

# **Rychlé metody stanovení antimikrobiálních účinků rostlinných extraktů**

Bc. Martina Bednaříková

---

Diplomová práce  
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

**Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně**

**Fakulta technologická**

**Ústav analýzy a chemie potravin**

**akademický rok: 2012/2013**

## **ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**

**(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)**

**Jméno a příjmení: Bc. Martina Bednaříková**  
**Osobní číslo: T11574**  
**Studijní program: N2901 Chemie a technologie potravin**  
**Studijní obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**  
**Forma studia: kombinovaná**

**Téma práce: Rychlé metody stanovení antimikrobiálních účinků rostlinných extraktů**

**Zásady pro vypracování:**

### **I. Teoretická část**

- 1. Charakteristika rostlinných extraktů - rozdělení, příprava, použití atd.**
- 2. Antimikrobiální účinky rostlinných extraktů**
- 3. Metody stanovení antimikrobiálních účinků**

### **II. Praktická část**

- 1. Vyzkoušet různé metody rychlého stanovení antimikrobiálních účinků rostlinných extraktů**
- 2. Optimalizovat a stanovit nejvhodnější metodu pro alkoholové rostlinné extrakty**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. VAN VUUREN, S. F. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 2008, roč. 119, č. 3, s. 462–472. ISSN 03788741. DOI: 10.1016/j.jep.2008.05.038. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874108003012>
2. URBÁŠKOVÁ, P. Rezistence bakterií k antibiotikům: Vybrané metody. 1.vyd. Praha: Trios, 1998, 120 s. ISBN 80-238-3106-2
3. DAVIDSON, P., SOFOS, J. N., BRANEN, A. L. Antimicrobials in food. 3rd ed. Boca Raton: Taylor, 2005, 706 p. Food Science and Technology, 145. ISBN 978-082-4740-375
4. COWAN, M. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews, October 1999, vol. 12, n. 4, s. 564 – 582. ISSN: 0893-8512

Vedoucí diplomové práce:

**Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**11. února 2013**

Termín odevzdání diplomové práce:

**17. května 2013**

Ve Zlíně dne 11. února 2013

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



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: BEDNAŘÍKOVÁ MARTINA

Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 10.05.2013

Martina Bednaříková

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.



(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce je zaměřena na testování různých metod rychlého stanovení antimikrobiálních účinků rostlinných extraktů a jejich vzájemného srovnání z hlediska efektivity a pracnosti. Jedná se o agarovou difuzní metodu, diskovou difuzní metodu a spektrofotometrické měření optické hustoty. Pro tyto účely byly využity metanolové extrakty z jedlých květů a netradičních druhů ovoce. Účinky těchto extraktů byly sledovány na vybrané grampozitivní a gramnegativní bakterie. Z výsledků je patrné, že pro rychlé stanovení antimikrobiálních účinků rostlinných extraktů je nejvhodnější disková difuzní metoda, dobré výsledky s možností získání rozšířených informací poskytuje metoda měření optické hustoty. Z důvodu spolehlivosti není vhodná agarová difuzní metoda.

Klíčová slova: rostlinný extrakt, antimikrobiální účinnost, difuzní metoda, optická hustota

## **ABSTRACT**

This thesis is focused on testing different methods for rapid determination of antimicrobial effects of plant extracts and their mutual comparison of effectiveness and labour intensity. It includes the agar diffusion test, a disk diffusion method and spectrophotometric measurement of optical density. For this purpose, methanol extracts of edible flowers and unconventional fruits were used. The effects of those extracts were monitored for selected Gram-positive and Gram-negative bacteria. The results show that the disk diffusion method is best for rapid determination of antimicrobial effects of plant extracts. Good results with possible extended information are obtained from measurement of optical density. The agar diffusion test is not suitable due to its reliability.

Keywords: plant extract, antimicrobial effectiveness, diffusion method, optical density

Ráda bych poděkovala vedoucí této diplomové práce Mgr. Magdě Doležalové, PhD. za odborné vedení, rady a čas, který mi věnovala při realizaci této práce.

Dále bych chtěla poděkovat pracovnícům laboratoří Ústavu technologie a mikrobiologie potravin FT UTB za ochotu a pomoc při vykonání praktické části diplomové práce.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 NETRADIČNÍ SUROVINY V GASTRONOMII</b> .....	<b>12</b>
1.1 JEDLÉ KVĚTY .....	12
1.2 NETRADIČNÍ OVOCE .....	14
<b>2 PŘÍRODNÍ LÁTKY</b> .....	<b>16</b>
2.1 METODY VHODNÉ K SEPARACI PŘÍRODNÍCH LÁTEK.....	16
2.1.1 Extrakce.....	16
2.1.2 Destilace .....	19
2.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINNOST.....	20
2.2.1 Vliv rostlinných extraktů na lidský organizmus .....	21
2.2.2 Mechanismus účinků antimikrobiálních látek na mikroorganismy.....	23
2.3 VYBRANÉ SKUPINY PŘÍRODNÍCH LÁTEK S ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITOU.....	24
2.3.1 Alkaloidy .....	24
2.3.2 Flavonoidy.....	25
2.3.3 Chinony .....	25
2.3.4 Glykosidy .....	25
2.3.5 Terpeny a terpenoidy.....	25
2.3.6 Fenoly.....	26
2.3.7 Třísloviny (Taniny) .....	26
<b>3 METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI BAKTERIÍ VŮČI ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTCE</b> .....	<b>28</b>
3.1 KVALITATIVNÍ METODY .....	28
3.1.1 Difuzní disková metoda .....	28
3.1.2 Agarová difuzní metoda .....	29
3.1.3 Bioautografická metoda .....	29
3.2 KVANTITATIVNÍ METODY .....	30
3.2.1 Agarová diluční metoda .....	30
3.2.2 Bujónová diluční metoda .....	30
3.2.3 E-test (epsilonometr test) .....	31
3.2.4 Spektrofotometrické měření optické hustoty .....	32
3.2.5 Průtoková cytometrie (flow cytometry) .....	32
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>33</b>
<b>4 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>34</b>
<b>5 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>35</b>
5.1 POMŮCKY A NÁSTROJE.....	35
5.2 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	35
5.2.1 Příprava MHA .....	35
5.2.2 Příprava MPB.....	36
5.2.3 Příprava fyziologického roztoku .....	36
5.3 MATERIÁL.....	36
5.3.1 Příprava extraktů .....	38



5.4	TESTOVANÉ KMENY .....	39
5.4.1	Příprava inokula .....	39
5.5	METODY.....	40
5.5.1	Agarová difuzní metoda.....	40
5.5.2	Disková difuzní metoda .....	40
5.5.3	Spektrofotometrické měření optické hustoty .....	40
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>42</b>
6.1	AGAROVÁ DIFUZNÍ METODA.....	42
6.2	DISKOVÁ DIFUZNÍ METODA .....	43
6.3	SPEKTRFOTOMETRICKÉ MĚŘENÍ OPTICKÉ HUSTOTY .....	45
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>58</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>65</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>67</b>

## ÚVOD

Říše rostlin představuje od pradávna prakticky nevyčerpatelný zdroj nových sloučenin. Z celkově odhadovaného množství cca 500 000 rostlinných druhů, které se na zemi vyskytují, bylo důkladné analýze podrobena jen malé množství z nich. Přesto lidé již v dávné minulosti využívali léčivé účinky rostlin i jejich extraktů, aniž by znali jejich přesné složení. Léčivé rostliny jsou již po staletí využívány pro léčbu nemocí.

Přestože byly účinné látky z rostlin časem nahrazeny dostupnějšími a finančně méně náročnými syntetickými látkami, začíná se opět objevovat zájem spotřebitelů o biologicky aktivní látky v přírodní formě.

Dnešní moderní separační techniky vybízí k získání velkého množství různých druhů extraktů o různých koncentracích účinných látek, jejichž případné pozitivní účinky na lidský organizmus je třeba podrobit důkladné analýze.

S nárůstem civilizačních chorob a s tím spojené přehnané užívání antibiotik, které vede ke vzniku antimikrobiální rezistence, vzrůstá zájem mnoha vědních oborů zejména o přírodní látky s antimikrobiálními a antioxidačními účinky.

Přestože existuje spousta standardních analytických metod vhodných ke zjištění antimikrobiálních účinků (např. difuzní a díluční metody), s technickým vývojem jde ruku v ruce i vývoj analytických metod (např. průtoková cytometrie, bioautografická metoda).

Cílem této práce bylo vytvořit vhodné rostlinné extrakty a zaměřit se na rychlý screening případné antimikrobiální účinnosti rostlinných extraktů a porovnat testované metody (agarová difuzní metoda, disková difuzní metoda a spektrofotometrické měření optické hustoty) z hlediska jejich vhodnosti, účinnosti a dostupnosti, případně optimalizovat metody pro dané podmínky.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 NETRADIČNÍ SUROVINY V GASTRONOMII

## 1.1 Jedlé květy

Jedlé květy se dnes běžně používají při různých kulinárních úpravách, přispívají ke zlepšení estetického vzhledu jídla, ale stále častěji jsou zmiňovány v souvislosti s biologicky aktivními látkami. Možné zdroje jedlých květů zahrnují květenství ovocných stromů, zeleniny, léčivek a okrasných rostlin [1, 2].

Řada látek zjištěných v jedlých květech má ochranné nebo dokonce léčivé účinky a často působí jako prevence různých onemocnění. Zajímavé jsou zejména látky s antioxidačními účinky, jako jsou fenolové látky, karotenoidy a další. Často i malý přídavek vhodných jedlých květů může zlepšit zdravotní kondici uživatele. Jedlé květy obsahují řadu sensoricky výrazných látek zlepšujících trávení [1, 3].

Existuje spousta jedlých květů, které jsou v různých zemích světa používány jako koření či léčivky. Takto jsou např. v USA využívány druhy jako je brutnák (*Borago officinalis*), fialka (*Viola tricolor*) či lichořeřišnice (*Tropaeolum majus*). V Evropě jsou takto využívány např. rostliny jako je proskurník (*Althea officinalis*), sedmikráska (*Bellis perennis*), pampeliška (*Taraxacum officinale*) a mnoho dalších [4].

Ačkoli by se mohlo zdát, že využití květů v gastronomii je trend dnešní doby, existují důkazy, že například v Asii se pro tyto účely používají např. květy denivky (*Hemerocallis*) již několik tisíc let [5]. Ve starověkém Římě se například používaly květy růží (*Rosa* spp.) při vaření různých druhů pyré. Ve středověké Francii se používaly květy měsíčku (*Calendula officinalis*) a šafránu (*Crocus*) pro přípravu různých salátů. Květy šafránu se dodnes používají jako jedlá barviva. Pro přípravu nápojů a salátů se v Evropě používaly pampelišky (*Taraxacum officinale*) [3].

Jedlé květy se většinou jí celé, ale v některých případech jsou konzumovány jen určité části např. okvětní lístky tulipánu (*Tulipa* spp.) chryzantém (*Chrysanthemum*) nebo růží (*Rosa* spp.). Někdy se konzumují pouze poupata např. u sedmikrásek (*Bellis perennis*) nebo u lichořeřišnice (*Tropaeolum majus*), která je používána jako náhražka mnohem dražších kapar [1].

Při konzumaci některých květin je nutné odstranit ty části rostliny, které jsou drsné a mohly by uvíznout v krku, nebo ty části, jež jsou hořké [6].

Stále více vzrůstající nároky konzumentů na vizuální aspekty a estetickou hodnotu jídla vedou k obecnému zesílení snahy využívat jedlé květy v gastronomii. Celé květy se podávají jako

obloha nebo ozdoba nejen teplých pokrmů, ale i ve studené kuchyni. Okvětní lístky se používají jako dekorace na saláty, sladká jídla, ovoce, zmrzlinové poháry či do nápojů. K docílení celkového estetického vzhledu je třeba dbát na odpovídající specifické chutě a vůně podávaného pokrmu a použitých květů [7].

Květiny mohou být usušeny, naloženy do alkoholu či cukru nebo zmrazeny. Metoda sublimačního sušení je ekonomicky a technicky náročná, ale je velmi efektivní, protože je zachován původní vzhled, barva, tvar a lesk květiny. Oblíbené je i mražení květin do kostek ledu, které se přidávají do koktailů [3].

Při obhajování vhodnosti květin pro lidskou stravu je dnes stále více kladen důraz na jejich kvalitu [4]. Na jakost květů pro lidskou výživu jsou vypracována pravidla pro bezpečné využití jedlých květů. Jakost květů sbíraných jako léčivky je dokonce dána normou jakosti ČSN [1, 3]. Nezávadnost jedlých květů z medicínského hlediska je závislá na respektování limitů obsahu toxických látek. Konzumace rostlin, u nichž není dobře známa jejich toxicita pro lidský organizmus, může být nebezpečná. Při konzumaci volně rostoucích rostlin je vždy nutná přesná identifikace. Je třeba mít na zřeteli, že některé složky jedlých květů jsou v malém množství léčivé, ale ve velkém množství mohou být jejich účinky na lidský organizmus zcela opačné. Při konzumaci jedlých květů je kladen důraz na používání rostlin, u nichž je znám jejich původ z důvodu možného negativního ovlivnění hnojivy, herbicidy a různými druhy pesticidů. Mimo toxických efektů jsou možné i různé alergické reakce u lidí citlivých na některou nedefinovanou složku. Časté alergické reakce vyvolávají květy chryzantém (*Chrysanthemum* spp.), které se projevují vyrážkami a ekzémy [8].

Mezi kritéria kvality patří alespoň minimální odolnost vůči nemocem a škůdcům [9].

Dalšími z kritérií kvality jedlých okrasných rostlin jsou odolnost vůči mechanickému poškození a trvanlivost po sklizení. Rostliny jsou ihned po sklizni umístěny do perforovaných plastových sáčků nebo nádob, které by je měly ochránit před mikrobiální kontaminací a vadnutím, přičemž perforace by měla zamezit kondenzaci par na rostlinách. Rostliny jsou skladovány při teplotě 1 - 4 °C po dobu 2 - 14 dní [10].

Z nutričního hlediska můžeme květ rozdělit na tři hlavní složky, které mohou hrát roli v lidské výživě. První z nich je pyl. Ačkoli je ho velmi malé množství a není příliš chuťově výrazný, je bohatým zdrojem bílkovin, aminokyselin a sacharidů, nasycených a nenasycených tuků, karotenoidů, flavonů a dalších [11, 12, 13].

Druhou složkou je nektar, což je většinou nasládlá tekutina obsahující vyváženou směs cukrů (fruktóza, glukóza a sacharóza), aminokyselin (hlavně prolin), bílkovin, anorganických iontů, tuků, organických kyselin, fenolických látek, alkaloidů, terpenoidů atd. [14].

Do třetí skupiny řadíme okvětní lístky a ostatní části květu. Tyto složky by také mohly být důležitým zdrojem výše zmíněných sloučenin a také minerálních látek, antioxidantů a vitamínů, protože např. žluté květy bývají velmi dobrým zdrojem vitamínu A. Je rovněž nutné zmínit alespoň základní smyslové vlastnosti jedlých květů. Chuť může být našimi receptory vnímána odlišně. Nejpříjemněji je vnímána sladká chuť např. růže (*Rosa damascena*) či tulipánu (*Tulipa* spp.) Tato chuť má původ v obsahu sacharózy a její transport do květů a okvětních lístků souvisí se syntézou éterických olejů typických pro jednotlivé druhy rostlin [15].

V průběhu stárnutí květu se obsah sacharózy může zvýšit kvůli zvýšené hydrolýze fruktanů a tato reakce se projevuje změnou osmotického tlaku, což má vizuálně za následek otvírání květů. Tento proces je v rostlině geneticky zakódován [16].

To znamená, že změny v chuti a konzistenci květů záleží na druhu. Některé jedlé květy mohou být velmi jemné, jiné zase ostré, křehké či dokonce hedvábně měkké. Smyslové vlastnosti vnímané našimi smysly (vzhled, tvar, chuť, vůně, velikost a zbarvení) reprezentují nejdůležitější kritéria kvality jedlých květů. Konzumenti většinou preferují žluté a oranžové barvy, méně oblíbené jsou pak modré a kombinace jiných barev [17].



Obr. 1. Jedlé květy [18].

## 1.2 Netradiční ovoce

Pod pojmem netradiční ovoce si lze představit takové druhy ovoce, které nepatří v ČR k běžně používaným standardům. Toto ovoce je zatím využíváno z důvodu nahrazení, rozšíření či doplnění stávajícího sortimentu na našem trhu. Od 60. let 20. století dochází

k neustálému úbytku starých krajových odrůd a méně známých ovocných dřevin. Tuto situaci si uvědomuje řada odborníků a snaží se aktivně iniciovat záchranu a obnovu soliterně stojících i alejových stromů. Netradiční druhy se většinou vyznačují skromnými nároky na pěstelské podmínky. Setkáváme se s nimi na extrémních stanovištích, kde mnohdy běžně pěstované ovocné dřeviny neprosívají. Výsadby starých a méně známých ovocných dřevin mohou být vysazovány do prostoru s problematickým zemědělským využitím. Přínosem je časný vstup do plodnosti, ale i každoroční sklizeň ovoce s vysokou biologickou hodnotou. Netradiční ovocné druhy doplňují soubor běžně pěstovaných ovocných druhů v našich klimatických podmínkách. Většinou se tato skupina řadí mezi nenáročné, přesto však hospodářsky významné. Předností je značná přizpůsobivost, ale u většiny z nich i vysoká mrazuvzdornost. K nejméně náročným druhům se řadí jeřáb obecný, aronie černá, růže dužnoplodá a rakytník řešetlakový, neboť jejich pěstování je úspěšné i ve vyšších polohách. Pro teplé oblasti je využívána kdouloň obecná, dřín obecný a morušovníky. Slunná poloha pak zase vyhovuje muchovníkům [19].

Stejně tak jako jedlé květy je toto ovoce často využíváno z důvodů nezvyklých tvarů, barev, chutí, pro zlepšení estetického hlediska potraviny, ale v mnoha případech vykazuje toto ovoce i blahodárné účinky na lidský organizmus.



*Obr. 2. Moruše [20].*



## 2 PŘÍRODNÍ LÁTKY

Rostlinná říše již odnepaměti představuje nevyčerpatelný zdroj nových sloučenin. Na zemské kouli je odhadováno asi 400 000 až 500 000 rostlinných druhů, z toho bylo pouze malé procento podrobenu důslednému testování [21].

Přírodní látky jsou sekundární rostlinné metabolity, které se získávají z různých částí rostlin. Mohou být přítomny v celé rostlině, nebo pouze v některé její části. Z nadzemní části rostlin se využívá květ, pupen, list, stonek, lodyha, nať, kůra, dřevo, semeno, plod, oplodí, stopka, výtrusy. Z podzemní části je pak využíván kořen, oddenek, hlíza a cibule. Přírodní látky jsou rostlinami syntetizovány mimo jiné i z důvodu vlastní obrany před napadením mikroorganismy, býložravci či různým hmyzem. Řada z těchto látek dává rostlině charakteristické zbarvení, vůni, chuť, ale i léčivé účinky, které lidé již od pradávna využívají [22, 23, 24].

### 2.1 Metody vhodné k separaci přírodních látek

Přírodní látky se získávají různými způsoby, z nichž nejznámější a nejpoužívanější metodou je destilace s vodní parou, hydrodestilace, nebo extrakce, kdy jsou nejčastěji využívanými činidly voda, etanol, metanol a aceton [25]. Látky, které nelze bez rozkladu destilovat, se nejlépe získávají lisováním. Vylisovaná tekutina však obsahuje také vodu a rozličné jiné látky [26].

