléze centrifugovány při 2500 rpm po dobu 5 minut. Vzniklý supernatant byl opatrně převeden do čisté 2ml

zkumavky, do které bylo posléze přidáno 500  $\mu$ l chloroformu. Směs byla krátce třepána na vortexu a dále centrifugována při 14 000 rpm po dobu 15 minut. Vzniklá vodná fáze, o přesně známém odměřeném množství, byla opatrně převedena do čisté 2ml zkumavky, k níž byl přidán v poměru 1:1 PB pufr. Směs byla krátce promíchána na vortexu a její část pipetována do kolonky s křemičitou membránou. Následovala centrifugace při 13 000 rpm po dobu 1 minuty. Přefiltrovaný roztok byl vylit a stejný postup byl proveden se zbytkem směsi. DNA zůstala zachycena na kolonce. Proto tedy byla kolonka přenesena do čisté 2ml zkumavky, do které bylo přidáno 500  $\mu$ l pufru AW<sub>2</sub>. Následovala opět centrifugace při 13 000 rpm po dobu 2 minut. Přefiltrovaný roztok byl vylit a prázdná kolonka centrifugována ještě jednou, aby došlo k dokonalému odstranění pufru AW<sub>2</sub>. Nakonec byla kolonka převedena do čisté 2ml zkumavky, převrstvena 50  $\mu$ l elučního roztoku pufru EB a centrifugována při 13 000 rpm po dobu 1 minuty, přičemž došlo k uvolnění DNA do daného pufru.

### 8.3 Stanovení koncentrace DNA

#### 8.3.1 Přístroje, pomůcky, chemikálie

- Multifunkční modulární reader Infinite® M200 PRO s destičkou NanoQuant Plate™ (TECAN)
- Mikropipety, sterilní špičky,
- Etanol (70%), EB pufr z komerční sady DNeasy® mericon® Food Kit (QIAGEN)

#### 8.3.2 Postup

Úspěšnost izolace DNA byla ověřena spektrofotometricky proměřením absorbance při vlnových délkách 260 nm a 280 nm na přístroji TECAN. Na destičku, vyčištěnou ethanolem, byly nejprve napipetovány 2  $\mu$ l elučního roztoku pufru, který byl použit při izolaci DNA, a provedena kalibrace přístroje - BLANK. Následně byly na destičku, která byla opět vyčištěna pomocí etanolu, nanесeny 2  $\mu$ l vzorku s izolovanou DNA a proměřena absorbance.



## 8.4 Polymerázová řetězová reakce

### 8.4.1 Přístroje, pomůcky, chemikálie

- AURA PCR (BIOAIR INSTRUMENTS)
- Termocykler pro PCR Aeris™ (ESCO)
- Vortex V-1 plus (Biosan)
- Mikropipety, sterilní špičky, sterilní mikrozkušavky (1,5 ml), sterilní mikrozkušavky v stripech s víčky (0,2 ml), stojan
- Sterilní voda pro PCR
- Go Taq® G2 Hot Start Green Master Mix (Promega) 5x zředěný
- Primery (Viz Tabulka 2) (East-Port)
- DNA izolovaná postupem popsáním v kapitole 8.2.2

Tabulka 2 Primery použité při PCR

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

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

### 8.4.2 Postup

Dalším krokem bylo vlastní provedení PCR metody pro namnožení úseků DNA získaných z izolace popsané v kapitole 8.2.2. Prvním úkolem byla příprava reakční směsi ve sterilním PCR boxu, který byl předem vysterilizován UV světlem po dobu 20 minut. Pro každý vzorek bylo připraveno 20  $\mu\text{l}$  reakční PCR směsi, která obsahovala izolovanou DNA, sterilní vodu pro PCR, MasterMix a příslušné dvojice primerů uvedených výše v tabulce 2. Pro každý vzorek bylo použito sedm různých dvojic primerů. To znamená, že pro každý vzorek bylo připraveno sedm reakčních směsí, lišících se obsahem použitých primerů. Množství jednotlivých komponent PCR směsi jsou uvedena v tabulce 3. Ta byla přepočítána na počet vzorků, navýšených o kontrolu a rezervu, a z výsledných množství pak připravena směs všech komponent mimo DNA. Každá vzniklá směs obsahovala jinou dvojici primerů. Směs byla důkladně promíchána na vortexu a posléze rozpipetována po 19  $\mu\text{l}$  do sterilních mikrozkušavek spojených do stripů po 8. Do jednotlivých mikrozkušavek byly následně přidány vzorky DNA o objemu 1  $\mu\text{l}$ , čímž jsme získali kompletní PCR směs pro jednu dvojici primerů. Jedna zkumavka obsahovala pouze 19  $\mu\text{l}$  směsi bez DNA, sloužící jako kontrola. Všechny vzorky byly důkladně promíchány na vortexu a vloženy do termocyklu. Stejným postupem bylo provedeno smíchání komponent i se zbylými primery.

Tabulka 3 Obecné složení reakční směsi jednoho vzorku

| Složení reakční směsi                 | Objem složky obsažené v jenom vzorku [ $\mu\text{l}$ ] |
|---------------------------------------|--|
| Go Taq® G2 Hot Start Green Master Mix | 10   |
| Sterilní voda pro PCR                 | 7  |
| Forward primer                        | 1  |
| Reverse primer                        | 1  |
| DNA                                   | 1  |
| Celkový objem                         | 20   |

Po navolení reakčního programu uvedeného v tabulce 4 byl termocykler spuštěn. Po ukončení PCR byl vzorek uchován při 4 °C do následného vyhodnocení pomocí gelové elektroforézy.

