



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra agroekosystémů

Diplomová práce

Hodnocení antifungální aktivity esenciálních olejů
prostřednictvím vybraných laboratorních metod

Autorka práce: Bc. Viola Kratochvílová

Vedoucí práce: Mgr. Ing. Kristýna Perná, Ph.D.

České Budějovice
2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

V současné době je využití antifungální aktivity esenciálních olejů při skladování zeleniny a potravin stále sledovanějším a zkoumanějším tématem. Antifungální účinky esenciálních olejů nabízí možnost prodloužení trvanlivosti potravin a snížení ztrát způsobených houbami a jinými mikroorganismy. Jedná se o přírodní látky, které pro člověka ani životní prostředí nejsou toxické. V poslední době zaznamenávají esenciální oleje rostoucí popularitu díky svému různorodému využití nejen např. v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, ale i v našich domácnostech. Tato popularita podporuje zájem o jejich využití v potravinářství jakožto přírodního prostředku ke snižování výskytu hub a prodlužování trvanlivosti potravin.

Cílem diplomové práce je porovnání antifungální účinnosti vybraných esenciálních olejů vůči izolovaným mikroskopickým houbám z kořenové zeleniny a porovnání vybraných metod použitých k hodnocení. Literární rešerše předložené práce shrnuje dosavadní znalosti z oblasti antimikrobiálních účinků esenciálních olejů, které nabízí možnost prodloužení trvanlivosti potravin a snížení ztrát způsobených houbami a jinými mikroorganismy. V rámci praktické části jsou z kořenové zeleniny izolovány 4 nejčtenější morfotypy mikroskopických hub (*Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Trichoderma* sp. a *Chalaropsis thielavioides*), které jsou využity při testování antifungální aktivity vybraných esenciálních olejů (citronelový, hřebíčkový, dobromyslový, mátový, skořicový a tymiánový) prostřednictvím metody diskové difuze a mikrodiluční metody. Výsledky metody diskové difuze a mikrodiluční metody se navzájem mírně liší. Při mikrodiluční metodě vychází inhibice esenciálních olejů mírně vyšší, pravděpodobně z důvodu obsahu těkavých látek, které se v uzavřeném prostoru mikrodestičky efektivněji šířily, a tím silněji ovlivňovaly růst testovaných hub. Avšak tři nejúčinnější oleje se v obou metodách shodují. Konkrétně jsou to oleje z dobromysli, tymiánu a skořice. Stejně tak se shoduje v obou metodách i nejméně účinný olej – mátový.

Klíčová slova: antifungální aktivita, esenciální oleje, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Chalaropsis thielavioides*

Abstract

The utilization of the antifungal activity of essential oils in the storage of vegetables and food is becoming an increasingly monitored and researched topic currently. The antifungal effects of essential oils offer the possibility of extending the shelf life of food and reducing losses caused by fungi and other microorganisms. These are natural substances that are non-toxic to humans or the environment. Essential oils have recently gained popularity due to their diverse applications, not only in industries such as cosmetics and pharmaceuticals but also in our households. This popularity supports the interest in their use in food as a natural means of reducing fungal occurrence and extending the shelf life of food.

The aim of this thesis is to compare the antifungal effectiveness of selected essential oils against isolated microscopic fungi from root vegetables and to compare selected methods used for evaluation. The literature review presented in this thesis summarizes the current knowledge in the area of the antimicrobial effects of essential oils, which offer the possibility of extending the shelf life of food and reducing losses caused by fungi and other microorganisms. In the practical part, the four most common morphotypes of microscopic fungi (*Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Trichoderma* sp., and *Chalaropsis thielavioides*) are isolated from root vegetables, which are used in testing the antifungal activity of selected essential oils (citronella, clove, dill, peppermint, cinnamon, and thyme) using the disk diffusion method and the microdilution method. The results of the disk diffusion method and the microdilution method slightly differ from each other. The inhibition of essential oils appears slightly higher in the microdilution method, likely due to the presence of volatile compounds that more effectively spread within the enclosed space of the microplate, thus exerting a stronger influence on the growth of the tested fungi. However, the three most effective oils are consistent in both methods. Specifically, these are the oils of dill, thyme, and cinnamon. Similarly, the least effective oil is consistent in both methods – peppermint oil.

