



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: [LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA](#)

Autor: Eliška Firmanová

Vedoucí práce: Ing. Petr Mráz, Ph.D.

České Budějovice 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „ *Inhibiční a baktericidní aktivita medů na patogen *Paenibacillus larvae* v závislosti na jejich zpracování* “ 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/diplomové 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

.....

podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu bakalářské práce Ing. Petru Mrázovi, Ph.D. za vřelý a profesionální přístup, pomoc při praktické části v laboratoři i se samotným zpracováním bakalářské práce.

Inhibiční a baktericidní aktivita medů na patogen *Paenibacillus larvae* v závislosti na jejich zpracování

Abstrakt

Tato práce se zabývá antimikrobiální a inhibiční aktivitou medu na původce onemocnění moru včelího plodu *Paenibacillus larvae*. Práce je rozdělena na dvě části, teoretickou a experimentální. Teoretická část práce se věnuje rešerši tohoto tématu a obsahuje 3 zásadní kapitoly. Prvním z nich je kapitola o včele medonosné z hlediska ekologie, významu a taxonomického zařazení. Druhá část je o medu, jeho složení a vzniku. Třetí se zabývá problematikou moru včelího plodu a jejímu původci *P. larvae*. Experimentální část je věnována testování vlivu antimikrobiální aktivity medu na bakterii *P. larvae*. Byl zkoumán i vliv zpracování medu na antimikrobiální aktivitu. Testované vzorky byly ohřáty na námi zvolené teploty 50°C a 70°C a v mikrovlnné troubě, vzorky byly zahřívány do ztekucení. Druhým předmětem testování u vzorků bylo vysoušení. Tím jsme dosáhly otestování vlivu dvou způsobů zpracování medu na jejich antimikrobiální aktivitu.

Byly k tomu použity metody k testování minimální inhibiční a baktericidní koncentrace. Minimální inhibiční koncentrace byla testována v mikrotitračních destičkách pomocí diluční metody, oproti tomu minimální baktericidní koncentraci jsme stanovovali pomocí diskové difúzní metody. Výsledky této práce by mohli příznivě přispět k dalšímu rozvoji apiterapie či využití medu v lékařství.

Klíčová slova

***Apis mellifera* ; mor včelího plodu; minimální inhibiční koncentrace; minimální baktericidní koncentrace; antimikrobiální aktivita**

Inhibitory and bactericidal activity of honeys on the pathogen *Paenibacillus larvae* depending on their processing

Abstract

This work deals with the antimicrobial and inhibitory activity of honey on the pathogen of American Foulbrood disease in honeybee larvae, *Paenibacillus larvae*. The work is divided into two parts, theoretical and experimental. The theoretical part focuses on a literature review of this topic and includes 3 essential chapters. The first one is about the honeybee in terms of ecology, importance, and taxonomic classification. The second part is about honey, its composition, and formation. The third chapter deals with the problem of American Foulbrood disease in honeybee larvae and its causative agent, *P. larvae*. The experimental part is dedicated to testing the effect of antimicrobial activity of honey on the bacterium *P. larvae*. The influence of honey processing on antimicrobial activity was also examined. The tested samples were heated at temperatures of 50°C, 70°C and heated in the microwave, honey samples were heated to liquefaction. The second testing was conducted through drying. This allowed us to test the effect of two methods of honey processing on their antimicrobial activity.

Methods for testing the minimum inhibitory and bactericidal concentrations were used. The minimum inhibitory concentration was tested in microtiter plates using the dilution method, while the minimum bactericidal concentration was determined using the disk diffusion method. The results of this work could contribute positively to the further development of apitherapy or the use of honey in medicine.

Key words

***Apis mellifera*; American Foulbrood disease; minimum inhibitory concentration; minimum bactericidal concentration; antimicrobial activity**

Obsah

1.	Úvod	8
2.	Teoretická část	9
2.1	Včelařství	9
2.1.1	Historie včelařství	9
2.1.2	Význam včelařství	10
2.1.3	Původ a taxonomie včely medonosné	11
2.1.4	Způsob života včely	11
2.1.5	Plemena včely	12
2.1.6	<i>Apis mellifera</i>	12
2.1.7	Zdravotní situace včel a ohrožení včelstev	13
2.1.8	Zdroje potravy včel	14
2.2	Nemoci včel	19
2.2.1	Mor včelího plodu	20
2.2.1.1.	<i>Paenibacillus larvae</i>	21
2.2.1.2.	Přenos MVP	22
2.2.1.3.	Patogeneze	23
2.2.1.4.	Virulence	23
2.2.1.5	Léčba a prevence	23
2.2.1.6	Genotypy <i>P.larvae</i>	24
2.3	Med	25
2.3.1	Vznik medu	26
2.3.2	Druhy medů	26
2.3.3	Získávání medu	28
2.3.4	Zpracování medu	29
2.3.5	Zahřívání a dekrystalizace	29
2.3.6	Filtrace medu	30
2.3.7	Pastování medu	31
2.3.8	Vysušování medu	31
2.3.9	Chemické složení medu	32
2.3.10	Antimikrobiální aktivita medu	34
2.3.11	Hydroxymethylfurfural	35
2.3.12	Fyzikální a chemické požadavky na med podle vyhlášky č. 76/2003 Sb. a normy Český med	36

2.4	<i>Minimální inhibiční koncentrace</i>	37
2.5	<i>Minimální baktericidní koncentrace</i>	37
3.	Cíl práce	38
4.	Metodika	39
4.1	<i>Použitá zařízení a materiál</i>	39
4.2	<i>Přístroje a pomůcky</i>	39
4.3	<i>Chemikálie</i>	39
4.4	<i>Živé půdy</i>	39
4.5	<i>Bakteriální kmen</i>	39
4.6	<i>Vzorky medů</i>	40
5.	Postup práce	41
5.1	<i>Stanovení MIC</i>	41
5.1.1	<i>Příprava media</i>	41
5.1.2	<i>Příprava bakteriální kultury</i>	42
5.1.3	<i>Příprava vzorků medu</i>	42
5.1.4	<i>Příprava inokula</i>	43
5.1.5	<i>Mikrotitrační destička</i>	43
5.1.6	<i>Výpočet MIC</i>	44
5.2	<i>Stanovení MBC</i>	44
6.	Výsledky	46
7.	Diskuze	53
8.	Závěr	55
9.	Seznam literatury	56
10.	Seznam obrázků	71
11.	Seznam zkratk	73

1. Úvod

Med je jedním z nejcennějších přírodních produktů, které lidstvo od starověku získalo. Používá se nejen jako nutriční produkt, ale také v tradiční medicíně a jako alternativní léčba klinických stavů od hojení ran až po léčbu rakoviny. Producentem je včela *Apis mellifera*, která ho vytváří sběrem a zahušťováním sladkých šťáv – především nektaru z květů a medovice, kterou vylučují například mšice. Med je populární především pro své antimikrobiální a antioxidační vlastnosti. Mezi faktory, které se podílejí na těchto účincích patří : vysoký obsah cukrů, glukózooxidázový systém, vysoký redoxní potenciál a chemické látky a enzymy s antimikrobiálním účinkem. Tyto složky činí med bakteriostatickým i bakteriocidním činidlem zároveň.

I přesto, že jsou včely velmi důležitou součástí celosvětového ekosystému, jejich úpadek po celém světě je nepřehlédnutelný. Úhyn včelstev má na svědomí nepřiměřené užívání chemických látek na zemědělských půdách, ale také včelí onemocnění, která jsou způsobována bakteriemi, viry a houbami. V této práci se budu zaměřovat na původce moru včelího plodu grampozitivní bakterii *Paenibacillus larvae*. Mor včelího plodu bývá považován za nejnebezpečnější včelí onemocnění, jelikož nezabíjí pouze včelí larvy, ale je velmi nebezpečný pro celé včelstvo. Opatření proti této chorobě jsou regulována zákonem a nejčastěji zahrnují likvidaci zjevně nemocných včelstev. Antibiotická léčba tohoto včelího onemocnění je v Evropě přísně zakázána.

Cílem této práce je zjistit inhibiční a baktericidní vlastnosti medu na původce moru včelího plodu patogen *Paenibacillus larvae*. A zda má vliv zpracování medu na jeho antimikrobiální vlastnosti. Výzkum spočíval ve stanovení minimální inhibiční a baktericidní koncentrace různých vzorků medu, které byly součástí média MYPGP ve kterém byla naočkovaná bakterie *P. larvae*.

2. Teoretická část

2.1 Včelařství

2.1.1 Historie včelařství

Včelařství má celosvětově velmi dlouhou historii. Jako důkazy nám slouží jeskynní malby z pozdní doby kamenné (Přidal, 2003). S největší pravděpodobností med patřil k základním surovinám pravěkého prehistorického člověka (Počuch, 2020). V době bronzové lidé připravovali nápoj z medu a vody, který nechali kvasit a tím byli schopni získat alkohol. V této době se včelí vosk začal stávat velmi vzácným produktem díky jeho multifunkčním využitím, používal se při mumifikaci a balzamování těl. Neodmyslitelný význam měl včelí vosk i pro výrobu svíček (Přidal, 2003).

Později se med začal užívat i jako léčivo. Svou popularitu si získal hlavně díky svým schopnostem ničit bakterie. Používal se především k hojení ran, které byly zasažené bakteriální infekcí (Počuch, 2020). Do roku 2450 př. n. l. Egypťané vybudovali sofistikované včelařství. Egypt byl pravděpodobně první říší, kde lidé chovali divoké včely v úlech, je známo, že přemísťovali úly v závislosti na rozkvětu určitých rostlin (Ransome, 2004).

Včelaření s horizontálními úly se v průběhu dvou tisíciletí rozšířilo po celém Středomoří. Med a vosk se staly důležitými obchodními komoditami během evropského středověku a včelařství ve skleповých, kládových, krabicových a stromových úlech vzkvétalo (Kritsky, 2017). Se Středověkem přišlo užití včelího vosku i v umění (Přidal, 2003). Byl používán pro sochařství, v malbě, anebo sloužil, jako ochranná vrstva uměleckých děl (Kritsky, 2017). Ani v novověku se ve včelařství mnoho nezměnilo. Teprve v posledních dvou stoletích postoupilo včelařství rychle dopředu. Ovšem vrcholem v rozšiřování tohoto druhu byl vývoz včelstev evropskými kolonizátory do celého světa na počátku 17. století (Delaplane a Mayer, 2000).

Koncem 18. a celé 19. století se objevovaly převratné technické objevy ke zdokonalování úlu, využití odstředivé síly v medometu a výroba umělých mezistěn, 20. století pak patřilo biologii včel i včelstev v moderních úlech. V některých státech, jako je Kanada, Rusko a USA, dosáhlo včelařství dokonce úrovně průmyslové výroby (Knesplová, 2010).

2.1.2 Význam včelařství

Jednou z hlavních významů včelaření je produkce medu a dalších úlových produktů, jako je včelí vosk, propolis a mateří kašička. Med je přírodní sladidlo a všestranná složka mnoha potravin, zatímco včelí vosk a propolis se používají v různých kosmetických přípravcích a výrobcích osobní péče, mateří kašička je látka bohatá na živiny, která se používá v některých zdravotních doplncích. Včelí produkty poskytují zdravé, vysoce výživné potraviny, bezpečné léky (apiterapie) a suroviny pro průmysl (Agera, 2011).

Další důležitou rolí včel je opylování. Opylení je považováno za nejdůležitější regulační, podpůrné a kulturní ekosystémové služby (Kremen, 2005; De Groot et al., 2010). Je to klíčová služba pro produkci ovoce, zeleniny, ořechů, bavlny a semenných plodin mezi mnoha dalšími zemědělskými plodinami a podporuje reprodukci společenstev divokých rostlin (Kearns et al., 1998; Aguilar et al., 2006). Včely jsou jedním z nejdůležitějších opylovačů na světě a hrají klíčovou roli v reprodukci mnoha druhů rostlin, včetně mnoha plodin, na které se lidé spoléhají jako potravu. Bez včel by se mnoho rostlinných druhů nemohlo reprodukovat, což by vedlo ke snížení biologické rozmanitosti a potenciálnímu kolapsu ekosystémů. Včelařství chrání přírodu, zemědělství, udržuje živobytí a zajišťuje potravinovou bezpečnost. Na včelstvo jsou kladeny velké nároky, neboť zajišťuje stabilitu ekosystémů vlivem opylování (Sládek a Čermák, 2016).

Včela je důležitá jak po stránce ekologické, tak po stránce hospodářské. Včela *Apis mellifera* dokonale splňuje kritéria pro použití jako bioindikátor. Bioindikátory umožňují znát zdravotní stav určitého ekosystému, to znamená, že umožňují nepřímo měřit kvalitu životního prostředí. To včela dokáže především díky získávání mnoha vzorků, protože za sběrem pylu cestuje na velké vzdálenosti. Také za letu sbírají různé látky ve vzduchu a díky tomu získáváme mnoho užitečných informací, které jsou pro nás důležité k porozumění ekosystému (Vargas -Valero et al., 2020).

Včely samotné zahrnují odhadem 25 000–30 000 druhů po celém světě, všechny jsou povinnými návštěvníky květin (Kearns et al., 1998; Buchmann a Nabhan, 1997). Spoléháme na to, že včely opylují 70 % nejcennějších plodin používaných přímo pro lidskou spotřebu. Produkce 84 % druhů plodin pěstovaných v Evropě přímo závisí na

hmyzích opylovateli zejména včelách. Celosvětově včely opylují více než 400 druhů plodin a v USA více než 130 druhů plodin (Kremen, 2005).

2.1.3 Původ a taxonomie včely medonosné

Hmyz představuje skutečně starou skupinu živočichů, která svými kořeny sahá do období mezi devonem a karbonem. Vyuvíjel se ještě před příchodem plazů (Weiss 2001).

Včela je nejznámější zástupce společenského hmyzu, patří do řádu blanokřídlého hmyzu (Hymenoptera), který čítá asi 100 000 druhů. Její celkové taxonomické zařazení je říše – živočichové (Animalia), kmen – členovci (Arthropoda), třída – hmyz (Insecta), řád – jak už bylo řečeno - blanokřídlí (Hymenoptera), podřád – štíhloпасí (Apocrita), čeleď – včelovití (Apidae), rod – (*Apis*). V rámci tohoto rodu existují čtyři druhy, které jsou *Apis florea*, *dorsata*, *cerana* a *mellifera* (Devillers a Pham-Delegue, 2002).

Včela se vyskytuje celosvětově. Předpokládá se, že včela medonosná původně pochází z oblasti dnešního Afganistanu, odkud se rozšiřovala do okolních oblastí a dále až do Evropy (Preston, 2006), ale ve spoustě zemí není původním hmyzem. Například na Nový Zéland či do Austrálie byla přivezena až v 17. století. Rozmanité klimatické podmínky, prostředí a flóra daly vzniknout mnoha poddruhům s charakteristickými adaptacemi k danému zeměpisnému místu (Winston 1991).

2.1.4 Způsob života včely

Včela medonosná žije ve společenství, které nazýváme včelstvo. Včely jsou společenský hmyz, který žije ve vysoce organizovaných koloniích. Způsob života včely je vysoce strukturovaný a točí se kolem dělby práce a spolupráce v rámci včelstva. Včelstvo se skládá z matky, dělnic a trubců. Tyto včelí kasty plní různé úkoly s ohledem na stáří jedince a roční období (Bentzen, 2008). Včelí královna je zodpovědná za kladení vajíček a je jedinou plodnou samicí ve včelstvu. Včelí samečci, nazývaní trubci, mají jediný účel – pářit se s královnou a neúčastní se jiných úkolů v kolonii. Dělnice, které tvoří většinu kolonie, jsou zodpovědné za úkoly, jako je stavba a údržba úlu, sběr nektaru a pylu, péče o mladé včely a obrana kolonie před predátory. Včely dělnice spolu komunikují pomocí složitých chemických signálů, včetně feromonů a tanců, aby koordinovaly své aktivity. Délka života včel se výrazně liší v závislosti na okamžiku

jejich vylíhnutí. Proto je lze klasifikovat buď jako krátkověké letní včely nebo dlouhověké zimní včely. Včely líhnuté na jaře a v létě žijí v průměru 25 - 40 dní, zatímco zimní včely mají mnohem delší životnost, více než 100 dní (Mattila et al., 2001). Způsob života včel je vysoce sezónní a v různých ročních obdobích se provádějí různé úkoly. Během jarních a letních měsíců se včely dělnice zaměřují na sběr nektaru a pylu, aby nakrmily mladé včely a uskladnily je na zimní měsíce, kdy je potravy nedostatek.

Celkově je způsob života včel vysoce organizovaný a spolupracující, přičemž každá včela plní specifický úkol, aby zajistila přežití a úspěch včelstva jako celku (Bentzien, 2008).



Obrázek 1: Včela medonosná (zdroj : vcela.wbs.cz)

2.1.5 Plemena včely *Apis mellifera*

V rámci druhu *Apis mellifera* existuje mnoho různých poddruhů nebo plemen, z nichž každý má své vlastní jedinečné vlastnosti. Plemena včely medonosné dělíme do čtyřech základních skupin. Severozápadní, jihovýchodní, africká a orientální. V Evropě se přirozeně vyskytují dvě skupiny – jihovýchodní a severozápadní. Severozápadní skupina se do Evropy šířila přes Gibraltarský průliv, paradoxně má tato skupina větší genetickou podobu s africkou skupinou než se skupinou jihovýchodní, která se do Evropy šířila přes Sinajský poloostrov. Každá z těchto čtyřech skupin se dále rozrůžnila do několika geografických plemen, nebo také poddruhů. Jednotlivá plemena rozdělujeme především podle exteriérových znaků. Liší se velikostí těla a další morfologií např. délkou končetin či sosáku (Daníhlík et al., 2017).