Tabulka 4 Zvolený průběh PCR

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

## 8.5 Elektroforéza

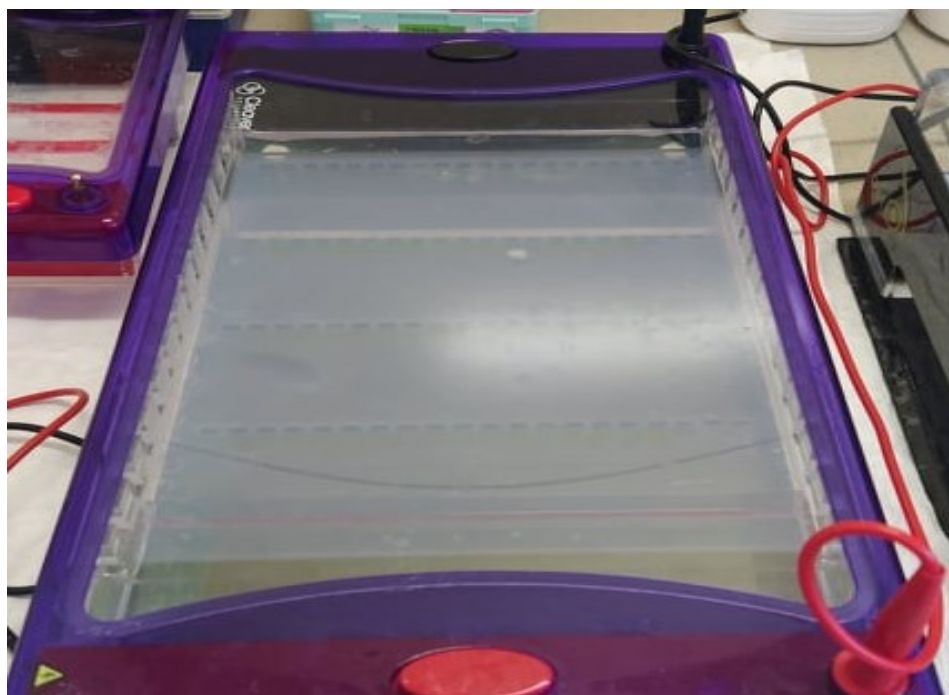
### 8.5.1 Přístroje pomůcky a chemikálie

- Váhy KB d=0,01 g (KERN)
- Mikrovlnná trouba (ELEKTROLUX)
- Elektroforetická vana včetně příslušenství (OWL)
- Elektrický zdroj MAJOR SCIENCE MP-300
- UV-Transiluminátor InGenius (SYNGENE)
- Odměrný válec, Erlenmeyerova baňka, lžička, rukavice, mikropipety, sterilní špičky
- Agaróza SeaKem (LONZA)
- Elektroforetický pufr TAE 1x koncentrovaný (Sigma)
- Fluorescenční barvivo Gel Nucleic Acid Stain (Biotium)
- DNA Ladder 100 bp Plus, pegGOLD (ThermoFisher)
- DNA získaná postupem popsáním v kapitole 8.4.2

### 8.5.2 Postup

Prvním úkolem byla příprava přesně známého množství 1,5% agarózového gelu. Do Erlenmeyerovy baňky bylo odváženo vypočítané množství agarózy, ke kterému bylo přidáno příslušné množství 1x koncentrovaného TAE pufru. Vzniklá směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarózy. Po mírném zchlazení, během kterého byla sestavena aparatura s hřebínkem, bylo ke gelu přidáno fluorescenční barvivo Gel Nucleic Acid Stain v množství 1 kapka na 50 ml gelu. Gel byl opatrně vlit do sestavené

aparatury tak, aby nevznikly bubliny. Po zatuhnutí byl šetrně odstraněn hřebínek a gel byl vložen do elektroforetické vany naplněné 1x koncentrovaným TAE pufrem. Do jamek vzniklých po vyjmutí hřebíčku bylo pipetováno 5  $\mu$ l DNA produktu a pro srovnání 5  $\mu$ l srovnávacího markeru DNA Ladder 100 bp Plus. Elektroforetická vana byla následně připojena k elektrickému zdroji, který byl nastaven na 90 V. Po proběhnutí separace do 2/3 gelu (Obrázek 4), byla elektroforéza zastavena a gel byl vložen do transiluminátoru pod UV světlo a pomocí fotodokumentačního systému GeneSnap byl zaznamenán výsledek elektroforetické separace.



Obrázek 4 Sledování průběhu elektroforézy (archiv autorky)

## 8.6 Kultivační stanovení plotnovou metodou

### 8.6.1 Přístroje pomůcky a chemikálie

- Váhy d=0,01 g (KERN)
- Autokláv H+P Varioklav135S (H+P LABORTECHNIK AG)
- Bio II Advance Biohazard Box (TELSTAR)
- Stomacher Lab Blander 400 (SEWARD)
- CO<sub>2</sub> Water Jacket Blander 400 (SEWARD)
- Termostat INE 600 (MEMMERT)

- Vodní lázeň (MEMMERT)
- Odměrný válec, reagenční lahve, mikropipety, sterilní špičky, Petriho misky, lžička, kádinka, sterilní sáčky do homogenizátoru, zkumavky, stojan, kahan, hokejky, rukavice
- PCA – Plate Count Agar (HIMEDIA)
- CHYGA – Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (HIMEDIA)
- RCA – Reinforced Clostridial Agar (HIMEDIA)
- Sterilní destilovaná voda
- Sterilní fyziologický roztok
- Ethanol (70%) (LachNer)

### 8.6.2 Příprava kultivačních půd

Do čistých reagenčních lahví byly připraveny navážky práškových směsí podle návodu výrobce uvedeného na obalu. Navážky byly následně rozpuštěny v příslušném množství destilované vody a poté sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po vychladnutí byly připravené půdy za aseptických podmínek rozlity do Petriho misek. Po zatuhnutí byly přichystány k samotnému kultivačnímu stanovení.

### 8.6.3 Postup

Pro kultivační stanovení byla za aseptických podmínek provedena navážka 5 g medu do sterilního sáčku. K té byl přidán devítinásobek fyziologického roztoku a obsah sáčku byl zhomogenizován s použitím stomacheru. Část vzniklého ředění  $10^{-1}$  byla napipetována do sterilní zkumavky a ta byla posléze vložena do vodní lázně vyhřáté na 80 °C po dobu 10 minut, z důvodu aktivace spor. Společně, se zbylou částí, pak bylo jednotlivě na příslušné misky pipetováno 100  $\mu$ l inokula, které bylo pomocí vyžíhané hokejky opatrně rozetřeno po povrchu agarů. Po zaschnutí byly misky kultivovány podle tabulky 5 dnem vzhůru. Po uplynutí doby kultivace byl pozorován nárůst jednotlivých kolonií, které byly dále spočítány, vyhodnoceny a identifikovány.