Keywords: antifungal activity, essential oils, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Chalaropsis thielavioides*

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala paní Mgr. Ing. Kristýně Perné, Ph.D. za odborné vedení, rady, poskytnutý čas při konzultacích a za pomoc v průběhu prováděného měření.

Obsah

Úvod.....	8
1 Literární část.....	9
1.1 Esenciální oleje	9
1.1.1 Chemické složení esenciálních olejů	9
1.1.2 Získávání a výroba esenciálních olejů	10
1.1.3 Využití esenciálních olejů	11
1.1.4 Skladování esenciálních olejů	12
1.2 Antimykotické látky	13
1.2.1 Antimykotické účinky esenciálních olejů	13
1.3 Charakteristika vybraných esenciálních olejů.....	14
1.3.1 Dobromysl obecná (<i>Origanum vulgare</i>)	14
1.3.2 Máta peprná (<i>Mentha piperita</i>)	15
1.3.3 Tymián obecný (<i>Thymus vulgaris</i>).....	16
1.3.4 Citronela jávská (<i>Cymbopogon winterianus</i>).....	17
1.3.5 Hřebíčkovce kořený (<i>Syzygium aromaticum</i>)	18
1.3.6 Skořicovník pravý (<i>Cinnamomum verum</i>)	20
1.4 Houby (<i>Fungi</i>).....	21
1.4.1 Obecná charakteristika	21
1.4.2 Mikroskopické houby	21
1.4.3 Charakteristika vybraných mikroskopických hub.....	21
Cíl práce	24
2 Metodika	25
2.1 Izolace mikroskopických hub z přirozeného substrátu	25
2.1.1 Inkubace zeleniny ve vlhkých komůrkách	26
2.1.2 Inkubace zeleniny na agarových plotnách	27

2.1.3	Výběr a determinace kmenů mikroskopických hub.....	27
2.2	Testování antifungální aktivity	29
2.2.1	Metoda diskové difuze	29
2.2.2	Mikrodiluční metoda.....	30
3	Výsledky	31
3.1	Metoda diskové difuze	31
3.1.1	Vliv esenciálních olejů na růst <i>Fusarium</i> sp.....	31
3.1.2	Vliv esenciálních olejů na růst <i>Paecilomyces</i> sp.....	33
3.1.3	Vliv esenciálních olejů na růst <i>Trichoderma</i> sp.....	34
3.1.4	Vliv esenciálních olejů na růst <i>Chalaropsis thielavioides</i>	35
3.2	Mikrodiluční metoda.....	37
3.2.1	Antifungální aktivita citronového EO	37
3.2.2	Antifungální aktivita dobromyslového EO	38
3.2.3	Antifungální aktivita hřebíčkového EO	39
3.2.4	Antifungální aktivita mátového EO	40
3.2.5	Antifungální aktivita skořicového EO	42
3.2.6	Antifungální aktivita tymiánového EO	43
4	Diskuze.....	44
5	Závěr	46
	Seznam použité literatury.....	1
	Seznam obrázků	10
	Seznam grafů.....	11
	Seznam tabulek	12
	Seznam použitých zkratk.....	13

Úvod

Problematika mikroskopických hub v potravinách představuje významný zdravotní i ekonomický problém po celém světě. Tyto mikroskopické houby způsobují znehodnocení potravin, snižují jejich trvanlivost a mohou produkovat toxiny škodlivé pro zdraví lidí. V posledních letech se zvyšuje zájem o alternativní přírodní prostředky k ochraně potravin před mikrobiální kontaminací a ztrátou kvality.