Celkově je výběr včelího plemene důležitým hlediskem pro včelaře, protože může ovlivnit zdraví a produktivitu včelstva, stejně jako kvalitu a množství produkovaného medu (Gruna et al., 2020).

2.1.6 Zdravotní situace včel a ohrožení včelstev

Včely medonosné jsou nejdůležitějšími opylovateli mnoha plodin a divoce kvetoucích druhů. Mnoho zemí na celém světě, zejména na severní polokouli, se při komerčním opylování určitých plodin spoléhá na včelu medonosnou, *A. mellifera* (Hristov et al., 2020). Populace *A. mellifera* je velká, i přesto existuje obava, že dochází k poklesu populace.

Například pokles počtu včelstev pozorovaný během 90. let v Evropě může souviset s politickým a ekonomickým otřesem ve východní Evropě způsobeným sovětským kolapsem (Aizen a Harder, 2009). V mnoha zemích sovětského bloku sloužil med jako druhá měna, a proto bylo mnoho lidí motivováno chovat včely. Když se na počátku 90. let změnil ekonomický systém, med ztratil svůj význam a lidé, kteří chovali své včely z ekonomických důvodů, se vzdali včelaření nebo snížili počet řízených včelích úlů (Engelsdorp a Meixner, 2010).

Politický převrat však není jediným důvodem poklesu včelstev. Za zásadní příčiny úbytku zodpovídají především ztráty stanovišť, klimatické změny, pesticidy, parazité, nemoci, změny ve využívání půdy a hospodaření s půdou včetně genetické modifikace plodin (Osterman et al., 2021 ; Duchenne et al., 2020).

2.1.6.1 Důsledky ztrát včelstev

Úbytek včelstev a včel by mohl ohrozit přežití rostlin některých druhů závislých na opylování včelami. Některé typy rostlin závisí pouze na opylení včelou (Eardley et al., 2007). Úbytek opylovačů může vést ke ztrátě opylovacích služeb, což má významné negativní, ekologické a ekonomické dopady, které by mohly významně ovlivnit zachování rozmanitosti volně žijících rostlin, širší stabilitu ekosystému, produkci plodin a zabezpečení potravin. Výzkumy ekologů naznačují, že přes 100 000 druhů rostlin by vyhynulo při absenci opylování včely (Potts et al., 2010).

2.1.6.2 Aktuální ztráty

V posledních letech v některých oblastech světa skutečně došlo ke zvýšení ztrát v řízených koloniích včel (Hristov et al., 2020). Úbytek včel je důležitou celosvětovou událostí, která způsobuje vážné ekologické škody (O'Neal et al., 2018).

Avšak, dle nedávných studií zjišťujeme, že úbytek včelstev není novým fenoménem a historické záznamy ukazují, že rozsáhlé ztráty nebyly v minulosti ničím neobvyklým. I když nedávné problémy mohou vyvolat dojem, že došlo k masivnímu poklesu, globální výzkum včelstev ukázal, že počty včel ve skutečnosti mezi lety 1961 a 2007 vzrostly (Gray et al., 2019).

2.1.7 Zdroje potravy včel

Včela medonosná je živočich a pro udržení životních funkcí potřebuje získávat z prostředí cukry, bílkoviny, minerály a vodu. Všechny tyto potřeby včelstvo pokrývá přínosem vody, pylu, nektaru a medovice. Přírodní cukry obsažené v nektaru a medovici jsou hlavním zdrojem energie. Zdrojem bílkovin je pyl (Gruna et al., 2020).

Množství bílkovin v potravě ovlivňuje základní imunokompetenci včel, jejich množství tuku v těle a aktivitu glukózo-oxidázy, jež se podílí na sterilitě potravy, nebo snižuje množství choroboplodných zárodků (Alaux et al., 2010).

2.1.7.1 Pyl

Pyl je nakyslá až nahořklá látka dle původu. Má příznivé účinky na lidský organismus a je nepostradatelnou složkou ve výživě včel (Titěra, 2017).

Hlavní potravou včelího plodu je mateří kašička, od třetího dne stáří larvičky se do ní však přidává pyl společně s medem. Pro optimální výživu plodu je důležité, aby byly v krmné kaši zastoupeny všechny potřebné aminokyseliny. Proto včely při sběru pylu na rozdíl od nektaru dávají přednost různosti před kvantitou. To znamená, že preferují méně vydatné a vzdálenější zdroje pro zpestření stravy svých potomků. Včela potřebuje bílkoviny především pro stavbu těla a tedy výživu plodu. Plod není přímo krmen pylem. Nasbíraný pyl je nejprve uložen v plástech, kde probíhá jeho fermentace. Takto upravený pyl konzumují mladé včely, které využijí bílkoviny z pylu k tvorbě proteinové krmné kaše pro krmení včelích larev. Vitamíny získávají včely z pylu, stejně jako životně důležité minerály a stopové prvky. Některé minerály jsou pokryty i ze zdroje vody (Gruna et al., 2020).



Obrázek 2: Květový pyl (zdroj: www.foxhoundbeecompany.com)

2.1.7.2 Nektar

Další nedílnou součástí potravy včel je nektar. Jedná se o vodný roztok přírodních cukrů, které vylučují rostliny. Nektar je vylučovaný rostlinnými orgány nazývané nektárie (obrázek 3). Toto pojmenování získaly díky švédskému přírodovědci a lékaři Carlu von Linné. Nektar bývá vylučován drobnými trhlínami, nebo přes povrchovou blánu některých buněk nektárií (Haragsim, 2013). Nektárie můžeme rozdělit dle umístění na květní a mimokvětní (Haragsim, 2013). Včely sbírají nektar převážně z květních nektáriích (Haragsim, 2013). Pro včelstvo je nektar především zdrojem cukrů a vody (Gruna et al., 2020). Krom toho bývají v nektaru v malém množství přítomny také bílkoviny, vitamíny, minerální látky, barviva a aromatické látky. Nektary však také obsahují širokou škálu stopových složek, z nichž některé ovlivňují jejich atraktivitu (Afik et al., 2008).

Nektárie hmyzosnubných rostlin jsou umístěny za účelem opylení, tak, aby se včely, jdoucí za nektarem dotkly prašníků a byly poprášeny pylem. Následně se včely dotknou blizny, čímž se na ni nalepí samčí pohlavní buňky rostlin, pylová zrna (Stoklasa, 1975).



Obrázek 3: Nektar u rostliny druhu kamélie (zdroj:www.wikipedia.org)

Obsah vody v nektaru je mezi 15-95%, v průměru obsahuje 40% cukrů. Včely málo láká nektar řidší než 15% cukru. Z cukrů v nektaru převládá především sacharóza, glukóza, a fruktóza a v různém poměru. V malém množství jsou obsaženy minerální látky, z kyselin se často vyskytuje kyselina jablečná, vinná, jantarová, šťavelová a citrónová. Dále jsou v nektaru obsaženy pryskyřičné látky, aromatické silice, terpeny, které mu dodávají specifickou chuť. Ph nektaru se pohybuje mezi 2,7 - 6,4. V nektaru jsou obsaženy i pevné částice jako pylová zrna a buňky rostlinných tkání (Počuch, 2020).

2.1.7.3 Medovice

Medovice je tekutina pocházející z lýkových pletiv rostlin. Na povrch ji ale nevyloučí rostlina sama jako je tomu u nektaru, nýbrž hmyz, tzv. producent medovice. Mezi producenty medovice patří nejčastěji mšice (Stoklasa, 1975). Mšice perforuje rostlinné pletivo a vysává z rostlin floémovou mízu, z níž spotřebovává zejména bílkovinnou složku, a přebytečné sladké šťávy vypouští na povrch rostlin (jehličí, listy) ve formě kapek medovice. Na medovici čekají mravenci a včely, aby si ji odnesli do sídla svých společenstev – mravenišť a úlů (Dupal et al., 2015). Medovicové medy jsou zejména medy lesní. Na rozdíl od nektaru včela medovici získává druhotně (Stoklasa, 1975).

Medovici tvoří i některé houby, zejména Paličkovice nachová, která tvoří medovici stejného složení jako od mšic. Kromě cukrů medovice obsahuje i aminokyseliny, organické kyseliny, vitaminy a minerální látky (Stoklasa, 1975).

2.1.7.4 Propolis

Propolis je směs látek, které včely používají k obraně úlu. Tato ochrana se týká vyplnění dutin ve stěnách úlu, omezení vstupu v chladných dnech a také mumifikování žádaných vetřelců, čímž se zabrání jejich rozkladu (Bogdan, 2008). To vysvětluje, proč je propolis také známý jako včelí lepidlo (Zabaiou et al., 2017).

Slovo propolis je řeckého původu a znamená předměstí nebo také obrana města (Wagh, 2013). Diskuse o původu propolisu probíhaly již od starověku. Objevily se pochybnosti o tom, zda jeho původ pochází z rostlin nebo včel. V dnešní době, s rozvojem analytických technik, je známo přibližné složení propolisu a faktory, které jej ovlivňují (Bogdan, 2008).



Obrázek 4: Propolis v úlu (zdroj: Abalg)

Včely sbírají pryskyřice z pupenů, exsudátů a dalších částí rostlin, mísí je s vlastními slinnými enzymy a včelím voskem, který vytváří propolis (Sforcin a Bankova, 2011; Schnitzler et al., 2010). V různých kontinentech a regionech se propolis liší složením. Je tomu tak z důvodu různých rostlinných zdrojů. I když má propolis jiné chemické složení, má podobné aktivity, jako jsou antibakteriální, protiplísňové, antivirové, antiparazitární, protizánětlivé, antiproliferativní a antioxidační (Inkėnienė a Ramanauskienė, 2011; Franchin et al., 2019). Propolis neobsahuje látky nezbytné pro metabolismus jednotlivých včel. Má však velký význam pro imunitu včelstva (Gruna et al., 2020). Tím, že má propolis antibakteriální účinky, je včelami využíván k dezinfekci stěn úlů a plástů (Morrisonová, 2014).

Dosud bylo jako složky propolisu identifikováno více než 180 sloučenin, především polyfenolů. Hlavními polyfenoly jsou flavonoidy, doprovázené fenolovými kyselinami a estery. Dalšími sloučeninami v propolisu jsou těkavé oleje a aromatické

kyseliny (5–10 %), vosky (30–40 %), pryskyřice, balzámy a pylová zrna, která jsou bohatým zdrojem základních prvků, jako je hořčík, nikl, vápník, železo a zinek (Dobrowolski et al., 1991).

2.1.7.5 Mateří kašička

Mateří kašička je žlutobílý a kyselý sekret hypofaryngeálních a mandibulárních žláz včelích kojenců používaný ke krmení mladých larev dělnic během prvních tří dnů a celého života včelích matek. Je jedním z nejoceňovanějších přírodních produktů, který se v různých částech světa již dlouhou dobu používá především v tradiční medicíně, zdravé výživě a kosmetice. Je také nejstudovanějším včelím produktem zaměřeným na odhalení jeho bioaktivit, jako jsou antimikrobiální a antioxidační účinky. Běžně se používá k doplnění léčby různých onemocnění, včetně rakoviny, cukrovky, kardiovaskulárních chorob a Alzheimerovy choroby (Ahmad et al., 2020).



Obrázek 5: Vyvíjející se larvy obklopené mateří kašičkou (zdroj: Waugsberg)

2.1.7.6 Voda

Voda je velmi podstatnou součástí výživy včel. Včelstvo potřebuje dostatek vody k výživě plodu, ke zpracování pylu, ředění uložených zásob a udržení optimální teploty a vlhkosti v úlu (Astolfi et al., 2021).

V úlu včely nevytváří velké zásoby vody z důvodu jednoduché dostupnosti v okolní krajině. Funkci shromažďování vody v úlu mají včely létavky. Jedná se o včely, jejichž povinností je přinášet vodu do úlu. Každý den nanosí pouze množství vody, které odpovídá aktuální spotřebě včelstva. V období nektarové snůšky bývá spotřeba vody úplně pokryta vodou obsaženou v rostlinném nektaru (Gruna et al., 2016).

V letních měsících je značné množství vody spotřebováno za účelem ochlazování úlu. K tomu dochází tak, že včely mávají křídly a odpařují kapky vody, aby snížily teplotu v úlu. Z tohoto důvodu potřebují včely stálý přístup k čerstvé vodě (Morrisonová, 2014; Gruna et al., 2016).



Obrázek 6: Včela čerpající vodu, kterou po sléze dopraví do úlu (zdroj : www.nkz.cz)

2.2 Nemoci včel

Nemoci včel jsou závažným problémem pro včelaře po celém světě. Mohou mít významný dopad na zdraví a produktivitu včelích kolonií a nakonec vést k celkovému zhroucení kolonie. Existuje mnoho různých nemocí, které mohou ovlivnit včely medonosné, způsobených bakteriemi, viry, houbami a parazity (Hristov et al., 2020). Například viry jsou všudypřítomné prakticky ve všech formách života, kde představují potenciální hrozbu pro zdraví organismu. To platí i pro viry nalezené ve včelách. Většina z těchto virů byla původně objevena u včel medonosných, buď prostřednictvím symptomů, nebo nemocí spojených s jinou infekcí (Yañez et al., 2020).

Mnoho nemocí včel má téměř globální rozšíření a prevence je důležitou součástí managementu včelstev (Martinello et al., 2017). V posledních dvou desetiletích se potýkáme se zvýšenými ztrátami kolonií včelstev v oblastech s mírným podnebím, o nichž se předpokládá, že jsou z velké části způsobeny původně exotickým ektoparazitickým roztočem *Varroa destructor* a virem deformovaných křídel, které roztoč přenáší (Yang et al., 2012).

Šíření patogenů samo o sobě hraje klíčovou roli v ohrožení opylovačů. Kromě toho přenos patogenů z včel medonosných na jiné druhy včel tento pokles zvyšuje (Nanetti et

al., 2021). Různorodé patogeny snižují odolnost včel medonosných potřebnou k udržení včelstev, zejména v zimě (Burritt et al., 2016).

K přenosu patogenů mezi včelami může docházet různými cestami: horizontálně (prostřednictvím květin, pylu, predace nebo přímým kontaktem), vertikálně nebo sexuálně (Cilia a Forzan, 2022). Při výskytu nějakého z včelích onemocnění včelaři mohou přijmout opatření k prevenci a léčbě nemocí včel, včetně praktikování správného managementu úlů, používání chemického ošetření a poskytování zdravé stravy svým včelám. Kromě toho vědci studují způsoby, jak vyvinout odolnější populace včel a snížit dopad onemocnění na tyto důležité opylovače (Martinello et al., 2017).

Myšlenka probiotik pro včely jako slibného nástroje ke zlepšení jejich zdraví je široce diskutována. Znalost přirozené střevní mikroflóry poskytuje příležitost vytvořit širokou strategii pro vitalitu včel, včetně vývoje moderních probiotických přípravků k použití namísto konvenčních antibiotik, ekologicky šetrných biocidů a prostředků biologické kontroly (Nowak et al., 2021). Je také důležité udržovat zdravé a různorodé zdroje potravy pro včely, protože nedostatek výživy může oslabit jejich imunitní systémy a zvýšit jejich náchylnost k nemocem (Gruna et al., 2016).

2.2.1.1 Mor včelího plodu

Mor včelího plodu (MVP) je vysoce infekční bakteriální onemocnění, které postihuje včelí larvy. Původcem je tyčinkovitá bakterie *Paenibacillus larvae*, dříve *P. larvae larvae* (Čermák et al., 2016). Tato bakterie způsobuje střevní infekci larev včely medonosné, která je pro infikované larvy nevyhnutelně smrtelná, jakmile se patogenu podaří napadnout tělní dutinu larvy (Genersch 2010).

Aktivní infekce vegetativními *P. larvae* jsou často smrtelné, vysoce přenosné a pro kolonie nevyhládivitelné, ale v klidovém stavu může sporová forma tohoto patogenu přetrvávat asymptomaticky po celá léta (Daisley et al., 2022).

K příznakům MVP patří úhyn mladých larev, které se následně promění v hnědou, mazlavou hmotu, která je snadno rozpoznatelná. Infikované larvy obvykle umírají před uzavřením voskové buňky a mrtvé larvy lze často vidět ležící na dně této buňky (obrázek 7,8), (Čermák et al., 2016).

Opatření proti této chorobě jsou regulována zákonem a nejčastěji zahrnují likvidaci zjevně nemocných včelstev (Alippi a Reynaldi, 2006).



Obrázek 7: Plod ve včelstvech napaden morem je standartně mezerovitý (zdroj : Karel Veselý)



Obrázek 8: Víčka buněk s uhynulými larvami

2.2.1.2 *Paenibacillus larvae*

Bakterie patřící do rodu *Paenibacillus* se vyskytují v různých prostředích, mnoho druhů má význam pro lidi, zvířata a rostliny. Většina z nich se nachází v půdě, často spojená s kořeny rostlin. Mnoho druhů *Paenibacillus* produkuje antimikrobiální sloučeniny, které jsou užitečné v lékařství nebo jako pesticidy, a mnohé poskytují enzymy, které by mohly být využity pro bioremediaci nebo pro výrobu cenných chemikálií. Některé druhy jsou patogeny pro včely např. *P. larvae* je grampozitivní,

sporotvorná bakterie, nejničivějšího bakteriálního onemocnění včely medonosné (Tsourkas, 2020).

Spory jsou oválné, jejich povrch je hladký bez znatelných výběžků a jsou velmi odolné vůči nepříznivým podmínkám, jako je teplota, tlak i dezinfekční prostředky. V půdě mohou spory přežívat až několik desítek let. Právě tato skutečnost je spojena s řadou problémů týkajících se tlumení této nákazy. Spory jsou přítomny ve včelstvu, které se s nimi setkalo, nebo jsou již všudypřítomné. Velmi snadno se stanou součástí úlu a i zásob včelstva (Čermák et al., 2016). *P. larvae* je rezistentní na antibiotika, což komplikuje léčbu (Tsourkas, 2020).