Tabulka 5 Kultivační podmínky stanovení jednotlivých skupin mikroorganismů

| Kultivační půda | Stanovení skupiny mikroorganismů                             | Podmínky kultivace                   |
|-----------------|--|--------------------------------------|
| PCA             | celkový počet mikroorganismů (CPM)                           | 30 °C po dobu 72 hodin               |
|                 | počet anaerobních sporulujících bakterií                     | anaerobně při 30 °C po dobu 72 hodin |
| CHYGA           | počet kvasinek a mikroskopických vláknitých hub              | 25 °C po dobu 5 až 7 dní             |
| RCA             | počet <i>Clostridium</i> spp. a dalších anaerobních bakterií | anaerobně při 30 °C po dobu 72 hodin |

## 8.7 MALDI TOF

### 8.7.1 Přístroje pomůcky a chemikálie

- Bio II Advance Biohazard Box (TELSTAR)
- PCA – Plate Count Agar (HIMEDIA)
- Sterilní očkovací klíčky, rukavice

### 8.7.2 Postup

Z předchozího postupu popsaného v kapitole 8.6.3 byly izolovány jednotlivé kolonie, které byly následně identifikovány metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight), konkrétně MALDI Biotyper System k proměření přítomných proteinů, které jsou následně porovnány s referenční knihovnou (MALDI Biotyper®, 2021).

Kolonie byly z jednotlivých misek izolovány a přeočkovány na PCA pomocí křížového roztěru za účelem získání čisté kultury a nárůstu jednotlivých kolonií. Separované kolonie pak byly podrobeny identifikaci metodou MALDI-TOF. MALDI-TOF analýza byla provedena ve spolupráci s Ing. Marikou Lhotskou v laboratoři mikrobiologie ve Vaše laboratoře s.r.o.

## 9 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 9.1 Izolace DNA ze vzorku a stanovení její koncentrace

Prvním důležitým krokem pro zjištění přítomnosti *Clostridium botulinum* v testovaných vzorcích medu, byla izolace DNA s následným stanovením její koncentrace. Měření koncentrace bylo provedeno na přístroji TECAN proměřením absorbcí při vlnových délkách 260 a 280 nm (Tabulka 6).

Tabulka 6 Výsledky stanovení koncentrace DNA

| Číslo vzorku | Absorbance při vlnových délkách |        | Koncentrace [ng/μl] | Poměr  |
|--------------|---------------------------------|--------|---------------------|--------|
|              | 260 nm                          | 280 nm |                     |        |
| 1            | 0,0584                          | 0,0271 | 58,4                | 2,15*  |
| 2            | 0,0368                          | 0,0197 | 36,8                | 1,87   |
| 3            | 0,0349                          | 0,0209 | 34,9                | 1,67** |
| 4            | 0,0127                          | 0,0079 | 12,7                | 1,61** |
| 5            | 0,0257                          | 0,0139 | 25,7                | 1,85   |
| 6            | 0,0092                          | 0,0049 | 9,2                 | 1,88   |
| 7            | 0,0036                          | 0,0020 | 3,6                 | 1,80   |
| 8            | 0,0128                          | 0,0070 | 12,8                | 1,83   |
| 9            | 0,0546                          | 0,0287 | 54,6                | 1,90*  |
| 10           | 0,0100                          | 0,0058 | 10,0                | 1,72   |
| 11           | 0,0352                          | 0,0189 | 35,2                | 1,86   |
| 12           | 0,0147                          | 0,0078 | 14,7                | 1,88   |
| 13           | 0,0645                          | 0,0349 | 64,5                | 1,85   |
| 14           | 0,0096                          | 0,0053 | 9,6                 | 1,81   |
| 15           | 0,0053                          | 0,0031 | 5,3                 | 1,71   |

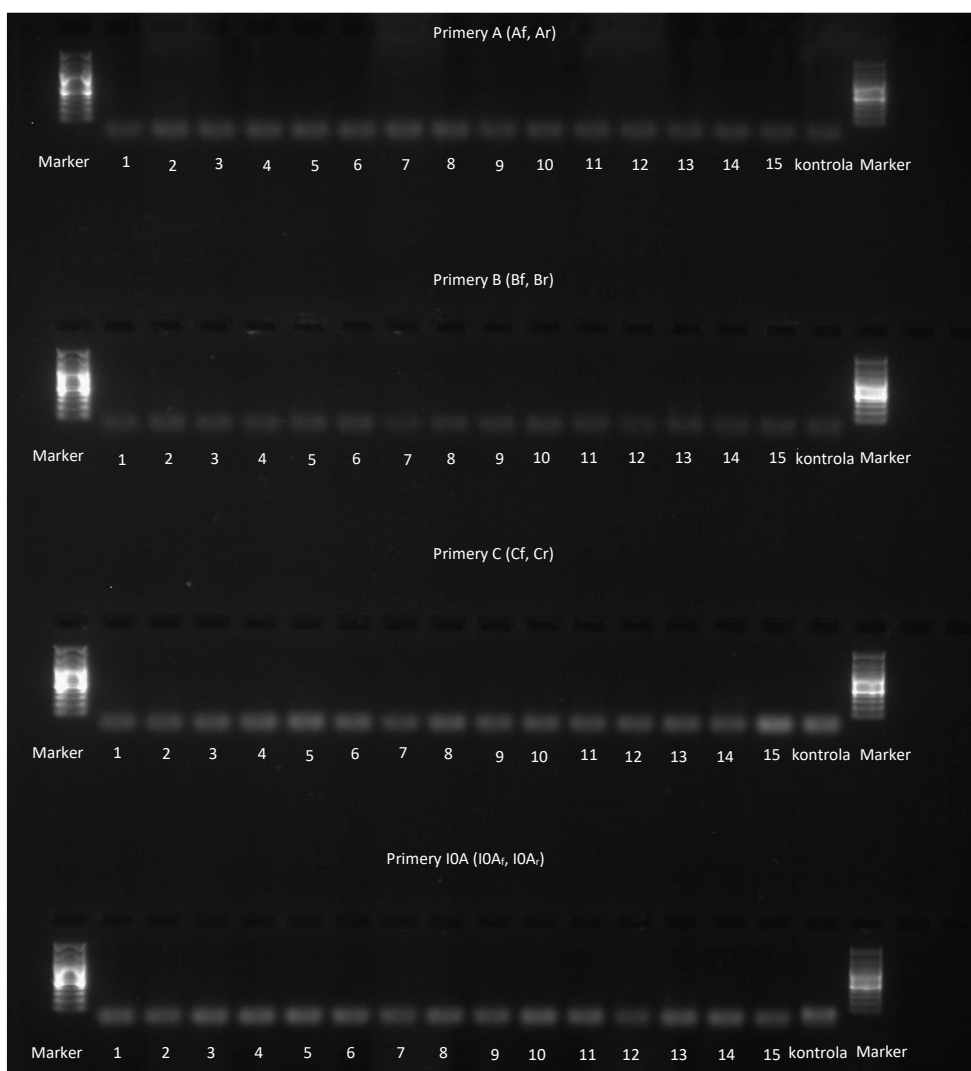
\*DNA znečištěna RNA; \*\* DNA znečištěna proteiny