#### 2.1.1 Extrakce

Z hlediska fyzikální chemie je proces extrakce vnímán jako přechod složky fázovým rozhraním mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami. Z analytického pohledu jsou jako extrakce vnímány i mnohé další metody, při nichž je převáděna složka směsi fázovým rozhraním z jedné fáze (plynné, kapalné, pevné) do druhé fáze (plynné, kapalné, pevné). V ideálním případě má být extrakční proces kvantitativní a reprezentativní s ohledem na analyzované složky, jednoduchý, rychlý, levný a musí umožňovat automatizaci. Volba extrakční metody pak záleží i na typu matrice, ve které jsou cílové analyty obsaženy [27].

Podle zvolených postupů a podmínek vyluhování získáváme různé výluhy. V zásadě se při vyluhování uplatňují dva mechanismy: difuze a permeace [28, 29].

Obsahové látky z rozrušených buněk přecházejí do vyluhovadla prostým rozpouštěním, které je v principu řízeno mechanismem difuze a probíhá podle koncentračního spádu. Rychlost vyluhování se řídí stejnými principy jako rychlost rozpouštění.

Rozpouštění obsahových látek z neporušených buněk je složitější. Vyluhovadlo musí nejdříve proniknout přes buněčnou membránu do buňky a vzniklý roztok musí naopak přestoupit přes buněčnou membránu z buňky (permeovat) [28, 29].

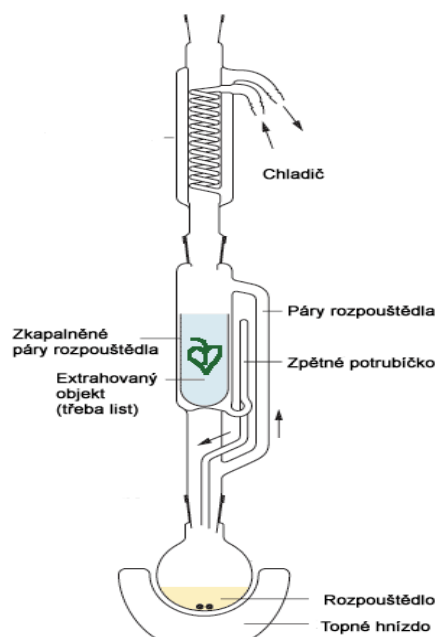
Při vyluhování se do výluhu kromě žádaných obsahových látek dostávají i nežádoucí příměsi (balastní látky). Proto je pro efektivitu extrakce důležitý stupeň rozdrobnění rostliny. Některé části rostlin je nutné před extrakcí odtučnit petroleterem, aby vyluhovadlo mohlo lépe pronikat k účinným látkám. Extrakce může probíhat diskontinuálně, kdy se objem vyluhovadla buď neobměňuje, případně obměňuje po určitých časových intervalech, nebo probíhá kontinuálně, kdy se k materiálu přivádí stále čerstvé vyluhovadlo. Tento postup je nejúčinnější. Důležitý je i hmotnostní poměr mezi rostlinným materiálem a vyluhovadlem. Jako rozpouštědlo slouží nejčastěji voda, etanol, je ale možné použít i stlačený plyn. Výťažnost extrakčního postupu se zvyšuje některými pomocnými látkami, které ovlivní rozpustnost vyluhovaných účinných látek [28, 29].

Trend posledních let ve vývoji extrakčních metod je řízen snahou nahradit zdlouhavé postupy s velkou spotřebou rozpouštědel novými instrumentálními technikami. Tyto nové techniky jsou populární pro minimální množství vzorku, jsou méně časově náročné, automatizovatelné a pro možnost on-line zapojení se separačními technikami jsou více žádoucí. Jedná se o mikrovlnou extrakci, mikroextrakci, extrakci pomocí nadkritické tekutiny a extrakci rozpouštědlem za zvýšené teploty a tlaku [30].

### **Perkolace**

Perkolace je účinná metoda, která může být realizována v perkolátoru nebo v Soxhletově extraktoru. V perkolátoru se rostlinný materiál nejprve navlhčí a na několik hodin se zalije vyluhovadlem a vše se za laboratorní teploty maceruje. Po uplynutí stanovené doby se otevře výpustný ventil perkolátoru a výluh se nechá rovnoměrně odkapávat. Současně je kontinuálně přiváděno nové vyluhovadlo [28, 31].

Soxhletův extraktor se používá zejména k dělení organických látek. Je tvořen destilační baňkou, do které se přivádí vyluhovadlo přes patronu s extrahovanou látkou. Po zahřátí stoupají páry vyluhovadla boční trubicí do chladiče, kde kondenzují a stékají na extrahovanou látku v extraktoru. Hladina kapaliny v extraktoru stoupá do úrovně přepadové trubice, kdy extrakt přeteče na principu spojených nádob zpět do baňky a celý děj se opakuje třikrát až pětkrát, nebo dokud není dosaženo požadované výtěžnosti [28, 31].



Obr. 3. Soxhletův extraktor [32].

### Macerace

Macerace je metoda, při které se rostlinný materiál přelije potřebným množstvím vyluhovadla tak, aby byl zcela ponořen a ponechá se stanovenou dobu luhovat za občasných míchání. Macerace může být jednostupňová, kdy se objem vyluhovadla nemění, nebo víceúrovňová, při které se vyluhovadlo periodicky obměňuje a získané výluhy se pak spojí [28, 31].

Vyluhování může probíhat při laboratorní teplotě, nebo za zvýšené teploty. Zahřátím se rychlost extrakce sice zvýší, ale může dojít k rozkladu termolabilních látek. Za zvýšené teploty je možné získat vodné nálevy (Infuze), kdy se materiál přelije vroucí vodou a nechá vyluhovat po dobu 45 minut, nebo vznikají odvary (Decocta), kdy se rostlinný materiál nejprve s vyluhovadlem povaří a potom nechá ještě 30 minut vyluhovat za postupného chladnutí [28, 31].

### **Extrakce organickým rozpouštědlem za zvýšené teploty a tlaku (PFE)**

Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem je nová extrakční technika, která probíhá za zvýšené teploty (40 - 200 °C) a tlaku (10 - 15 MPa) během krátkého časového intervalu (5 - 20 min). Ve srovnání s klasickými postupy za nízkých teplot a tlaků nabízí hned několik výhod:

- zvýšená teplota zvyšuje těkavost analyzované látky a usnadňuje její uvolnění;
- zvýšený tlak udržuje činidlo v kapalném stavu nad jeho bodem varu a zlepšuje kontakt rozpouštědla s analytem;
- nepřítomnost světla a kyslíku snižuje možnost degradace a oxidačních procesů.

K extrakci lze použít čistá rozpouštědla i směsi vzájemně mísitelných rozpouštědel [27].

Extrakční proces je natolik ideální, že byla tato metoda Agenturou pro ochranu životního prostředí (EPA-Environmental Protection Agency) zařazena pod protokolem 3545A v únoru 2007 mezi celosvětově uznávané standardizované metody [33].

Mimo klasických extrakčních metod jsou v poslední době stále častěji využívány i potenciálně možné alternativní metody a to zejména z důvodů větší ochrany životního prostředí i z hlediska náročnosti na použité podmínky. Příkladem je enzymová extrakce biologicky aktivních látek z rostlin. Enzymy jsou ideální katalyzátory, které pomáhají při získávání, úpravě nebo syntéze komplexních bioaktivních látek přírodního původu. Extrakce podporovaná enzymy je založena na vlastní schopnosti enzymů katalyzovat reakce s vynikající specifičností, selektivitou a schopností fungovat i za mírných podmínek vodného extraktu. Svojí šetrností vůči přírodě vzbuzuje metoda zájem potravinářského průmyslu a rovněž pomáhá farmaceutickým firmám hledat nové možnosti využití látek jinak těžko přístupných. Enzymy mají schopnost rozkládat nebo narušovat buněčné stěny a membrány, což umožňuje lepší uvolňování a efektivnější extrakci bioaktivních látek. Aplikace enzymu před samotnou extrakcí snižuje množství použitého rozpouštědla a zvyšuje výtěžek extrahovaných látek. Tento způsob umožňuje získat chemicky čisté produkty a probíhá za mírných podmínek (teplota, tlak), které minimalizují konkurenční reakce. Narušením matrice buněčné stěny se do extraktu uvolní i složky jako jsou např. fenolové sloučeniny, čímž dojde k výraznému zlepšení kvality extraktu [34, 35].

#### **2.1.2 Destilace**

Destilace je nejpoužívanější metodou čištění kapalných látek, dělení kapalných směsí o různém bodu varu nebo odstraňování rozpouštědel z méně těkavých látek. Podstatou destilace je

uvedení kapaliny do varu přiváděním tepla a kondenzace vzniklých par v oddělené části přístroje. Tímto způsobem lze oddělit těkavější látku od méně těkavé a zároveň zjistit teplotní rozmezí varu směsi. Při zahřátí dvousložkové směsi na teplotu varu přechází do plynné fáze směs bohatší na těkavější složku [28, 36].

Podle způsobu provedení můžeme destilace rozdělit na několik druhů: prostá, frakční, rektifikace, za sníženého tlaku, azotropní, molekulární, hydrodestilace, mikrodestilace, destilace s vodní parou a mnohé další [28, 36].

### **Destilace s vodní parou**

Destilace s vodní parou je metoda vhodná právě k izolaci látek obsažených v rostlinných materiálech, protože je takto možné destilovat málo těkavé látky, které se s vodou nemísí, nebo jsou v ní nepatrně rozpustné, aniž by bylo nutné je zahřívat na bod varu těkavější složky. Voda je výhodné činidlo, protože s většinou organických látek se nemísí, snižuje podstatným způsobem bod varu směsi, množství vodní páry nutné k předdestilování organické látky je podstatně malé a výtěžky jsou poměrně vysoké. Destilace se provádí za současného prohánění vodní páry destilovanou směsí. Tato pára je vyvíjena v oddělené nádobě a při průchodu rostlinným materiálem s sebou strhává i látky, které se vypařují. Látky rozpustné ve vodě zůstávají ve zbytcích vody v nádobě s rostlinným materiálem. Tato metoda je vhodná např. pro vonné terpenické oleje [28, 36].

### **Hydrodestilace**

Pro destilaci oleje z malých množství rostlinného materiálu je často využívána Clevengerova aparatura, což je skleněná destilační aparatura. Destilační proces probíhá 2-3 hodiny bez ohledu na množství materiálu. Rostlinný materiál se rozmělní a následně vloží do skleněné baňky, kde se zalije destilovanou vodou a přivede k varu. Působením vysoké teploty se oddělí silice, které jsou unášeny vodní parou. Získaný olej se po odseparování vody suší bezvodným síranem sodným [37].

## **2.2 Antimikrobiální účinnost**

Antimikrobiální účinnost rostlinných extraktů je dána jejich chemickým složením, jež specificky ovlivňuje mikroorganismy. Tyto látky způsobují buď ztrátu životaschopnosti, nebo pozastaví růst a rozmnožování mikroorganismů [22, 38]. Možnostmi využití přírodních látek se zabývají vědci na celém světě zejména pro možnost rozsáhlého využití nejen v potravinářském průmyslu, ale i v řadě dalších odvětví jakými jsou kosmetika, farmaceutika

či medicína [39, 40, 41, 42]. Zájem o výzkum přírodních antimikrobiálních látek stoupá zejména proto, že v posledních desetiletích se stala celosvětovým problémem antimikrobiální rezistence [39, 40, 41, 42].

V roce 1928 objevil Alexander Fleming antibiotické působení plísně *Penicillium* na stafylokoky. Účinná látka (penicilin) inhibovala růst grampozitivních bakterií. Další antibiotikum (streptomycin) objevil v roce 1940 Selman A. Waksman ve filtrátu kultury aktinomycet. Streptomycin byl účinný i proti gramnegativním bakteriím. Od té doby bylo izolováno několik tisíc antibiotik produkovaných mikroorganismy. Antibiotika sice umožnila velký vzestup v léčbě infekčních chorob, ale brzy se zjistilo, že nadměrné užívání těchto látek vede ke vzniku rezistence vůči nim. Mezi zavedením antibiotika a popsáním prvních bakterií, které jsou rezistentní k dané látce, existuje poměrně krátký interval. V důsledku masivního používání antibiotik, jsou bakterie schopny přizpůsobit se změněným podmínkám vnějšího prostředí a objevují se nové kmeny s velkým rozsahem rezistence. Proto v popředí boje s rezistentními mikroorganismy stojí výzkum umožňující hledání nových bioaktivních sloučenin s antimikrobiálními účinky. Přírodní látky lze využívat jednak k samostatné léčbě, ale rovněž je možná jejich kombinace spolu s antibiotiky, protože zejména ve veterinární medicíně byl popsán synergický efekt spolupůsobení antibiotik a přírodních antimikrobiálních látek [39, 40, 41, 42].

Požadavky na ideální antimikrobiální látku jsou různorodé, ale látka by měla splňovat především kritérium co nejširšího spektra silných účinků, neměla by mít toxické účinky ani jiné vedlejší účinky, které by například oslabovaly imunitu či užitečnou bakteriální flóru a měla by být hypoalergenní. Další kritéria se týkají cenové dostupnosti a vědeckého prozkoumání produktu [43].

### **2.2.1 Vliv rostlinných extraktů na lidský organizmus**

Rostlinné extrakty se využívají ve velké míře zejména v kosmetickém, potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Extrakty se používají ve formě silic, siličných drog, nebo jednotlivých izolovaných složek silic. Účinky drogy, silice a izolované látky přitom bývají často odlišné. Aromatické látky působí na čichové nebo chuťové receptory člověka a vyvolávají dojem vůně nebo chuti, ale rovněž vyvolávají důležitou biologickou činnost. Tato aktivita působí na různých orgánových úrovních a vyvolává určité účinky podle druhu silice. Tyto účinky mohou být žádoucí, protože mají různé léčebné efekty, ale rovněž mohou působit dráždivě na

pokožku nebo na sliznici, nebo jako alergeny a tyto účinky pak nepovažujeme za žádoucí. V silicích mohou být obsaženy i jedovaté látky [44].

Rostlinné extrakty jsou často používány jako analgetika (zmírňující bolest), anestetika (znectivující), spazmolytika (uvolňují hladké svalstvo), diuretika (působící močopudně), expektancia (podporují sekreci hlenů), stomachika (podporují chuť k jídlu), karminativa (působící proti plynatosti), dezinfekce (ničící mikroorganismy), kdy jsou schopny působit antimikrobiálně, antivirově, antimykoticky [22, 23, 24].

Zejména v posledních letech jsou stále více doceňovány i antioxidační účinky rostlinných extraktů. Jednou ze studií zabývajících se antioxidačními účinky přírodních extraktů je studie testující extrakt z nového koření v řepkovém oleji. Protože oxidační produkty lipidů snižují výživovou i senzoryckou hodnotu jídla, existují snahy zabránit oxidaci lipidů přidávkem přirozených a syntetických antioxidantů. Testovaný extrakt z nového koření byl připraven extrakcí s acetaldehydem při pokojové teplotě po dobu 48 hodin a následně zfiltrován. Výtažky z nového koření byly přidány ke vzorkům oleje. Vzorky byly skladovány v hermeticky uzavřených lahvích v termostatu po dobu 48 hodin při teplotě 40 °C. Během doby uskladnění byla antioxidační aktivita extraktu nového koření vyjádřena jako snížení poměru kyseliny peroxidové a thiobarbiturové v reagujících produktech v porovnání s kontrolním vzorkem během této doby. Složení výtažku nového koření bylo zjištěno plynovou chromatografií v kombinaci s hmotnostní spektrofotometrií, kdy hlavní složku výtažku tvořil eugenol (52,6%). Peroxidové číslo kontrolního vzorku čistého oleje začalo růst po 11 dnech a po 17 dnech přesáhlo hodnotu, která je označována jako konec indukční doby. Peroxidové číslo se u vzorků s přidávkem nového koření zvýšilo později a indukční doba byla ukončena až po 21 dnech. Předpokládá se, že výtažek z nového koření měl inhibiční účinek na produkci peroxidu vodíku v oleji a tím se prodloužila indukční doba testovaného oleje. Antioxidační účinek je spojován s fenolickými směsmi, protože bývají dobrým donorem atomu vodíku a jejich radikály jsou poměrně stabilní. Toto platí i pro eugenol [45].

V době, kdy prudce narůstá výskyt civilizačních chorob, se dostává do popředí hledání nových antibakteriálních a cytotoxických látek. Mezi nově zkoumané látky patří také naftochinony (juglon, plumbagin a lawson). Některé se řadí mezi hlavní obsahové látky hospodářsky zcela nevýznamných rostlin jako je *Dionaea muscipula* Ell. Naftochinony se v přírodě vyskytují u celé řady rostlinných čeledí, zejména u čeledí *Plumbaginaceae*, *Juglandaceae*, *Droseraceae*, *Verbenaceae* a u spousty dalších. V minulosti byly rostlinné drogy s obsahem naftochinonů používány v tradičních medicínách různých národů. V Číně a jiných asijských



zemích byly a stále jsou využívány při léčbě rakoviny, revmatoidní artritidy, bolestivé menstruace a zhmožděnin. Jihoameričtí Indiáni používali a stále používají některé rostliny s obsahem naftochinonů k léčbě kožních forem leishmanióz (parazitické onemocnění způsobené prvokem rodu *Leishmania*), nebo jako antimalarikum (působící proti malárii). V Indii se některých rostlin s obsahem naftochinonů využívá jako prostředku proti pohlavním chorobám. Některé naftochinony byly testovány na akutní toxicitu, přičemž byly popsány některé méně i více závažné nežádoucí účinky jako průjem, kožní vyrážky, leukocytopenie (snížený počet leukocytů v krvi), zvýšení hladiny fosfatázy v krevním séru a hepatotoxicita (chemicky způsobené poškození jater). Některá analoga naftochinonů vystupují jako inhibitory enzymů, jež zřejmě odpovídají za některé typy nádorového bujení. Díky tomu by mohli být potenciálními terapeutickými zdroji při léčbě některých typů nádorů. V některých studiích byl prokázán antimutagenní efekt naftochinonů. Naftochinony byly testovány i na antimikrobiální účinky, přičemž některé práce byly zaměřeny na bakterie dutiny ústní. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u plumbaginu, lawsonu a juglonu, při kombinaci dvou naftochinonů docházelo k synergistickému působení a ještě výraznějšímu antimikrobiálnímu efektu. Tato studie předpokládá dobrý výhled pro využití těchto látek v boji proti ústním infekcím. Mechanismus účinků není ještě zcela objasněn, ale naftochinony pravděpodobně zasahují do řetězce přenosu elektronů na mitochondriálních membránách parazitů a způsobují jeho přerušení, čímž dochází k inhibici růstu parazitů a jejich zániku [46].

### 2.2.2 Mechanismus účinků antimikrobiálních látek na mikroorganismy

Ačkoli jsou látky s antimikrobiální aktivitou po chemické stránce velmi rozmanité, lze je rozdělit do tří základních skupin dle mechanismu jejich působení:

- látky, které poškozují strukturu buňky nebo její funkci;
- látky, které působí na mikrobiální enzymy;
- látky, které reagují s DNA.

Většinu těchto látek však nelze zařadit pouze do jedné z výše uvedených skupin, protože některé sloučeniny přírodního původu mají více mechanismů účinku. Je ale možné stanovit primární účinek, jenž je pro antimikrobiální látku určující [22, 38].