Esenciální oleje se stávají stále populárnější volbou díky svým přírodním antifungálním vlastnostem a širokému spektru biologické aktivity. Obsahují mnoho bioaktivních sloučenin, které vykazují inhibiční účinky vůči růstu mikroorganismů, včetně mikroskopických hub. Jejich potenciál jako alternativních antimikrobiálních látek je stále více zkoumán jak ve vědeckém, tak i v průmyslovém prostředí. Esenciální oleje by mohly přispět k prevenci výskytu mikroskopických hub v potravinách, a tedy i prodloužit jejich trvanlivost, což by zároveň chránilo zdraví spotřebitelů a snižovalo vznik ekonomických ztrát.

1 Literární část

1.1 Esenciální oleje

Esenciální oleje (EO), také zvané éterické oleje, či silice, představují směsi látek, které jsou součástí vnitřní struktury aromatických rostlin (Loza-Tavera, 1999). Jedná se o přirozeně se vyskytující látky v květech, listech, kůře, kořenech, semenech a dalších částech těchto rostlin (Harding, 2016). Vizuální rozdíly mezi EO jsou značné, některé jsou bezbarvé, jiné vykazují široké spektrum odstínů, od světle žluté až po červeno-oranžovou (např. skořicový nebo santalový olej) (Haro-González, 2021).

Nejčastěji využívané EO jsou získávány z květů, např. z jasmínu (*Jasminum* spp.), růže (*Rosa* spp.), violek (*Viola* spp.) a levandule (*Lavandula* spp.). Mezi další často využívají zdroje patří listy rostlin, jako je např. tymián obecný (*Thymus vulgaris*), eukalyptus (*Eucalyptus* spp.), máta peprná (*Mentha piperita*), rozmarýn lékařský (*Salvia rosmarinus*) a voňatka citronová (*Cymbopogon citratus*). Často využívané rostliny, jejichž silice jsou obsaženy v plodech, jsou např. pomerančovník čínský (*Citrus sinensis*), citroník pravý (*Citrus limon*) a badyáník pravý (*Illicium verum*). Mezi rostliny s obsahem silic v semenech patří např. kardamovník obecný (*Elettaria cardamomum*), kávovník arabský (*Coffea arabica*) a pepřovník černý (*Piper nigrum*). Kromě toho se také využívá kůra např. v případě skořicovníku pravého (*Cinnamomum verum*) (Haro-González, 2021; Husičková, 2022).

1.1.1 Chemické složení esenciálních olejů

Složení EO z hlediska chemické stránky je velmi komplexní. Ve směsi čistých EO se nachází více než 200 složek. Obecně jsou charakterizovány dvěma nebo třemi hlavními složkami, které se v EO vyskytují v koncentraci 20–70 % (Canadian.cz, 2020; Hanif et al., 2019).

Obvykle směsi EO obsahují deriváty fenyylpropanů nebo terpeny. Mohou být klasifikovány do dvou částí – prchavá část (90–95 %) a stabilní zbytek (1–10 %). Prchavá část obsahuje zejména monoterpeny, seskviterpeny a jejich kyslíkaté deriváty. Těkavé látky EO mají tendenci odpařovat se při relativně nízkých teplotách (Cavanagh, 2008; Haro-González, 2021). Stabilní zbytek obsahuje mastné kyseliny, uhlovodíky, steroly, vosky, flavonoidy a karotenoidy. Přítomnost a koncentrace určitých chemických složek EO v rostlině také kolísají v závislosti na ročním období,

klimatických podmínkách a na místě růstu rostliny (Saharkhiz et al., 2012; Hanif et al., 2019).

Monoterpeny

Monoterpeny jsou acyklické, monocyklické nebo bicyklické C₁₀-izoprenoidy. Skládají se ze dvou izoprenových jednotek C₅ (Loza-Tavera, 1999).