Z tabulky je možné vyčíst hodnoty změřených absorbcí při jednotlivých vlnových délkách. Na základě těchto hodnot existuje vztah, jehož výsledkem je číselné vyjádření odpovídající čistotě izolované DNA z daného vzorku. Tento vztah je dán poměrem absorbcí při 260 a 280 nm, jehož ideální hodnota je rovna 1,8. V případě, že je tato hodnota vyšší než 1,9, ukazuje to na případ, kdy je DNA znečištěna RNA. Naopak v případě, kdy je hodnota nižší než 1,7, ukazuje to na DNA znečištěnou proteiny. Na základě změřených

koncentrací je viditelné, že izolace DNA použitím komerčního kitu pro potraviny - DNeasy® mericon® Food Kit (QIAGEN), byla provedena úspěšně, se získáním DNA o dostatečné koncentraci a čistotě. Mírně znečištěné byly pouze 4 vzorky. Na základě toho byly vyizolované DNA podrobeny další analýze.

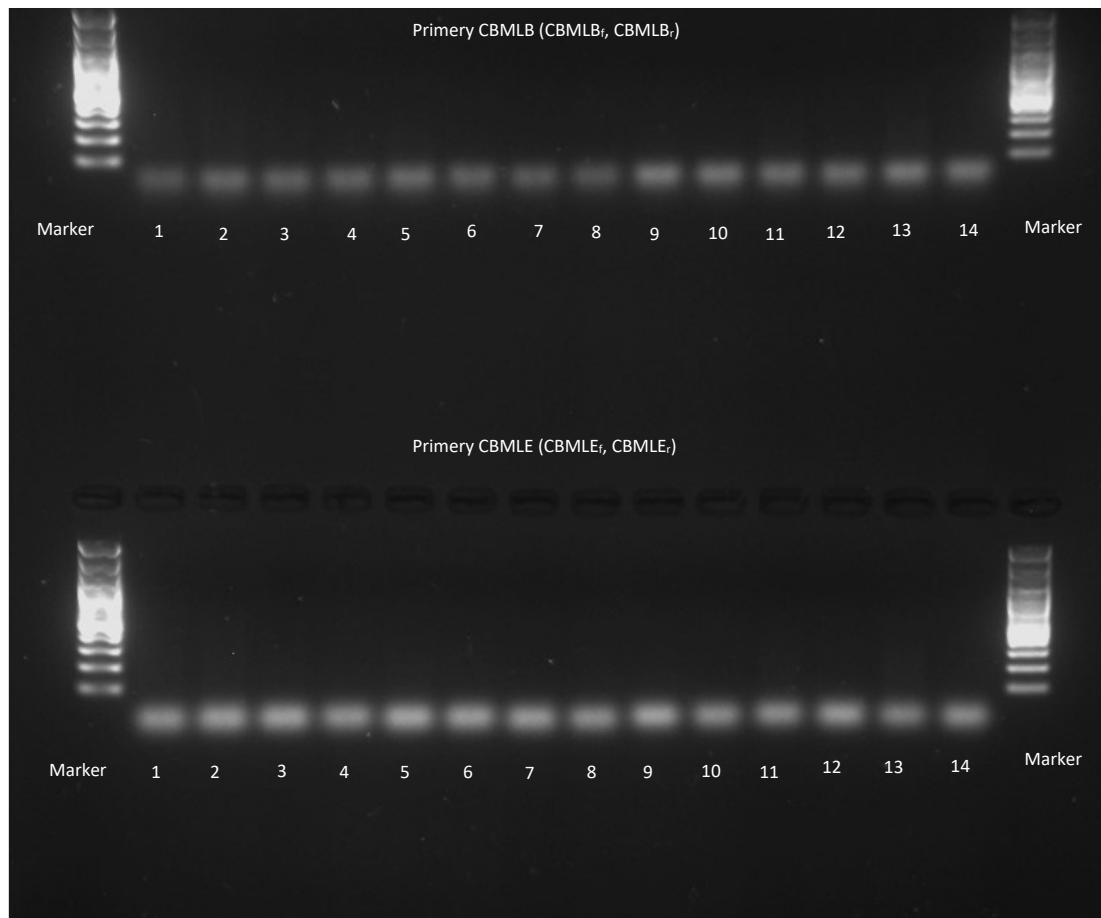
## 9.2 PCR s elektroforetickým ověřením

Dalším krokem bylo zmmožnění úseku DNA, specifického pro *Clostridium botulinum*, využitím PCR metody, při níž byly zvoleny konkrétní dvojice primerů, navazující se na specifické místo ve struktuře DNA těchto bakterií. Po proběhnutí PCR byly výsledné produkty analyzovány metodou gelové elektroforézy, přičemž byly společně se srovnávacím markerem (DNA Ladder 100 bp Plus) naneseny na agarózový gel, separovány a vizualizovány pod UV zářením.