Obrázek 9: Spora Paenibacillus larvae (zdroj: Antonín Přidal)

2.2.1.3 Přenos MVP

MVP může přenášet několika způsoby. Nejběžnější způsob přenosu je prostřednictvím spor, které jsou vysoce odolné vůči faktorům prostředí a mohou přetrvávat ve včelařském vybavení, medu a vosku po dlouhou dobu. Spory se mohou přenášet z infikovaných larev na jiné larvy prostřednictvím kontaminované potravy a ze včely na včelu, šíření dělnicemi, které neúmyslně sbírají spory *P. larvae* z prostředí nebo kontaminovaných úlů (Pohorecka et al., 2012). Pokud dělnice zadrží spory ve svém medovém váčku, mohou infikovat včelí larvy (plod) při vyvracení obsahu svého medového žaludku (včetně spor *P. larvae*) během krmení larvami. Další možný přenos je prostřednictvím kontaminovaného včelího vosku nebo dokonce rukou a oděvů včelařů (Hansen a Brodsgaard, 1999).

Když dojde k infekci, spory vyklíčí a zabijí včelí larvy. Bakterie zkapalňují larvy a produkují viskózní tekutinu nabitou sporami. Nemoc se rychle šíří uvnitř úlu a může zničit celé úly, pokud se infekce neléčí (Ebeling et al., 2016).

2.2.1.4 Patogeneze

Aby se larva nakazila, musí být vystavena potravě kontaminované sporami během prvních 36 hodin po vylíhnutí larvičky z vajíčka (Hansen a Brodsgaard, 1999). Po požití mladou larvou vyklíčí spory *P. larvae* v lumenu středního střeva larvy, kde se vegetativní bakterie masivně množí, než nakonec naruší epitel středního střeva a napadnou hemocoel (krevní prostor u hmyzu, v němž obíhá u embrya krevní tekutina) (Yue et al. 2008). Touto dobou je infikovaná larva mrtvá, ale *P. larvae* stále prospívá a zcela rozloží mrtvou larvu na provázkovitou hmotu tzv. příškvár. Jakmile dojde k úbytku organických živin, *P. larvae* sporuluje a vláknitá hmota vysychá v buňce plodu na vysoce nakažlivou škálu obsahující spory. Tyto spory řídí přenos *P. larvae* uvnitř kolonie. V dalším průběhu onemocnění na úrovni kolonie se stále více larev infikuje a hyne, takže nakonec nedostatek plodu, a tedy nedostatek potomstva vede ke kolapsu celé kolonie (Genersch 2010).

2.2.1.5 Virulence

Virulence je schopnost patogenu vyvolat onemocnění. Hodnocení míry virulence nám určuje letální dávka (LD50). Jde o hodnotu, po níž zhyne 50 % pokusných zvířat. Průběh onemocnění MVP tedy ovlivňuje virulence, u některých jedinců jsou následky fatální, na některých se onemocnění nemusí projevit. To může způsobit potíže s detekcí *P. larvae*. Krom této komplikace je problém s detekcí také spojen s rychlostí průběhu onemocnění, které je způsobeno jedním z genotypů *P. larvae* (Hansen a Brodsgaard, 1999).

Nejmladší larvy (12–36 h po vylíhnutí vajíček) představují nejcitlivější stadium pro spory, kdy i velmi nízká dávka spor (střední letální dávka, LD50 ~9 bakterií na larvu) je smrtelná in vitro. Mrtvé larvy se rozkládají na typické hnědé, lepkavé a částečně tekutá hmota, což je primární klinický příznak pro diagnózu MVP (Alvarado et al., 2013).

2.2.1.6 Léčba a prevence

Populární přístup v léčbě MVP v některých zemích, jako je USA, je potlačení klinické fáze onemocnění doplněnými antibiotiky, nicméně se ukázalo, že tato praxe vede k bakteriální rezistenci (Eguaras et al., 2005) nebo kontaminaci včelích produktů (Mutinelli, 2003). Léčba antibiotiky má však několik nevýhod. Například mnoho divokých kmenů *P. larvae* má antibiotickou rezistenci vůči oxytetracyklinu (Alippi a Reynaldi, 2006).

V Evropské unii je však léčba antibiotiky zakázána z důvodu možných nálezů reziduí antibiotik v medu, které by mohly představovat zdravotní rizika pro děti a vyvíjející se miminka (Murray a Aronstein, 2006). Postižená včelstva jsou často ničena spálením úlů. Antibiotická léčba také může zvýšit šance na plísňovou infekci v důsledku narušení normální rovnováhy bakterií ve včelím střevě (Alippi a Reynaldi, 2006; Raymann et al., 2017). Narušení bakteriální flóry ovlivňuje obranné mechanismy včely proti patogenům (Alippi a Reynaldi, 2006; Raymann et al., 2017).

Mezi bakteriálními druhy běžně obývajícími tělo včely patří výtrusný *Brevibacillus laterosporus*, jehož antimikrobiální potenciál je dobře zdokumentován. Navzdory tomu, že tato bakterie byla nalezena jako sekundární vetřelec ve včelstvech postižených hnilobou včelího plodu způsobeným *Melissococcus pluton* (White, 1912), nedávno bylo hlášeno, že má příznivé účinky na včely a vykazuje specifický inhibiční účinek proti *P. larvae*. Mechanismus vedoucí k takové inhibici však dosud nebyl objasněn (Alippi a Reynaldi, 2006), (Hamdi et al., 2011).

Management *P. larvae* je pro včelaře hlavním problémem, zejména kvůli omezením spojeným s používáním antibiotik v EU ve včelím společenství a rozvojem rezistence u různých kmenů *P. larvae*. Proto se provádějí výzkumné studie s cílem nalézt alternativní a účinné přírodní antimikrobiální látky (Isidorov et al., 2023).

Mezi doporučená preventivních opatření proti MVP patří nekupovat včely bez veterinárního osvědčení, nepoužívat staré rámečky, neusazovat roje neznámého původu, udržovat pořádek a provádět dezinfekci, nebrat včelám na zimu všechn med a získávat včelí matky získávat z prověřených linií (Sládek a Čermák, 2016).

2.2.1.7 Genotypy *P. larvae*

Pro genotypizaci a klasifikaci *P. larvae* bylo vyvinuto několik technik, mezi ty nejzásadnější patří polymerázová řetězcová reakce (PCR) s repetitivním prvkem (Genersch et al., 2010). Repetitivní elementová PCR s enterobakteriálními repetitivními intergenovými konsenzuálními (ERIC) primery odhalila čtyři genotypy *P. larvae* ERIC I-IV, což ukazuje, že výsledná klasifikace koreluje s fenotypovými rozdíly. ERIC I, celosvětově nejrozšířenější genotyp, zabíjí infikované larvy do 12 dnů. ERIC II, který je také často izolován z ohnisek moru včelího plodu, zabíjí infikované larvy do 7 dnů. Zdá se, že ERIC III a IV nemají vysokou epidemiologickou relevanci, ale jsou považovány za rychle zabíjející. Díky údajům o genomu a proteomu o genotypech ERIC zjišťujeme, jak současné typizační schéma souvisí s různou virulencí genotypů (Genersch et al., 2010; Rauch et al., 2009)

2.3 Med

Med je přírodní hustá sladká a lepkavá kapalina, která je produkovaná různými druhy včel na světě. Produkují jak včely medonosné, tak včely bez žihadel (Rao et al., 2016; Mohammed, 2022). Konkrétně jde o hustý viskózní roztok skládající se z cukrů, enzymů a aminokyselin. Přesněji hovoříme o sacharóze, glukóze, fruktóze, aminokyselinách, pylu, minerálech a glukózo-oxidáze, která přeměňuje sacharózu na jednoduchou glukózu a fruktózu a produkuje kyselinu glukonovou (Mohammed, 2022).

Složení, barva, vůně a chuť medu závisí především na květech, zeměpisných oblastech, klimatu a druzích včel, které se podílejí na jeho výrobě. Vše je zároveň ovlivněno povětrnostními podmínkami, zpracováním, manipulací, balením a dobou skladování medu (Escuredo et al., 2014; Tornuk a kol., 2013).

Jde o jeden z nejcennějších přírodních produktů, které lidstvo od starověku získalo. Používá se nejen jako nutriční produkt, ale také v tradiční medicíně a jako alternativní léčba klinických stavů od hojení ran až po léčbu rakoviny (Samarghandian et al., 2017).

Včely oceňují med pro jeho cukry, které konzumují na podporu celkové metabolické aktivity, zejména letových svalů při hledání potravy, a jako potravu pro jejich larvy. Za tímto účelem si včely dělají zásoby medu, aby se samy obstaraly během běžného shánění potravy i během chudých období, například při přezimování (Suarez et al., 1996).

Med obsahuje makro a mikroživiny, které v zásadě závisí na různých faktorech: 1) typu včel, 2) květinovém zdroji a 3) faktorech prostředí a zpracování (Titěra, 2006).

2.3.1 Vznik medu

Vznik medu je velmi složitý proces, který je závislý na včelstvu jako celku (Počuch, 2020). Med vzniká sběrem a zpracováním nektaru a medovice včelami z okolní vegetace (Mohammed, 2022). Základním stavebním kamenem pro vznik medu je sluneční energie, kterou zelené rostliny umí zachycovat a skladovat pro další využití. Díky fotosyntéze se z vody a oxidu uhličitého vytváří molekuly monosacharidů, které rostlina dále využívá. Jednou z možností využití jednoduchých cukrů je jako stavební látka. Rostlina dokáže jednotlivé monosacharidy spojovat do řetězců a tím tvoří tzv. celulózu. Jiné sacharidy jsou použity jako zásobárny energie např. škrob. Jednoduché sacharidy jsou dobře rozpustné ve vodě a kolují v rostlině v cévních svazcích (Titěra, 2006).

Včely sbírají nektar z květů pomocí svých dlouhých trubicovitých jazyků. Nektar je uložen ve specializovaném orgánu, který se nachází v břiše včely. Jakmile včely nashromáždí dostatek nektaru, vrátí se do úlu a vyvrhnou nektar do tlamy jiné včely. Tento proces se několikrát opakuje, dokud není nektar částečně stráven enzymy v ústech včel. Enzymy rozkládají složité cukry v nektaru na jednodušší cukry, které jsou snadněji stravitelné a skladovatelné. Dalším krokem při vzniku medu je zahušťování, respektive odpaření přebytečné vody z nektaru (Titěra, 2006). Nektar, který včely přinesou je náhodně ukládán do plástů, včely jej dále zpracovávají přenášením z buňky do buňky. Opakovaným nasáváním a vyvrhováním včelami tzv. tryfolaxe. Nektar obohacován o enzymy, zahušťován a v med dozrává přirozenou cestou za 3 – 4 dny (Stoklasa, 1975). Včelstvo má dokonale zvládnutou klimatizaci svého obydlí. Aktivní výměnou vzduchu, využíváním velkého povrchu a úpravou teploty dovedou včely odpařovat vodu ze zásob až na pouhých 15% (Titěra, 2006).

2.3.2 Druhy medů

Med můžeme řadit do skupin podle několika hledisek a jeho členění je ošetřeno ve vyhlášce č. 76/2003 Sb.

Jedním z hledisek pro rozdělení medu je jeho zpracování: v současné době je nejvíce medu získávána pomocí vytáčení, kdy na med v plástech působí odstředivá síla. Také existuje med, který se přímo v plástech prodává, nazývá se med plástečkový. Je populární především v USA. Dalším druhem medu je med lisovaný, který včelaři získávají vytlačováním medu z plástů. Lisování bylo dříve nejrozšířenějším způsobem získávání medu; po zavedení medometu se však od něj téměř upustilo. V normě je také uveden med filtrovaný, jedná se o med, který má snížený obsah pylových zrn, a také med pastovaný, u kterého byla technologicky podpořena krystalizace (Gruna et al., 2016).

Dalším způsobem dělení medů je dělení dle původu. Rozlišujeme med květový, medovicový. Květový med produkují včely z nektaru květů, medovicový med se získává ze sekretů živých částí rostlin nebo výměšků hmyzu sajícího rostliny na živé části rostlin. U těchto druhů se velmi liší chemická složení (Prodoliet a Hischenhuber, 1998). Jedná se o obsah různých aromatických látek, éterických olejů, barviv, organických kyselin a enzymů. Všechny tyto aspekty mají vliv na konzistenci medu, chuť, barvu, vůni i vzhled (Přidal, 2020, s. 101).

2.3.2.1 Květové medy

Květové medy jsou složeny výhradně z nektarů květů (obrázek 10). Mezi nektarové (květové) medy patří medy z ovocných stromů, akátové medy, vřesové, řepkové, lipové nebo slunečnicové. Jsou to medy světlé a poměrně rychle krystalizují (Gruna et al., 2016).



Obrázek 10: Květový a medovicový med (zdroj : vcelky.cz)

2.3.2.2 *Medovicové medy*

Parazité jako mšice a červi napadají listí stromů, z nichž získávají glukózu, fruktózu a sacharózu. Sacharózu využijí pro vlastní potřeby a glukózu a fruktózu vyloučí. Jelikož je tento roztok velmi sladký včely ho sbírají (Šefčík, 2014). Složení medovicového medu a květového je velmi rozdílné. Medovicové medy jsou tmavší (obrázek 10), obsahují více prospěšných složek a má svá chuťová specifika.

Medovicový med nekystalizuje tak brzy jako med květový (Gruna et al., 2016).

2.3.3 *Získávání medu*

Získávání medu začíná vyjmutím rámků z úlu. Je velmi důležité smést včely, používá se k tomu včelařský smetáček, který má měkké štětiny a včelám tak nemůže ublížit. K vyjmutí medu je nutné odvíčkovat plásty. Včelí medová víčka jsou tvořena voskem s příměsí medu a propolisu, pod nimi se ukrývá med. Je tomu tak, protože jakmile včela přemění nektar na med, zavíčkují buňky medových plástů. K tomu se využívá pomůcka s názvem odvíčkovácí vidlička či odvíčkovácí nůž. Po odvíčkování plástů se rámký vkládají do medometu (obrázek 11), který z buněk dostane med (Morrisonová, 2014). Medomet funguje na principu odstředivé síly. Rámky se v něm otáčejí a odstředivou silou z nich vylétává obsažený med (Gruna et al., 2016).



Obrázek 11: Ruční medomet (zdroj: jahan.cz)

2.3.3.1 *Čištění medu*

Čištění medu se týká procesu odstraňování jakýchkoli nečistot nebo cizích látek, které mohou být přítomny v medu, jako je vosk, pyl nebo zbytky. Účelem čištění medu je zlepšit čírost, barvu a chuť medu a prodloužit jeho trvanlivost (Snowdon a Cliver, 1996).

Existuje několik metod čištění medu, včetně pasírování, filtrování a odstředování. Scezení zahrnuje použití síta nebo tenká k odstranění velkých částic z medu, zatímco filtrování zahrnuje průchod medu přes jemnou síťku nebo papírový filtr, aby se odstranily menší částice. Odstředování je pokročilejší metoda, která zahrnuje stáčení medu vysokou rychlostí, aby se oddělil od jakýchkoli pevných částic (Subramanian et al., 2007).

Důležitým aspektem, který je nutné si uvědomit, že zatímco čištění medu může zlepšit kvalitu medu, může také odstranit některé prospěšné sloučeniny přirozeně se vyskytující v medu, jako je pyl a propolis. Z tohoto důvodu někteří lidé preferují surový med, který nebyl čištěn ani zpracován (Snowdon a Cliver, 1996).

2.3.3.2 Skladování medu

Skladování medu je důležitým aspektem zachování kvality a čerstvosti produktu. Správné skladování může pomoci zachovat chuť, vůni a nutriční hodnotu medu a zabránit jeho kontaminaci nebo zkažení. Při skladování medu je důležité uchovávat ho na chladném a suchém místě, mimo přímé sluneční světlo a zdroje tepla. Vzhledem k tomu že je med hygroskopický, mohl by přijímat vodu z okolního prostředí (Šefčík, 2014). Vystavení teplu a světlu může způsobit rozpad medu a ztrátu chuti a živin. Med by měl být skladován maximálně do teploty 20°C. Vyšší teplota může v dlouhodobém časovém horizontu způsobit znehodnocení medu z hlediska kvality a obsahu prospěšných látek (Gruna et al., 2016).

2.3.4 Zpracování medu

2.3.5 Zahřívání a dekrystalizace

Většina druhů medu jsou přesycené roztoky sacharidů, v důsledku čehož podléhají krystalizaci. Krystalizace je fyzikální proces, kdy dochází k přechodu z čirého roztoku do neprůhledné pastovité konzistence nebo do úplného ztuhnutí (Gruna et al., 2016). Krystalizace medu je přirozený proces, který neovlivňuje kvalitu medu a už vůbec nezpůsobuje snížení kvality. Aby se zabránilo nebo odstranilo krystalizaci medu, je tepelně zpracován a zkapalněn; to však vede ke snížení aktivity glukózooxidázy i všech ostatních enzymů přítomných v medu. Při teplotě do 55°C je enzym GOD stabilní, jeho aktivita kolísá jen nepatrně, při 55–70°C aktivita enzymu klesá (Kretavičius et al., 2010).

Zahřívání nejen usnadňuje zpracování stáčení snížením viskozity medu, ale také snižuje obsah vody v medu, aby se zabránilo kvašení, a oddaluje granulaci zničením velkých cukerných jader (Singh a Singh, 2018).

2.3.5.1 *Techniky ztekucování medu*

Ztekucování medu je proces přeměny zkrystalizovaného medu zpět do tekutého stavu. Med může krystalizovat vlivem změn teplot, podmínek skladování nebo přirozených vlastností samotného medu. Zkapalnění může usnadnit použití medu a může obnovit jeho texturu a konzistenci (Gruna et al., 2016).