Jsou to přírodní látky vyskytující se v EO, které přispívají k charakteristické vůni a chuti rostliny. Uplatňují se v regulaci růstu, reprodukčním cyklu a obranných mechanismech rostlin. Mezi významné monoterpeny, které mají převážně komerční význam, patří menthol, menthon, kafa, karvon, tymol, fenchon a alfa-pinen (Loza-Tavera, 1999; Dvořáková a spol., 2011).

Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou bezbarvé organické sloučeniny s molekulárním vzorcem C₁₅H₂₄. Tyto molekuly jsou sestaveny ze tří izoprenových jednotek a obvykle se vyskytují ve formě izopentenylového zbytku, neboť čistý izopren se v přírodě téměř nevyskytuje. Podobně jako monoterpeny mohou mít seskviterpeny acyklickou, cyklickou i bicyklickou strukturu (Ashour et al., 2010; Horáčková, 2018).

Některé seskviterpeny mohou vykazovat protizánětlivé, antiparazitické a antikarcinogenní vlastnosti, avšak jiné mohou mít toxické účinky a způsobovat nežádoucí důsledky (Příkrylová, 2018).

1.1.2 Získávání a výroba esenciálních olejů

EO jsou extrahovány z celé rostliny nebo z její části. Způsob extrakce je velmi důležitý aspekt konečné kvality EO. Získání EO probíhá prostřednictvím různých metod, jejichž použití se liší v závislosti na rostlině, z níž se olej extrahuje. Mezi nejčastěji používané metody patří destilace vodní parou, hydrodestilace a lisování za studena (Loza-Tavera, 1999).

Destilace vodní parou

Tento proces zahrnuje ohřátí rostlinného materiálu ve vodní páře. Pára extrahuje aromatické látky z rostlinného materiálu a následně se kondenzuje do tekuté formy, což vede k tvorbě EO. Tato metoda je velmi hojně využívána nejen z důvodu extrakce EO, ale také pro vznik vedlejšího produktu ve formě květinové vody, která má široké využití v kosmetickém či farmaceutickém průmyslu (Tuley de Silva, 1995).

Hydrodestilace

Hydrodestilace je metoda extrakce EO z rostlinného materiálu, která využívá páru vznikající při ohřevu směsi rostlinného materiálu ve vodě. Při tomto procesu jsou aromatické látky z rostliny vydány do páry a následně kondenzovány do EO (Tuley de Silva, 1995; Başer et Buchbauer, 2010).

Lisování za studena

Tato metoda je obvyklá pro získání EO z citrusových plodů, jako jsou pomeranče, citrony nebo grep. Při tomto procesu se díky působení tlaku mechanicky rozdrtí olejové buňky v kůře citrusových plodů, a tím se uvolní jejich obsah. Tento obsah je následně smíchán s vodou, se kterou společně vytvoří vodní emulzi. Směs se poté odstředí a tím se oddělí EO. Tyto oleje jsou běžně dostupné a z tohoto důvodu také často využívány v kosmetickém a aromaterapeutickém průmyslu (Tisserand a Young, 2014).

1.1.3 Využití esenciálních olejů

EO mají širokou škálu využití a jsou hojně využívány již od středověku pro jejich baktericidní, virucidní, fungicidní, antiparazitické či insekticidní účinky. V dnešní době jsou využívány zejména ve farmaceutickém, hygienickém, kosmetickém, zemědělském a potravinářském průmyslu (Cavanagh, 2007; Bakkali et al., 2008).

Výpary EO jsou pro rostliny důležité z důvodu plnění mnoha funkcí. Jsou využívány rostlinami jako prostředek k lákání opylovačů, pravděpodobně hrají roli v komunikaci mezi rostlinami a působí jako přirozený obranný mechanismus proti patogenům a predátorům, včetně mikroorganismů, hmyzu nebo býložravců (Cavanagh, 2007).