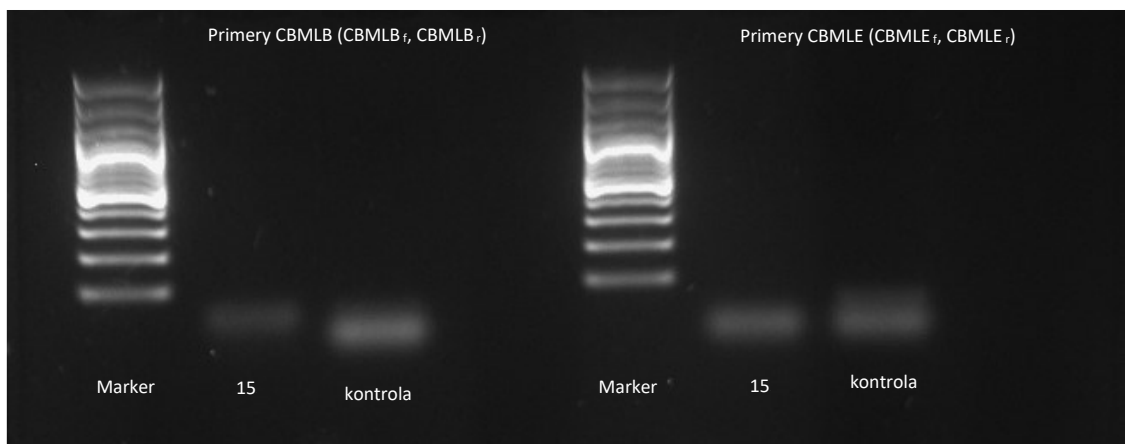


Obrázek 5 Výsledky průběhu elektroforézy 1 (získáno pomocí GeneSnap)  
Jednotlivé dráhy označují čísla vzorků meďů.

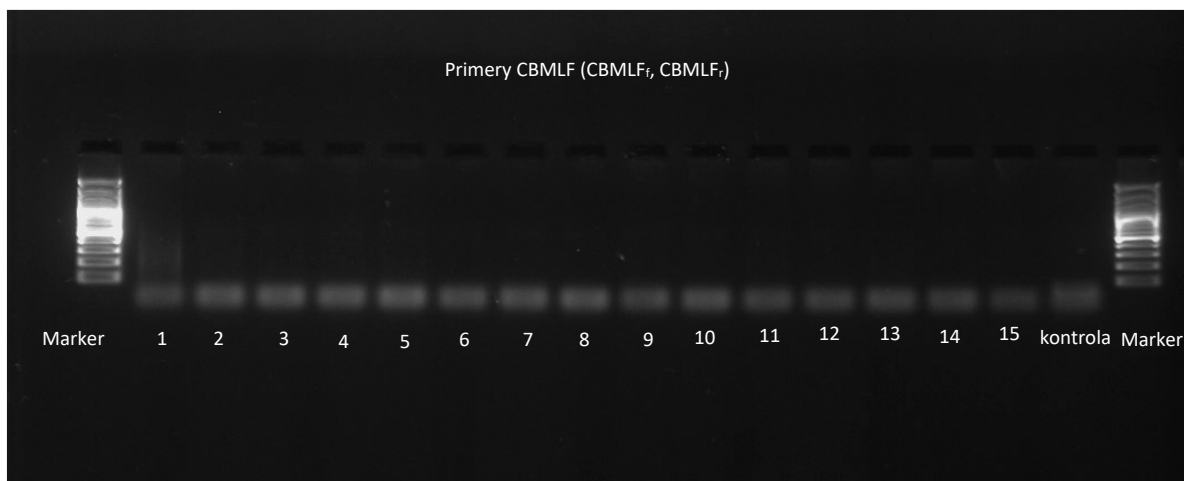




Obrázek 6 Výsledky průběhu elektroforézy 2 (získáno pomocí GeneSnap)  
Jednotlivé dráhy označují čísla vzorků meďů.



Obrázek 7 Výsledky průběhu elektroforézy 2 pokračování (získáno pomocí GeneSnap)  
Vzorek meďů č. 15 a kontrolní vzorek.



Obrázek 8 Výsledky průběhu elektroforézy 3 (získáno pomocí GeneSnap)  
Jednotlivé dráhy označují čísla vzorků medů.

Z výsledků elektroforézy (Obrázek 5-8) vyplývá, že v PCR směsi byla sice DNA přítomna v dostatečné koncentraci tak, aby se projevila pod UV světlem, ale nejedná se o výsledný PCR produkt, který by odpovídal DNA *Clostridium botulinum*. Příslušné fragmenty byly porovnány s DNA markerem o známé velikosti. Jejich velikost neodpovídá velikosti PCR produktu, který by byl v případě přítomnosti DNA této bakterie a použitím jednotlivých specifických primerů získán. Tyto velikosti byly uvedeny výše (Tabulka 2). Velikost fragmentů je podle průběhu elektroforézy malá a jedná se tedy o krátké úseky DNA, mezi nimiž se nacházejí i nezreagované primery. Z tohoto výsledku lze tedy dojít k závěru, že v žádném z 15 vzorků medu nebyla potvrzena přítomnost bakterie *Clostridium botulinum*. Tento závěr byl ověřen kultivační metodou s následnou identifikací pomocí hmotnostní spektrometrické metody MALDI-TOF.

### 9.3 Kultivační stanovení

Kultivačním stanovením byl pozorován nárůst mikroorganismů vyskytujících se v analyzovaných vzorcích medů. Toto stanovení vypovídalo o přítomnosti kultivovatelných specifických skupin mikroorganismů v příslušných vzorcích. Díky tomu bylo možné zjistit přítomné indikátorové skupiny mikroorganismů (jako CFU/g medu; Tabulka 7). V žádném z testovaných vzorků nebyl detekován nárůst *Clostridium* spp., plísní ani kvasinek. Přítomnost kvasinek by mohla naznačovat, že se v medu nachází vyšší obsah vody.