Z výše uvedeného je patrné, že mechanismus účinků přírodních látek na mikroorganismy je složitý proces, který nebyl ještě zcela objasněn. Výzkumy bylo zjištěno, že antimikrobiální aktivita esenciálních olejů souvisí s hydrofilními a lipofilními vlastnostmi daných složek.

Terpeny působí inhibičně na enzymy katalyzující v membráně bakteriální buňky. Carvacrol a thymol způsobují rupturu lipopolysacharidové vrstvy, což má za následek rozrušení vnější membrány. Tea tree olej denaturuje membránové proteiny, což vede k úniku draselných iontů, poruše buněčného dýchání a následně k lýze buňky. Některé složky přírodních látek zase působí na mikroorganismy tak, že blokují fosforylaci adenosin-difosfátu, čímž přerušují primární energetický metabolismus daného mikroorganismu. Některé silice rovněž inhibují syntézu DNA, RNA, proteinů a polysacharidů v buněčné stěně plísní a bakterií. U hub způsobují změny shodné s efektem působení antimykotik [39].

Antimikrobiální účinky přírodních látek souvisí se složením buněčné stěny a cytoplazmatické membrány daného mikroorganismu. Grampozitivní bakterie mají ve své buněčné stěně silnější vrstvu peptidoglykanu protkanou řetězcí kyseliny teichoové. Zatímco buněčná stěna gramnegativních bakterií obsahuje málo peptidoglykanu bez kyseliny teichoové, ale má silnou vrstvu lipoproteinů a lipopolysacharidů, které znesnadňují průnik účinných přírodních látek dovnitř buňky. Gramnegativní mikroorganismy jsou tedy odolnější proti působení rostlinných extraktů [39, 47].

Složení přírodních látek a tím i jejich antimikrobiálních účinků ovlivňuje řada faktorů, jako jsou klimatické a růstové podmínky v lokalitě, odkud byla matečná rostlina získána, použitá část rostliny a její vývojový stav v době sklizně, dále způsob získání extraktu a jeho uchování [39].

## **2.3 Vybrané skupiny přírodních látek s antimikrobiální aktivitou**

### **2.3.1 Alkaloidy**

Alkaloidy jsou heterocyklické dusíkaté sloučeniny vyskytující se v přírodě ve formě solí s organickými kyselinami. Většina alkaloidů je rostlinného původu. V roce 1805 byl z máku setého izolován alkaloid morfin, který je dodnes využíván v lékařství. Mezi alkaloidy známé pro své antimikrobiální účinky řadíme např. chinin a berberin [22, 48].

Alkaloidy jsou lipofilní, ve vodě málo rozpustné, většinou pevné a bezbarvé. Velice často rostlina obsahuje jeden alkaloid jako hlavní a ten je doprovázen řadou vedlejších alkaloidů, většinou strukturně podobných. Rovněž i složení alkaloidů v jednotlivých částech rostliny bývá podobné, ale existují výjimky. Obsah alkaloidů se mění okolními vlivy působícími na rostlinu, kolísá během vegetace a zpravidla se jeho tvorba zastavuje při začátku kvetení [24].

### 2.3.2 Flavonoidy

Flavonoidy se řadí mezi polyfenolické sloučeniny. Mají různou chemickou strukturu. Jsou hojně přítomny v rostlinách, kde se podílí na energetickém metabolismu a fotosyntéze. Nachází se v rostlinných tkáních uvnitř buněk, ale i na povrchu rostlinných orgánů. Objevitelem flavonoidů byl významný maďarský biochemik Albert Szent-Györgyi, který první flavonoidy izoloval v průběhu třicátých let 20. století z citrusových plodů. V dnešní době je známo asi 4000 flavonoidních látek [22, 48, 49].

### 2.3.3 Chinony

Chinony jsou aromatické sloučeniny se dvěma substituovanými karbonylovými skupinami. Způsobují hnědnutí ovoce a zeleniny při jejich zpracování. Byl popsán bakteriostatický účinek antrachinonu na některé bakterie [50].

Chinony jsou nejrozšířenější skupinou přírodních barviv, ale jsou málo vidět. Jsou obsaženy hlavně v kořenech a kůře, výjimku tvoří pestrobarevné zbarvení mnoha druhů hub a také barevné výměšky brouků [24].

### 2.3.4 Glykosidy

Glykosidy se řadí mezi deriváty sacharidů, které vznikají náhradou vodíkového atomu hydroxylové skupiny za cukerný zbytek nebo necukerný zbytek tzv. aglykon, který mohou tvořit steroidy, flavony a podobně. Hojně se vyskytují v rostlinách, ale mohou být rovněž syntetizovány mikroorganismy i živočichy [48].

Některé druhy glykosidů jsou charakteristické pro danou čeleď rostliny, ale častěji je přítomno více typů glykosidů. Pro rostlinu má tvorba glykosidů pravděpodobně detoxikační význam, při němž se lipofilní a toxické látky transformují na sloučeniny ve vodě rozpustné, které pak mohou být v těle rostliny transportovány [24].

### 2.3.5 Terpeny a terpenoidy

Terpeny jsou organické sloučeniny řadící se mezi izoprenoidy. Rozdělují se podle počtu izoprenových jednotek. Jsou součástí rostlinných silic a pryskyřic a jsou dobře rozpustné v tucích. Doposud jsou známy jejich biologické funkce jen u malého množství z nich. Terpeny obsahující kyslík se nazývají terpenoidy. Antimikrobiální mechanismus jejich účinků je založen na porušení membránových struktur mikroorganismů [22].

### 2.3.6 Fenoly

Fenoly jsou organické sloučeniny, které mají hydroxylovou skupinu navázanou na atom uhlíku aromatického kruhu. V přírodě je rozšířeno více než 8000 fenolických látek. Fenoly se často vyskytují ve stěnách rostlinných buněk. Mnoho fenolických látek se uplatňuje při biosyntéze živočišných či rostlinných pigmentů. Fenoly a jejich deriváty dodávají ovoci a zelenině charakteristickou chuť a vůni, jsou příčinou charakteristické květinové vůně. Jsou nedílnou složkou hormonů, antioxidantů a tvoří často součást antimikrobiálních léků. Mezi nejznámější fenolické látky patří kyselina skořicová, kyselina kávová, kyselina salicylová, kyselina gallová a jejich deriváty. Cytotoxické působení fenolických látek souvisí s počtem a umístěním hydroxylových skupin. S rostoucím počtem hydroxylových skupin roste jejich toxicita [22, 49, 51].

### 2.3.7 Třísloviny (Taniny)

Po chemické stránce jsou třísloviny polyfenoly a jsou to látky chemicky nestálé. Mají svraťovou, trpkou či hořkou chuť a jejich společnou vlastností je, že sráží proteiny. S bílkovinami, těžkými kovy a také s alkaloidy reagují za vzniku nerozpustných sloučenin, odtud jejich použití jako antidota při otravách [24].

Třísloviny jsou komplikované směsi složitých sloučenin, avšak jakési základní rozdělení podle jejich chemické struktury existuje:

- hydrolyzovatelné třísloviny;
- nehydrolyzovatelné třísloviny;
- třísloviny neznámé konstituce.

Hydrolyzovatelné taniny se skládají z cukru, na který je navázáno esterifikací několik monomerních skupin kyseliny gallové. Na stupni esterifikace pak závisí, zda jsou esterifikované jen některé skupiny, nebo všechny. Kondenzované taniny jsou polymery flavonových jednotek [24].

Taniny jsou ve výživě zvířat považovány za antinutriční látky, ale v určité koncentraci mohou mít příznivý vliv na zvířata v důsledku antioxidačních a antimikrobiálních účinků. Taniny z různých rostlinných extraktů působí jako prevence proti střevním parazitům, bakteriím, virům a protozoím a jsou často užívány v tradiční medicíně k likvidaci průjemových onemocnění. Někteří odborníci uvádějí omezený výskyt průjmů a sníženou mortalitu hospodářských zvířat při aplikaci taninů z různých rostlinných extraktů. Současně se však sleduje negativní

vliv taninů v důsledku vázání a inhibice endogenních enzymů. Odborníci řeší otázku, zda taniny ovlivňují i aktivitu exogenních enzymů. Touto otázkou se zabývá studie provedená v Lublani, která měla za úkol zhodnotit vliv různých koncentrací taninu na účinnost exogenní fytázy aplikované do krmiv prasat. Zdrojem taninu byly extrakty z kaštanu jedlého. Závěr studie uvádí, že taniny nesnížily vliv fytázy na využití fosforu, avšak pozitivní vliv fytázy na stravitelnost proteinu byl významně snížen. Zůstává však otázkou, zda jiné formy taninů (z jiných zdrojů) mohou mít vliv na další exogenní enzymy [52].

### 3 METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI BAKTERIÍ VŮČI ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTCE

Používané metody spočívají ve zjištění schopnosti růstu bakterií za přítomnosti antibiotika. Antibiotikum se přidá do tekuté nebo tuhé půdy. Výsledky lze hodnotit kvalitativně nebo kvantitativně [53].

Výsledky kvantitativních i kvalitativních metod může ovlivnit řada faktorů jako je např. složení a kvalita živného média, obsah solí a minerálních látek, růstová fáze testovaného kmene, podmínky inkubace atd. [54].

#### 3.1 Kvalitativní metody

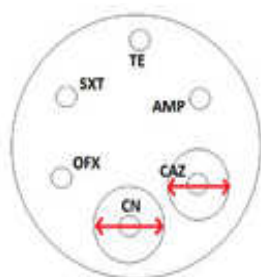
K prokázání účinků antimikrobiálních látek jsou často používány difuzní metody. Tyto metody slouží k semikvantitativnímu stanovení citlivosti bakterií na antimikrobiální látku. Spolehlivost difuzních metod vůči dilučním metodám je uváděna 95 %. Principem těchto metod je difuze antimikrobiální látky ze zdroje do okolí, čímž vzniká klesající koncentrační gradient bránící růstu mikroorganismů do vzdálenosti inhibiční zóny [53]. Výsledky kvalitativních metod ukazují, zdali je antibiotikum účinné, nebo zda je testovaný kmen k ATB rezistentní. Hodnocení probíhá na základě měření velikosti inhibičních zón s následným porovnáním s referenčními hodnotami [55].

##### 3.1.1 Difuzní disková metoda

Tato jednoduchá metoda slouží k orientačnímu stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiální látce. Je založena na difuzi antimikrobiální látky z papírového disku do agarové půdy, kdy je agar naočkován stanovenou koncentrací mikroorganismu. Absorpcí vody z půdy dochází k uvolňování látky, která následně difunduje do média [55].

Během inkubace dochází k růstu bakterií až do inhibiční koncentrace gradientu difuze antimikrobiální látky. Jakmile je jí dosaženo, přestává viditelný růst bakterií a dochází k vytvoření tzv. inhibiční zóny v okolí zdroje antimikrobiální látky. Inhibiční zóny, které vznikají v okolí disku během inkubace bakteriální populace na půdě, jsou obvykle kulatého tvaru a jejich velikost je ovlivněna nejen stupněm citlivosti testovaného kmene, ale i difuzibilitou antimikrobiální látky, pH půdy, její výškou, bobtnavostí a koncentrací agarového gelu, živnými látkami a dalšími substancemi obsaženými v půdě, jakož i velikostí inokula a rychlostí jeho množení [56].

Čím se kmen množí pomaleji, tím je zóna při stejné citlivosti kmene větší. Z výše uvedeného je patrné, že nelze stanovit univerzální hraniční průměry inhibičních zón pro jednotlivá antibiotika [53]. Nelze ani jednoduše vztahovat inhibiční zóny ke stupni citlivosti testovaného kmene. Metoda proto dovoluje v běžných podmínkách pouze kvalitativní hodnocení. U vzniklé inhibiční zóny měříme její průměr [56].



Obr. 4. Měření průměru inhibiční zóny u difuzní diskové metody [57].

Disková difuzní metoda (Kirby-Bauerův test) využívá Mueller - Hintonův agar (MHA), který ve srovnání s jinými půdami neobsahuje inhibitory sulfonamidů. Pro vyšetření gramnegativních bakterií se používá tento agar, pro grampozitivní bakterie se půda obohacuje přidávkou ovčí nebo koňské krve. Suspenze testovaného kmene musí být v takovém množství, aby po nanesení a odstranění přebytku z povrchu rostly kolonie v těsném dotyku. Tomu odpovídá hustota inokula upravená na zákal 0,5 McFarlandovy stupnice (McF) [55].

Touto metodou je možné testovat účinné koncentrace antimikrobiální látky, čehož je možné docílit napuštěním disků látkou o různé koncentraci. Dalším významným faktorem ovlivňujícím výsledky je tedy obsah účinné látky v disku a hustota inokula [58, 59].

### 3.1.2 Agarová difuzní metoda

Princip této metody je podobný jako u diskové difuzní metody. Rozdílná je pouze aplikace antimikrobiální látky, kdy se místo přikládání papírových disků pipetuje antimikrobiální látka přímo do jamek hloubených v agarovém médiu [60].

### 3.1.3 Bioautografická metoda

Existují metody tenkovrstevné chromatografie pro stanovení antimikrobiální účinnosti extraktu. Na jejich detekci se využívá především bioautografie. Extrakt se nanese na silikagel. Deska se ošetří vhodným rozpouštědlem, nechá se zaschnout a přenesení se na Petriho misku. Petriho miska se přelije agarem s jednodenní kulturou indikátorové bakterie a vše se postříká MTT. Metoda je založena na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na fialový formazan. Reakce probíhá pouze na mitochon-



driální membráně živých buněk. Díky silnému detergentu se formazan rozpustí, čímž dojde k zabarvení o různé intenzitě. Čím tmavší barva je, tím více je i živých buněk. Mrtvé buňky zůstávají bezbarvé, což se projeví ve formě inhibiční zóny [61].

### 3.2 Kvantitativní metody

Mezi kvantitativní metody stanovení citlivosti řadíme agarové a bujónové diluční metody. Těmito metodami lze stanovit účinné množství antimikrobiálních látek inhibujících mikroorganismus tzv. minimální inhibiční koncentraci. Výsledek kvantitativních testů se vyjadřuje jako MIC (minimální inhibiční koncentrace), což je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky schopná inhibovat růst testovaného mikroorganismu, nebo jako MBC (minimální baktericidní koncentrace), což je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky schopná usmrtit daný mikroorganismus [54].

#### 3.2.1 Agarová diluční metoda

V agarovém médiu obsahujícím zvolené koncentrace antimikrobiální látky se zjišťuje MIC. Běžně se připravuje asi 15 koncentrací jednoho antibiotika, které jsou řaděné dvojnásobně geometrickou řadou. Na povrch agarových médií je nanášeno standardní inokulum vyšetřovaných bakterií, přičemž na jedné plotně je možné testovat až 20 kmenů. Po inkubaci se hledá nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která inhibuje růst vyšetřovaného kmene. Tato metoda je vysoce standardizovanou referenční metodou, která je často využívána k hodnocení ostatních metod. Pro svoji spolehlivost je často využívána k hodnocení nových antimikrobiálních látek. Metoda je však ekonomicky náročná a pracná [53].

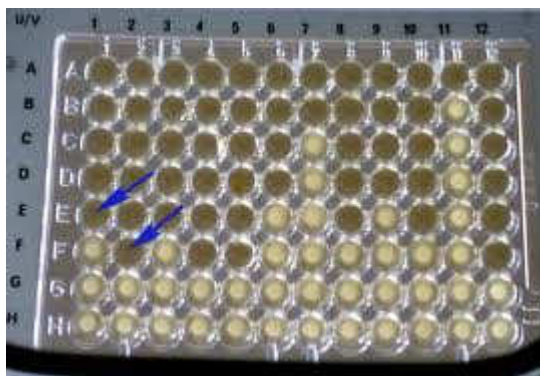
#### 3.2.2 Bujónová diluční metoda

Tato metoda se nejčastěji provádí v MHB (Mueller - Hintonův bujón) s upravenou koncentrací hořčíku a vápníku. Bujónová diluční metoda zahrnuje dva způsoby provedení: diluční makrometoda a diluční mikrometoda.

Diluční makrometoda se též nazývá zkumavková metoda. Do 13 zkumavek s kultivačním médiem se přidává sestupné množství antimikrobiální látky a poté se zaočkuje inokulem testovaného kmene o hustotě 0,5 stupňů McFarlanda. Pro kontrolu kvality růstu se připraví i zkumavka obsahující pouze inokulum. Po příslušné době inkubace se odečte MIC a porovná s kontrolním vzorkem. Jedná se opět o vysoce standardizovanou metodu, jejíž použití je vhodné zejména pro testování citlivosti antibiotika k jednomu druhu mikroorganismu [53].

Diluční mikrometoda se provádí v mikrotitračních destičkách. Do každé destičky lze aplikovat 12 druhů antibiotik po 8 koncentracích. Do destičky se aplikuje v bujónu naředěná antimikrobiální látka, která je opět ředěná geometrickou řadou. Standardně se používá MHB. Inokulum se připraví na hodnotu zákalu 1,5 - 3 stupně McFarlanda. Růst bakterií se projeví zákalem nebo vznikem sedimentu. Po inkubaci se destička položí na tmavou podložku a růst v jamkách s antibiotikem se porovnává s kontrolní jamkou bez antibiotika. MIC je nejnižší koncentrace antibiotika, která zamezí růstu mikroorganismu, proto v jamce již nevznikne zákal ani sediment. Diluční mikrometoda je časově i finančně nenáročná, ale obtížněji se rozeznává vznik zákalu či sedimentu [53].

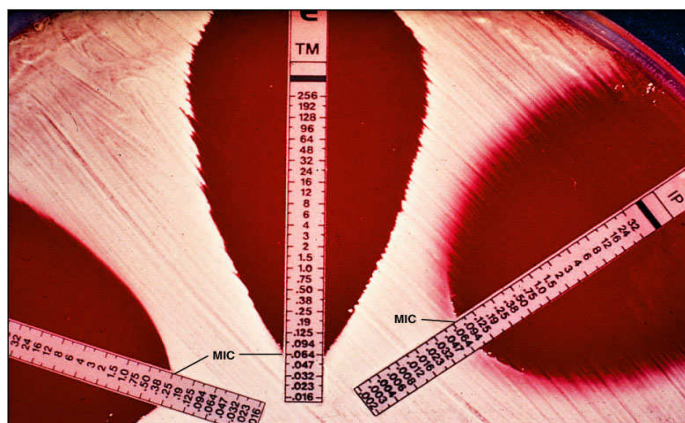
Použití difuzní i diluční metody komplikují v případě rostlinných silic některé jejich vlastnosti, zejména pak jejich nedostatečná rozpustnost ve vodě a těkavost. Tyto metody byly vyvinuty pro vodorozpustné látky, proto musí být jejich použití různě modifikováno. Do živných půd lze přidávat různá rozpouštědla, která sice vyřeší problém rozpustnosti, ale současně mohou nepříznivě ovlivnit růstové vlastnosti použitých mikroorganismů [39, 62].



Obr. 5. Titrační mikrodestička [63].

### 3.2.3 E-test (epsilonometr test)

Tato metoda kombinuje principy diskové difuzní metody a diluční metody. E-test je inertní plastický proužek, který na své jedné straně obsahuje exponenciální gradient koncentrací antimikrobiální látky v tuhém stavu. Na druhé straně je vyznačen kód antibiotika a stupnice, která obvykle odpovídá 15 ředění dvojnásobně geometrickou řadou. Stupnice slouží k odečítání MIC. Na povrch agarů naočkovaných inokulem se přiloží E-test stranou s antimikrobiální látkou. Po inkubaci se kolem proužku objeví elipsa inhibovaného růstu. MIC se odečítá v místě, kde elipsa protíná okraj proužku. Metoda je nákladná pro pořizovací cenu E-testu [53].