Jejich silné aroma může pozitivně ovlivňovat náladu a duševní pohodu lidí, což je jedním z důvodů, proč jsou tak oblíbené v aromaterapii. EO se dále uplatňují například v přírodních medicínách, jako je např. čínská medicína nebo ájurvéda (Cavanagh, 2007; Zrubecká, 2021). Potenciálním odvětvím využití EO je konzervace a prodloužení trvanlivosti výrobků (Saharkhiz et al., 2012). Dále se dají využít jako ekologicky šetrné lákající látky k chytání škodlivých hmyzích škůdců s imitací jejich vlastních feromonů, a dokonce i jako léčiva pro terapii mnoha nemocí, včetně nádorů (Breitmaier, 2006).

Aromaterapie

Aromaterapie je označení pro přírodní terapeutickou metodu, která cíleně využívá léčivých vlastností aromatických EO za účelem udržení nebo zlepšení zdraví, ale také k navození fyzické, duševní a emoční pohody. EO ovlivňují naši mysl prostřednictvím čichu, což má komplexní účinek na neurochemické procesy, emoce a chování. Vnímání vůní aktivuje limbický systém mozku, který ovlivňuje paměť, emoce a chování, a umožňuje rychlé vzpomínání a mentální „cestování časem a prostorem“, což přispívá k psychologickému efektu esencí (Harding, 2016; Zrubecká, 2021).

EO se díky své prchavosti odpařují do okolního prostředí, které díky svým antimikrobiálním účinkům „čistí“ od nežádoucích mikroorganismů. Při následném vdechnutí putuje vzduch s obsahem EO do plic, kde se vstřebává a vstupuje přímo do krevního oběhu. EO je možné ve zředěné koncentraci využívat přímo na kůži, např. při masáži či koupeli, kdy se vstřebávají pokožkou a mohou eliminovat patogenní organismy, a to díky svým antiseptickým a antibakteriálním vlastnostem. Správně dávkované EO nemají vedlejší účinky a mohou posilovat obranyschopnost organismu a předcházet komplikacím (Zrubecká, 2021).

1.1.4 Skladování esenciálních olejů

Při dlouhodobém skladování za nepříznivých podmínek jsou EO citlivé na chemickou degradaci. Třemi hlavními faktory zodpovědnými za tuto degradaci jsou teplo, světlo a kyslík. Při skladování v tmavých, chladných a uzavřených nádobách se může délka degradace prodloužit o měsíce až roky, avšak při skladování v nevhodných podmínkách může proběhnout během několika dnů či týdnů (Tisserand, 2013).

Negativní účinky tepla na EO nejsou dosud plně prozkoumány, ale některé studie naznačují významné rozdíly vlivu teplotních podmínek mezi různými druhy EO. Citlivost EO na teplotní změny může být ovlivněna jejich obsahem monoterpenů.

Světlo, zejména UV záření, může vést k tvorbě reaktivních kyslíkových volných radikálů, což může také ovlivnit složení EO.

Atmosférický kyslík může změnit chemické složení EO oxidací, což způsobuje ztrátu terapeutických vlastností a může zvýšit alergenní potenciál. Skladování v chladu a temnu může tento proces zpomalit. Citrusové oleje jsou zvláště citlivé na oxidaci kvůli obsahu limonenu (Tisserand a Young, 2014).

1.2 Antimykotické látky

Antimykotické účinky může vykazovat řada chemických sloučenin, které mají schopnost potlačovat nebo usmrcovat houby či jiné mikroorganismy způsobující infekce. Mezi tyto sloučeniny patří např. některé organické kyseliny, jódové sloučeniny a mnoho dalších. Tyto látky mohou působit buď specificky na mikroskopické houby nebo nesespecificky na různé mikroorganismy, včetně bakterií. Jsou důležité v léčbě mykotických infekcí, které mohou postihnout různé části lidského těla (Nazzaro et al., 2017).