Tabulka 7 Identifikované mikroorganismy

| Číslo vzorku | CFU                          |  |
|--------------|------------------------------|--|
|              | Celkový počet mikroorganismů | Počet anaerobních sporulujících mikroorganismů |
| 1.           | ND*                          | <10 CFU/g**                                    |
| 2.           | <10 CFU/g                    | <10 CFU/g                                      |
| 3.           | <10 CFU/g                    | <10 CFU/g                                      |
| 4.           | ND                           | <10 CFU/g                                      |
| 5.           | ND                           | <10 CFU/g                                      |
| 6.           | ND                           | ND   |
| 7.           | <10 CFU/g                    | <10 CFU/g                                      |
| 8.           | <10 CFU/g                    | <10 CFU/g                                      |
| 9.           | <10 CFU/g                    | <10 CFU/g                                      |
| 10.          | ND                           | ND   |
| 11.          | <10 CFU/g                    | <10 CFU/g                                      |
| 12.          | ND                           | ND   |
| 13.          | <10 CFU/g                    | ND   |
| 14.          | <10 CFU/g                    | <10 CFU/g                                      |
| 15.          | <10 CFU/g                    | <10 CFU/g                                      |

\*ND = nedetekován nárůst na žádné ze 3 paralelních plotnách

\*\* nárůst 1 kolonie zjištěn na 1 nebo 2 plotnách

#### 9.4 Identifikace mikroorganismů

Posledním úkolem byla identifikace mikroorganismů. Z příslušných půd byly po kultivačním stanovení izolovány jednotlivé kolonie, které byly pomocí křížového roztěru přeneseny na PCA. Celkem se jednalo o 40 kolonií. Ty byly následně identifikovány metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF ve spolupráci s Ing. Marikou Lhotskou v laboratoři mikrobiologie ve Vaše laboratoře s.r.o. Analyzované proteiny přítomné v buňce byly porovnány s referenční knihovnou, podle které byl daný mikroorganismus identifikován (Tabulka 8).

Tabulka 8 Identifikované mikroorganismy

| Číslo vzorku | Izolát | Identifikovaný MO                                | Skóre |
|--------------|--------|--|-------|
| 1            | 1S     | <i>Bacillus pumilus</i>                          | 1,81  |
|              | 1R1    | <i>Bacillus pumilus</i>                          | 1,83  |
| 2            | 2P2    | <i>Bacillus subtilis</i>                         | 1,98  |
|              | 2R     | <i>Bacillus pumilus</i>                          | 1,80  |
| 3            | 3P2    | <i>Bacillus pumilus</i>                          | 2,00  |
| 4            | 4R     | <i>Bacillus licheniformis</i>                    | 2,01  |
| 5            | 5R     | <i>Alkalihalobacillus clausii</i>                | 1,70  |
| 7            | 7P     | <i>Escherichia coli</i>                          | 2,01  |
|              | 7R2    | <i>Escherichia coli</i>                          | 2,05  |
| 8            | 8P2    | <i>Bacillus megaterium (Priestia megaterium)</i> | 1,82  |
|              | 8S     | <i>Bacillus pumilus</i>                          | 1,89  |
| 9            | 9P     | <i>Bacillus pumilus</i>                          | 1,87  |
| 11           | 11P2   | <i>Bacillus cereus</i>                           | 2,22  |
|              | 11R    | <i>Bacillus licheniformis</i>                    | 2,15  |
| 14           | 14P1   | <i>Bacillus altitudinis</i>                      | 1,72  |
|              | 14P3   | <i>Bacillus pumilus</i>                          | 1,97  |
|              | 14P4   | <i>Bacillus altitudinis</i>                      | 1,71  |
| 15           | 15P1   | <i>Bacillus pumilus</i>                          | 1,77  |

Identifikaci mikroorganismů odpovídá skóre v rozmezí 0 (minimum) až 3 (maximum), které charakterizuje spolehlivost dané identifikace. Identifikované mikroorganismy tvoří převážně sporulující bakterie rodu *Bacillus*, které se do medu mohly dostat primární kontaminací, a to tak, že byly do úlu zaneseny samotnými včelami. Jedná se totiž převážně o bakterie, které se běžně vyskytují v půdě, vzduchu, prachu nebo gastrointestinálním traktu (Grabowski, 2015; Snowdon, 1996). Jedinou identifikovanou bakterií, která se do vzorku medu musela dostat později, je *Escherichia coli*, zachycena ve vzorku medu č. 7, která v prostředí medu dlouho nepřežívá (Frank, 2010). Velkou část bakterií se vůbec nepodařilo identifikovat. To mohlo být způsobeno nízkou koncentrací daného mikroorganismu nebo nepřítomností spektra v referenční knihovně, které by bylo pro příslušný mikroorganismus charakteristické. Ani touto metodou nebyla bakterie *Clostridium botulinum* identifikována, čímž byl potvrzen výsledek, vyplývající z molekulárních metod.

## 9.5 Souhrnná diskuze

V medu lze pozorovat mikroorganismy, které jsou schopny odolávat vysoké koncentraci sacharidů, a tím i nižší hodnotě vodní aktivity, kyselému prostředí a jeho antimikrobním účinkům. Jejich výskyt ale může značně ovlivnit kvalitu medu a jeho zdravotní nezávadnost (Snowdon, 1996; Vorlová, 2002).

Mikroflóru medu tvoří mikroorganismy, které se do medu mohou dostat z plástů, pylu, prachu, vzduchu, půdy nebo nektaru. Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím mikrobiální kvalitu medu je však samotný zdravotní stav každé jednotlivé včely, která med sklízí, přenáší a upravuje, čímž vzniká nejpravděpodobnější cesta přenosu mikroorganismů do medu (Grabowski, 2015; Kačániová, 2009).

Jedním z největších rizik alimentárního onemocnění spojeného s konzumací medu u malých dětí do jednoho roku je konzumace medu, která u jiných osob zpravidla nezpůsobuje zdravotní komplikace. Jedná se o kojenecký botulismus, způsobený bakterií *Clostridium botulinum*. (Špačková, 2017).

Výsledky této bakalářské práce byly porovnány se závěry dalších prací. První z nich je diplomová práce Ing. Veroniky Pavlové (Pavlová, 2020), která se zabývá sledováním diverzity mikroflóry medů. Tato práce byla navíc inspirací k provedení praktické části mé práce a bylo z ní vycházeno při metodice izolace DNA ze vzorků medu. Lokality, ze kterých byly vzorky medů získány, jsou polohou velmi blízké. Dalo by se tedy očekávat, že výsledky budou podobné. Stejně tomu tak bylo v případě výskytu sporulující bakterie *Clostridium botulinum*, která nebyla detekována v žádném ze 70 testovaných vzorků v diplomové práci Pavlové (Pavlová, 2020). V diplomové práci Pavlové byly mikroorganismy dále charakterizovány metodou DGGE s následnou sekvenací, kterou se povedlo identifikovat 33 druhů vegetativních forem bakterií. V porovnání s kultivační metodou se jedná bezesporu o citlivější metodu. Neodhalila však výskyt sporulujících bakterií rodu *Bacillus* (případně nových zástupců vyčleněných z tohoto rodu), které byly získány v této práci kultivačně s následnou identifikací izolátů metodou MALDI-TOF.