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Obr. 6. E-test [64].

### 3.2.4 Spektrofotometrické měření optické hustoty

Další možnosti měření antimikrobiální aktivity rostlinných extraktů skýtá spektrofotometrická metoda. Inokulum se zaočkuje do sady zkumavek obsahující médium s danou koncentrací testovaných látek. Z těchto zkumavek jsou následně naplněny sterilní mikrodestičky (96 jamek), ve kterých probíhá jak kultivace, tak samotné měření absorbance. Po určitých časových intervalech se měří absorbance na spektrofotometrickém přístroji. Ke zvýšení přesnosti měření je absorbance v každé jamce měřena vícekrát a výsledná absorbance je pak vyjádřena jako průměr těchto hodnot. Výsledky je možné statisticky zpracovat. Data lze vyhodnotit počítačovým programem a výstupem jsou křivky závislosti absorbance na čase [35].

### 3.2.5 Průtoková cytometrie (flow cytometry)

Tato metoda umožňuje simultánní měření a analýzu fyzikálních a chemických vlastností buňky nebo jiných biologických částic během jejich průchodu laserovým paprskem. Ve chvíli, kdy buňka tento paprsek kříží, dochází k lomu a rozptylu světla, který podle směru a úhlu lomu bývá označován jako přímý a boční rozptyl. Mimo parametrů lomu a rozptylu světla je detekována také fluorescence procházejících buněk nebo částic. Fluorescenční barviva navázaná na analyzované buňky nebo částice absorbují světlo určité vlnové délky vyzařované laserem a následně vyzařují část takto absorbovaného světla, avšak již o odlišné vlnové délce. Průtokové cytometry využívají jako světelné zdroje nejčastěji argonový laser o excitační vlnové délce 488 nanometrů. Zařízení se skládá ze systému fluidního, optického a elektronického [65, 66].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

- testování tří rychlých metod stanovení antimikrobiálních účinků rostlinných extraktů (agarová difuzní metoda, disková difuzní metoda, spektrofotometrické měření optické hustoty);
- vyhodnocení nejvhodnější metody pro alkoholové rostlinné extrakty.

## 5 MATERIÁL A METODY

### 5.1 Pomůcky a nástroje

- parafilm (Vitrum VWR, Česká republika)
- inkubátor mikrobiologický (MEMMERT, Německo)
- BIOHAZARD box EUROFLOW (Clean Air, Holandsko)
- laboratorní třepačka Vortex, (Heidolph, Německo)
- parní sterilizátor VARIOKLAV 75S, 135S (Labortechnik AG, Německo)
- pH metr HANNA pH 211 (Fischer Scientific, spol. s.r.o., Česká republika)
- mikropipety (Hirschmann Laborgerate, Německo)
- termoblok Bio TD (Biotech, Česká republika)
- DENZI-LA-METER (Erba Lachema, Česká republika)
- Benchmark BioRad Microplate Reader (Biorad, Česká republika)
- běžné laboratorní sklo, pomůcky a spotřební materiál

### 5.2 Chemikálie a roztoky

- metanol (Penta, Česká republika)
- rostlinný jednodruhový jedlý olej VEGETOL (Setuza, Česká republika)
- Mueller Hinton agar (Himedia Laboratoires, Indie)
- masopeptonový bujón
- fyziologický roztok

#### 5.2.1 Příprava MHA

Půda byla připravena smícháním 38 g instantní půdy a 1000 ml destilované vody. Po provedení kontroly pH média ( $\text{pH } 7,3 \pm 0,2$ ) byla následně provedena sterilizace parním autoklávem ( $121\text{ }^\circ\text{C}/15\text{ min}$ ). Po zchlazení bylo médium rozlito do Petriho misek.

### 5.2.2 Příprava MPB

Bujón byl připraven smícháním 5 g NaCl (Penta, Česká republika), 3g masového extraktu (Himedia Laboratoires, Indie), 5g peptonu (Himedia Laboratoires, Indie) a 1000 ml destilované vody (pH 7,2). Následně byl sterilizován v autoklávu (121 °C/15 min).

### 5.2.3 Příprava fyziologického roztoku

Fyziologický roztok byl připraven smícháním 8,5g NaCl a 1000 ml destilované vody. Následně byl sterilizován v autoklávu (121 °C/15 min).

## 5.3 Materiál

Vzorky ovoce poskytla Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta. Sběr vzorků proběhl v obci Žabčice (nadmořská výška 182 m.n.m.). Vzorky květů poskytla Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta. Květy byly sbírány v obci Lednice (nadmořská výška 173 m.n.m.). Květy a ovoce byly sbírány v období květen až červenec 2012. Seznam použitých jedlých květů a netradičních druhů ovoce je uveden v tabulce (Tab. 1).

Tab. 1. Seznam vzorků.

označení vzorku	název vzorku
1	<i>Hemerocallis fulva</i> 'Saucy Lady'
2	<i>Borago officinalis</i> (bílý)
3	<i>Phlox paniculata</i> (bílý)
4	<i>Calendula officinalis</i>
5	<i>Borago officinalis</i> (modrý)
6	<i>Salvia officinalis</i>
7	<i>Belamcanda chinensis</i>
8	<i>Salvia lavandulifolia</i>
9	<i>Hemerocallis fulva</i> 'Alan'
10	<i>Matricaria recutita</i>
11	<i>Salvia nemorosa</i> Violet 'Queen'



12	<i>Salvia sclarea</i>
13	<i>Salvia glutinosa</i>
14	<i>Salvia nemorosa</i>
15	<i>Hosta</i> 'Golden Tiara'
16	<i>Hosta sieboldiana</i>
17	<i>Hemerocallis</i> 'Red Rum'
18	<i>Salvia amplexicaulis</i>
19	<i>Hemerocallis fulva</i> 'Buzz Bomb'
20	<i>Hemerocallis fulva</i> (červená)
21	<i>Phlox paniculata</i> (růžový)
22	<i>Hemerocallis fulva</i> 'Pizza'
23	<i>Monarda didyma</i> 'Scorpion'
24	<i>Ziziphora persica</i>
25	<i>Rosa</i> 'Gloria Dei'
26	<i>Gaura lindheimeri</i>
27	<i>Salvia nemorosa</i> 'Rose Queen'
28	<i>Salvia przewalskii</i>
29	<i>Salvia verticillata</i>
30	<i>Hemerocallis fulva</i> 'Corky'
31	<i>Lavandula angustifolia</i>
32	<i>Salvia transsylvanica</i>
33	<i>Salvia virgata</i>
34	<i>Phlox paniculata</i> 'Eclairer'
35	<i>Hosta</i> 'Ginko Craig'
36	<i>Hosta ventricosa</i>

37	<i>Hosta</i> 'Hydon Sunset'
38	<i>Hosta</i> 'Blue Cadet'
1B	<i>Lonicera kamtschatica</i> 'Amfora'
2B	<i>Lonicera kamtschatica</i> 'Altaj'
3B	<i>Lonicera kamtschatica</i> 'Fialka'
4B	<i>Lonicera kamtschatica</i>
5B	<i>Lonicera kamtschatica</i> 'Leningradský velikán'
6B	<i>Lonicera kamtschatica</i> 'Sinoglaska'
8B	<i>Morus</i> 'Jugoslávská'
9B	<i>Amelanchier</i> 'Thiessen'
10B	<i>Amelanchier</i> 'Tišnovský velkoplodý'
11B	<i>Amelanchier</i> 'Lamarckii Ballerina'
12B	<i>Amelanchier</i> 'Ostravský'
13 B	<i>Amelanchier</i> 'Tišnovský'
14B	<i>Morus trnaviensis</i> (zralé plody)
15B	<i>Morus trnaviensis</i> (nedozrálé plody)
Ko	<i>Origanum dubium</i>

### 5.3.1 Příprava extraktů

Extrakty byly připraveny v červenci 2012 z 5 g vzorku, ke kterému bylo přidáno 50 ml metanolu. Vzorky byly ponechány 24 hodin při teplotě 25 °C. Po uplynutí této doby byly vzorky přefiltrovány, uzavřeny do uzavíratelných zkumavek, zajištěny parafilmem a uchovávány v chladu.

Vzorek esenciálního oleje (*Origanum dubium*), který sloužil jako kontrola antibakteriálního účinku [67], byl získán destilací s vodní parou a poskytla jej univerzita Mustafa Kemal v Turecku.

Pro další měření byly použity různě zakoncentrované vzorky připravené odpařením. Nejdříve byly odpařeny původní vzorky z 1 ml na 0,5 ml při pokojové teplotě a současně byly připraveny i vzorky odpařené v termobloku při teplotě 40 °C a to z 1 ml na 0,25 ml.

Další zakoncentrování bylo provedeno jen u vybraných vzorků. Jednalo se o odpaření při pokojové teplotě z 18 ml na 7,5 ml. Takto odpařenými vzorky byly napuštěny disky a zbytek byl dále odpařován v termobloku při teplotě 40 °C až do úplného odpaření metanolu. K takovému vzorku bylo přidáno 20 µl rostlinného oleje.

Pro testování diskovou difuzní metodou byly z filtračního papíru připraveny disky o průměru 5 mm. Sterilní disky byly napuštěny testovanými extrakty v objemu 10 µl.

## 5.4 Testované kmeny

Pro testování antimikrobiální aktivity výše uvedených vzorků byly používány tyto vybrané kmeny gramnegativních a grampozitivních bakterií:

- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium CCM 7205
- *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955
- *Pseudomonas fluorescens*
- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953
- *Micrococcus luteus* CCM 732
- *Bacillus cereus* CCM 2010

### 5.4.1 Příprava inokula

Sterilní bakteriologickou kličkou bylo nabráno několik kolonií daného mikroorganismu a přidáno do zkumavky se sterilním bujónem. Bakterie byly kultivovány při teplotě 37 °C/24h, *Micrococcus luteus* a *Pseudomonas fluorescens* při teplotě 30 °C/48h. Následující den byl do sterilní plastové zkumavky napipetován fyziologický roztok a postupně byla přidávána tekutá kultura až do hodnoty zákalu 0,5 McF. Tímto způsobem byla připravena inokula všech mikroorganismů. Pro využití spektrofotometrického měření optické hustoty byla připravena inokula na hodnotu zákalu 1 McF.

## 5.5 Metody

### 5.5.1 Agarová difuzní metoda

Pro tuto metodu bylo výše uvedeným způsobem připraveno inokulum pro každou bakterii na hodnotu zákalu 0,5 McF. Na Petriho misky s MHA bylo napipetováno 0,1 ml inokula, které bylo dokonale rozetřeno hokejkou. Byly do nich vyhloubeny kulaté jamky o průměru 1 cm. Do jamek bylo vždy pipetováno 10  $\mu$ l vybraných metanolových extraktů o různých koncentracích, do kontrolní jamky bylo pipetováno stejné množství metanolu, pouze kontrolního vzorku oregana bylo pipetováno množství 3  $\mu$ l. Jamky s metanolem sloužily jako kontrola, že metanol sám nemá antimikrobiální účinky a jamky s extraktem oregana plnily funkci pozitivní kontroly. Takto připravené misky byly kultivovány v termostatu dle požadavků daného mikroorganismu (většina při teplotě 37 °C/24h, *Micrococcus luteus* a *Pseudomonas fluorescens* při teplotě 30 °C/48h).

### 5.5.2 Disková difuzní metoda

První krok této metody spočíval ve zhotovení disků napuštěných různě koncentrovanými vzorky a rovněž oběma kontrolami (oregano, metanol). Dále byla zhotovena inokula na hodnotu zákalu 0,5 McF. Inokula byla pipetována v množství 0,1 ml na Petriho misky s MHA a následně byla hokejkou roztírána do sucha. Při pozdějších měření bylo hokejkování nahrazeno metodou přelévání. Toto spočívalo v napipetování 1 ml inokula na Petriho misku s MHA a krouživým pohybem byla inokulem důkladně pokryta celá plocha agaru. Přebytečné inokulum bylo následně odsáto pipetou a nanášeno na další Petriho misku s MHA. Tento způsob roztěru inokula byl rychlejší a efektivnější. Na vyschlý agar byly disky nanášeny pomocí dvou injekčních jehel. Takto připravené misky byly kultivovány v termostatu dle požadavků daného mikroorganismu (většina při teplotě 37 °C/24h, *Micrococcus luteus* a *Pseudomonas fluorescens* při teplotě 30 °C/48h).

### 5.5.3 Spektrofotometrické měření optické hustoty

Pro tuto metodu byly vybrány vzorky na základě souběžně běžících pokusů v rámci jiné diplomové práce [68]. Byla připravena inokula od každého mikroorganismu na hodnotu zákalu 1 McF. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno do jamek prokazujících kontrolu sterility 200  $\mu$ l MPB, do jamek kontroly růstu bakterií bylo napipetováno 5  $\mu$ l inokula a 200  $\mu$ l MPB, do jamek s kontrolou metanolu byly k 5  $\mu$ l inokula a 200  $\mu$ l MPB ještě napipe-

továny 3  $\mu\text{l}$  metanolu a do jamek s experimentem bylo napipetováno 5  $\mu\text{l}$  inokula, 200  $\mu\text{l}$  MPB a 3  $\mu\text{l}$  příslušného vzorku.

Měření optické hustoty probíhalo na přístroji Benchmark Microplate Reader v různých časových intervalech. Pro všechna měření byl zvolen filtr 655 nm a doba třepání vzorků 5 sekund. Měření probíhalo po dobu 48 hodin, kdy byly intervaly mezi jednotlivými měřeními stanoveny dle průběžných výsledků měření. V mezidobí jednotlivých měření byly destičky kultivovány v termostatu (gramnegativní bakterie při teplotě 37 °C, grampozitivní bakterie při teplotě 30 °C).

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Testování antimikrobiálních účinků metanolových extraktů bylo prováděno pomocí tří rychlých metod. První z nich je agarová difuzní metoda, dále disková difuzní metoda a poslední metoda je založena na měření optické hustoty v tekuté kultuře v mikrotitrační destičce.

### 6.1 Agarová difuzní metoda

Pro testování antimikrobiálních účinků vytipovaných metanolových extraktů byla nejdříve použita jamková metoda difuze v agaru. Účinek byl testován na bakterie gramnegativní *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* a grampozitivní *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* a *Bacillus cereus*.

Do vyhloubených jamek byly pipetovány vybrané různě koncentrované vzorky rostlinných extraktů. Jednalo se o vzorky 6, 29, 30 a 31, kdy byly použity jednak v původní neodpařené podobě, dále dvojnásobně zakoncentrované (odpařené z 1 ml na 0,5 ml při pokojové teplotě) a čtyřnásobně zakoncentrované (odpařené z 1 ml na 0,25 ml při 40 °C). Oregano (pozitivní kontrola) vykazovalo ve všech případech antimikrobiální účinnost, kdy největší účinnost byla na bakterii *Micrococcus luteus* (30 mm) a nejmenší na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (11 mm). Z těchto čtyř vzorků vykázal antimikrobiální účinnost pouze vzorek 6 (*Salvia officinalis*) a to pouze na grampozitivní bakterie. Největší antimikrobiální aktivita se projevila na bakterii *Micrococcus luteus* (23 mm) a nejmenší na bakterii *Staphylococcus auerus* (13 mm). Navíc byly testovány tyto vzorky po odpaření. Vzorek odpařený při pokojové teplotě vytvořil největší inhibiční zónu na bakterii *Micrococcus luteus* (25 mm) a nejmenší na bakterii *Bacillus cereus* (16 mm). Vzorky odpařené za zvýšené teploty nevykázaly žádnou antimikrobiální účinnost. Odpaření vzorků z 1 ml na 0,5 ml za pokojové teploty bylo efektivní, zatímco odpaření vzorků z 1 ml na 0,25 ml v termobloku mělo na antimikrobiální účinky vzorků negativní vliv. Agarová difuzní metoda byla dříve využita např. k testování baktericidních a fungicidních účinků esenciálního oleje z *Ambrosia trifida* [69].

Při využití této metody však selhala kontrola v podobě metanolových jamek, kde se rovněž tvořily malé inhibiční zóny na bakteriích *Salmonella typhimurium* (11 mm), *Staphylococcus auerus* (11 mm) a *Micrococcus luteus* (14 mm). Při využití agarové difuzní metody hrozilo riziko vylití obsahu jamek, zejména pokud by byl agar nízký. Z těchto důvodů není tato metoda pro využití měření antimikrobiální aktivity rostlinných extraktů zcela vhodná, proto bylo přistoupeno k testování dalšími způsoby.

## 6.2 Disková difuzní metoda

Ke zjištění antimikrobiální účinnosti diskovou difuzní metodou byly použity gramnegativní bakterie *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* a *Pseudomonas aeruginosa* a dále gram-pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* a *Bacillus cereus*.

Touto metodou bylo testováno všech 52 vzorků na výše uvedené bakterie. Při všech měřeních byly účinné disky napuštěné oreganem (pozitivní kontrola) a naopak bez účinnosti byly všechny disky napuštěné metanolem, což je základní předpoklad pro správnost provedeného experimentu. Při prvním měření, kdy byly použity neodpařené extrakty, vykázal antimikrobiální aktivitu pouze vzorek 6 (*Salvia officinalis*), kdy na bakterii *Bacillus cereus* vytvořil inhibiční zónu (5 mm) a na bakterii *Micrococcus luteus* (12 mm). Při dalším měření bylo pracováno s vytipovanými vzorky 6, 29, 30 a 31, které byly odpařeny. Kontrolní disk s oreganem vytvořil největší inhibiční zónu na bakterii *Micrococcus luteus* (22 mm) a nejmenší na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (6 mm). Ze všech čtyř vybraných extraktů vykázal účinnost pouze vzorek 6 na gram-pozitivní bakterie. Extrakt odpařený z 1 ml na 0,5 ml při pokojové teplotě vytvořil inhibiční zónu na bakterii *Staphylococcus aureus* (6 mm), *Micrococcus luteus* (12 mm) a *Bacillus cereus* (8 mm). Extrakt odpařený z 1 ml na 0,25 ml v termobloku vytvořil inhibiční zóny o velikosti 7 mm na bakterii *Staphylococcus aureus* a 19 mm na *Micrococcus luteus*.

Protože byla stanovena větší antimikrobiální účinnost u odpařených extraktů, bylo pokračováno v experimentech již pouze s takto upravenými vzorky.

Všech 52 vzorků bylo odpařeno z 1 ml na 0,25 ml při 40 °C a testováno na výše uvedené bakterie (Tab. 2). Vytipované vzorky 6, 29, 30 a 31 byly ještě dále zakoncentrovány odpařením z 18 ml na 7,5 ml a odpařením do sucha, kdy k takto odpařenému vzorku byl přidán rostlinný jedlý olej.