Antimykotika v zemědělství chrání rostliny před houbovými chorobami, které mohou snížit výnosy a poškodit plodiny. Jsou aplikována na semena, části vzrostlých rostlin nebo do půdy, aby předešla vzniku a šíření houbových infekcí. Používání antimykotik v zemědělství je součástí integrovaného managementu rostlin. Při využívání těchto postupů je však důležité dodržovat přísné regulace a postupy pro minimalizaci negativních dopadů na životní prostředí a lidské zdraví (Brauer et al., 2019; Chiu et al., 2022).

1.2.1 Antimykotické účinky esenciálních olejů

Zájem o antimykotickou aktivitu EO v posledních letech výrazně vzrostl. Bylo prokázáno, že těkavé složky některých EO mají silnou antimykotickou aktivitu, často vyšší než při přímém kontaktu (Cavanagh, 2007). Z přírodních látek patří EO mezi nejnadějnější možnosti pro potlačení růstu hub. Mnoho druhů EO z různých rostlin nebo bylin vykazuje vysoké antimykotické vlastnosti. Tyto oleje, stejně jako jiné rostlinné látky, mohou potlačit růst mikroorganismů a tvorbu biofilmu pomocí specifických mechanismů (Uma et al., 2017).

Za antimikrobiální nebo antimykotickou aktivitu EO mohou být zodpovědné vlastnosti terpenů a terpenoidů. Tyto látky, díky své vysoké lipofilnosti a nízké molekulové hmotnosti, dokáží narušit buněčnou membránu, což vede k buněčné smrti nebo inhibici sporulace a klíčení hub, které mohou způsobovat onemocnění rostlin, kožní infekce či degradaci zemědělské produkce a potravin (Nazzaro et al., 2017)

1.3 Charakteristika vybraných esenciálních olejů

1.3.1 Dobromysl obecná (*Origanum vulgare*)

Taxonomické zařazení (dle Biolib.cz):

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)

Řád: hluchavkotvaré (*Lamiales*)

Čeleď: hluchavkovité (*Lamiaceae*)

Rod: dobromysl (*Origanum*)

Druh: dobromysl obecná (*Origanum vulgare* L.)

Charakteristika

Dobromysl obecná (*O. vulgare* L.), známá též pod názvem oregano, je vytrvalá bylina původně pocházející z oblasti Středomoří a západná Eurasie. Následně byla zavlečena i do Severní Ameriky (Pezzani et al., 2017). Jedná se o rostlinu dorůstající kolem 30–50 cm výšky. Na listech, listenech a kalichu se vyskytují polokulovité tmavé lesklé žlázy, které vylučují silice (Möllerová, 2008).

Tato aromatická bylina je využívána po celém světě jako koření a léčivá rostlina současně (Pezzani et al., 2017). Je používána jako prostředek k léčbě mnohých onemocnění, jako jsou křečovitý kašel, zažívací potíže a menstruační problémy. Dále je široce využívána ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu, jako aromatická přísada potravinářských výrobků, alkoholických nápojů a v parfumerii pro svou kořenitou vůni (Şahin et al., 2004).

Využití dobromyslového esenciálního oleje

EO *Origanum vulgare* se vyznačuje žlutohnědou barvou a charakteristickou výraznou, příjemnou kořeněnou vůní (Aromakh.cz, 2024). Hlavními složkami oleje jsou zejména cymen, terpinen, thymol, 4-terpineol a karvakrol (Pezzani et al., 2017; Oniga et al., 2018).