Výsledky práce byly také srovnány s publikací (Wojtacka, 2017), která byla inspirací pro použití primerů v této bakalářské práci (viz. kapitola 8.4). Výše zmíněná studie se zabývala analýzou 50 litevských medů na přítomnost *Clostridium botulinum* s použitím multiplex-PCR. Ta ukázala, že touto bakterií bylo kontaminováno 30 vzorků. Stejně primery byly použity i v další podobné studii (Wojtacka, 2016), ve které bylo testováno celkem

102 vzorků medu z nichž bylo 22 pozitivně testováno na přítomnost *Clostridium botulinum*. Opět byla použita multiplex-PCR s využitím stejných primerů.

I přesto, že byly využity stejné primery, jako ve výše uvedených studiích, a bylo provedeno kultivační stanovení s následnou identifikací vybraných izolovaných mikroorganismů metodou MALDI-TOF, se v žádném z testovaných vzorků medů neprokázala přítomnost *Clostridium botulinum*, což znamená, že tyto medy by neměly pro děti do jednoho roku představovat riziko spojené s onemocněním zvaným kojenecký botulismus. Je třeba však brát v úvahu, že výsledky uvedené v této práci nelze zobecňovat na medy získané od včelařů v dané oblasti, respektive v České republice.

## ZÁVĚR

Tato práce se zabývala mikroflórou 15 vzorků směsných medů, získaných od soukromých včelařů, se zaměřením na výskyt bakterií *Clostridium botulinum* a jejich detekci využitím molekulárních metod. Závěr těchto metod byl ověřen také kultivačně s následným využitím metody MALDI-TOF.

Žádný z testovaných vzorků medů neobsahoval bakterie *Clostridium botulinum*, které by mohly představovat případné riziko pro děti do jednoho roku, s projevem alimentárního onemocnění nazývaného kojenecký botulismus. Po úspěšné izolaci DNA z jednotlivých vzorků medu, která byla ověřena změřením příslušných koncentrací, bylo provedením PCR s následným elektroforetickým vyhodnocením zjištěno, že se v žádném vzorku nenachází DNA, která by patřila této bakterii, produkující nebezpečný toxin. Tento závěr byl ověřen také metodou MALDI-TOF, která navazovala na předchozí kultivační stanovení. Ani ta však neukázala na přítomnost této bakterie. Byly identifikovány jiné sporulující bakterie rodu *Bacillus*, které se do medu dostaly pravděpodobně primární kontaminací, způsobenou samotnými včelami. Jedná se o zástupce vyskytující se převážně v půdě, na kterou mohly včely dosednout. Převážně se jedná o *Bacillus pumilus*.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ALCAMO, I. Edward, 2001. *DNA technology: the awesome skill*. 2nd. San Diego: Academic Press. ISBN 0120489201.
- BROWN, T. A., 2016. *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*. Seventh edition. Chichester: Wiley Blackwell. ISBN 978-111-9072-560.
- ČERMÁKOVÁ, Tatiana, Róbert CHLEBO a Milena HUSÁRIKOVÁ, 2010. *Knih o medu*. Bratislava: Estone Books. ISBN 978-80-8109-132-2.
- ČESKO, 2003. Vyhláška č. 76/2003 Sb. Vyhláška, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. In: *Sbírka zákonů České republiky*. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-76>
- DNeasy® mericon® Food Kit: Handbook, 2014. QIAGEN®.
- DRAŠAR, Jan, 1978. *Včelařství*. 1. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 312 s. ISBN 07-079-78.
- FRANK, Renate, 2010. *Zázračný med*. [Líbeznice]: Víkend. ISBN 978-80-7433-024-7.
- FREIMAN, Anatoli a Anatoli FREIMAN, 2004. The story of Clostridium botulinum: from food poisoning to Botox. *Clin Med* [online]. Royal College of Physicians, 4(3), 258–261 [cit. 2022-05-12]. ISSN 1470-2118. Dostupné z: doi:10.7861
- GRABOWSKI, N.T. a G KLEIN, 2015. Microbiology and Food-borne Pathogens in Honey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 57(9), 1852-1862 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2015.1029041
- JELÍNEK, Jan, 2021. *Úvod do biochemie a molekulární biologie (nejen) pro gymnázia*. Vydání první. Prostějov: Computer Media. ISBN 978-80-7402-440-5.
- KAČÁNIOVÁ, Miroslava, Simona PAVLIČOVÁ, P. HAŠČÍK, G. KOCIUBINSKI, Vladimíra KňAZOVICKÁ, M. SUDZINA, Janka SUDZINOVÁ a Martina FIKSELOVÁ, 2009. Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* [online]. 56(3), 285-295 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1217-8950. Dostupné z: doi:10.1556/AMicr.56.2009.3.7
- Klinicky významné bakterie*, 2012. 1. vyd. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-588-6.
- MALDI Biotyper®, 2021. © Bruker.
- Med*, 2010. 1. vyd. Přeložil Kateřina BLAHOVÁ. Praha: Sun. Užitečné rady. ISBN 978-80-7371-342-3.
- NOVÁKOVÁ, Elena, 2017. Clostridium botulinum. *REVUE MEDICÍNY V PRAXI* [online]. 15(3), 1-4 [cit. 2022-03-15]. Dostupné z: [https://www.vzbb.sk/sk/aktuality/spravy/2017/clostridium\\_revue\\_3\\_2017.pdf](https://www.vzbb.sk/sk/aktuality/spravy/2017/clostridium_revue_3_2017.pdf)
- PAVLOVÁ, Veronika, 2020. *Sledování diverzity mikroflóry v medu*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí práce Leona Buňková,.
- POORMONTASERI, M., S. HOSSEINZADEH a S.S. SHEKARFOROUSH, 2014. Characterization of clostridium botulinum spores and its toxin in honey. *Iranian Journal of Veterinary Research* [online]. 15(1), 36-39 [cit. 2022-05-14]. ISSN 17281997. Dostupné z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edselc&an=edselc.2-52.0-84901620699&scope=site>
- PŘIDAL, Antonín, 2003. *Včelí produkty*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 8071577170.
- PŘIDAL, Antonín a Květoslav ČERMÁK, 2005. *Včelařství*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-7157-850-9.
- SNOWDON, J.A. a D.O. CLIVER, 1996. Microorganisms in Honey: a review. *International Journal of Food Microbiology (Netherlands)* [online]. 31(1-3), 1-26 [cit. 2022-03-01]. ISSN