Nejběžnější technikou používanou pro ztekucování medu je konvekční metoda, která spočívá v umístění nádoby s medem do termostatu vyhřívaného vzduchem nebo vodou. Pro úplné rozpuštění krystalů se takový med zahřívá na předem nastavenou konstantní teplotu až několik dní, záleží na objemu sudu a množství medu. Při použití metody ke zkapalnění medu je důležité vyhnout se zahřívání medu nad 40°C. Tato teplota je považována za horní hranici pro zachování chuti a nutričních vlastností medu. Proces může trvat několik hodin v závislosti na množství zkapalněného medu a rozsahu krystalizace. Ztekucování začíná od stran nádoby a postupuje směrem ke středu, protože med se nejprve zahřívá na stěnách a teplo se pohybuje směrem ke středu. Již rozteklý med je dále zbytečně zahříván, což je plýtvání energií a které inaktivuje výše uvedené enzymy a zvyšuje obsah hydroxymethylfurfuralu (Kretavičius et al., 2010).

Další metodou ztekucování medu je šetrné zahřátí v teplé vodní lázni. Jedná se o umístění nádoby s medem do větší nádoby s teplou vodou a postupné ohřívání, dokud se krystaly nerozpustí, opět dodržujeme teplotu do 40°C (Gruna et al., 2016).

2.3.6 *Filtrace medu*

Filtrace je technologický proces, který probíhá za přítomnosti podtlaku a vyšších teplot. Tyto teploty velmi často přesahují 50°C, závisí však na zvolené metodice. Hlavním důvodem filtrace je zastavení procesu krystalizace a odstranění drobných nečistot (Wilczyńska, 2014). Filtrace vyžaduje zvýšené tepelné ošetření, z tohoto důvodu ji řadíme mezi metody, které jsou k medu nejméně šetrné. Díky filtraci je z medu možné odstranit pyl, vzduchové bubliny či částice v medu rozptýlené apod. Filtrací jsme schopni z medu odstranit i pylová zrna o velikosti menší než 200µm (Gruna et al., 2016).

2.3.7 Pastování medu

Jedná se technologii zpracování, kdy se za co nejkratší časový úsek snažíme zkrystalizovat tekutý med. Chceme docílit tvorby krystalků. Pro pastování jsou vhodné medy, které nemají obsah vody vyšší než 19%. Existují dva způsoby jak docílit pastovaného medu. Tím prvním je míchání nativního tekutého medu, který je naočkován medem krystalickým. Tímto způsobem uvedeme med do polotekutého skupenství a několik dní občasně promícháváme. Dochází k narušení vazeb. Med začne krystalizovat do velmi malých krystalů a tak dosáhneme krémové konzistence. Druhým způsobem je drcení již zkrystalovaného medu, opět dojde k narušení struktur a zniká jemná, bílá, krystalická pasta (Gruna et al., 2016).



Obrázek 12: Pastovaný med (zdroj: medczech.cz)

2.3.8 Vysušování medu

Vysoušení medu je proces odstraňování přebytečné vlhkosti z medu, aby se prodloužila jeho trvanlivost a zabránilo se kvašení. Obsah vlhkosti medu se může lišit v závislosti na faktorech jako je zdroj nektaru, klima a způsoby zpracování. Med s vysokým obsahem vlhkosti se může snadno zkazit a může též podporovat růst škodlivých mikroorganismů (Kwakman et al., 2010).

Existuje několik metod vysoušení medu, včetně přirozeného sušení na vzduchu, odstředivé síly a vakuového sušení. Přirozené sušení na vzduchu spočívá v roztírání medu v tenkých vrstvách a nechání ho přirozeně uschnout za kontrolovaných podmínek teploty a vlhkosti. Odstředivá síla spočívá v točení medu v stroji, aby se oddělila vlhkost od

medu. Vakuové sušení spočívá v umístění medu do vakuové komory a následném použití nízkého tlaku k odpaření vlhkosti (Al-Waili et al., 2011; Kwakman et al., 2010).

2.3.9 Chemické složení medu

Mezi chemické složky medu patří cukry, polyfenoly, flavonoidy, hydroxymethylfurfural, peroxid vodíku, methylglyoxal, proteiny, enzymy, vitamíny, minerály a lipidy (Mohammed, 2022). Obecně platí, že čím je med tmavší, tím vyšší je jeho obsah fenolů a jeho antioxidační síla (Lourdes González-Miret et al., 2005), (Nozal et al., 2005). Většina medů na světě má stejné nebo podobné fyzikálních vlastností a chemického složení (Ranneh et al., 2021).

2.3.9.1 Cukry

Cukry zaujímají 95-99% sušiny medu, jsou tedy nejvíce zastoupenou složkou medu. Hlavní podíl tvoří monosacharidy – glukóza, fruktóza. Převaha jednoduchých cukrů a zejména nadměrný obsah fruktózy ovlivňuje fyzikální a nutriční charakteristiky medu (Počuch, 2020). Nejvíce identifikovanými disacharidy jsou maltóza, maltulóza, turanóza, sacharóza, nigeróza, zatímco několik trisacharidů, jako je erlosa, centóza, isomaltotrios, panóza, psopanosa a ketóza, se vyskytuje v malém množství (Ranneh et al., 2021).

Mezi nejčastější trisacharidy patří melicitóza. Skládá se z glukózy, fruktózy a dalšího cukru zvaného galaktóza. Přítomnost melizitózy v medu může být problematická z několika důvodů. Její přítomnost může způsobit, že med krystalizuje rychleji a má hrubší strukturu než jiné druhy medu. To může způsobit, že med bude méně atraktivní a méně prodejný pro spotřebitele (Gruna et al., 2016).

2.3.9.2 Bílkoviny

Další významnou složkou medu jsou bílkoviny. Obsah bílkovin v medu se pohybuje zhruba mezi 0,2–0,5 % ve formě enzymů a volných aminokyselin. Obecně se celkové množství volných aminokyselin v medu pohybuje přibližně mezi 10 a 200 mg/100 g medu prolin přispívá 50 % z celkového množství aminokyselin (Iglesias et al.,

2004). V medu můžeme tak najít α -alanin i β -alanin. Kromě těchto dvou izomerů byla ve vzorcích medu identifikována kyselina G-aminomáselná a ornitin (Hermosín et al., 2003).

2.3.9.3 Enzymy

Na rozdíl od jiných sladidel obsahuje med různé aktivní enzymy, které hrají klíčovou roli v jeho biologické funkci. Zdrojem těchto enzymů je pravděpodobně nektar, včela nebo mikroorganismy v medu (Alvarez-Suarez et al., 2013). Enzymy se podílejí na metabolismu sacharidů patří mezi ně: diastáza (amyláza), invertáza (sacharáza), glukosidáza, glukózooxidáza a kataláza (Babacan et al., 2002; Pontoh a Low, 2002).

I když se invertáza podílí na katalýze sacharózy a na její složku v medu, malé množství sacharózy může být přítomno i v konečné fázi zrání medu (Ball, 2007).

Funkcí diastázy je rozkládat chemické vazby ve škrobu a hlavně v maltóze, i když škrob není detekován v žádném vzorku medu. Původní funkce diastázy v medu tedy zůstává nejasná, nicméně bylo vyvinuto jen málo metod k měření diastázy jako indikátoru kvality medu, kde je kvalita medu pozitivně úměrná množství diastázy (Ball, 2007; Popek, 2002).

Pokud jde o proteolytické enzymy medu, tedy enzymy, které štěpí bílkovinné struktury, je známo, že včely používají tři endopeptidázy středního střeva (trypsin, chymotrypsin a elastázu) a exopeptidázu leucin-amino-peptidázu k trávení bílkovin z potravy (Burgess et al., 1996).

2.3.9.4 Lipidy

Množství lipidů ve většině vzorků medu je zanedbatelné kolem 0,002 %. Rostliny a vosk se podílejí především na výstupu různých lipidových sloučenin ve formě kyselin, jako je kyselina palmitová, olejová, miristová a linolová (Alvarez-Suarez et al., 2010).

2.3.9.5 Vitamíny a minerály

Profil minerálů a vitamínů v medu se liší podle druhového složení a geografického původu, představuje 0,2–0,5 % sušiny medu. Přestože esenciální minerály a prvky jsou v

medu stopové, lidské tělo je potřebuje k dokonalému provedení několika biologických akcí (Bogdanov et al., 2007).

Draslík a sodík tvoří většinou 80 % celkových minerálů, zatímco železo, měď a mangan jsou vzácné (De Oliveira Resende Ribeiro et al., 2014).

2.3.10 Antimikrobiální aktivita medu

Léčivé látky a antioxidanty obsažené v medu chrání včely před většinou bakterií a dalšími nepříznivými vlivy (Titěra, 2006). Právě díky hojně zastoupeným antioxidantním látkám jako jsou fenolové kyseliny, flavonoidy, glukózo-oxidáza, kataláza, kyselina askorbové, deriváty karotenoidů, organické kyseliny, aminokyseliny a bílkoviny, je vhodný jako preventivní látka proti různým nemocem, jako je rakovina, kardiovaskulární onemocnění, zánětlivá onemocnění, neurologická degenerace, hojení ran, infekční onemocnění a stárnutí (Yilmaz a Aygin, 2020).

Flavonoidy (kaempferol, katechin a kvercetin) a fenolové kyseliny (kyselina kávová a kyselina gallová) jsou nejdůležitějšími složkami medu se známou protirakovinnou aktivitou. Hlavními navrhovanými mechanismy protirakovinné aktivity medu a jeho složek jsou antioxidantní, apoptotické, nádorové nekrotické faktory inhibující, antiproliferativní, imunomodulační, protizánětlivé a estrogení účinky (Waheed et al., 2019).

2.3.10.1 Glukózooxidáza

Glukóza oxidáza (GOx) je enzym, který se přirozeně vyskytuje v medu. Jde o oxidoreduktázový enzym s mnoha důležitými úlohami v biologických procesech. Je často označován za „ideální enzym“ pro svůj rychlý mechanismus účinku, vysokou stabilitu a specifčnost (Bauer et al., 2022).

Katalyzuje přeměnu glukózy na kyselinu glukonovou a peroxid vodíku. Přítomnost GOx v medu je jedním z faktorů, které přispívají k antibakteriálním vlastnostem medu, protože peroxid vodíku může inhibovat růst bakterií (Kwakman a Zaat, 2012). V současné době je známo, že GOx produkují pouze houby a hmyz (Bauer

et al., 2022 ;White Jr. a Subers, 1964). GOx je vylučován z podhltnové žlázy včely do nektaru během procesu zrání medu (Kretavičius et al., 2010).

Množství glukózooxidázy v medu se však může lišit v závislosti na různých faktorech, jako je typ květového nektaru, který včely sbírají, a podmínky skladování medu. V průběhu času se glukózooxidáza může stát méně aktivní nebo dokonce neaktivní, což může vést ke snížení antibakteriálních vlastností medu (Kwakman a Zaat, 2012).

Některé výzkumy navíc naznačují, že glukózooxidáza může mít potenciál jako přírodní konzervant potravin, protože může pomoci inhibovat růst bakterií a prodloužit trvanlivost některých potravin (Gruna et al., 2016). Stojí za zmínku, že někteří lidé mohou být alergičtí na glukózooxidázu nebo jiné složky medu a po konzumaci medu se u nich mohou objevit příznaky jako kopřivka, svědění nebo potíže s dýcháním (Kwakman a Zaat, 2012).

2.3.11 Hydroxymethylfurfural

Hydroxymethylfurfural je organická sloučenina známá jako 5-hydroxymethylfurfural (HMF) vzniká z redukujících cukrů v medu a různých zpracovaných potravinách v kyselém prostředí, když jsou zahřívány Maillardovou reakcí (Fallico et al., 2004). Jedná se o neenzymatickou reakci mezi redukujícími sacharidy nebo produkty jejich degradace s aminokyselinami, nebo bílkovinami v potravinách (Martins et al., 2000). Kromě zpracování medu ovlivňují tvorbu HMF i podmínky skladování a HMF se stalo vhodným ukazatelem kvality medu (Fallico et al., 2004).

Poměrně závažným problémem, který vzniká při zahřívání medu, je tvorba HMF během procesu štěpení fruktózy. HMF je toxický a rakovinotvorný (Michail et al., 2007), proto je uveden ve všech medových normách a používá se při regulaci kvality medu.

Zvýšené koncentrace HMF v medu signalizují přehřátí, skladování ve špatných podmínkách nebo stáří medu. Jak Komise pro Codex Alimentarius (Alinorm 01/25, 2000), tak Evropská unie (směrnice EU 110/2001) stanovila limit HMF v medu na 40 mg/kg s následujícími výjimkami. Med pocházející ze zemí nebo oblastí s tropickými teplotami mohou obsahovat až 80 mg/kg naopak medy s nízkým obsahem enzymů maximálně 15 mg/kg pro med s nízkým obsahem enzymů (Zappalà et al., 2005).

2.3.12 Fyzikální a chemické požadavky na med podle vyhlášky č. 76/2003 Sb. a normy Český med

Tabulka 1: Fyzikální a chemické požadavky na med podle vyhlášky (zdroj : Včelařství, svazek III.)

Požadavek	Druh medu			Norma Český med PN ČVS 1/1999
	květový	medovicový	pekařský (průmyslový)	
Součet obsahů fruktozy a glukózy (% hmot.nejméně)	60	45	-	-
Obsah sacharózy (% hmot.nejvýše)	5	5	-	5
Obsah vody (% hmot.nejvýše)	20	20	23	18
Kyselost (mekv/kg nejvýše)	50	50	80	-
Hydroxymehylfurfural (mg/kg nejvýše)	40	40	-	20
Obsah ve vodě nerozpustných látek (% hmot.nejvýše)	0,10	0,10	-	-
Elektrická vodivost(mS.m ⁴)	Nejvýše 80,0	Nejméně 80,0	-	-
Aktivita diastázy (stupňů podle Schadeho nejméně)	8,0	8,0	-	bez významných rozdílů

Pozn. Hodnoty uvedené v tabulce značí požadavky na med, které každý vzorek musí splňovat, aby nebyl označen za porušený.

V současné době se snaží Evropská komise o zpřísnění analýzy medů, aby se dařilo lépe odhalovat porušené medy. V současné době je velkým problémem zbytkové množství antibiotik přítomných v medu. Přítomnost ATB je způsobena léčbou MVP v zahraničí. V souvislosti s porušováním kvality medu se čeští včelaři řadí mezi ty nejspolehlivější (Gruna et al., 2016; Vyhláška 1999 – Český med).

2.4 *Minimální inhibiční koncentrace*

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je měřítkem účinnosti antimikrobiálního činidla proti konkrétnímu mikroorganismu (Andrews, 2001). MIC je nejnižší koncentrace antibakteriálního činidla vyjádřená v $\mu\text{g/ml}$, která za přísně kontrolovaných podmínek *in vitro* zcela zabraňuje viditelnému růstu testovaného kmene organismu (Kowalska-Krochmal a Dudek-Wicher, 2020). Hodnoty se používají např. ke stanovení citlivosti bakterií na léky (Wiegand et al., 2008).

Testování MIC se běžně používá v mikrobiologii a klinických laboratořích k určení neúčinnějšího antibiotika nebo antimykotika pro použití při léčbě infekce způsobené konkrétním mikroorganismem. Pomáhá určit vhodné dávkování antibiotika a délku léčby potřebnou k účinné eliminaci infekce (Andrews, 2001).

2.5 *Minimální baktericidní koncentrace*

MBC je minimální koncentrace antibiotika, která zabíjí inokulum a může být stanovena z testů MIC ředění bujónu subkultivací na agarovém médiu bez antibiotik (French, 2006). Ve studiích usmrcování v čase je MBC minimální množství antibiotika, které ve standardním testu vede k $\geq 99,9\%$ snížení počátečního inokula během 24 hodin. Činidlo je obvykle považováno za baktericidní, pokud MBC není více než čtyřnásobek MIC (French, 2006).

Stanovení baktericidní aktivity poskytuje příležitost odhalit možnou toleranci k lékům, které by se normálně považovaly za účinné proti testovanému druhu a mohly by vést ke klinickému selhání (Yue et al., 2008). Stanovení MBC se normálně provádějí proti kulturám v logaritmické růstové fázi; při klinických infekcích mohou organismy růst pomaleji a za těchto podmínek může být baktericidní aktivita některých agens snížena nebo ztracena (Kim a Anthony, 1981), (Eng et al., 1991).

Obecně platí, že činidla, která narušují buněčnou stěnu nebo buněčnou membránu nebo interferují s esenciálními bakteriálními enzymy, jsou pravděpodobně baktericidní, zatímco látky, které inhibují funkci ribozomů a syntézu proteinů, mají tendenci být bakteriostatické (Lamb et al., 1999).

3. Cíl práce

1. Ověření či vyvrácení hypotézy ohledně inhibiční a baktericidní aktivity medu na námi zvolený patogen *Paenibacillus larvae*.
2. Stanovení minimální inhibiční a baktericidní koncentrace medu.

Cílem mé bakalářské práce bylo stanovit antimikrobiální aktivitu a inhibiční účinky několika vybraných vzorků medu na vybranou bakterii *Paenibacillus larvae*. Tyto vlastnosti byly stanovovány u 6 různých vzorků medu, které byly buď nativní, nebo vysušené. Medy byly získány od včelařů na území České republiky. U vzorků jsme porovnávali i změnu antibakteriální aktivity a inhibičních vlastností po zahřátí na námi zvolené teploty.

Hypotézy

1. Med inhibuje bakterii *Paenibacillus larvae*.
2. Zpracování a zacházení s medem má vliv na jeho antimikrobiální aktivitu.