V lékařství se EO *O. vulgare* využívá na podporu obranyschopnosti organismu, zvyšuje chuť k jídlu, redukuje nadýmání, přispívá k udržení optimálního krevního tlaku, pomáhá snižovat teplotu těla, je užitečný při revmatických potížích, funguje jako

repellent a má protiplísňové vlastnosti. Je silným antiseptikem. Je vhodný pro mastnou, problematickou a aknézní pleť. Přidává se do masážních olejů pro uvolnění bolestivých a ztuhlých svalů a je součástí produktů pro ústní hygienu. V aromaterapii se využívá na povzbuzení paměti a pomáhá při psychosomatických problémech (Harding, 2016; Bora, 2022).

1.3.2 Máta peprná (*Mentha piperita*)

Taxonomické zařazení (dle Biolib.cz):

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)

Řád: hluchavkotvaré (*Lamiales*)

Čeleď: hluchavkovité (*Lamiaceae*)

Rod: máta (*Mentha*)

Druh: máta peprná (*Mentha piperita* L.)

Charakteristika

Máta peprná (*M. piperita* L.) vznikla jako hybridní druh z máty klasnaté (*M. spicata* L.) a máty vodní (*M. aquatica* L.). Pravděpodobně pochází ze západní Evropy a v současnosti je rozšířená v mírných klimatických podmínkách po celém světě. Pěstuje se i v České republice. Jedná se o vytrvalou bylinu dorůstající výšky 40–80 cm a vytvářející nadzemní plazivé výběžky (Pazdera, 2015).

Mátové druhy byly známy a člověkem využívány již před více než 2000 lety. Samotná máta se používá více než 250 let (Saharkhiz et al., 2012). *M. piperita* je celosvětově pěstovanou vytrvalou bylinou typickou svým svěžím, „větrovým“ aromatem. Čaj z máty blahodárně působí na trávicí trakt a pomáhá při enteritidě, nadýmání, střevní kolice a onemocnění žlučníku (McKay et al., 2006).

Využití mátového esenciálního oleje

EO *M. piperita* má světle žlutou barvu, je znám svou chladivou, štiplavou, mentolovou vůní s čistými sladkými tóny (Harding, 2016). Hlavními sloučeninami EO z máty jsou menthon, mentol, menthofuran, β -felandren, isomenthon, acetat mentolu, β -karyofylen a 1,8-cineol (Moghaddam et al., 2013).

M. piperita je druh, který má ekonomickou hodnotu zejména díky svému aroma, vůni a léčivým vlastnostem. Vědecky je prokázáno mnoho prospěšných účinků, např. antivirové, antibakteriální, analgetické a antioxidantní účinky. Kromě toho bylo prokázáno, že EO *M. piperita* má inhibiční účinky proti růstu hub a produkci aflatoxinu druhu *Aspergillus* (Saharkhiz et al., 2012).

V aromaterapii se EO *M. piperita* využívá při obnově energie při vyčerpání, na podporu pozitivitu a zklidnění mysli. J. Harding (2016) doporučuje mátový olej na zmírnění zažívacích problémů, včetně bolesti břicha a žaludeční potíže. Dále je vhodný pro problematickou pleť s akné. Má chladivý efekt a podporuje prokrvení pokožky. Používá se v přípravcích na masáže a pro ústní hygienu (Shah a Millo, 2004).

1.3.3 Tymián obecný (*Thymus vulgaris*)

Taxonomické zařazení (dle Biolib.cz):

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)

Řád: hluchavkotvaré (*Lamiales*)

Čeleď: hluchavkovité (*Lamiaceae*)

Rod: mateřídouška (*Thymus*)

Druh: tymián obecný (*Thymus vulgaris* L.)

Charakteristika

Tymián obecný (*T. vulgaris* L.), také znám jako mateřídouška obecná, je malá vytrvalá poloopadavá bylina dorůstající délky 30 cm. Původním místem výskytu je Středomoří, ale v současné době zplaňuje i na jiných místech Evropy s teplým a suchým podnebím. Má listy s četnými přisedlými žlázkami, vylučujícími silice (Pazdera, 2015).