Tab. 2. Výsledky měření difuzní diskové metody, velikost zón v [mm].

vzorek	<i>M. luteus</i>	<i>B. cerus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
metOH	--	--	--	--	--	--
Ko	13,0	20,0	10,0	16,0	13,0	8,0
1	6,0	--	--	--	--	--
2	6,0	--	--	--	--	--
6	10,0	10,5	--	--	--	--
8	--	7,0	--	--	--	--
10	--	6,0	--	--	--	--
11	--	5,5	--	--	--	--
12	--	6,0	--	--	--	--
14	--	5,5	--	--	--	--
18	6,0	--	--	--	--	--
23	--	5,5	--	--	--	--
26	6,0	--	--	--	--	--
28	--	5,5	--	--	--	--
32	8,0	--	--	--	--	--
33	8,0	--	--	--	--	--
6(odpařený z 18ml na 7,5 ml)	6,0	5,5	6,0	--	--	--
6 (dpařený do sucha + olej)	8,0	8,0	6,0	--	--	--

Z tabulky je patrné, že oregano vytvořilo největší inhibiční zónu na bakterii *Bacillus cereus* a naopak nejmenší zóna vznikla na bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Největší inhibiční účinky



prokázal vzorek 6 na bakteriích *Micrococcus luteus* (10 mm) a *Bacillus cereus* (10,5 mm). Ani jeden rostlinný extrakt nepůsobil inhibičně na gramnegativní bakterie, zatímco na grampozitivní bakterie *Micrococcus luteus* a *Bacillus cereus* byly velice účinné, počet vzorků vykazujících antimikrobiální aktivitu podstatně vzrostl.

Ke stejným výsledkům dospěl ve své práci i Borchard a kol. [70], kdy použil diskovou difuzní metodu k testování antimikrobiální účinnosti květů *Rumex crispus* a *Rumex acetosella* na půdách zaočkovaných kmeny *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Studie uvádí, že na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* vytvořil *Rumex crispus* inhibiční zónu o velikosti 12 mm a *Rumex acetosella* 11 mm. Antimikrobiální účinnost na gramnegativních bakteriích nebyla prokázána [70].

Obdobný výsledek je uváděn i ve studii Babuly a kol. [63], kdy výrazné inhibiční zóny vznikly při použití petroléterového a metanolického extraktu rostliny *Dionaea muscipula* pouze na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus*.

Difuzní disková metoda byla vyhodnocena jako poměrně časově nenáročná a vzhledem ke správnosti kontrol a účinnosti vzorků i spolehlivá metoda pro stanovení antimikrobiálních účinků rostlinných alkoholových extraktů. Bylo však patrné, že antimikrobiální účinnost rostlinných extraktů ovlivňuje koncentrace účinné látky na disku, což vysvětluje, že při prvních měřeních byl účinný pouze jeden vzorek, zatímco po zakoncentrování vzorků podstatně vzrostl počet účinných extraktů. Mimo možnosti rychlého a spolehlivého stanovení antimikrobiální aktivity nabízí tato metoda i různé obměny využití téhož testovaného materiálu a okamžité srovnání těchto obměn.

Difuzní diskovou metodu použili Rasooli a Mirmostafa (2003) ke studiu citlivosti *E.coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae* a *P. aeruginosa* na esenciální olej z tymiánu [71].

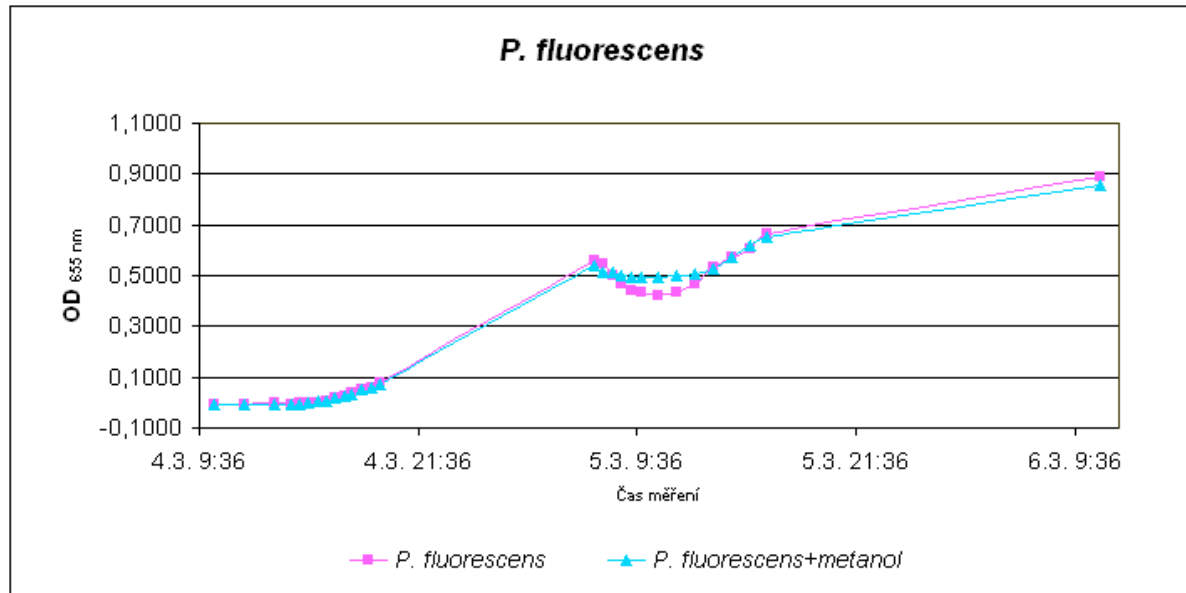
### 6.3 Spektrofotometrické měření optické hustoty

Pro využití spektrofotometrického měření optické hustoty byla připravena inokula těchto gramnegativních bakterií *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens* a inokula grampozitivních bakterií *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* a *Bacillus cereus*.

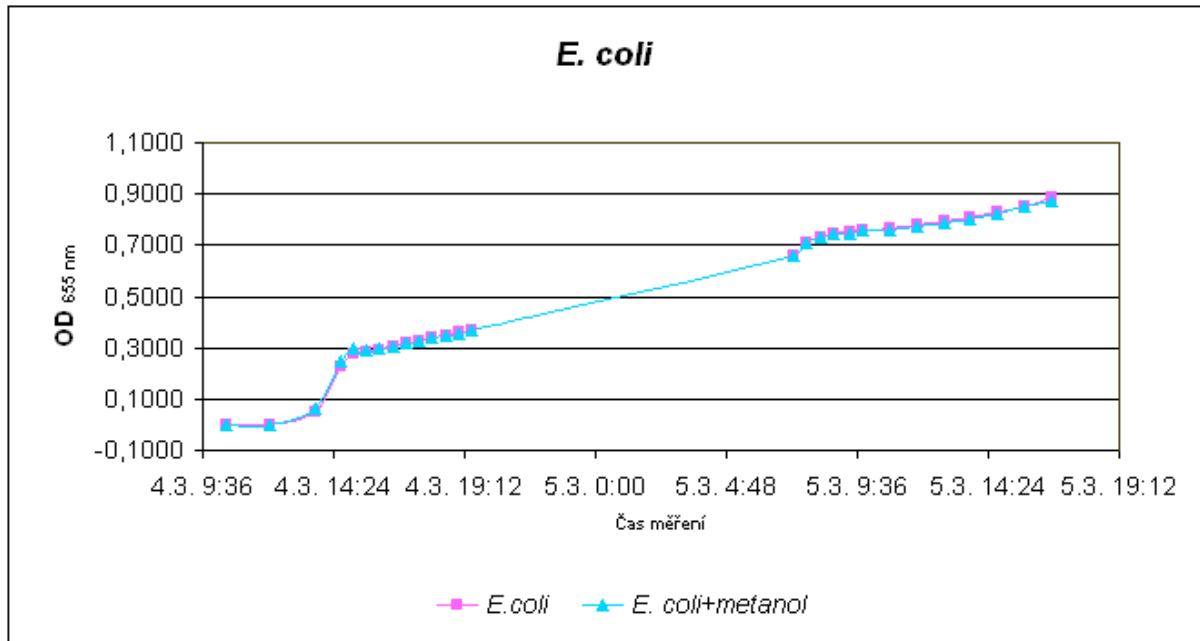
Pro daná měření byly použity vytipované vzorky extraktů odpařené z 1 ml původního extraktu na 0,25 ml. Odpaření bylo provedeno v termobloku při teplotě 40 °C. Pro grampozitivní bakterie byly vytipovány na základě souběžně běžících pokusů na jiné diplomové práci (citace

Kutňák) vzorky 5, 6, 8, 11, 13, 14, 23, 34 a 35, zatímco pro gramnegativní bakterie to byly vzorky 5, 10, 13, 15, 19, 35, 6B, 10B, 13B. Měření probíhalo v různých časových intervalech, kdy v době velkého nárůstu bakterií byl nejkratší interval měření 0,5 hodiny. Růst bakterií přestal být významný po cca 30 hodinách měření, mimo bakterie *Pseudomonas fluorescens* a *Micrococcus luteus*, které přestaly růst asi po 48 hodinách.

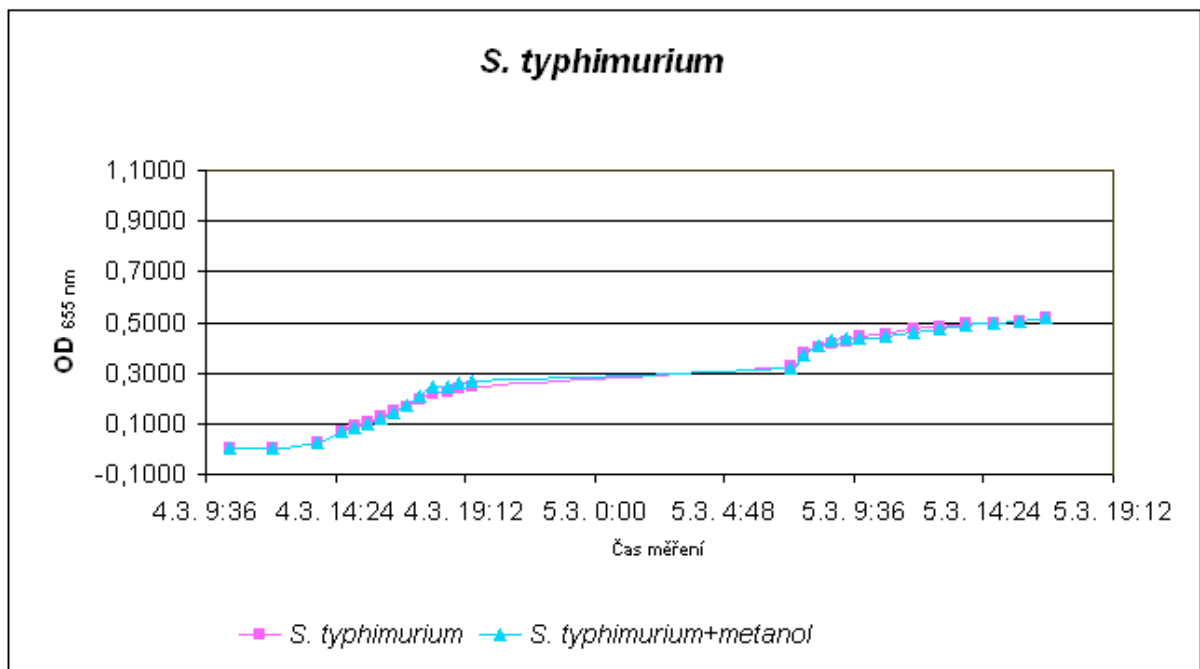
Z naměřených hodnot byly sestaveny grafy pro každou bakterii zvlášť, kdy první graf pro danou bakterii vždy znázorňuje růst bakterie samotné a vedle růstové křivky bakterie je křivka bakterie s metanolem. Tyto grafy slouží jako kontrola, že metanol sám nemá inhibiční účinky na růst bakterie, což je z grafů (Obr. 7, 8, 9, 11, 12) patrné. Problém nastal u bakterie *Micrococcus luteus*, kdy ještě druhý den byla patrná celková shoda obou křivek, ale třetí den měření začala sama bakterie ještě růst, zatímco bakterie s metanolem již ne. Toto je tedy jediný případ, kdy metanol měl na růst bakterie inhibující účinky (Obr. 10). Nejlépe je shoda obou křivek patrná na bakteriích *Escherichia coli* (Obr. 8) a *Salmonella typhimurium* (Obr. 9), zatímco drobné odlišnosti v růstu obou křivek jsou patrné na bakterii *Bacillus cereus* (Obr. 12), což může být způsobené tím, že tato bakterie vytváří spory.



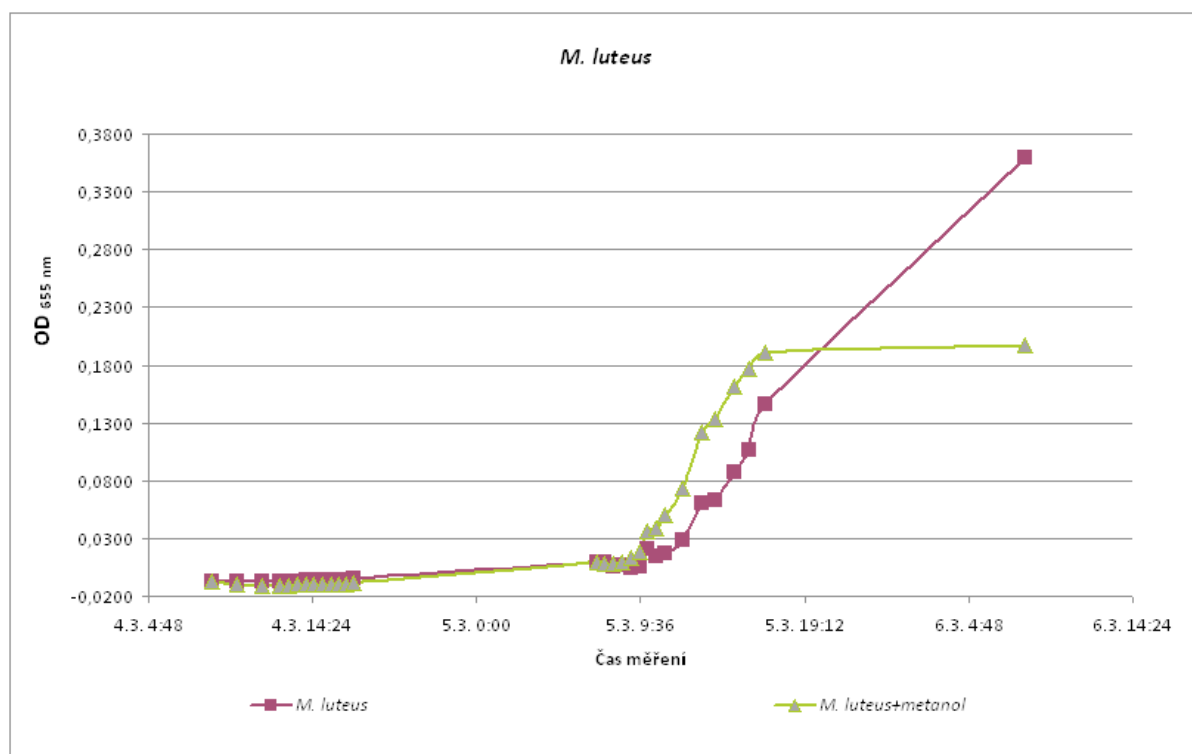
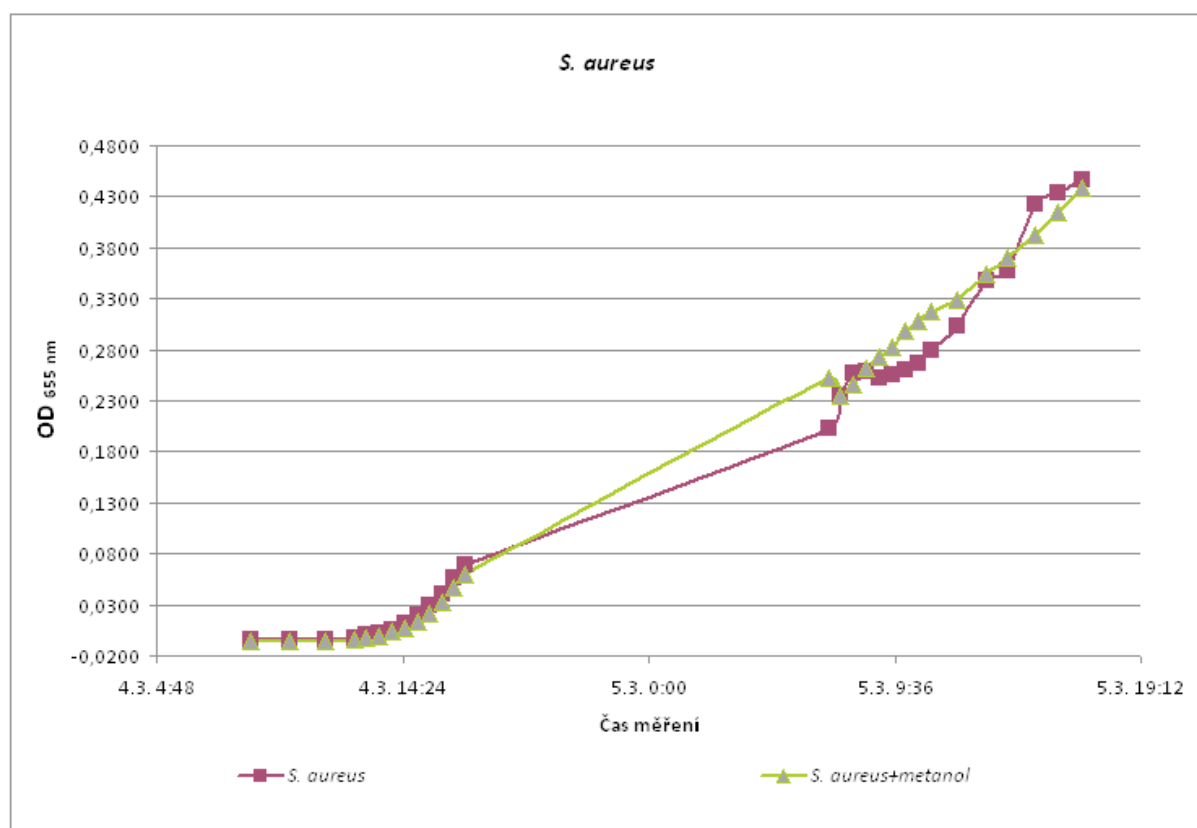
Obr. 7. Měření OD kontroly růstu *P. fluorescens*.

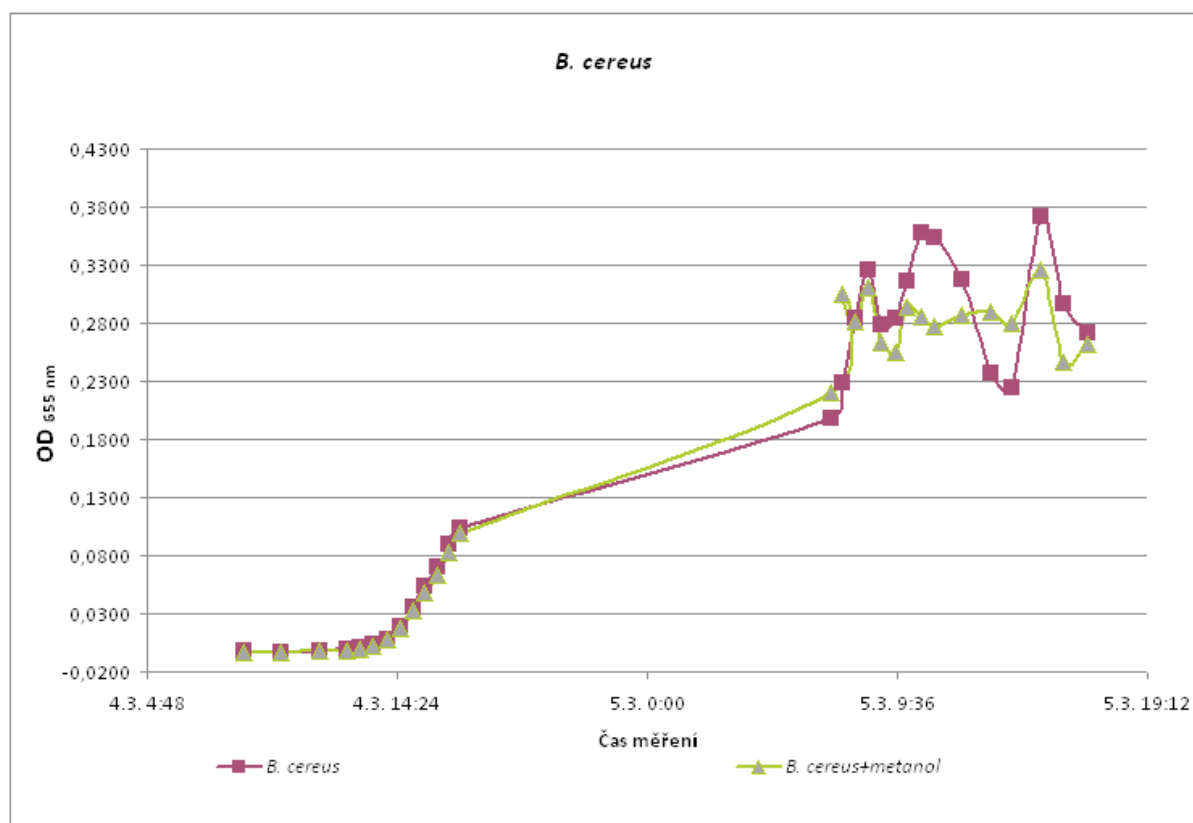


Obr. 8. Měření OD kontroly růstu *E. coli*.