4. Metodika

4.1 Použitá zařízení a materiál

4.2 Přístroje a pomůcky

- Petriho misky, kádinky, odměrné válce, lžice, navažovací lodička, skleněné zkumavky, plastové špičky pro automatické pipety, stojan na zkumavky
- Mikrotitrační destička s plochým dnem, 96 jamek
- Biohazard box (Telstar BioVanguard Green Line)
- Automatické mikropipety
- Laboratorní váhy (KERN ABS)
- Bakteriologické kličky
- Vortex (Velp scientifica)
- Autokláv (Tuttnauer)
- Spektrofotometr (BIO-RAD xMark)
- Termostat (LabTech)
- Denzitometr (Biosan Unimed)

4.3 Chemikálie

- Destilovaná voda
- 10 % roztok glukózy
- Pyruvát sodný
- Kvasnicový extrakt
- Hydrogenfosforečnan draselný
- Agar

4.4 Živné půdy

- Mueller-Hinton Broth (MH)

4.5 Bakteriální kmen

- Bakteriální kmen *Paenibacillus larvae* CCM 4488

4.6 Vzorky medů

Vzorky medů byly získány od včelařů na území České republiky.

Tabulka 2: Vybrané vzorky medů k experimentální části (zdroj: vlastní)

Název vzorku	Med sušený po dobu 12h	Nativní med
R	R1	R2
M	M1	M2
L	L1	L2
Z	Z1	Z2
LIB	LIB1	LIB2
F	F1	F2

U vybraných vzorků byl otestován i vliv teploty a mikro vln na antimikrobiální aktivitu medu. Stanovení bylo prováděno u všech vzorků nativních medů.

Teplota byla zvolena 50°C, 70°C a ohřev v mikrovlnné troubě.

Celkový počet vzorků je tedy 12 základních, které se budou stanovovat bez tepelného ohřevu

6 vzorků nativních ohřátých na 50°C, na 70°C a v mikrovlnné troubě.

Dohromady bylo testováno 30 vzorků medu.

5. Postup práce

5.1 Stanovení MIC

5.1.1 Příprava media

Pro tento výzkum budu využívat tekuté a tuhé medium MYGP. Jednotlivé přípravy medií se budou lišit pouze přidáním agaru. V tuhém médiu bude agar přítomen, v tekutém nikoliv.

Složení media :

Příprava na 100 ml

1g Mueller-Hinton broth

1,5 g yeast extract

0,3 g K_2HPO_4

0,1 g Na-pyruvate

2 g agar (do tekutých živných půd nepřidáváme)

→ Po vyjmutí média z autoklávu bylo přidáno 0,2g 10% roztoku glukózy (tento roztok se autoklávuje samostatně)

Práci jsme prováděli výhradně v laminárním boxu a v rukavicích.

Všechny potřebné složky jsme navážili na laboratorních váhách pomocí lžičky a navažovací lodičky. Vážili jsme s přesností na 2 desetinná místa. Navážená množství bylo přesunuto do kádinky a doplněno zhruba do 50ml, následně důkladně rozmícháno. Kádinka byla doplněna destilovanou vodou do 100ml. Kádinka jsme uzavřeli a umístili do autoklávu. Autokláv sterilizoval po dobu 15 min při teplotě 121°C. Po této době jsme médium vyjmuli z autoklávu a po mírném zchladnutí přidali 2 ml 10% glukózy.

Tekuté médium necháváme zchladnout v kádince. Tuhé s agarem ještě za tepla přelíváme do Petriho misek. To provádíme ve sterilním prostředí v laminárním boxu. Takto připravené živné půdy necháme zatuhnout a následně umístíme do lednice. Jsou připraveny k následné práci s kulturami.

5.1.2 Příprava bakteriální kultury

Bakteriální kultura *Paenibacillus larvae* kmen CCM 4488 byla kryoprezervována v -80°C pro dlouhodobé skladování. Muselo dojít k oživení kmene. 30 μl takto připravené kultury nanese na námi připravenou půdu MYPGP v Petriho misce. Kultivujeme po dobu 48h při 37°C . K tomu využijeme termostat. Po dvou dnech zkontrolujeme nárůst. Pokud by nárůst úspěšný, můžeme tuto kulturu dále zpracovávat.

5.1.3 Příprava vzorků medu

Vybrané vzorky medů řádně promícháme. Od každého vzorku si navážíme 1g do eppendorf zkumavky s objemem 2ml. Vážíme s přesností na 3 desetinná místa. Takto navážené vzorky doplníme tekutým médiem MYPGP do 2ml. Tím dosáhneme 50% koncentrace roztoku. Zvortexujeme abychom vytvořily suspenzní roztok o stejné koncentraci po celém jeho objemu.

Při výzkumu vlivu teploty na antimikrobiální aktivitu medu, jsme jednotlivé vzorky při dalším opakování MIC do ztekucení ohřály na 50°C , 70°C a v mikrovlnné troubě. K ohřevu na 50°C a 70°C jsme využili termoblok.

V tomto případě nejprve vzorek ohřejeme na dobu požadovanou ke ztekucení medu, až poté doplníme do 2ml (obrázek 13).



Obrázek 13: Doplnění media do eppendorf zkumavek se vzorkem medu (zdroj : vlastní foto)

5.1.4 Příprava inokula

Připravujeme z předem narostlé kultury *P. larvae* CCM 4488. Inokulum připravujeme až těsně před plněním do jamek. Bakteriologickou kličkou odebereme potřebné množství kolonie, abychom vytvořili zákal o denzitě 0,5 McFarland. Promícháme. Zákal si ověříme pomocí denzitometru.

5.1.5 Mikrotitrační destička

Destičku si naplníme 100 μ l předpřipraveným tekutým médiem MYGP pomocí automatické pipety. Při plnění vynecháváme řadu A, viz Obrázek 14. Do řady A přidáme 200 μ l připraveného vzorku medu, každý vzorek testujeme ve třech opakování. Poté si vezmeme multikanálovou pipetu a vzorky rozředíme geometrickou řadou. V každé řadě minimálně 10 krát promícháme. U posledních dvou řad ředění vynecháme. Tyto dvě řady nám budou sloužit jako pozitivní a negativní kontrola. Předem připravené inokulum o denzitě 0,5 McF nabere pomocí automatické pipety a do každé jamky kromě poslední řady (negativní kontrola) přidáme 10 μ l roztoku. Destičku překryjeme víčkem, řádně popíšeme a vložíme do spektrofotometru. Ve spektrofotometru se destička mírně protřepe po dobu deseti sekund, aby se vzorek zhomogenizoval. A můžeme měřit při vlnové délce 405nm.

Měření na spektrofotometru :

Využíváme skutečnosti, že mnoho látek pohlcuje elektromagnetické záření ve viditelné nebo ultrafialové části spektra, méně často infračervené záření. Míra, jakou látka pohlcuje světlo různých vlnových délek. Množství světla určité vlnové délky, které pohltí např. látka rozpuštěná v roztoku, závisí na koncentraci látky. Měříme absorpci dané látky v určitém rozsahu vlnových délek světla (Østergaard, 2018).

→ Následuje kultivace po 48h. Při teplotě 37 °C. K tomu využijeme termostat.

Po dvou dnech měříme nárůst kultur v jednotlivých jamkách a hodnotíme výsledky.

5.1.6 Výpočet MIC

Hodnotu získáme tak, že od absorbancí v jednotlivých jamkách po 48 hodinách odečteme původní hodnotu. Tento výsledek poté porovnáme s hodnotami pozitivních a negativních kontrol a dle toho určíme procentuální inhibici.

Vzorec :

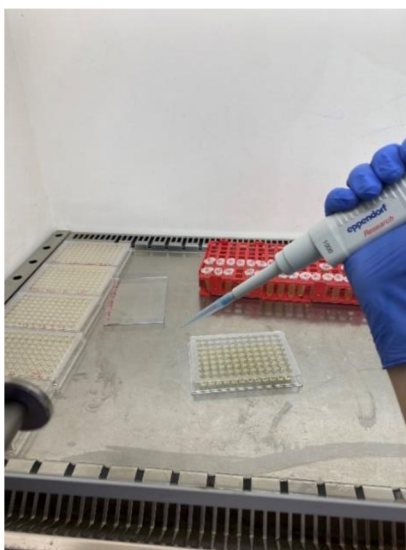
$$\text{Inhibice v \%} = \frac{100 - [A1 - A0] - \text{neg. c.}}{(\text{poz. c.} - \text{neg. c.})} * 100$$

A1.....hodnota absorbance po 48h

A0.....hodnota absorbance před kultivací

Neg.c.....hodnota absorbance u negativní kontroly

Poz.c.....hodnota absorbance u pozitivní kontroly

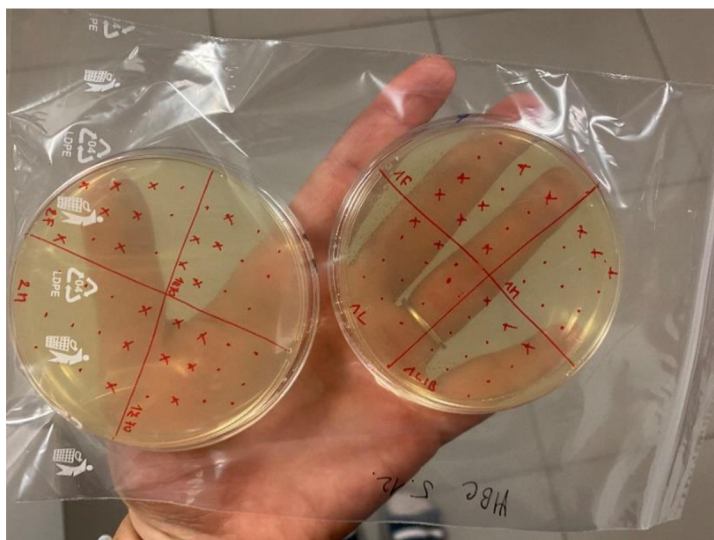


Obrázek 14: Rozplňování media do mikrotitrační destičky (zdroj: Vlastní foto)

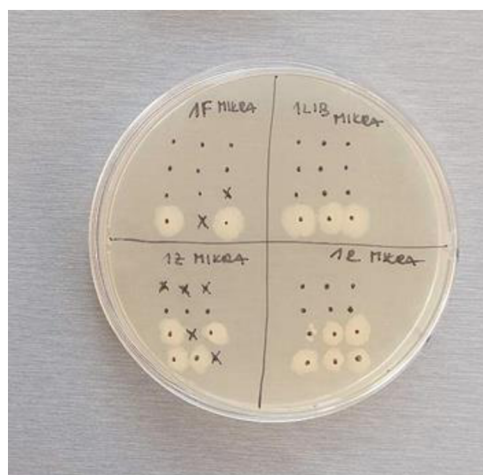
5.2 Stanovení MBC

Připravíme si živné půdy a pečlivě si je nadepíšeme. Poté dle předepsaných vzorků z již kultivovaných destiček medu nabíráme bakteriologickou kličkou. Odebíráme z jamek, které neprokazovaly bakteriální růst. Necháme zaschnout (obrázek 15). Přiklopíme víčkem a kultivujeme opět při 37°C po dobu 48h.

Pozorujeme nárůst a hodnotíme (obrázek 16).



Obrázek 15: Plotny pro testování MBC (zdroj: Vlastní foto)



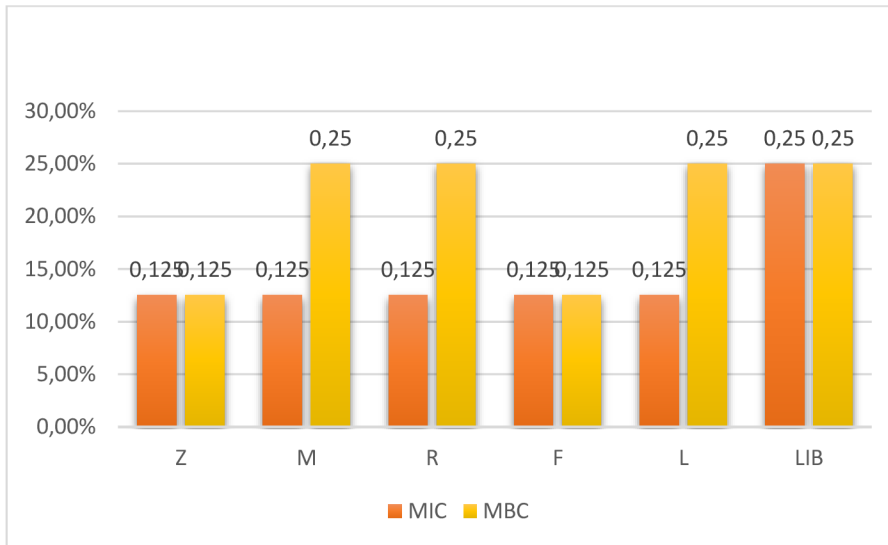
Obrázek 16: Plotny po kultivaci 48h při 37°C (zdroj: vlastní)

6. Výsledky

Všechny analýzy byly provedeny v tripletech a data jsou prezentována jako průměr ± standardní odchylka.

Výsledky vzorků nativních medů bez tepelného ohřevu :

Grafické zobrazení hodnot :

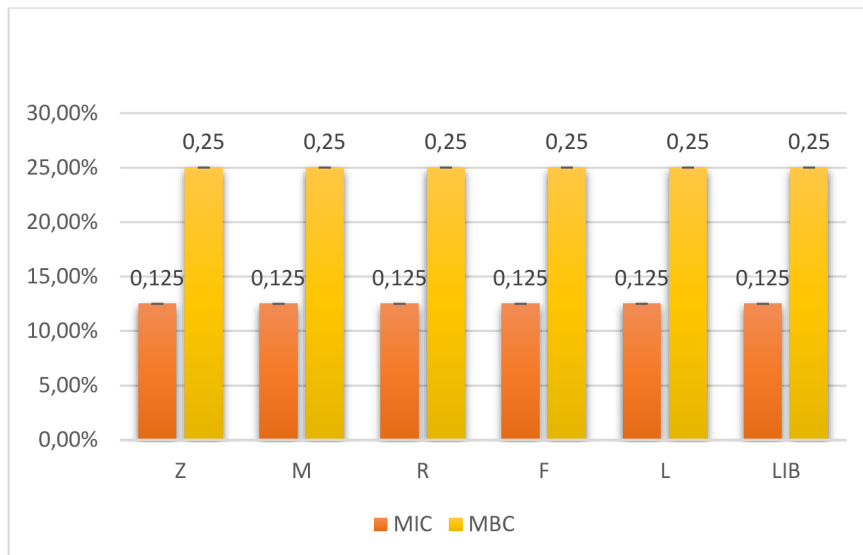


Obrázek 17 : Výsledky hodnot MIC a MBC u nativních vzorků medu bez tepelného ohřevu (zdroj: vlastní)

Vzorky nativní měly téměř totožné výsledky MIC, až na hodnotu vzorku LIB, kde byla minimální inhibiční koncentrace 25 %. MBC diskovou difúzní metodou se opět pohybovalo mezi 12,5 a 25%, vyšší hodnota byla četnější. Průměrná hodnota MIC vyšla 14,58%, MBC 20,83% (obrázek 17).

Výsledky vzorků vysušených medů bez tepelného ohřevu :

Grafické zobrazení hodnot :

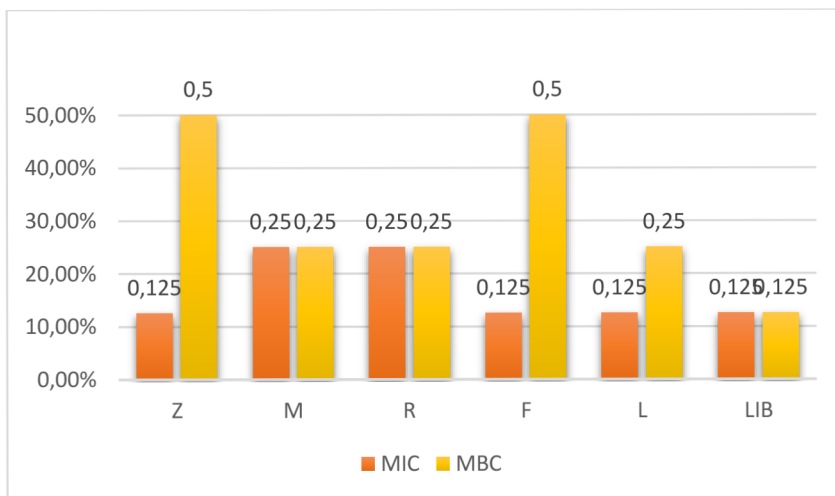


Obrázek 18: Výsledky hodnot MIC a MBC u nativních vzorků medu bez tepelného ohřevu (zdroj: vlastní)

Vysušené vzorky medu měly poněkud nižší hodnoty než vzorky nevysušené, obě hodnoty MIC i MBC byly výrazně nižší. MIC byla stejně jako MBC shodná u všech stanovovaných vzorků. Průměrná hodnota MIC byla tedy 12,5%, MBC 25% (obrázek 18). Vysušený med vykazoval vyšší antimikrobiální aktivitu.