01681605. Dostupné z:  
<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsagr&an=edsagr.NL9701220&scope=site>
- ŠMARDÁ, Jan, 2005. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.
- ŠPAČKOVÁ, Michaela a Zdenka MANDÁKOVÁ, 2017. Kojenecký botulismus – med jako rizikový faktor. *ZPRÁVY CENTRA EPIDEMIOLOGIE A MIKROBIOLOGE* [online]. Praha: SZÚ, **26**(4), 152–156 [cit. 2022-03-15]. ISSN 1804 – 8676. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy\\_EM/26\\_2017/04\\_duben/152\\_botulismus.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/26_2017/04_duben/152_botulismus.pdf)
- VESELÝ, Vladimír, Dalibor TITĚRA a František KAMLER, 1997. *Základy včelaření*. Praha: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR. Živočišná výroba (Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR). ISBN 80-710-5139-X.
- VORLOVÁ, Lenka, 2002. *Med: souborná analýza*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, Fakulta veterinární hygieny a ekologie. ISBN 8073054507.
- VOTAVA, Miroslav, 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 80-902896-6-5.
- WOJTACKA, Joanna, Beata WYSOK, Aistė KABAŠINSKIENė, Agnieszka WISZNIEWSKA, Małgorzata GOMÓŁKA-PAWLICKA, Joanna SZTEYN, Mindaugas MALAKAUSKAS a Alicja MIGOWSKA-CALIK, 2017. Prevalence of Clostridium botulinum Type A, B, E and F Isolated From Directly Sold Honey in Lithuania. *Journal of Agricultural Science and Technology* [online]. **19**, 335-343 [cit. 2022-05-14]. ISSN 1680-7073. Dostupné z:  
[https://www.researchgate.net/publication/314101019\\_Prevalence\\_of\\_Clostridium\\_botulinum\\_Type\\_A\\_B\\_E\\_and\\_F\\_Isolated\\_From\\_Directly\\_Sold\\_Honey\\_in\\_Lithuania](https://www.researchgate.net/publication/314101019_Prevalence_of_Clostridium_botulinum_Type_A_B_E_and_F_Isolated_From_Directly_Sold_Honey_in_Lithuania)
- WOJTACKA, Joanna, Beata WYSOK, Zbigniew LIPIŃSKI, Małgorzata GOMÓŁKA-PAWLICKA, Helena RYBAK-CHMIELEWSKA a Agnieszka WISZNIEWSKA-ŁASZCZYCH, 2016. Clostridium botulinum Spores Found in Honey from Small Apiaries in Poland. *Journal of Apicultural Science* [online]. **60**(2), 89-100 [cit. 2022-05-19]. ISSN 2299-4831. Dostupné z: doi:10.1515/jas-2016-0020

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

|           |  |
|-----------|--|
| bp        | base pairs (párů bází)                                     |
| CPM       | celkový počet mikroorganismů                               |
| DNA       | deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)         |
| CHYGA     | Chloramphenicol Yeast Glucose Agar                         |
| MALDI-TOF | Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight |
| MO        | mikroorganismus  |
| PCA       | Plate Count Agar   |
| PCR       | Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)   |
| pH        | power of hydrogen  |
| RCA       | Reinforced Clostridial Agar                                |
| RNA       | ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)                   |
| SDS       | sodium dodecyl sulfate (dodecylsulfát sodný)               |
| TAE       | tris-acetát-EDTA   |
| UV        | ultraviolet (ultrafialové)                                 |

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

|  |    |
|--|----|
| Obrázek 1 Odlišení matky ve včelstvu (archiv autorky) .....  | 14 |
| Obrázek 2 Dělnice tvořící zásoby (archiv autorky) .....  | 15 |
| Obrázek 3 Geografické zobrazení původu testovaných vzorků medu (vytvořeno pomocí <a href="http://detske.napady.net">detske.napady.net</a> a <a href="http://ucebnicemapy.cz">ucebnicemapy.cz</a> ) ..... | 30 |
| Obrázek 4 Sledování průběhu elektroforézy (archiv autorky).....  | 36 |
| Obrázek 5 Výsledky průběhu elektroforézy 1 (získáno pomocí GeneSnap) Jednotlivé dráhy označují čísla vzorků medů.....  | 40 |
| Obrázek 6 Výsledky průběhu elektroforézy 2 (získáno pomocí GeneSnap) Jednotlivé dráhy označují čísla vzorků medů.....  | 41 |
| Obrázek 7 Výsledky průběhu elektroforézy 2 pokračování (získáno pomocí GeneSnap) Vzorek medu č. 15 a kontrolní vzorek.....   | 41 |
| Obrázek 8 Výsledky průběhu elektroforézy 3 (získáno pomocí GeneSnap) Jednotlivé dráhy označují čísla vzorků medů.....  | 42 |

**SEZNAM TABULEK**

|   |    |
|---|----|
| Tabulka 1 Testované druhy medu a jejich původ .....                             | 30 |
| Tabulka 2 Primery použité při PCR.....  | 33 |
| Tabulka 3 Obecné složení reakční směsi jednoho vzorku.....                      | 34 |
| Tabulka 4 Zvolený průběh PCR .....  | 35 |
| Tabulka 5 Kultivační podmínky stanovení jednotlivých skupin mikroorganismů..... | 38 |
| Tabulka 6 Výsledky stanovení koncentrace DNA.....                               | 39 |
| Tabulka 7 Identifikované mikroorganismy.....                                    | 43 |
| Tabulka 8 Identifikované mikroorganismy.....                                    | 44 |