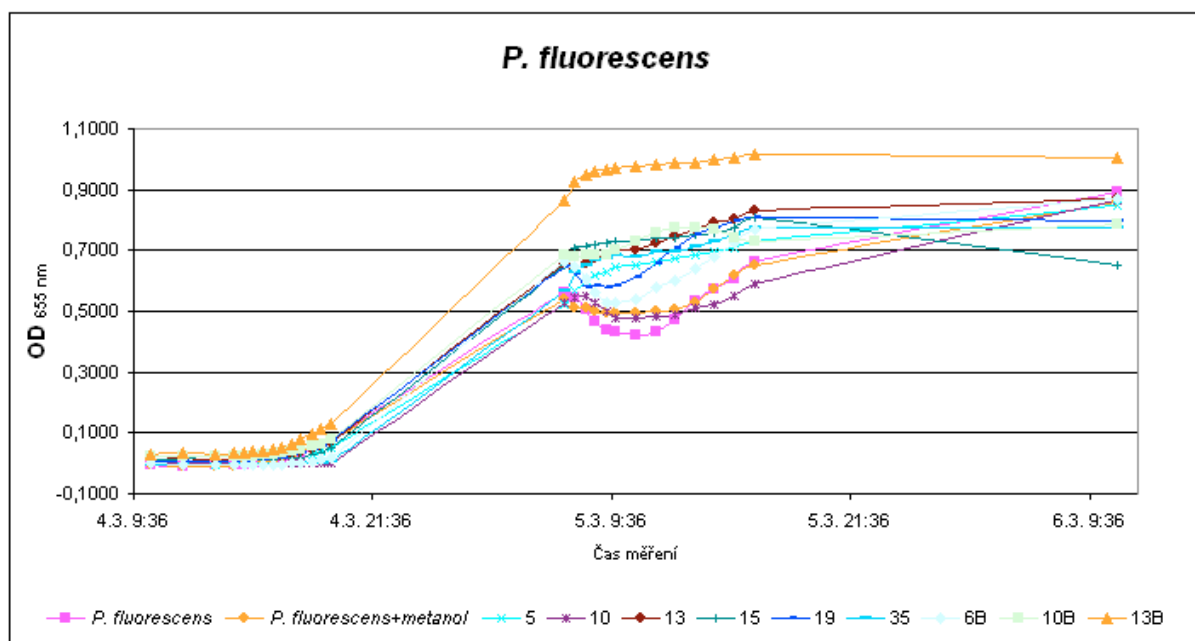
Obr. 9. Měření OD kontroly růstu *S. typhimurium*.

Obr. 10. Měření OD kontroly růstu *M. luteus*.Obr. 11. Měření OD kontroly růstu *S. aureus*.

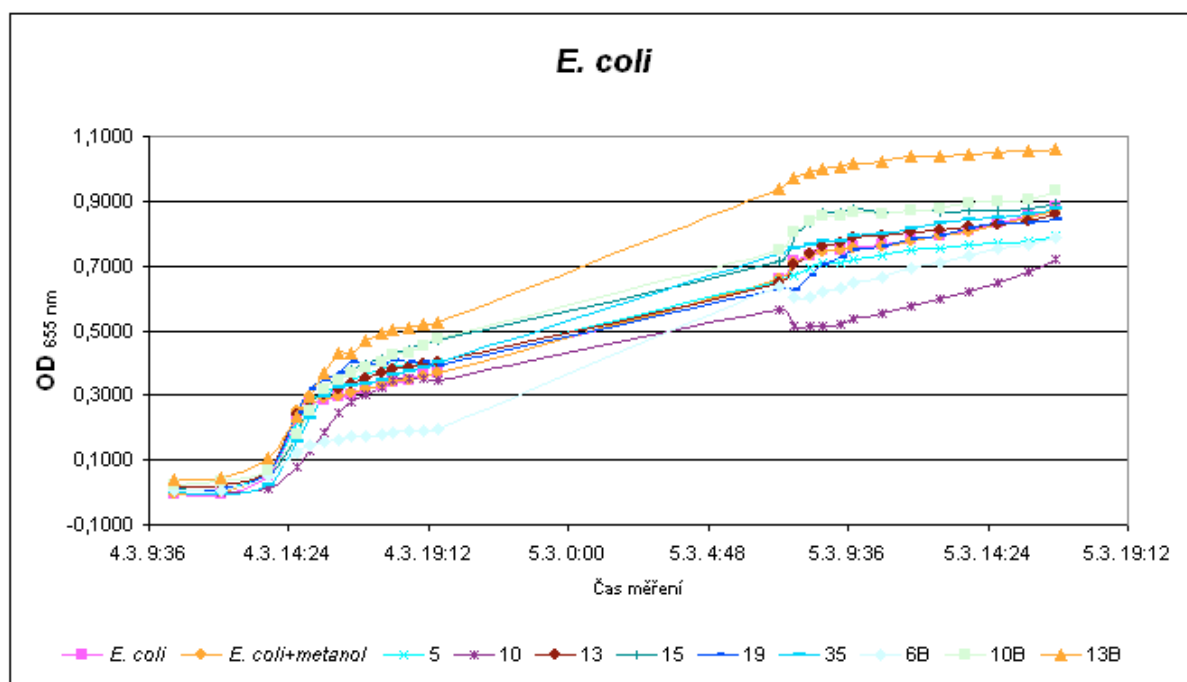


Obr. 12. Měření OD kontroly růstu *B. cereus*.

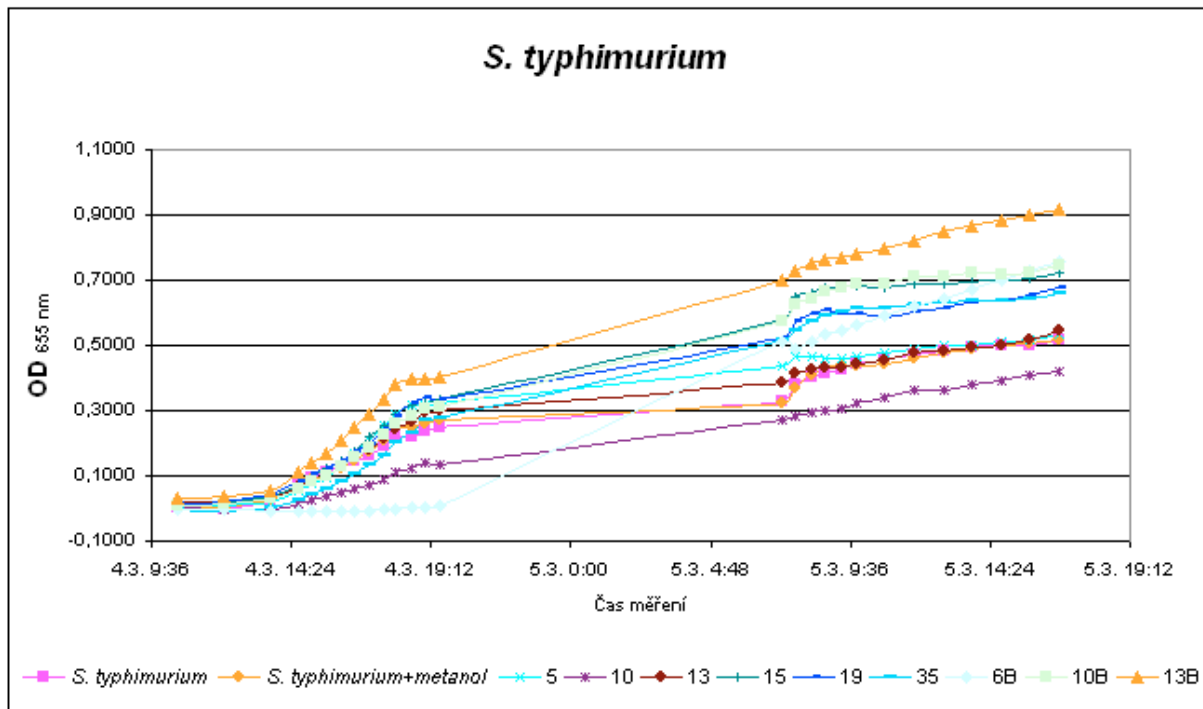
Další graf pro každou konkrétní bakterii pak ukazuje všechny naměřené hodnoty jak obou předchozích kontrol, tak i všech testovaných vzorků. Tyto grafy (Obr. 13, 14, 15, 16, 17, 18) jsou v práci uvedeny spíše pro celkovou orientaci úspěšnosti vybraných vzorků na danou bakterii, neboť velké množství vzorků, jak je z grafů patrné, způsobuje malou přehlednost v grafech. Z těchto grafů vyplývá, že zatímco některé použité vzorky mají na danou bakterii inhibiční účinky, existují i látky, které naopak na růst bakterie mají pozitivní vliv jako např. vzorek 13B na všechny tři použité gramnegativní bakterie, tak vzorek 35 na grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus*. Ke stejnému zjištění, že některé přírodní látky podporují růst bakterií, dospěla ve své práci i Poláková a kol. [35], když na kmenech bakterií *Bacillus cereus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* a *Fusarium culmorum* testovala antimikrobiální aktivity acylfruktos a dospěla k závěru, že největší antimikrobiální účinek vykazovala kaprinoylfruktosa, zatímco palmitoylfruktosa růst některých mikroorganismů podporovala.



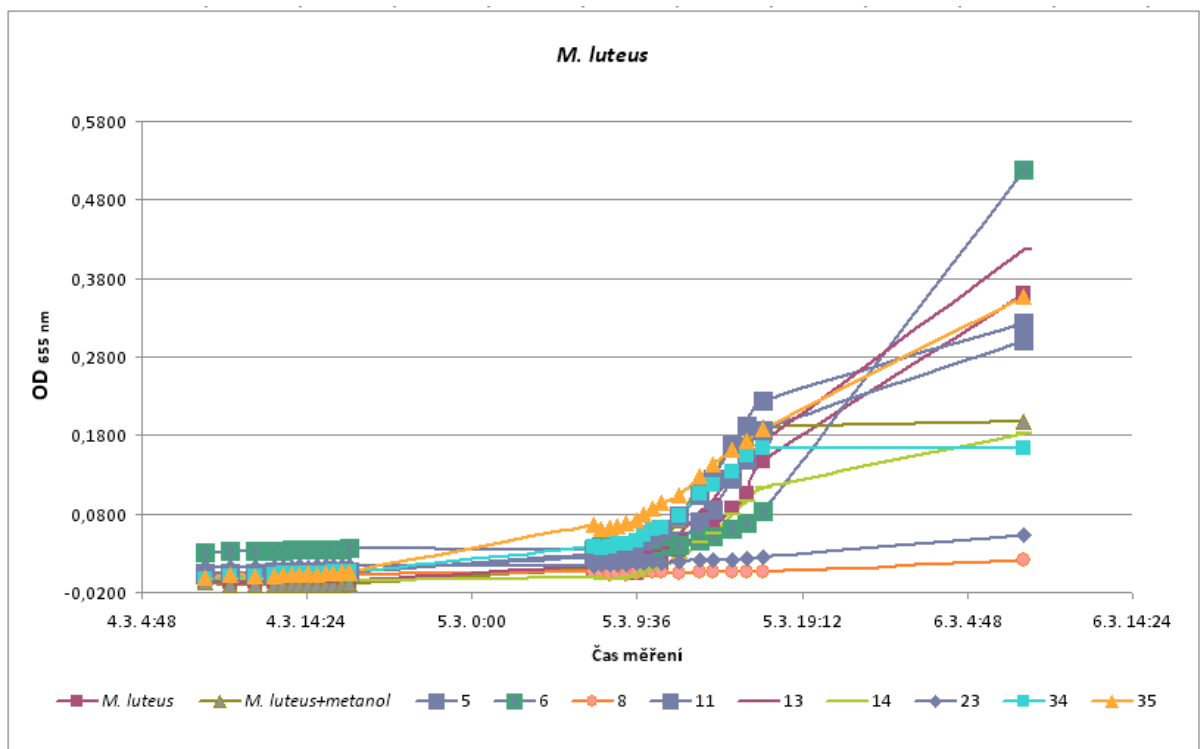
Obr. 13. Měření OD kontroly a testovaných extraktů s bakterií *P. fluorescens*.



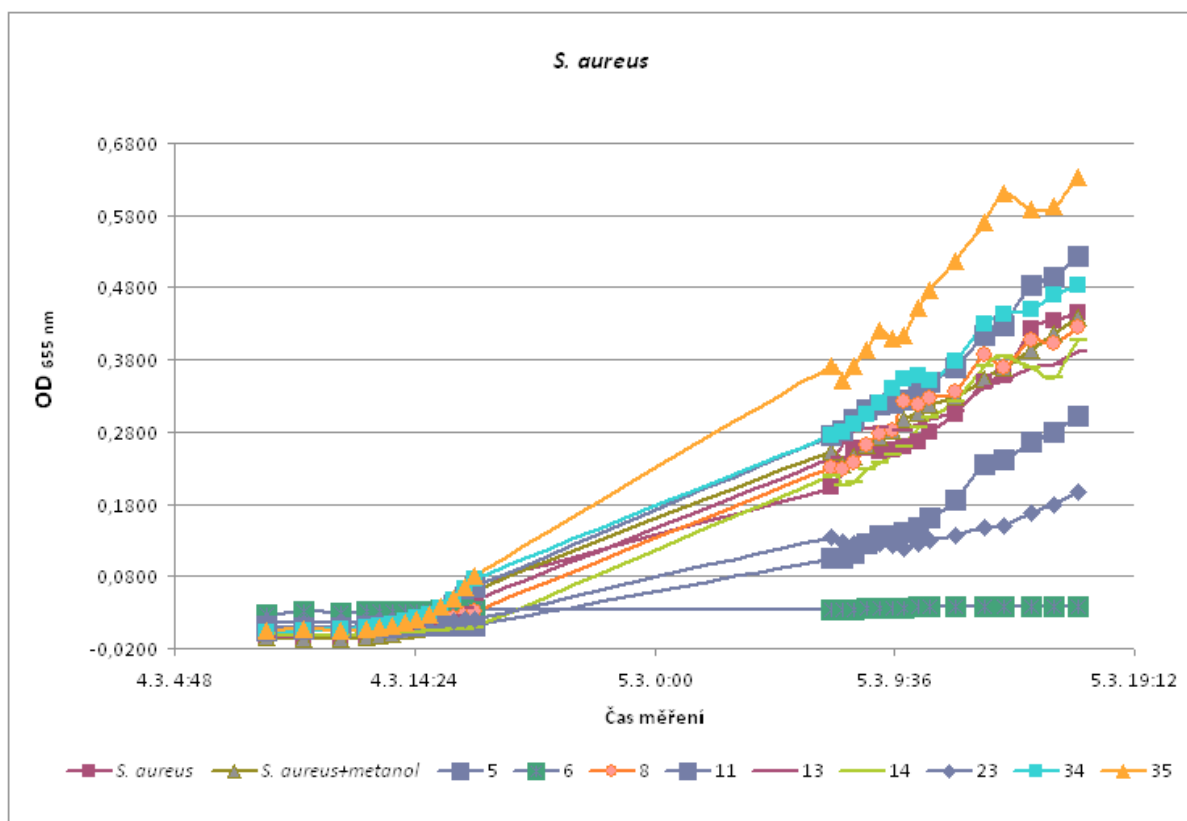
Obr. 14. Měření OD kontroly a testovaných extraktů s bakterií *E. coli*.



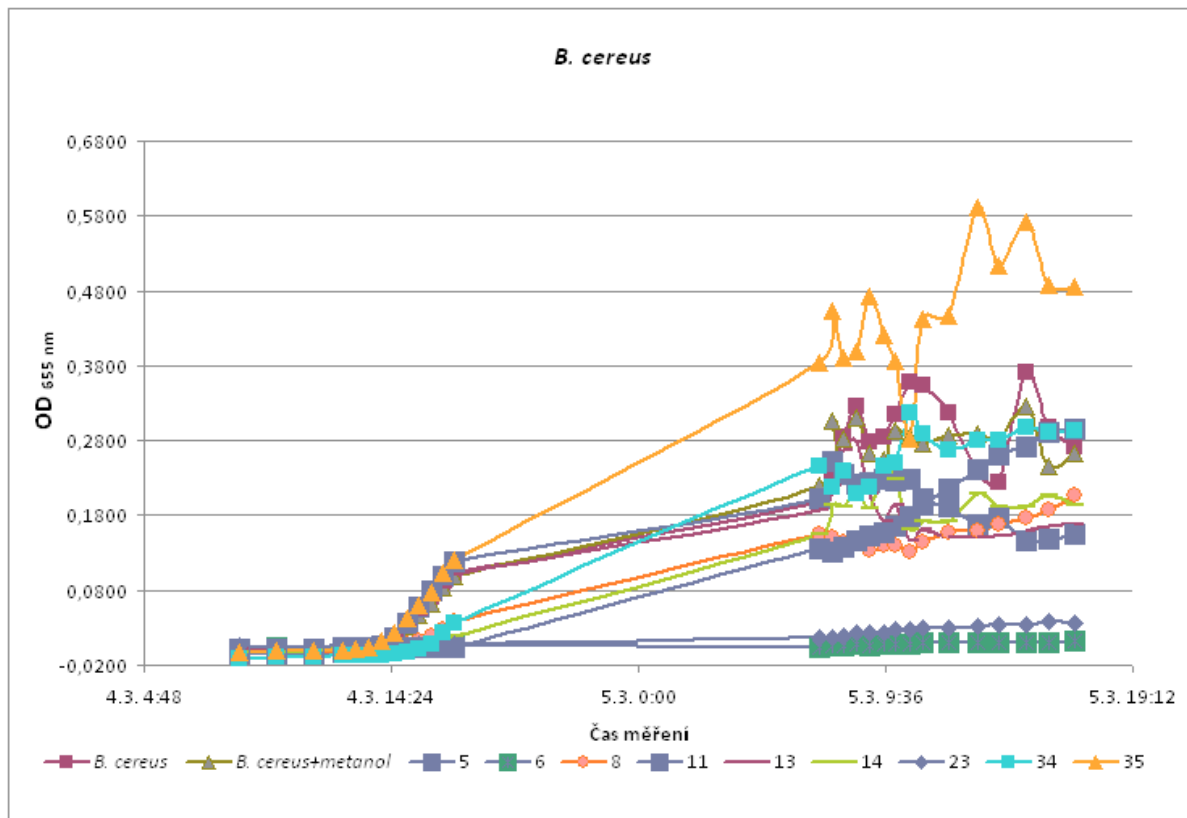
Obr. 15. Měření OD kontroly a testovaných extraktů s bakterií *S. typhimurium*.