Výsledky medu zahřátého na 50°C :

Grafické zobrazení hodnot :

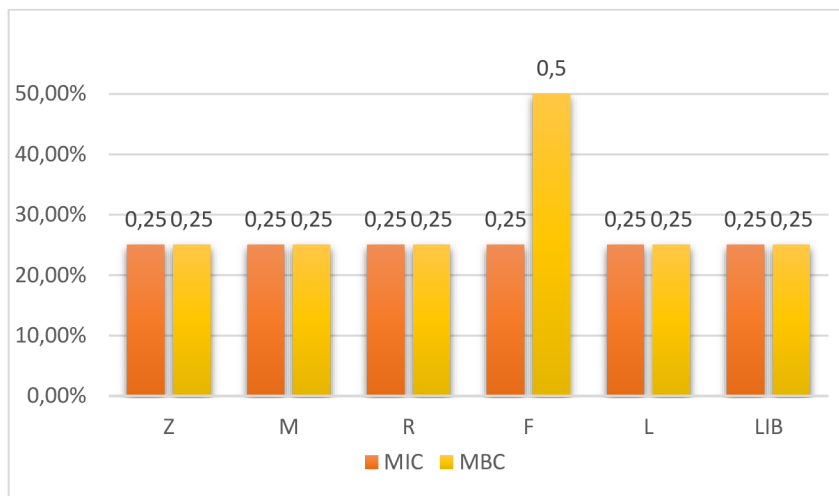


Obrázek 19 : Výsledky hodnot MIC a MBC u nativních vzorků medu zahřáté na 50 °C (zdroj: vlastní)

Výsledky vzorků, které byly před stanovením ohřáty na 50°C mají průměrné hodnoty MIC i MBC o něco vyšší než medy stanovované bez ohřátí. Nejčteněji zastoupené procento inhibice u MIC je 12,5%. MBC je poněkud rozmanitější co se týče hodnot, rozpětí je zde od 12,5% do 50 % (obrázek 19).

Výsledky medu zahřátého na 70°C :

Grafické zobrazení hodnot :



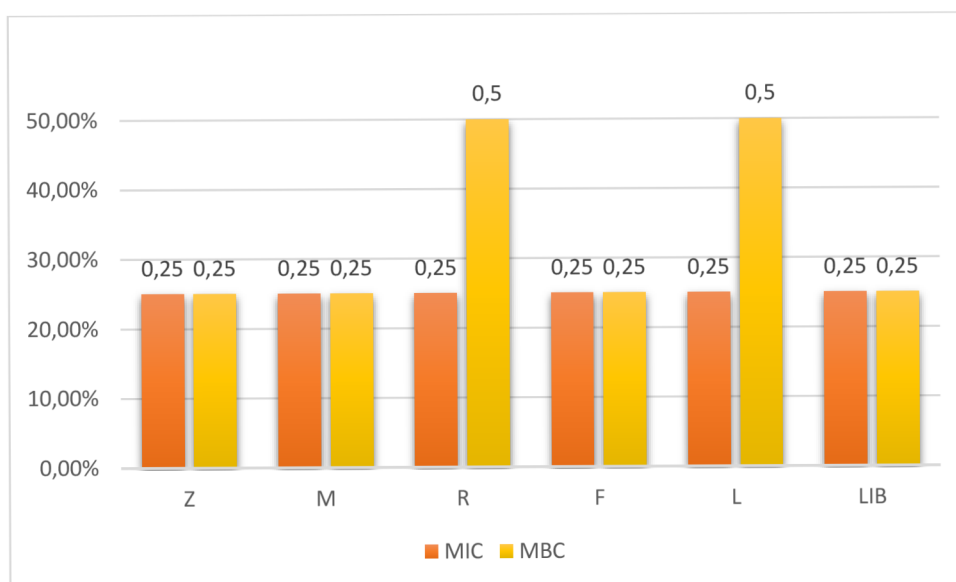
Obrázek 20 : Výsledky hodnot MIC a MBC u nativních vzorků medu zahřáté na 70 °C (zdroj: vlastní)

Výsledky vzorků, které byly před stanovení ohřaty na 70°C mají téměř shodné všechny hodnoty. U MIC jsou všechny hodnoty totožné. MBC má 5 shodných výsledků, které vykazují hodnotu 25%, až na výjimku a tou je vzorek, který má dvojnásobek této hodnoty. Průměr u MIC činí 25 %, u MBC je to 29,17% (obrázek 20).

Výsledky medu ohřátého v mikrovlnné troubě :

Nativní vzorky ohřáté v mikrovlnné troubě u MIC všechny vykazují shodnou hodnotu 25% inhibice. U MBC je dvakrát zastoupena hodnota 50 %, ale čtyřikrát 25%. Průměr tedy činí 33,33% (obrázek 21).

Grafické zobrazení hodnot :



Obrázek 21: Výsledky hodnot MIC a MBC u nativních vzorků medu zahřáté v mikrovlnné troubě (zdroj: vlastní)

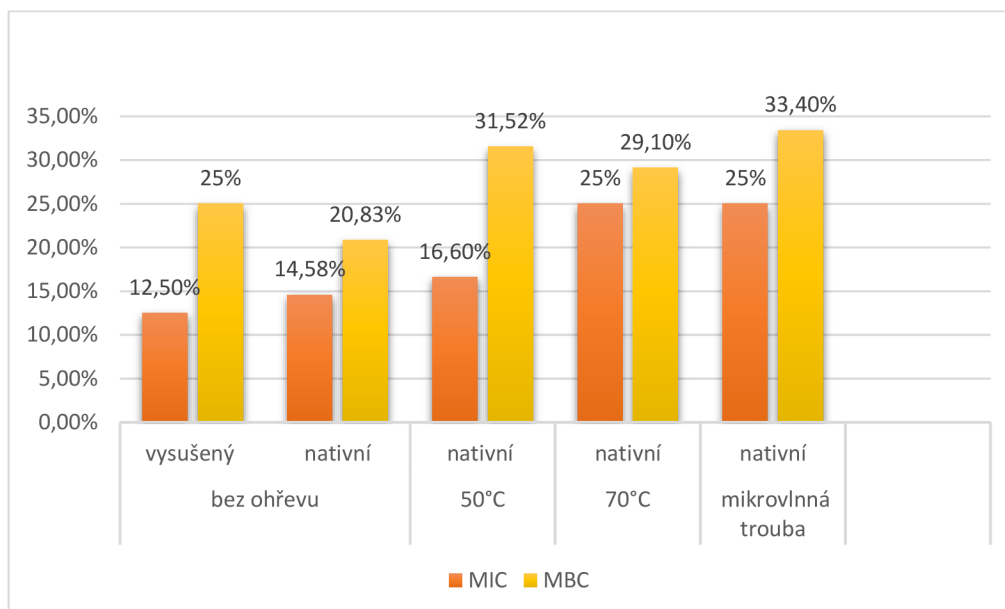
Tabulka průměrných MIC a všech výsledných hodnot vzorků medů :

Tabulka 3 : Shrnutí všech hodnot analyzovaných vzorků medů

	Bez ohřevu		50°C	70°C	mikrovlnná trouba
	vysušený	nativní	nativní	nativní	nativní
MIC	12,5%	14,58 %	16,6 %	25 %	25 %
MBC	25%	20,83 %	31,5 %	29,1 %	33,4 %

(zdroj: vlastní)

Grafické zobrazení hodnot :



Obrázek 22 : Průměrné hodnoty MIC a MBC u všech vzorků medu (zdroj: vlastní)

U průměrných hodnot všech stanovení při určitých zpracování pozorujeme stoupající trend MIC i MBC až na výjimku MBC u vzorků ohřátých v mikrovlnné troubě, kde se hodnota MIC nezvýšila. Se stoupající teplotou se nám hodnoty zvyšují, klesá antimikrobiální aktivita (obrázek 22, tabulka 3).

7. Diskuze

V mé práci jsem se zaměřila na výzkum inhibiční a antimikrobiální aktivity medu na patogen *Paenibacillus larvae*, který způsobuje velmi závažné onemocnění včel - mor včelího plodu. Dále jsem porovnávala vliv zpracování medu na jeho antimikrobiální vlastnosti.

Na rozdíl od práce (Fuselli et al., 2005) jsme bakteriální kmen nezískávaly z medových plástů úlů vykazujících klinické příznaky moru včelího plodu, ale získaly jsme ho z České sbírky mikroorganismů BRNO. Antimikrobiální aktivita byla stanovena pro grampozitivní bakterii *P. larvae*. Konkrétně šlo o kmen *P. larvae* CCM 4488. Bylo zvažováno i použití kmenu CCM 4486, ten však neprokazoval takovou schopnost růstu jako následně užitý kmen. Bakteriální kmen byl až do použití skladován při - 80°C.

Při tomto výzkumu byla kultivace prováděna za mikroaerobních podmínek při 37 °C na MYPGP agaru (Mueller-Hintonův, bujón - kvasinkový, extrakt – glukóza - pyruvát sodný a K₂HPO₄) po dobu 48 hodin (Fuselli et al., 2005). Metodika byla prováděna dle (Flesar et al., 2010) s malými modifikacemi postupem dle kapitoly 4. K testování medů byly zvoleny již zmíněné metody MIC a MBC, které využil i (Zainolm et al., 2013) v testování antimikrobiální aktivity medů. Výsledky ukázaly, že zpracování medů má vliv na jejich antimikrobiální vlastnosti.

U prvního stanovení bez ohřátí vzorků pozorujeme, že vysušené medy mají nižší průměr MIC, o 2,08%. Mohlo by to být z důvodu obecného tvrzení (Nedic et al., 2020), který říká, že se snižováním obsahu vlhkosti v medu se jeho antimikrobiální aktivita zvyšuje. Konkrétní účinky vysoušení na antimikrobiální aktivitu medu však závisí na několika faktorech, včetně druhu medu, teploty a trvání vysoušení a přítomnosti jiných látek v medu. Některé výzkumy naznačují, že kontrolované vysoušení medu může být způsobem, jak zvýšit jeho antimikrobiální aktivitu a prodloužit jeho trvanlivost (Almasaudi, 2021). Především záleží na hraniční teplotě u vysoušení, aby nedošlo k poškození látek zodpovídajících za antimikrobiální a antioxidační účinky. Nižší MIC (14,58%) vykazoval med vysušený, však nižší MBC med nativní zde byl rozdíl 4,17%.

Pokud nahlédneme do výsledků medů zahřátých na 50°C a porovnáme je s výsledky medu bez ohřevu, zjistíme, že daleko lepší výsledky vykazovaly medy bez tepelné úpravy, bez ohledu na to, zda se jednalo o vzorek vysušený či nativní. Bylo tomu tak u MIC i MBC. Podle studie (Mat Ramlan et al., 2021) bylo zjištěno, že tepelné zpracování

negativně ovlivňuje většinu vzorků medu, zejména při teplotách 55°C a 65°C. Naše tepelné zpracování se pohybovalo mezi těmito teplotami. MIC se s porovnáním vysušeného medu bez ohřátí a ohřátého na 50°C zvýšila o 4,1%, tím pádem došlo ke snížení antibakteriální aktivity. V porovnání s medem nativním bez ohřevu byla hodnota MIC zvýšena pouze o 2,02%, opět došlo ke snížení antimikrobiální aktivity.

Stejně tvrzení můžeme uplatnit i u hodnot medů, které byly před stanovením ohřaty na teplotu 70°C. Průměrná hodnota MIC byla 25%, což je v porovnání s předchozími výrazně vyšší hodnota. Rozdíl mezi hodnotou nativního medu bez ohřevu a medem zahřátým na 70°C je rozdíl 10,42%. MIC vzrostla i oproti medu ohřátého na 50°C, zde se hodnota zvýšila o 4,17%. Průměrné hodnoty MBC byly 29,1%, byly vyšší oproti medům bez ohřátí, avšak proti vzorkům ohřátých na 50% vykazovaly nižší MBC.

Výzkum, který prováděli Sulaiman a Sarbon (2022) měl podobné výsledky. Studovali nezahřátý a zahřátý malajský med (název druhu nebyl uveden) při třech různých teplotách (50°C, 70°C a 90°C) proti čtyřem specifickým bakteriím: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* a *Pseudomonas aeruginosa*. Zjistili, že nezpracovaný med proti čtyřem typům bakterií vykazoval nejnižší hodnotu MIC. Jak se teplota zvyšovala, hodnota MIC se také zvyšovala, což naznačuje, že antibakteriální aktivity zpracovaného medu byly sníženy. Mezi antibakteriální sloučeniny jiné než fenolové kyseliny a flavonoidy, které mohou být ovlivněny teplotou, patří peroxid vodíku. Sulaiman a Sarbon (2022) napsal, že zahřívání medu po dobu 20 minut na 50°C by ovlivnilo enzym glukózooxidázu a výrazně snížilo jeho enzymatickou aktivitu. Některé flavonoidy, které jsou citlivé na teplo, jako je kvercetin a rutin, které mají také antimikrobiální sloučeniny, mohou být ovlivněny teplem.

Porovnání medů pod vlivem mikrovln se průměrnou MIC neliší od medů zahřátých na 70°C. Však MBC je mírně zvýšená. Mohlo dojít k většímu poškození synergických složek medu, z toho důvodu že dochází k rozkmitání polárních molekul (v našem případě vody) a tak dojde k vyššímu ohřevu. Tím pádem teplo působí na termolabilní antibakteriální látky, jako jsou enzymy polyfenolické látky, fenoly a další látky odpovědné za antibakteriální vlastnosti (Schepartz a Subers, 1964) White a Subers (1964) říká, že zahřívání nad fyziologické teploty je obecně pro enzymy škodlivé a předchozí studie o glukózooxidáze v medu zjistila, že zahřívání na 50 °C po dobu 20 minut významně snižuje aktivitu enzymu. Zároveň musíme brát v potaz, že výsledky týkající se

tepelného zpracování nemusí platit obecně. Kowalski (2013) ukázal, že vztah mezi koncentrací fenolu popř. jiných antibakteriálních látek a tepelným nebo mikrovlnným zpracováním závisí na původu medu. Proto nemůžeme obecně říci, že námi zvolená teplota či mikrovlnný ohřev, by na všechny medy z různých částí světa působil identicky.

Díky naší experimentální části můžeme říci, že tepelné zpracování medu snižuje jeho antimikrobiální aktivitu.

Dle mého názoru by se do příštího výzkumu mělo zapojit i testování chemického složení medu, které je ovlivněno jednotlivými složkami a především jejich procentuálnímu zastoupení např. polyfenolických sloučenin, peroxidu vodíku, 1,2-dikarbonylových sloučenin a včelího defenzinu-1. Tyto látky v medu působí synergicky (Hussain, 2018). Díky tomu je med účinný proti různým mikroorganismům. Rozdíly v množství a strukturních modifikacích složek jsou také hlavním faktorem, který přispívá k tomu, proč některé medy mohou být účinnější při inhibici růstu bakterií než jiné jak zmiňuje (Farhanah Mat Ramlan et al., 2021).

V následujícím stanovení bych zvažila kultivaci nejen na plotnách, ale též v tekutých živných médiích, odkud by se přenášely na kultivační půdy. Mohlo by dojít k většímu pomnožení bakterií.

8. Závěr

Z výsledků je zřejmé, že tepelné zpracování snižuje jeho antimikrobiální aktivitu medu na patogen *P.larvae*. Práce v první rešeršní části shrnuje informace o včelařství, jeho historii a významu. Druhá část je zaměřena na poznatky ohledně moru včelího plodu o jeho původci *P.larvae*, přenosu, virulenci, patogenzi a v neposlední řadě a prevenci a léčbě. Třetí část rešerše pojednává o medu z hlediska vzniku, složení, zpracování a především o jeho antimikrobiální aktivitě. Všechny tyto tři části poté spojuje experimentální část práce.

V experimentální části jsme pomocí metod pro testování antimikrobiální aktivity, konkrétně MIC a MBC, stanovili inhibiční a baktericidní koncentrace jednotlivých vzorků nativních a vysušených, které jsme před stanovením tepelně zpracovali. Výsledné hodnoty jednotlivých vzorků jsme převedly do průměrných hodnot, abychom docílili objektivnějšího výsledku a mohlo dojít k snazšímu porovnání.

Cílem práce bylo ověřit či vyvrátit hypotézy ohledně inhibiční a baktericidní aktivity medu na námi zvolený patogen *Paenibacillus larvae* a stanovit minimální inhibiční a baktericidní koncentraci medu. Oba cíle jsme splnila. Výsledky testování MIC a MBC vybraných vzorků medů vyšly v souladu s očekáváním. Med dokáže inhibovat bakterii *P.larvae*. Avšak k dalšímu testování bychom měli přiřadit i testování jednotlivých vzorků medů z hlediska složení a poměru zastoupených složek. To by mohlo mít velký vliv na objasnění antimikrobiálních vlastností medu.

Experimentální částí jsme potvrdily hypotézy, že med dokáže inhibovat bakterii *P.larvae* a zpracování a zacházení s medem má vliv na jeho antimikrobiální aktivitu.

9. Seznam literatury

- 1) ADJLANE, N. et al., 2020. Honey bee colony winter loss rates for 35 countries participating in the COLOSS survey for winter 2018–2019, and the effects of a new queen on the risk of colony winter loss. *Journal of Apicultural Research*. 59(5), 744-751. DOI: 10.1080/00218839.2020.1797272. ISSN 0021-8839.
- 2) AFIK, O., DAG, A., SHAFIR, S., 2008. Honeybee, *Apis mellifera*, round dance is influenced by trace components of floral nectar. *Animal Behaviour*. 75(6), 71-377. ISSN 0003-3472.
- 3) AGERA, S.I.N., 2011. Role of beekeeping in the conservation of forest. *Global Journal of Agricultural Sciences*. 10(1), 27-32. ISSN 1596-2903.
- 4) AGUILAR, R., ASHWORTH, L., GALETTO, L., AIZEN, M.A., 2006. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology letters*. 9(8), 968-980. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2006.00927.x. ISSN 1461-023X.
- 5) AHMAD, S., CAMPOS, M.G., FRATINI, F., ALTAYE, S.Z., LI, J., 2020. New Insights into the Biological and Pharmaceutical Properties of Royal Jelly. *International journal of molecular sciences*. 21(2). DOI: 10.3390/ijms21020382. ISSN 1422-0067.
- 6) AIZEN, M.A., HARDER, L.D., 2009. The Global Stock of Domesticated Honey Bees Is Growing Slower Than Agricultural Demand for Pollination. *Current biology*. 19(11), 915-918. DOI: 10.1016/j.cub.2009.03.071. ISSN 0960-9822.
- 7) ALAUX, C., DUCLOZ, F., CRAUSER, D., LE CONTE, Y., 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology letters*. Royal Society, (6). DOI: 10.1098. ISSN 1744-957X.
- 8) ALIPPI, A.M., REYNALDI, F.J., 2006. Inhibition of the growth of *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. *Journal of Invertebrate Pathology*. 91(3), 141-146. DOI: 10.1016/j.jip.2005.12.002. ISSN 0022-2011.
- 9) 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 1319-562X.