Obr. 16. Měření OD kontroly a testovaných extraktů s bakterií *M. luteus*.



Obr. 17. Měření OD kontroly a testovaných extraktů s bakterií *S. aureus*.



Obr. 18. Měření OD kontroly a testovaných extraktů s bakterií *B. cereus*.

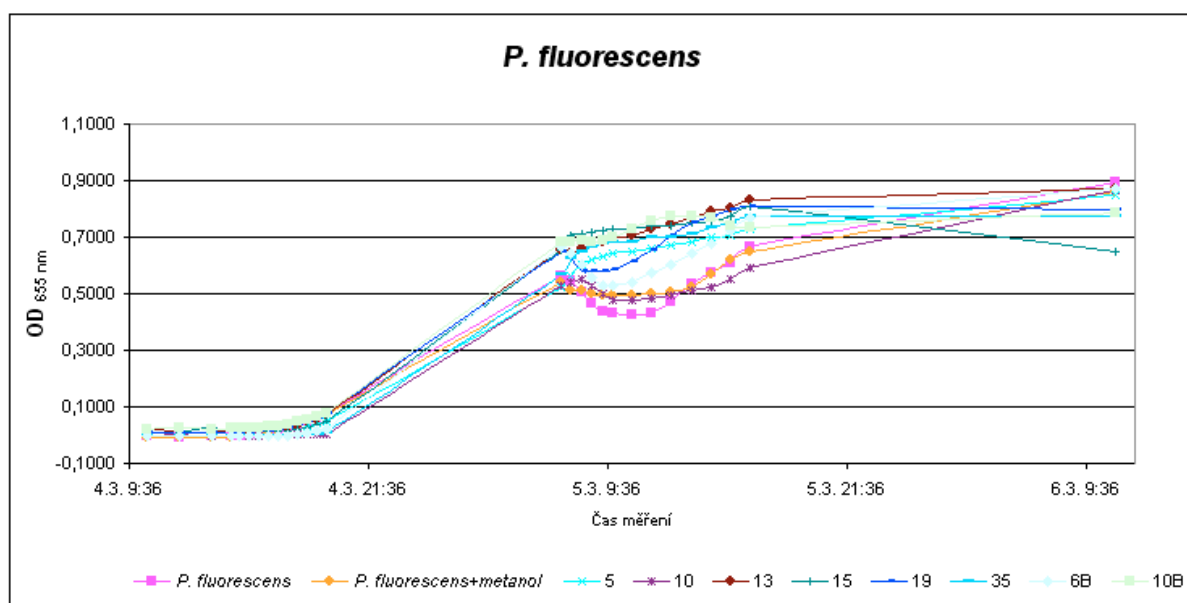


Pro lepší orientaci jsou v dalších grafech (Obr. 19, 20, 21, 22, 23, 24) vybrány vždy pouze vzorky, které působily na růst dané bakterie inhibičně a pro srovnání je vždy ještě uvedena růstová křivka daného mikroorganismu.

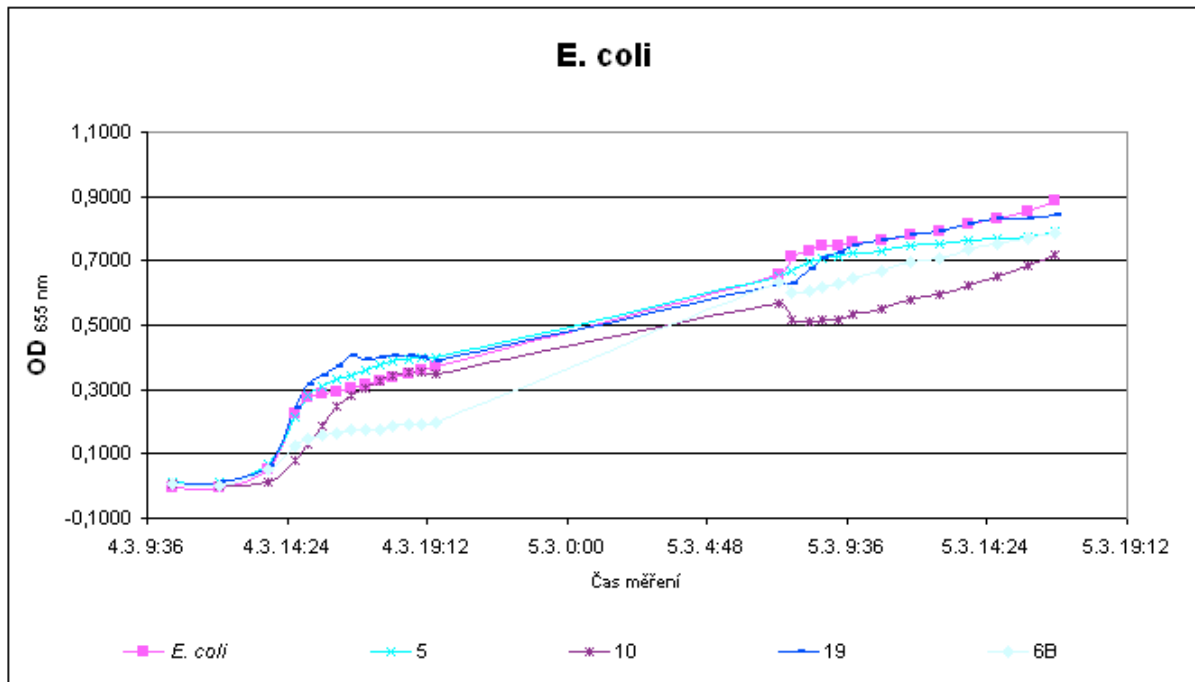
Z těchto grafů je patrné, že na bakterii *Salmonella typhimurium* (Obr. 21) měl inhibiční účinky pouze vzorek 10. Na bakterii *Pseudomonas fluorescens* projevil viditelné inhibiční účinky vzorek 5, 10, 13, 15, 19, 35, 6B a 10B (Obr. 19). Na poslední testovanou gramnegativní bakterii *Escherichia coli* (Obr. 20) měly inhibiční účinky vzorky 5, 10, 19 a 6B. Na všechny gramnegativní bakterie projevil shodně antimikrobiální aktivitu vzorek 10.

V případě stejných grafů, které vyjadřují inhibiční účinky vzorků na grampozitivní bakterie, jsou výsledky mnohem lepší. Na bakterii *Micrococcus luteus* (Obr. 22) měly inhibiční účinky vzorky 5, 8, 11, 14, 23, 34, ale bohužel i metanolvá kontrola.

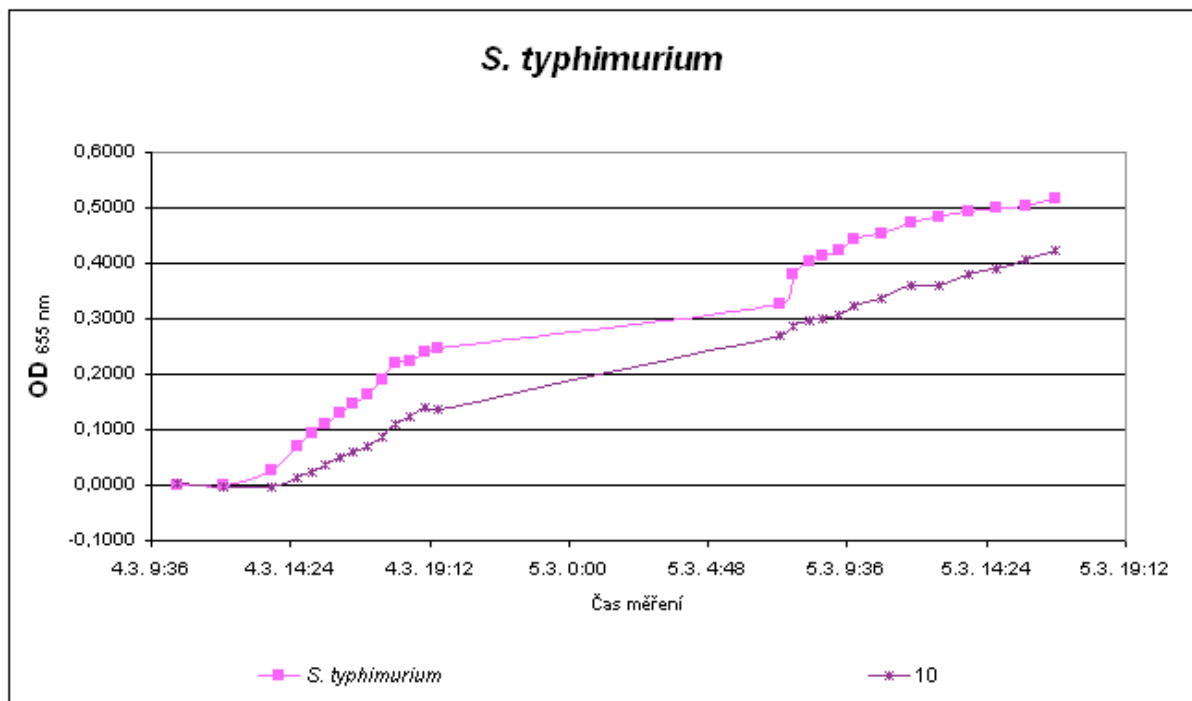
Vzorky 8, 14 a 23 působily inhibičně i na další dvě testované grampozitivní bakterie. Na růst bakterie *Staphylococcus aureus* (Obr. 23) měl negativní vliv ještě vzorek 6, 11 a 13 a na růst bakterie *Bacillus cereus* (Obr. 24) to byly ještě vzorky 5, 6 a 13. Ve srovnání s difuzní diskovou metodou byly naměřeny inhibiční účinky některých vzorků i u gramnegativních bakterií, což se u difuzní diskové metody nepodařilo. Na všechny testované gramnegativní bakterie vykázal shodně inhibiční účinek vzorek 10. Co se týče inhibice grampozitivních bakterií, vykazaly shodu na potlačení růstu bakterie *Bacillus cereus* vzorky 6, 8, 14 a 23 jak při využití difuzní diskové metody, tak při měření optické hustoty.



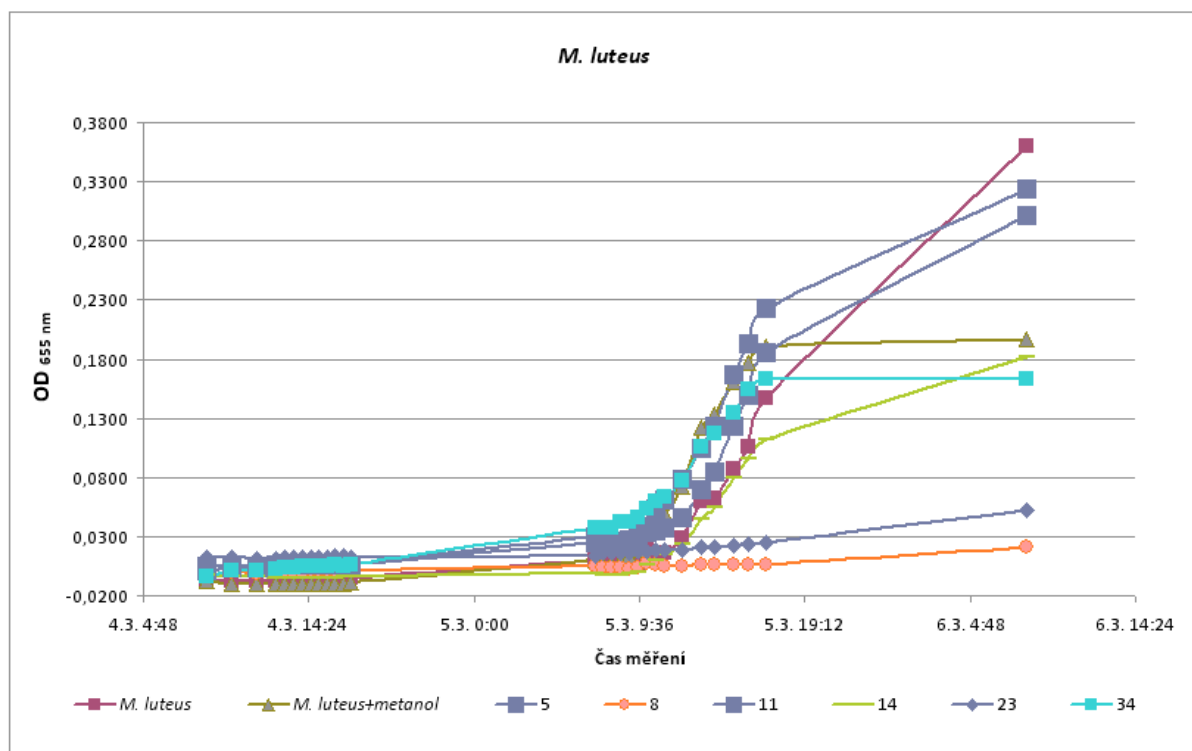
Obr. 19. Měření OD kontroly a vzorků inhibujících *P. fluorescens*.



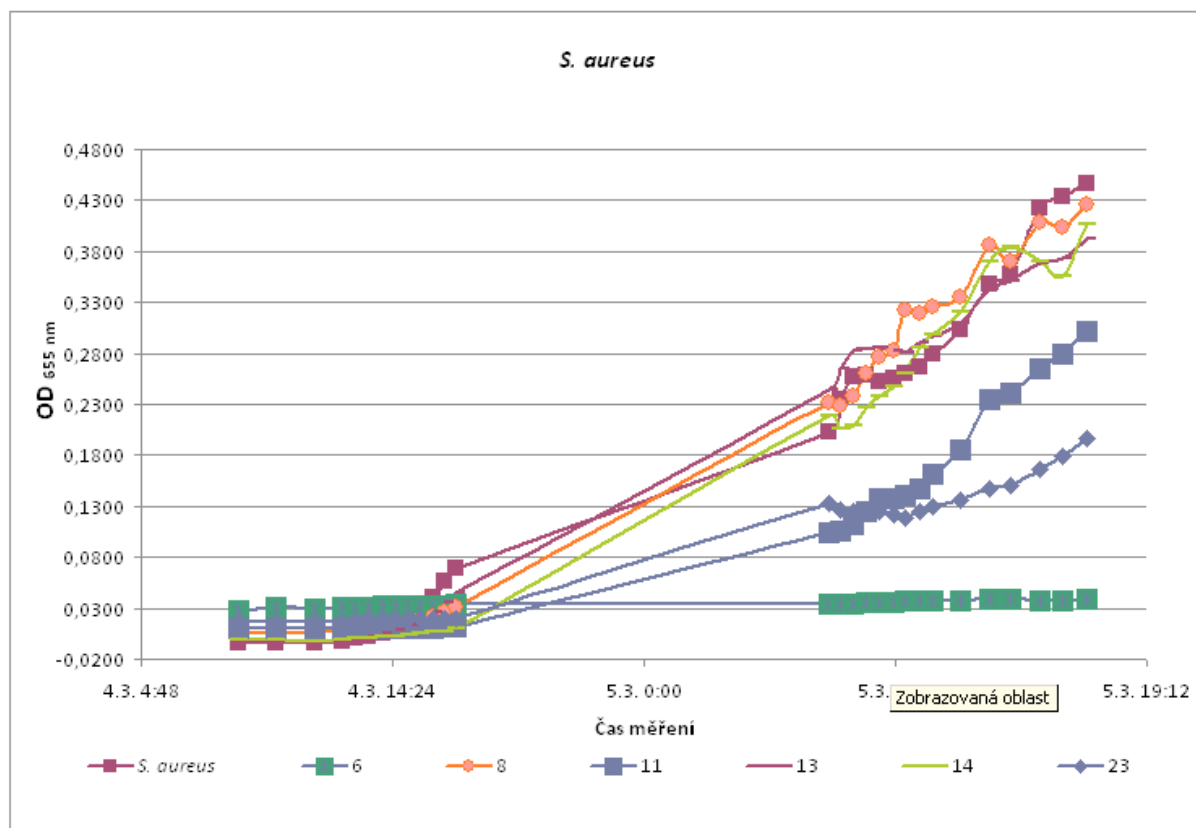
Obr. 20. Měření OD kontroly a vzorků inhibujících E. coli.



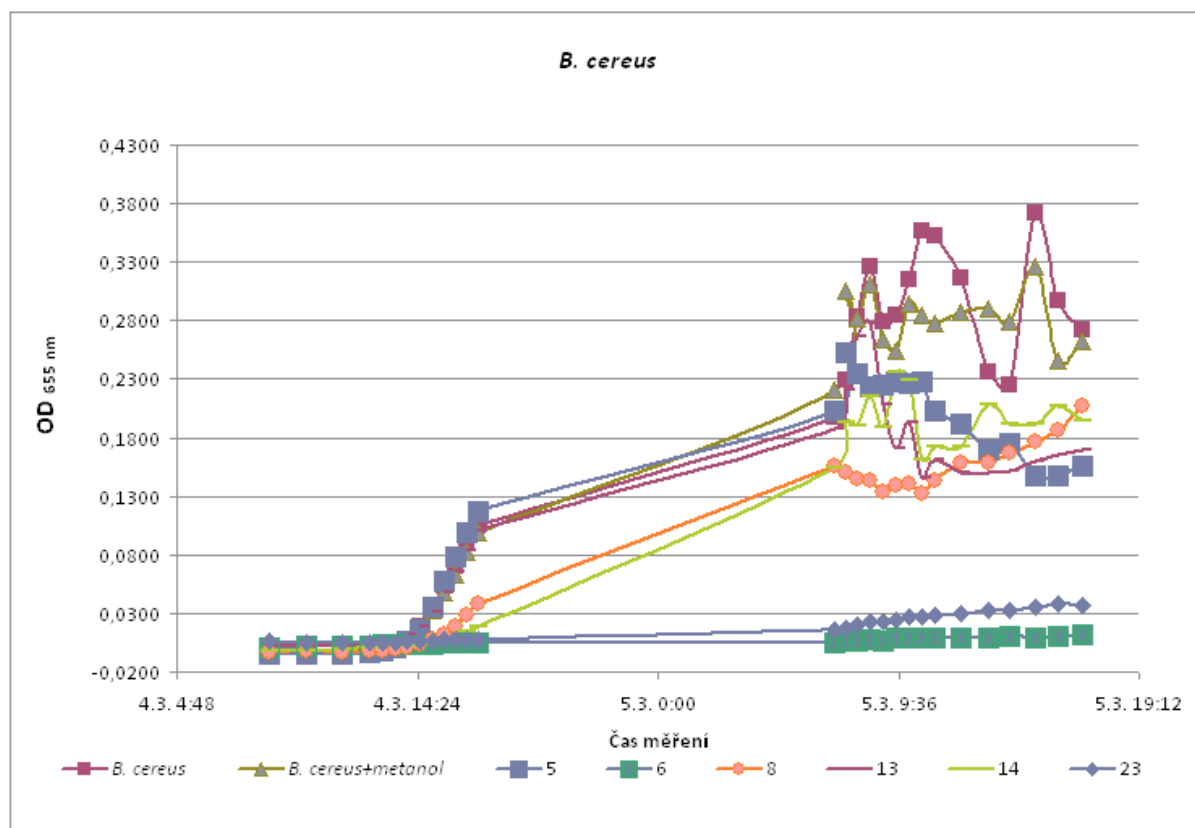
Obr. 21. Měření OD kontroly a vzorků inhibujících S. typhimurium.



Obr. 22. Měření OD kontroly a vzorků inhibujících *M. luteus*.



Obr. 23. Měření OD kontroly a vzorků inhibujících *S. aureus*.



Obr. 24. Měření OD kontroly a vzorků inhibujících *B. cereus*.

Měření optické hustoty poskytlo poměrně velké množství zajímavých výsledků o antimikrobiální účinnosti rostlinných extraktů. Ve srovnání s difuzní diskovou metodou bylo však toto měření podstatně náročnější na čas, obzvláště v době největšího růstu bakterií, kdy byla měření prováděna v krátkých časových intervalech. Oproti časové náročnosti však spektrofotometrické měření optické hustoty poskytuje velké množství dat, která se dají různě kombinovat, porovnávat a statisticky vyhodnocovat. Pro rychlý screening antimikrobiálních účinků rostlinných extraktů je určitě vhodná disková difuzní metoda a pro přesnější vyhodnocení a vzájemné porovnávání antimikrobiálních účinků rostlinných extraktů je výhodné použití měření optické hustoty.

## ZÁVĚR

Hledání přírodních látek, které by bylo možné využít především z hlediska jejich antimikrobiální účinnosti, se dostává do popředí zájmu mnoha vědních oborů a to zejména z důvodu prudkého nárůstu civilizačních chorob. Dalším často diskutovaným problémem posledních let je vzrůstající antibiotická rezistence. Proto existují snahy tyto přetrvávající problémy řešit a to zejména v oblasti hledání přírodních látek vykazujících antimikrobiální účinnost.

Testy provedené v této práci prokazují, že výsledky měření antimikrobiální účinnosti při použití různých metod, ač za použití stejné testované látky a stejného mikroorganismu, mohou být odlišné. Agarová difuzní metoda se pro měření antimikrobiální účinnosti rostlinných metanolových extraktů jeví jako nevhodná. Při použití diskové difuzní metody a spektrofotometrického měření optické hustoty bylo dosaženo dobrých výsledků, přičemž některé výsledky se při použití obou metod shodovaly.

Prokazatelně lepších výsledků dosahovaly vzorky, které byly zakoncentrovány odpařením.

Časová náročnost byla v případě použitých obou difuzních metod zhruba stejná. Obě metody jsou nenáročné z hlediska pracnosti. Při použití diskové difuzní metody bylo použito dvou různých způsobů roztěru inokula, kdy způsob přelití inokula byl mnohem rychlejší a efektivnější v porovnání s klasickým hokejkováním. Při použití spektrofotometrického měření optické hustoty je z důvodu častých měření metoda časově náročná. Takto naměřené výsledky však obsahují soubor velkého množství dat, která je následně možné statisticky dále zpracovávat a vyhodnocovat.

Výzkum provedený v rámci této práce poukázal na možné klady a zápory použitých metod. Je však nutné říci, že se jedná pouze o studii s omezeným rozsahem a je třeba se danou problematikou dále zabývat.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KOPEC, K., Balík, J. *Kvalitologie zahradnických produktů*. 1. vyd. Brno: MZLU, 2008, 171 s. ISBN:978-80-7375-198-2
- [2] MLČEK, J. ROP, O. Fresh edible flowers of ornamental plants - A new source of nutraceutical foods. *Trends in Food Science and Technology*. 2011, vol. 22, p. 561-569
- [3] KOPEC, K. Jedlé květy pro zpestření jídelníčku. *Výživa a potraviny*. 2004, vol. 59, s. 151-152
- [4] MORSOEVÁ, K. *Jedlé květy*. 1. vyd., Praha: Volvox Globator, 1999, 87 s. ISBN 80-7207-254-4
- [5] CICHEWICZ, R.H.; LIM K.C.; MCKERROW, J.H.; NAIR, M.G. Kwanzoquinones A-G and other constituents of *Hemerocallis fulva* 'Kwanzo' roots and their activity against the human pathogenic trematode *Schistosoma mansoni*. *Tetrahedron*, 2002, vol.58, s.8597-8606
- [6] DETLEV, H. *Plané rostliny k jídlu*. 1. vyd., Praha: Granit, 2004, 253 s. ISBN 80-7296-033-4
- [7] SCHERF, G. *Plané rostliny a jejich použití v kuchyni*. 1. vyd., Praha: Pavel Dobrovský BETA, 2004, 128 s. ISBN 80-7306-165-1
- [8] OSIMITZ, T.G. FRANZOSA, J. A. MACIVER, D.R. MAILBACH, H.I. *Pyrethrum allergic contact dermatitis in humans - real?, common?, or not documented? An evidence - based approach*, Cutaneous and ocular Toxicology, no. 4, 2006, vol. 25, p. 287 - 308
- [9] NEGEBAUEROVÁ, J, VÁBKOVÁ, J. Jedlé květy součástí food stylingu, *Zahradnictví*, 2009. vol. 83, s. 22-24
- [10] KELLEY, K.M. CAMERON, A.C. BIERNBAUM, J.A. POFF, K.L. Effect of storage temperature on the quality of edible flowers, *Postharvest Biology and Technology*, 2003, vol. 28, s. 341-344
- [11] PARKINSON, B. PACINI, E.A. Comparison of tapetal structure and function in pteridophytes and angiosperms, *Plant system and Evolution*, 1995, vol. 149, p. 155-185

- [12] DOBSON, H. E. M. Survey of pollen and pollenkitt lipids - chemical cues to flower visitors?, *American Journal of Botany*, 1988, vol. 75, p. 170-182
- [13] LUNAU, K. Notes of the color of pollen. *Plant systematics and evolution*, 1995. vol.198, p. 235-252
- [14] NICOLSON, S.W, NEPI, M. PACINI, E. Nectaries and nectar, *Springer*, 2007, ISBN 978-1-4020-5936-0
- [15] POGOREĽSKAYA, A.N. KHOLODOVA, V.P. REZNIKOVA, S.A. Physiological aspect of essential oil accumulation in petals of essential oil rose, *Fiziologiya Rastanii*, 1980, vol. 27, no. 2, p. 356-362, ISSN 0015-3303
- [16] LE ROY, K., VERGAUWEN, R., CAMMER V., YOSHIDA, M., at al. Fructan 1-exohydrolase is associated with flower openin in *Campanula rapunculoides*, *Functional plant biology*. 2007 no.34, s. 972-983, ISSN 1445-4408
- [17] KELLEY, K. M., BEHE, B.K., BIERNBAUM, J.A., POFF, K.L. Effect of storage temperature on the quality of edible flowers: effects on consumer preferences. *HortScience*, 2002, vol. 37, p. 218-221
- [18] In:Mlsná kočka, [online] [cit.2013-03-15] Dostupné z:  
[http://nd04.jxs.cz/688/453/0533211740\\_76019617\\_o2.jpg](http://nd04.jxs.cz/688/453/0533211740_76019617_o2.jpg)
- [19] SALAŠ, P. Rostliny v podmínkách měnícího se klimatu. Lednice: *Úroda*, vědecká příloha, 2011, s. 519-527, ISSN 0139-6013
- [20] In:Seznamovoce,[online][cit.2013-03-15]Dostupné z:  
<http://ovoce.webzdarma.cz/Jednotlive/Obr/Moruse.jpg>
- [21] GROTEWOLD, E. *The Science of Flavonoids*. New York: Science+Business Media, Inc., 2006. 274 s. ISBN-13:978-0387-28821-5
- [22] COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents, *Clin. Microbiol. Reviews*, 1999, vol 12, no. 4, s. 564-582. ISSN: 0893-8512
- [23] WONG, S.Y., et al. Antibacterial activities of naturally occurring compounds against *Mycobacterium avium* spp.Paratuberculosis. *Applied and enviromental microbiology*, 2008, vol. 73, no. 19, s. 5986-5990. ISSN: 1098-5336
- [24] MORAVCOVÁ, J. *Biologicky aktivní přírodní látky*, Praha:VŠCHT Praha, 2006, 108 s.

- [25] PRABUSEENIVASAN, S., JAYAKUMAR, M., IGNACIMUTHU, S. In vitro antimicrobial activity of some plant essential oils, *BMC complementary and alternative medicine*, 2006, vol. 30, n. 6, s. 39. ISSN: 1472-6882
- [26] BACÍLKOVÁ, B., PAULUSOVÁ, H. *Vliv silic a jejich hlavních účinných látek na mikroorganismy a na archivní materiál*, Praha: Národní archiv, 2012. s. 28
- [27] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*, 2. vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2
- [28] VOON, H., BHAT, R., RUSUL, G. Flower extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Application. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2012, vol.11, s.34-55
- [29] HOUGHTON, P.J., RAMANA, A. *Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts*. London, UK: Chapman and Hall, 1998, s.199
- [30] RICHTER, B.E. et al. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 1996, vol. 68, no. 6, s. 1033 - 1039
- [31] SING, J. *Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants*. Italy: International. Centre for Science and High Technology, 2008, s. 67-82
- [32] In:Písmák, [online][cit.2013-03-15]Dostupné z:  
<http://www.home.karneval.cz/00009044/obr/soxhlet.gif>
- [33] In:epa [online][cit.2013-03-15] Dostupné z:  
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3545a.pdf>
- [34] PURI, M., SHARMA, D., BARROW, C. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants, *Trends in Biotechnology*, 2012, vol. 30, p. 37-43
- [35] POLÁKOVÁ, L., KARLOVÁ T., ŠMIDRKAL, J. , FILIP, V. Enzymová příprava derivátů mastných kyselin s antimikrobiální aktivitou a jejich využití, *Chemické listy*, 2010, vol. 104, s. 692-696
- [36] In: Pedagogická fakulta MU [online] [cit. 2013-03-02] Dostupné z:  
[http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech-old/soubory/operace/separacni\\_metody/destilace.pdf](http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech-old/soubory/operace/separacni_metody/destilace.pdf)



- [37] FAKHARI A.R., SALEHI P., HEYDARI R., et al. Hydrodistillation-headspace solvent microextraction, a new method for analysis of the essential oil components of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Chromatography A* 1098, 2005, s.14-18
- [38] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vydání, Praha: Viktoria publishing, 1995, 361s. ISBN 80-85605-71-6
- [39] KALEMBA, D., KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 2003, vol. 10, no. 10, s. 813-829
- [40] VINŠOVÁ, J., IMRANOVSKÝ, A. Salicylanilidy - stále aktuální skupina s potenciální antibakteriální aktivitou, *Česká a slovenská farmacie*, 2004, vol. 53, o. 6, s.294-299
- [41] OPLETAL, L., ŠIMERDA, B. Antiinvazivní látky přírodního původu jako aditiva do krmiv, Ministerstvo zemědělství ČR - Vědecký výbor pro výživu zvířat, Výzkumný ústav pro výživu zvířat, 2005, s. 27-37
- [42] DEMNEROVÁ, K. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. 3. vydání, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 179 s. ISBN 80-7080-415-7
- [43] SHARAMON, S., BAGINSKI, B.J. *Zázračná síla grapefruitu*, Praha: Pragma, 1999, 190 s., ISBN 8072053876
- [44] HUBÍK, J., DUŠEK, J., SPILKOVÁ, J., ŠÍCHA, J. *Obecná farmakognosie. II. Sekundární látky*. UK v Praze, SPN Praha, 1989
- [45] NGUYEN, D.V., TAKÁCSOVÁ, M. JAKUBÍK, T., KRISTIÁNOVÁ, K., DANG, M.N. Antioxidative Effect and composition of allspice in rapeseed oil. *Czech Journal of Food Science*. Praha: Česká akademie zemědělských věd, 2000, vol. 18, s.150-152
- [46] BABULA, P. at all. Studium biologické aktivity naftochinonů, In: linkos [online]. May 26, 2004 [cit. 2012-09-03]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-bstrakt/abstrakta/cislo/297/>

- [47] HYNIE, S. *Speciální farmakologie VII/B. Protiinfekční léčiva*, Praha: Karolinum, 2003, s. 16-18
- [48] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*, Praha: Academia, 2002. s. 67-80
- [49] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin 3. 2. vyd.* Tábor: Nakladatelství OSSIS, 2002. 368 s., ISBN 80-86659-02-X
- [50] KAZMI, M.H. et al. An anthraquinone derivative from *Cassia italica*. *Phytochemistry*, 1994, vol. 36, s. 761-763. ISSN:1874-3900
- [51] VELÍŠEK, J., CEJPEK, K. *Biosynthesis of Food Components*. Tábor: Osis, 2008
- [52] In: agris [online] [cit.2013-03-14] Dostupné z: <http://www.agris.cz/clanek/139016>
- [53] URBÁŠKOVÁ, P. *Rezistence bakterií k antibiotikům, Vybrané metody*. Praha: Trios, 1998, ISBN 80-238-3106-2
- [54] URBÁŠKOVÁ, P., SCHINDLER, J., TICHÁČEK, B., POTUŽNÍK, V. *Vyšetření pro antimikrobiální terapii*, Praha: Avicenum, 1985, s. 19-31
- [55] URBÁŠKOVÁ, P., SCHINDLER, J., TICHÁČEK, B., POTUŽNÍK, V. *Vyšetření pro antimikrobiální terapii*. Avicenum, 1985, 150 s.
- [56] LOCHMAN, O. *Základy antimikrobiální terapie*. 2.vyd. Praha: Triton, 1999, 127 s., ISBN 80-7254-005-X
- [57] In: WikiSkrita, [online] [cit.2013-03-15] Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Diskov%C3%BD\\_difuzn%C3%AD\\_test](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Diskov%C3%BD_difuzn%C3%AD_test)
- [58] DIDRY, N., DUBREUIL, L., TROTIN, F., PINKAS, M. Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination, *Pharmazie*, 1993, vol. 48, no. 4, s. 301 - 304
- [59] KIM, J., MARSHALL, M.R. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens, *J. Agric. Food. Chem.*, 1995, vol. 43, s. 2839 - 2845
- [60] WANG, P., KONG, C.H., ZHANG, C.X. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ambrosia trifida* L., *Molecules.*, 2006, vol 11, no. 7, s. 549 – 555

- [61] Tan, S.P., Lawlor P.G., Leonard, F. Extraction and bioautographic-guided separation of antibacterial compounds from *Ulva lactuca*, *Springer Science+Business Media B.V.* , 2011, DOI 10.1007/s10811-011-9747-3
- [62] NEDOROSTOVA, L. KLOUCEK, P. KOKOSKA, L. STOLCOVA, M. PULKRABEK, J. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, 2009, vol.20, p. 157-160
- [63] In:3.lékařská fakulta UK, [online] [cit.2013-03-15] Dostupné z:  
<http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/rep/graphics/micdest.jpg>
- [64] In:antranik, [online] [cit.2013-03-15] Dostupné z: [http://antranik.org/wp-content/uploads/2012/06/NotesforFinalExam\\_html\\_m10026864-300x206.jpg](http://antranik.org/wp-content/uploads/2012/06/NotesforFinalExam_html_m10026864-300x206.jpg)
- [65] ORMEROD, M.G. *Flow Cytometry*. Second Edition, IRL Press, Oxford, New York, 1994
- [66] SHAPIRO, H. M. *Practical Flow Cytometry*, Third Edition, Willey-Liss, New York-Chichester, 1995
- [67] BANTOVÁ, A. *Možnosti využití rostlinných extraktů pro snížení povrchové kontaminace chlazené drůbeže*. Zlín, 2010. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav biochemie a analýzy potravin. Vedoucí diplomová práce Mgr. Magda Doležalová, PhD.
- [68] KUTŇÁK, M. *Antimikrobiální účinky extraktů z jedlých květů a netradičních druhů ovoce*. Zatím nepublikováno. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav biochemie a analýzy potravin. Vedoucí diplomová práce Mgr. Magda Doležalová, PhD.
- [69] WANG, P. KONG, C.H. ZHANG, C.X. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ambrosia trifida*.L. , *Molecules*, 2006, vol. 25, s. 549- 555, ISN 1420-3049
- [70] BORCHARD, J.R., WYSE, D.L., SHEAFFER, C. C. at all. Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin, *Journal of medicinal plants research*, vol. 2, s. 98-110
- [71] RASOOLI, L. MIRMOSTAFA, S.A. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, vol. 51, no. 8, p.

2200-2205, ISSN 1520-5118

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

ATB antibiotikum

DNA deoxyribonukleová kyselina

RNA ribonukleová kyselina

MHA Mueller - Hintonův agar

MHB Mueller - Hintonův bujón

McF McFarlandův stupeň

MTT 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid

MIC minimální inhibiční koncentrace

MBC minimální baktericidní koncentrace

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obr. 1. Jedlé květy</i> .....	14
<i>Obr. 2. Moruše</i> .....	15
<i>Obr. 3. Soxhletův extraktor</i> .....	18
<i>Obr. 4. Měření průměru inhibiční zóny u difuzní diskové metody</i> .....	29
<i>Obr. 5. Titrační mikrodestička</i> .....	31
<i>Obr. 6. E-test</i> .....	32
<i>Obr. 7. Měření OD kontroly růstu <i>P. fluorescens</i></i> .....	46
<i>Obr. 8. Měření OD kontroly růstu <i>E. coli</i></i> .....	47
<i>Obr. 9. Měření OD kontroly růstu <i>S. typhimurium</i></i> .....	47
<i>Obr. 10. Měření OD kontroly růstu <i>M. luteus</i></i> .....	48
<i>Obr. 11. Měření OD kontroly růstu <i>S. aureus</i></i> .....	48
<i>Obr. 12. Měření OD kontroly růstu <i>B. cereus</i></i> .....	49
<i>Obr. 13. Měření OD kontroly a testovaných extraktů s bakterií <i>P. fluorescens</i></i> .....	50
<i>Obr. 14. Měření OD kontroly a testovaných extraktů s bakterií <i>E. coli</i></i> .....	50
<i>Obr. 15. Měření OD kontroly a testovaných extraktů s bakterií <i>S. typhimurium</i></i> .....	51
<i>Obr. 16. Měření OD kontroly a testovaných extraktů s bakterií <i>M. luteus</i></i> .....	51
<i>Obr. 17. Měření OD kontroly a testovaných extraktů s bakterií <i>S. aureus</i></i> .....	52
<i>Obr. 18. Měření OD kontroly a testovaných extraktů s bakterií <i>B. cereus</i></i> .....	52
<i>Obr. 19. Měření OD kontroly a vzorků inhibujících <i>P. fluorescens</i></i> .....	53
<i>Obr. 20. Měření OD kontroly a vzorků inhibujících <i>E. coli</i></i> .....	54
<i>Obr. 21. Měření OD kontroly a vzorků inhibujících <i>S. typhimurium</i></i> .....	54
<i>Obr. 22. Měření OD kontroly a vzorků inhibujících <i>M. luteus</i></i> .....	55
<i>Obr. 23. Měření OD kontroly a vzorků inhibujících <i>S. aureus</i></i> .....	55
<i>Obr. 24. Měření OD kontroly a vzorků inhibujících <i>B. cereus</i></i> .....	56

**SEZNAM TABULEK**

*Tab. 1. Seznam vzorků. .... 36*

*Tab. 2. Výsledky měření difuzní diskové metody, velikost zón v [mm]. .... 44*