- 10) ALVARADO, I., PHUI, A., ELEKONICH, M.M., ABEL-SANTOS, E., 2013. Requirements for In Vitro Germination of *Paenibacillus larvae* Spores. *Journal of Bacteriology*. 195(5), 1005-1011. DOI: 10.1128/JB.01958-12. ISSN 0021-9193.
- 11) ALVAREZ-SUAREZ, J.M., BATTINO, M., GIAMPIERI, F., 2013. Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Current Medicinal Chemistry*. 20(5), 621-638. DOI: 10.2174/092986713804999358. ISSN 0929-8673.
- 12) AL-WAILI, N., SALOM, K., AL-GHAMDI, A.A., 2011. Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice. *The Scientific World Journal*. 11(1), 766-787. DOI: 10.1100/tsw.2011.78. ISSN 2356-6140.
- 13) ANDREWS, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48(1), 5-16. DOI: 10.1093/jac/48.suppl_1.5. ISSN 1460-2091.
- 14) Antioxidant Properties of Honey and Its Role in Preventing Health Disorder, 2015. *The Open Nutraceuticals Journal*. Department of Pharmacology, School of Medical Sciences, Universiti Sains Malaysia, Health Campus, 16150 Kubang Kerian, Kelantan, Malaysia, 2010(8), 6-16. DOI: 10.2174/18763960010030100006. ISSN 1876-3960.
- 15) ASTOLFI, M.L. et al., 2021. An Analytical Method for the Biomonitoring of Mercury in Bees and Beehive Products by Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry. *Molecules*. 26(16), 48-78. DOI: 10.3390/molecules26164878. ISSN 1431-5157.
- 16) ASTON, D., 2013. Honey bee winter loss survey for England 2007-8. *Journal of Apicultural Research*. 49(1), 111-112. DOI: 10.3896/IBRA.1.49.1.21. ISSN 218839.
- 17) BABACAN, S., PIVARNIK, L.F., RAND, A.G., 2002. Honey Amylase Activity and Food Starch Degradation. *Journal of Food Science*. 67(5), 1625-1630. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb08695.x. ISSN 1750-3841.
- 18) BALL, D.W., 2007. The Chemical Composition of Honey. *Journal of Chemical Education*. 84(10). DOI: 10.1021/ed084p1643.

- 19) BANKOVA, V.S., DE CASTRO, S.L., MARCUCCIC, M.C., 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* (31), 3-15. DOI: 10.1051/apido:2000102.
- 20) BAUER, J.A., ZÁMOCKÁ, M., MAJTÁN, J., V.B.-H.1, BAUEROVÁ-HLINKOVÁ, V., 2022. Glucose Oxidase, an Enzyme “Ferrari”: Its Structure, Function, Production and Properties in the Light of Various Industrial and Biotechnological Applications. *Biomolecules*. 12(3), 472. DOI: 10.3390/biom12030472. ISSN 2218-273X.
- 21) BENTZIEN, C., 2008. *Ekologický chov včel*. Praha: Vikend. ISBN 8086891866.
- 22) BOGDAN, K., 2008. Pochodzenie propolisu w świetle teorii i badań naukowych: The origin of propolis in the theories and scientific research. *Herba Polonica*. 54(4), 179–186.
- 23) BUCHMANN, S.L., NABHAN, G.P., 1997. *The Forgotten Pollinators*. Island Press. ISBN 1-55963-352-2.
- 24) BURGESS, E.P.J., MALONE, L.A., CHRISTELLER, J.T. ., 1996. Effects of two proteinase inhibitors on the digestive enzymes and survival of honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*. 42(9), 823-828. DOI: 10.1016/0022-1910(96)00045-5. ISSN 0022-1910.
- 25) BURRITT, N.L. et al., 2016. Sepsis and Hemocyte Loss in Honey Bees (*Apis mellifera*) Infected with *Serratia marcescens* Strain Sicaria. *PLOS ONE*. 11(12). DOI: 10.1371/journal.pone.0167752. ISSN 1932-6203.
- 26) CILIA, G., FORZAN, M., 2022. Editorial: Insights into bee diseases and bee health. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 12(5), 1-4. DOI: 10.3389/fcimb.2022.993440. ISSN 22352988.
- 27) ČERMÁK, K. et al., 2016. *Včelařství: svazek I*. České Budějovice: Pracovní společnost nástavkových včelařů. ISBN 978-80-260-9090-8.
- 28) *Český med: Norma jakosti č. ČSV 1/1999*, 1999.
- 29) DAISLEY, B.A. et al., 2022. Disentangling the microbial ecological factors impacting honey bee susceptibility to *Paenibacillus larvae* infection. *Trends in Microbiology*. DOI: 10.1016/j.tim.2022.11.012. ISSN 0966-842X.
- 30) DANIHLÍK, J. et al., 2017. *Včelařství: Svazek II*. Praha. ISBN 978-80-270-0776-9.
- 31) DE GROOT, R.S., ALKEMADE, R., BRAAT, L., HEIN, L., WILLEMEN, L., 2010. Challenges in integrating the concept of ecosystem services and values in

- landscape planning, management and decision making. *Ecological Complexity*. 7(3), 260-272. DOI: 10.1016/j.ecocom.2009.10.006. ISSN 1476-945X.
- 32) DE OLIVEIRA RESENDE RIBEIRO, R. et al., 2014. Determination of Trace Elements in Honey from Different Regions in Rio de Janeiro State (Brazil) by Total Reflection X-Ray Fluorescence. *Journal of Food Science*. 79(4). DOI: 10.1111/1750-3841.12363. ISSN 1750-3841.
- 33) DELAPLANE, K.S., MAYER, D.F., 2000. *Crop Pollination By Bees*. New York, Oxon: CABI. ISBN 0-85199-448-2.
- 34) DEVILLERS, J., PHAM-DELEGUE, M.H., 2002. *Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals*. Londýn. ISBN 9780429218767.
- 35) DOBROWOLSKI, J.W., VOHORA, S.B., SHARMA, K., NAQVI, S.A.H., DANDIYA, P.C., 1991. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology*. 1991(35), 77-82. DOI: 10.1016/0378-8741(91)90135-Z. ISSN 0378-8741.
- 36) DUCHENNE, F. et al., 2020. Long-term effects of global change on occupancy and flight period of wild bees in Belgium. *Global change biology*. 26(12), 6753-6766. DOI: 10.1111/gcb.15379. ISSN 1365-2486.
- 37) DUPAL, L., KAMLER, F., TITĚRA, D., VOŘECHOVSKÁ, M., VINŠOVÁ, H., 2015. *Jak poznáme kvalitu? Med*. Praha: Sdružení českých spotřebitelů, z. ú. v rámci priorit České technologické platformy pro potraviny. ISBN 978-80-87719-29-9.
- 38) EARDLEY, C. et al., 2007. *Crops, Browse and Pollinators in Africa An Initial Stock-taking*. 2. Rome, Italy: Viale delle Terme di Caracalla. ISBN 978-92-5-105900-5.
- 39) EBELING, J., KNISPEL, H., HERTLEIN, G., FÜNFHAUS, A., GENERSCH, E., 2016. Biology of *Paenibacillus larvae*, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(17), 7387-95. DOI: 10.1007/s00253-016-7716-0. ISSN 0175-7598.
- 40) ENG, R.H., PADBERG, F.T., SMITH, S.M., TAN, E.N., CHERUBIN, C.E., 1991. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35(9), 1824 - 1828. DOI: 10.1128/AAC.35.9.1824. ISSN 0066-4804.
- 41) ENGELSDORP, D. van, MEIXNER, M.D. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may

- affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103(supplement), 80-95. DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.011. ISSN 0022-2011.
- 42) FALLICO, B., ZAPPALÀ, M., ARENA, E., VERZERA, A., 2004. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Food Chemistry*. 85(2), 305-313. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.07.010. ISSN 0308-8146.
- 43) FARHANAH MAT RAMLAN, N.A., MD ZIN, A.S., SAFARI, N.F., CHAN, K.W., ZAWAWI, N., 2021. Application of Heating on the Antioxidant and Antibacterial Properties of Malaysian and Australian Stingless Bee Honey. *Antibiotics*. 10(11), 1365. DOI: 10.3390/antibiotics10111365. ISSN 0021-8820.
- 44) FLESAR, J. et al., 2010. In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus larvae* and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Veterinary microbiology*. 28(1-2), 129-133. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.03.018. ISSN 0378-1135.
- 45) FRANCHIN, M. et al., 2019. Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis Inhibits Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Elucidation of the Mechanism of Action. *Journal of Natural Products*. 24(11), 954-960. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00938. ISSN 0163-3864.
- 46) FRENCH, G.L., 2006. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections--the potential role of daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58(6), 1107-1117. DOI: 10.1093/jac/dkl393. ISSN 0305-7453.
- 47) FUSELLI, S.R., DE LA ROSA, S.B.G., EGUARAS, M.J., FRITZ, R., 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of Citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(7), 2574-2580. DOI: 10.1021/jf048207p. ISSN 0021-8561.
- 48) GENERSCH, E., 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103(supplement), S10-S19. DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.015. ISSN 1096-0805.
- 49) GONZÁLEZ-MIRET, M.L., TERRAB, A., FERNÁNDEZ-RECAMALES, M.A., HEREDIA, F.J., HERNANZ, D., 2005. Multivariate Correlation between Color and Mineral Composition of Honeys and by Their Botanical

- Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(7), 2574–2580. DOI: 10.1021/jf048207p. ISSN 0021-8561.
- 50)** GRAY, A. et al., 2019. Loss rates of honey bee colonies during winter 2017/18 in 36 countries participating in the COLOSS survey, including effects of forage sources. *Journal of Apicultural Research*. 58(4), 479-485. DOI: 10.1080/00218839.2019.1615661. ISSN 0021-8839.
- 51)** GRUNA, B., POČUCH, M., PŘIDAL, A., LSTIBŮREK, J., 2016. *Včelařství*. České Budějovice: PSNV. ISBN 978-80-907079-3-1.
- 52)** GRUNA, B., POČUCH, M., PŘIDAL, A., LSTIBŮREK, J., 2020. *Včelařství: Svazek III*. Praha: Pracovní společnost nástavkových včelařů. ISBN 978-80-907079-3-1.
- 53)** GUPTA, R.K., SAINI, S., 2018. Impact of drying techniques on physico-chemical properties and antioxidant activity of honey. *Journal of Food Science and Technology*. 55(9), 3573-3583. DOI: 10.1007/s13197-018-3338-9. ISSN 0022-1155.
- 54)** HAMDI, C. et al., 2011. Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. *Journal of Applied Entomology*. 135(7), 524-533. DOI: 10.1111/j.1439-0418.2010.01609.x. ISSN 0931-2048.
- 55)** HANSEN, H., BRØDSGAARD, C.J., 1999. American Foulbrood: A Review of Its Biology, Diagnosis and Control. *Bee world*. 80(1), 195-201. DOI: 10.1080/0005772X.1999.11099415. ISSN 0005-772X.
- 56)** HARAGSIM, O., 2013. *Včelařské dřeviny a byliny*. 2. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-8484-7.
- 57)** HERMOSÍN, I., M. CHICÓN, R., CABEZUDO, M.D., 2003. Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*. 83(2), 263-268. DOI: doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00089-X. ISSN 0308-8146.
- 58)** HOAGE, T.R., ROTHENBUHLER, W.C., 1966. Larval Honey Bee Response to Various Doses of Bacillus larvae Spores. *Journal of Economic Entomology*. 59(1), 42-45. DOI: 10.1093/jee/59.1.42. ISSN 0022-0493.
- 59)** HRISTOV, P., SHUMKOVA, R., PALOVA, N., NEOV, B., 2020. Factors Associated with Honey Bee Colony Losses: A Mini-Review. *Veterinary sciences*. 7(4), 1-17. DOI: 10.3390/vetsci7040166. ISSN 2306-7381.
- 60)** HUANG, X.-F. et al., 2014. Paenibacillus abyssi sp. nov., isolated from an abyssal sediment sample from the Indian Ocean. *Antonie van Leeuwenhoek: Journal of*

Microbiology. 106(6), 1089-1095. DOI: 10.1007/s10482-014-0277-2. ISSN 0003-6072.

- 61) CHIRSANOVA, A., CAPCANARI, T., BOISTEAN, A., EL MEHDI, I.K., 2021. Bee honey: history, characteristics, properties, benefits and adulteration in the beekeeping sector. *Journal of Social Sciences*. Technical University of Moldova, 98 - 114. DOI: 10.52326. ISSN 2587-3490.
- 62) IGLESIAS, M.T., DE LORENZO, C., DEL CARMEN POLO, M., JÉSUS MARTÍN-ÁLVAREZ, P., PUEYO, E., 2004. Usefulness of Amino Acid Composition To Discriminate between Honeydew and Floral Honeys. Application to Honeys from a Small Geographic Area. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004(52), 84–89. DOI: 10.1021/jf030454q. ISSN 0021-8561.
- 63) INKĚNIENĚ, A.M., RAMANAUSKIENĚ, K., 2011. Propolis oil extract: quality analysis and evaluation of its antimicrobial activity. *Natural Product Research*. 25(15), 1463-1468. DOI: 10.1080/14786419.2010.529440. ISSN 1478-6419.
- 64) ISIDOROV, V.A., MASLOWIECKA, J., PELLIZZER, N., MIRANDA, D., BAKIER, S., 2023. Chemical composition of volatile components in the honey of some species of stingless bees. *Food control*. 146(1). DOI: 10.1016/j.foodcont.2022.109545. ISSN 0956-7135.
- 65) JELÍNEK, J., ZICHÁČEK, V., 2014. *Biologie pro gymnázia*. 11. Nakladatelství Olomouc. ISBN 978-80-7182-338-4.
- 66) KEARNS, C.A., INOUYE, D.W., WASER, N.M., 1998. ENDANGERED MUTUALISMS: The Conservation of Plant-Pollinator Interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 29(1), 83-112. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.29.1.83. ISSN 1545-2069.
- 67) KIM, K.S., ANTHONY, B.F., 1981. Importance of bacterial growth phase in determining minimal bactericidal concentrations of penicillin and methicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 19(6), 1075 - 1077. DOI: 10.1128/AAC.19.6.1075. ISSN 0066-4804.
- 68) KNESPLOVÁ, T., 2010. *Včely, včelařství v životě člověka a ve školní výuce*. v Praze. Diplomová práce. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE PEDAGOGICKÁ FAKULTA KATEDRA BIOLOGIE A ENVIRONMENTÁLNÍCH STUDIÍ. Vedoucí práce Prof. RNDr. Lubomír Hanel, CSc.

- 69) KOWALSKA-KROCHMAL, B., DUDEK-WICHER, R., 2020. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*. Wroclaw, Poland, 10(2), 165. DOI: 10.3390/pathogens10020165. ISSN 2076-0817.
- 70) KREMEN, C., 2005. Managing ecosystem services: what do we need to know about their ecology?. *Ecology letters*. 8(5), 468-479. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2005.00751.x. ISSN 1461-0248.
- 71) KRETAVIČIUS, J., KURTINAITIENE, B., RAČYS, J., ČEKSTERYTĖ, V., 2010. Inactivation of glucose oxidase during heat-treatment de-crystallization of honey. *ŽEMDIRBYSTĖ=AGRICULTURE*. 97(4), 115-122. ISSN 1392-3196.
- 72) KRITSKY, G., 2017. Beekeeping from Antiquity Through the Middle Ages: Annual Review of Entomology. *Annual Review of Entomology*. Mount St. Joseph University, Cincinnati, Ohio 45233, 62(1), 249-264. DOI: 10.1146/annurev-ento-031616-035115. ISSN 0066-4170.
- 73) KWAKMAN, P.H.S. et al., 2010. How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*. 27(4), 2546-2582. DOI: 10.1096/fj.09-150789. ISSN 3643-3650.
- 74) 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 1521-6551.
- 75) LAMB, H.M., FIGGITT, D.P., FAULDS, D., 1999. Quinupristin/dalfopristin: a review of its use in the management of serious gram-positive infections. *Drugs: ADIS DRUG EVALUATION*. 58(6), 1061–1097. DOI: 10.2165/00003495-199958060-00008. ISSN 0012-6667.
- 76) M MACHADO, A., MIGUEL, M.G., VILAS-BOAS, M., FIGUEIREDO, A.C., 2020. Honey Volatiles as a Fingerprint for Botanical Origin-A Review on their Occurrence on Monofloral Honeys. *Molecules*. 2020(25(2)). DOI: 10.3390/molecules25020374. ISSN ISSN 1420-3049.
- 77) MARTINELLO, M. et al., 2017. Spring mortality in honey bees in northeastern Italy: detection of pesticides and viruses in dead honey bees and other matrices. *Journal of Apicultural Research*. 56(3), 239-254. DOI: 10.1080/00218839.2017.1304878. ISSN 218839.
- 78) MARTINS, S.I.F.S., JONGEN, W.M.F., VAN BOEKEL, M.A.J.S., 2000. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology*. 11(9-10), 364-373. DOI: 10.1016/S0924-2244(01)00022-X. ISSN 0924-2244.

- 79) MATTILA, H.R., HARRIS, J.L., OTIS, G.W., 2001. Timing of production of winter bees in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Insectes Sociaux: International Journal for the Study of Social Arthropods*. 88-93. DOI: 10.1007/PL00001764. ISSN 0020-1812.
- 80) MCMENAMIN, A.J., FLENNIKEN, M.L., 2018. Recently identified bee viruses and their impact on bee pollinators. *Current Opinion in Insect Science*. 26, 120-129. DOI: 10.1016/j.cois.2018.02.009. ISSN 2214-5745.
- 81) MEERAUS, W.H., PETERSEN, I., GILBERT, R., 2015. Association between Antibiotic Prescribing in Pregnancy and Cerebral Palsy or Epilepsy in Children Born at Term: A Cohort Study Using The Health Improvement Network. *PLOS ONE*. 10(3). DOI: 10.1371/journal.pone.0122034. ISSN 1932-6203.
- 82) MOHAMMED, M.E.A., 2022. Factors Affecting the Physicochemical Properties and Chemical Composition of Bee's Honey. *Food Reviews International*. 2022(38:6), 1330-1341. DOI: 10.1080/87559129.2020.1810701. ISSN 1525-6103.
- 83) MORRISONOVÁ, A., 2014. *Homegrown honey bees*. North Adams: Storey books Publishing. ISBN 978-16-034-2994-8.
- 84) MORRISONOVÁ, A., 2014. *Včelaření krok za krokem*. Praha: Euromedia Group, k.s. - Knižní klub. ISBN 978-80-242-4215-6.
- 85) Multivariate Correlation between Color and Mineral Composition of Honeys and by Their Botanical Origin, 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(7), 2574–2580. DOI: 10.1021/jf048207p.
- 86) MURRAY, D., ARONSTEIN, K.A., 2006. Oxytetracycline-resistance in the honey bee pathogen *Paenibacillus* larvae is encoded on novel plasmid pMA67. *Journal of Apicultural Research*. 45(4), 207-214. DOI: 10.1080/00218839.2006.11101349. ISSN 0021-8839.
- 87) NANETTI, A., BORTOLOTTI, L., CILIA, G., 2021. Pathogens Spillover from Honey Bees to Other Arthropod. *Pathogens*. 10(8), 1044. DOI: 10.3390/pathogens10081044. ISSN 2076-0817.
- 88) NEDIC, N., ZLATANOVIĆ, I., GOJAK, M., RUDONJA, N., 2020. Study of vacuum and freeze drying of bee honey. *Thermal science*. 24((00), 194-194. DOI: 10.2298/TSCI200317194N. ISSN 0354-9836.
- 89) NOWAK, A., SZCZUKA, D., GÓRCZYŃSKA, A., MOTYL, I., KRĘGIEL, D., 2021. Characterization of *Apis mellifera* Gastrointestinal Microbiota and Lactic

- Acid Bacteria for Honeybee Protection-A Review. *Cells*. 10(3). DOI: 10.3390/cells10030701. ISSN 2073-4409.
- 90) NOZAL, M.J. et al., 2005. The Use of Carbohydrate Profiles and Chemometrics in the Characterization of Natural Honeys of Identical Geographical Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(8), 3095–3100. DOI: 10.1021/jf0489724. ISSN 1520-5118.
- 91) O'NEAL, S.T., ANDERSON, T.D., WU-SMART, J.Y., 2018. Interactions between pesticides and pathogen susceptibility in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*. 26(2), 57-62. DOI: 10.1016/j.cois.2018.01.006. ISSN 2214-5745.
- 92) OSÉS, S.M., CANTERO, L., PUERTAS, G., FERNÁNDEZ-MUIÑO, M.Á., SANCHO, M.T., 2022. Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities of ling-heather honey powder obtained by different methods with several carriers. *LWT*. 159(1), 113-235. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113235. ISSN 0023-6438.
- 93) ØSTERGAARD, J., 2018. UV imaging in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 147(5), 140-148. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.07.055. ISSN 2230-7885.
- 94) OSTERMAN, J. et al., 2021. Global trends in the number and diversity of managed pollinator species. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 322(107653), 1-13. DOI: 10.1016/j.agee.2021.107653. ISSN 0167-8809.
- 95) POHORECKA, K., SKUBIDA, P., MISZCZAK, A., 2012. Residues of Neonicotinoid Insecticides in Bee Collected Plant Materials from Oilseed Rape Crops and their Effect on Bee Colonies. *Journal of Apicultural Science*. 56(2), 115-135. DOI: 10.2478/v10289-012-0029-3. ISSN 1643-4439.
- 96) PONTOH, J., LOW, N.H., 2002. Purification and characterization of β -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32(6), 679-690. DOI: 10.1016/S0965-1748(01)00147-3. ISSN 0965-1748.
- 97) POPEK, S., 2002. A procedure to identify a honey type. *Food Chemistry*. 79(3), 401-406. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00391-6. ISSN 0308-8146.
- 98) POTTS, S.G. et al., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*. 25(6), 345-353. DOI: 10.1016/j.tree.2010.01.007. ISSN 1872-8383.

- 99) POTTS, S.G., IMPERATRIZ FONSECA, V., AIZEN, M.A., NGO, H.T., BIESMEIJER, J.C., 2016. *The Assessment Report of the Intergovernmental Science-policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on Pollinators, Pollination and Food Production*. Intergovernmental SciencePolicy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. ISBN 978-92-807-3568-0.
- 100) PRODOLLIET, J., HISCHENHUBER, C., 1998. Food authentication by carbohydrate chromatography. *Z Lebensm Unters Forsch* (207), 1-12. DOI: 10.1007/s002170050286. ISSN 1438-2377.
- 101) PRZYBYLEK, I., KARPINSKI, T.M., 2019. Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules*. 24(11), 2047. DOI: 10.3390/molecules24112047. ISSN 1420-3049.
- 102) PŘIDAL, A., 2003. *Včelí produkty*. V Brně : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 8071577170.
- 103) PŘIDAL, A., 2013. Vlastnosti medu a jeho zkoušení na jakost a pravost: Hospodářská zvířata. *Veterinářství*. ISSN 0506-8231.
- 104) RANNEH, Y. et al., 2021. Honey and its nutritional and anti-inflammatory value. *BMC Complementary Medicine and Therapies* [online]. 14.1.2021, 21(30 (2021) [cit. 2023-2-24]. DOI: 10.1186/s12906-020-03170-5. ISSN 26627671.
- 105) RANSOME, H.M., 2004. *The Sacred Bee in Ancient Times and Folklore (Dover Books on Anthropology and Folklore)*. Mineola: Dover Publications. ISBN 9780486434940.
- 106) RAO, P.V., KRISHNAN, K.T., SALLEH, N., GAN, S.H., 2016. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 26(5), 657-664. DOI: 10.1016/j.bjp.2016.01.012. ISSN 0102-695X.
- 107) RAUCH, S., ASHIRALIEVA, A., HEDTKE, K., GENERSCH, E., 2009. Negative Correlation between Individual-Insect-Level Virulence and Colony-Level Virulence of *Paenibacillus larvae*, the Etiological Agent of American Foulbrood of Honeybees. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(10), 3344 - 3347. DOI: 10.1128/AEM.02839-08. ISSN 0099-2240.
- 108) RAYMANN, K., SHAFFER, Z., MORAN, N.A., 2017. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *Plos Biology*. 15(3). DOI: 10.1371/journal.pbio.2001861. ISSN 1544-9173.

- 109)** REMNANT, E.J. et al., 2017. A Diverse Range of Novel RNA Viruses in Geographically Distinct Honey Bee Populations. *Journal of Virology*. 91(16). DOI: 10.1128/JVI.00158-17. ISSN 1098-5514.
- 110)** SAMARGHANDIAN, S., FARKHONDEH, T., SAMINI, F., 2017. Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research. *Pharmacognosy Research* (9), 121-127. DOI: 10.4103/0974-8490.204647. ISSN 0976-4836.
- 111)** SFORCIN, J.M., BANKOVA, V., 2011. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. *Journal of Ethnopharmacology*. 133(2), 253-260. DOI: 10.1016/j.jep.2010.10.032. ISSN 0378-8741.
- 112)** SCHEPARTZ, A.I., SUBERS, M.H., 1964. The glucose oxidase of honey I. Purification and some general properties of the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Specialized Section on Enzymological Subjects*. 85(2), 228-237. DOI: 10.1016/0926-6569(64)90243-3. ISSN 0926-6569.
- 113)** SCHNITZLER, P. et al., 2010. Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. *Psychotherapy research*. 24(S1), S20-S28. DOI: 10.1002/ptr.2868. ISSN 1050-3307.
- 114)** SINGH, I., SINGH, S., 2018. Honey moisture reduction and its quality. *Journal of Food Science and Technology*. 55(10), 3861–3871. DOI: 10.1007/s13197-018-3341-5. ISSN 0022-1155.
- 115)** SLÁDEK, K., ČERMÁK, K., 2016. *Ekologie chovu včel*. ISBN 978-80-7465-215-8.
- 116)** SNOWDON, J.A., CLIVER, D.O., 1996. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*. 31(1-3), 1-26. DOI: 10.1016/0168-1605(96)00970-1. ISSN 0168-1605.
- 117)** STOKLASA, J., 1975. *Včelí produkty ve výživě, lékařství, farmacii a kosmetice*. Praha: SZN-Státní zemědělské nakladatelství.
- 118)** Studies on Bee Venom and Its Medical Uses, 2012. *International Journal of Advancements in Research and Technology*. Cairo, Egypt: Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ain Shams University, (1), 69-83. ISSN 2278-7763.
- 119)** SUAREZ, R.K., LIGHTON, J.R., JOOS, B., ROBERTS, S.P., HARRISON, J.F., 1996. Energy metabolism, enzymatic flux capacities, and metabolic flux rates in flying honeybees. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America*). 93(22), 12616-12620. DOI: 10.1073/pnas.93.22.12616. ISSN 0027-8424.
- 120)** SUBRAMANIAN, R., UMESH HEBBAR, H., RASTOGI, N.K., 2007. Processing of Honey: A Review. *International Journal of Food Properties*. 10(1), 127-143. DOI: 10.1080/10942910600981708. ISSN 1094-2912.
- 121)** SULAIMAN, N.H.I., SARBON, N.M., 2022. Physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties of selected Malaysian honey as treated at different temperature: A comparative study. *Journal of Apicultural Research*. 61(4), 567-575. DOI: 10.1080/00218839.2020.1846295. ISSN 0021-8839.
- 122)** ŠEFČÍK, J., 2014. *Začínáme včelařit*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-4857-3.
- 123)** TARR, H.L.A., 1937. STUDIES ON AMERICAN FOUL BROOD OF BEES: THE RELATIVE PATHOGENICITY OF VEGETATIVE CELLS AND ENDOSPORES OF BACILLUS LARVAE FOR THE BROOD OF THE BEE. *Annals of Applied Biology*. 24(2), 377-384. DOI: 1744-7348.1937.tb05040.x. ISSN 0003-4746.
- 124)** TITĚRA, D., 2006. *Včelí produkty mýtů zbavené*. Nakladatelství Brázda. ISBN 80-209-0347-X.
- 125)** TITĚRA, D., 2009. *Mor včelího plodu*. Dol: Výzkumný ústav včelařství v Dole. ISBN 978-80-87196-02-1.
- 126)** TITĚRA, D., 2017. *Včelí produkty mýtů zbavené*. 3. Brázda. ISBN 80-209-0347-X.
- 127)** TOPOLSKA, G. et al., 2010. Winter colony losses in Poland. *Journal of Apicultural Research*. 49(1), 126-128. DOI: 10.3896/IBRA.1.49.1.27. ISSN 0021-8839.
- 128)** TSOURKAS, P.K., 2020. *Paenibacillus larvae* bacteriophages: obscure past, promising future. *Microbial genomics*. 6(2), 1-10. DOI: 10.1099/mgen.0.000329. ISSN 20575858.
- 129)** VARGAS -VALERO, A. et al., 2020. Residuos de plaguicidas en miel y cera de colonias de abejas de La Comarca Lagunera: Pesticides residues in honey and wax from bee colonies in La Comarca Lagunera. *Abanico Veterinario*. Colonia El Pedregal, Tepic, Nayarit, Mexiko, 11(11). DOI: 10.21929. ISSN 2448-6132.

- 130)** WAGH, V.D., 2013. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*. 2013(308249), 11. DOI: 10.1155/2013/308249. ISSN 2633-4682.
- 131)** WAHEED, M. et al., 2019. Honey and cancer: A mechanistic review. *Clinical nutrition*. 38(6). DOI: 10.1016/j.clnu.2018.12.019. ISSN 2499-2503.
- 132)** WEISS, K., 2001. *The Little Book of bees*. 1. New York: Copernicus New York. ISBN 978-0-387-95252-9.
- 133)** WHITE JR., J.W., SUBERS, M.H., 1964. Studies on Honey Inhibine. 3. Effect of Heat. *Journal of Apicultural Research*. 3(1), 45-50. DOI: 10.1080/00218839.1964.11100082. ISSN 218839.
- 134)** WIEGAND, I., HILPERT, K., HANCOCK, R.E.W., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 3, 163-175. DOI: 10.1038/nprot.2007.521. ISSN 1754-2189.
- 135)** WILCZYŃSKA, A., 2014. Effect of filtration on colour, antioxidant activity and total phenolics of honey. *LWT - Food Science and Technology*. 57(2), 764-774. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.01.034. ISSN 0023-6438.
- 136)** YAÑEZ, O. et al., 2020. Bee Viruses: Routes of Infection in Hymenoptera. *Frontiers in Microbiology*. 11(943), 1-22. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00943. ISSN 1664-302X.
- 137)** YANG, B., PENG, G., LI, T., KADOWAK, T., 2012. Molecular and phylogenetic characterization of honey bee viruses, Nosema microsporidia, protozoan parasites, and parasitic mites in China. *Ecology and Evolution*. 3(2), 298-311. DOI: 10.1002/ece3.464. ISSN 2045-7758.
- 138)** YILMAZ, A.C., AYGİN, D., 2020. HONEY DRESSING IN WOUND TREATMENT: A SYSTEMATIC REVIEW. *Complementary Therapies in Medicine*. 51(1), 102388. DOI: 10.1016/j.ctim.2020.102388. ISSN 0965-2299.
- 139)** YUE, D., NORDHOFF, M., WIELER, L.H., GENERSCH, E., 2008. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*. 10(6), 1612-1620. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01579.x. ISSN 1462-2920.
- 140)** YUE, L. et al., 2008. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. *Veterinary*

Microbiology. 132(3-4), 414-420. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.05.009. ISSN 0378-1135.

- 141)** ZABAIYOU, N. et al., 2017. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids*. 207(2), 214-222. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2017.04.005. ISSN 0009-3084.
- 142)** ZAINOLM, M.I., YUSOFF, K.M., YUSOFF, M.Y.M., 2013. *Antibacterial activity of selected Malaysian honey.: BMC Complementary and Alternative Medicine 13* [online]. 10.6.2013 [cit. 2022-4-18]. DOI: 10.1186/1472-6882-13-129.
- 143)** ZAPPALÀ, M., FALLICO, B., ARENA, E., VERZERA, A., 2005. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food Control*. 16(3), 273-277. DOI: 10.1016/j.foodcont.2004.03.006. ISSN 0956-7135.

10. Seznam obrázků

Obrázek 1: Včela medonosná (zdroj : vcela.wbs.cz).....	12
Obrázek 2: Květový pyl (zdroj: www.foxhoundbeecompany.com).....	15
Obrázek 3: Nektar u rostliny druhu kamélie (zdroj:www.wikipedie.org).....	16
Obrázek 4: Propolis v úlu (zdroj: Abalg).....	17
Obrázek 5: Vytvářející se larvy obklopené mateří kašičkou (zdroj: Waugsberg).....	18
Obrázek 6: Včela čerpající vodu, kterou po sléze dopraví do úlu (zdroj : Shutterstock).....	19
Obrázek 7: Plod ve včelstvech napaden morem je standartně mezerovitý (zdroj : Karel Veselý).....	21
Obrázek 8: Víčka buněk s uhynulými larvami	21
Obrázek 9: Spora <i>Paenibacillus larvae</i> (zdroj: Antonín Přidal).....	22
Obrázek 10: Květový a medovicový med (zdroj : vcelky.cz)	27
Obrázek 11: Ruční medomet (zdroj: jahan.cz)	28
Obrázek 12: Pastovaný med (zdroj: medczech.cz).....	31
Obrázek 13: Doplnění media do eppendorf zkumavek se vzorkem medu (zdroj : vlastní foto).....	42
Obrázek 14: Rozplňování media do mikrotitrační destičky (zdroj: Vlastní foto)	44
Obrázek 15: Plotny pro testování MBC (zdroj: Vlastní foto).....	45
Obrázek 16: Plotny po kultivaci 48h při 37°C (zdroj: vlastní).....	45
Obrázek 17 : Výsledky hodnot MIC a MBC u nativních vzorků medu bez tepelného ohřevu (zdroj: vlastní).....	46
Obrázek 18: Výsledky hodnot MIC a MBC u nativních vzorků medu bez tepelného ohřevu (zdroj: vlastní).....	47
Obrázek 19 : Výsledky hodnot MIC a MBC u nativních vzorků medu zahřáté na 50 °C (zdroj: vlastní).....	48
Obrázek 20 : Výsledky hodnot MIC a MBC u nativních vzorků medu zahřáté na 70 °C (zdroj: vlastní).....	49
Obrázek 21: Výsledky hodnot MIC a MBC u nativních vzorků medu zahřáté v mikrovlnné troubě (zdroj: vlastní)	50
Obrázek 22 : Průměrné hodnoty MIC a MBC u všech vzorků medu (zdroj: vlastní)	51

11. Seznam zkratek

ATB - antibiotika

ERIC – Enterobacterial Repetitive Integrance Consensus

MBC – minimální baktericidní koncentrace

MH - Mueller-Hinton Broth

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MVP – mor včelího plodu

MYGP – Muller - Hinton broth, Yeast extract, Potassium phosphate, Glucose and Pyruvate

PCR – polymerázová řetězcová reakce