Tymián je využíván pro kuchařské účely, a to jak v čerstvé, tak i ve své sušené formě (Harding, 2016). Tymián má antibakteriální, antifungální a desinfekční účinky, působí proti některým prvokům a kvasinkám a částečně účinkuje i proti herpetickým virům. Používá se jako kloktadlo při zánětech v dutině ústní nebo při angíně a k výplachům při gynekologických problémech (Pazdera, 2015).

Využití tymiánového esenciálního oleje

EO z *T. vulgaris* má žlutohnědou barvu a vyznačuje se intenzivní, ostrou, pronikavou, ale příjemnou bylinnou vůní (Aromakh.cz, 2024). Podle zvolené oblasti sběru se z *T. vulgaris* získávají EO s odlišným chemickým složením. Tyto oleje jsou známé jako tzv. chemotypy a jedním z nejbezpečnějších a nejúčinnějších je Tymián linalool z Francie, který je šetrný k pokožce a vyznačuje se svou jemnou bylinkovou a štiplavou vůní (Harding, 2016).

Tymiánový EO má léčivé vlastnosti, působí jako antiseptikum, které podporuje hojení ran a snižuje riziko infekcí v ústní dutině. Pomáhá také při nevolnosti, únavě, respiračních potížích, nachlazení a kašli (Rizwan, 2012). Je častou součástí masážních olejů pro uvolnění bolestivých a ztuhlých svalů. Masti z tymiánového EO se používají k léčbě infikovaných ran, oparů a aftů. Je také součástí protizánětlivých a hojivých krémů, mastí a balzámů. Podporuje trávení a je účinný proti střevním parazitům (Pazdera, 2015; Karelhadek.eu, 2024). Dále podporuje růst vlasů a zabráňuje jejich vypadávání. Má také vynikající repelentní účinek proti hmyzím škůdcům (Rizwan, 2012).

1.3.4 Citronela jávská (*Cymbopogon winterianus*)

Taxonomické zařazení (dle Biolib.cz):

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: jednoděložné (*Liliopsida*)

Řád: lipnicotvaré (*Poales*)

Čeleď: lipnicovité (*Poaceae*)

Rod: voňatka (*Cymbopogon*)

Druh: citronela jávská (*Cymbopogon winterianus* L.)

Charakteristika

Rod *Cymbopogon* zahrnuje více než 100 druhů, které se vyskytují v tropických oblastech (Leite et al., 2010). Některé druhy rodu *Cymbopogon* představují důležitý zdroj přírodních EO (Verma et al., 2020).

Na trhu jsou k dispozici dva typy citronelových EO, a to cejlonský a jávský typ, které jsou získávány z druhů *C. nardus* a *C. winterianus*. Liší se mezi sebou zejména

obsahem citronellalu (Leite et al., 2010). Díky své vyšší výtěžnosti se na trhu více vyskytuje citronela jávského typu (*Cymbopogon winterianus*). Pochází z tropických a semitropických oblastí Asie, Indie, Indonésie a pěstuje se i v Jižní a Střední Americe. Světová produkce citronelového oleje přesahuje 2000 tun ročně (Simic et al., 2008; Verma et al., 2020).

Využití citronelového esenciálního oleje

EO z *C. winterianus*, tzv. Java citronella, má žlutou barvu a vyznačuje se lehkou, mírně nasládlou a teplou citronovou vůní. Díky své vůni a účinkům se často využívá jako alternativa k meduňce lékařské (*Melissa officinalis*) (Karelhadek.eu, 2024). Hlavními složkami EO z *C. winterianus* jsou citral, citronellal, geraniol, citronellol, isopulegol, elemol a limonen (Verma et al., 2020).

Citronelový olej se používá jako antiseptikum, antispasmodikum, diuretikum, působí antistresově a povzbuzuje duševní stav (Kakaraparthi et al., 2014; Harding, 2016). Je vhodný pro problematickou pleť a snižuje tvorbu mazu, a to i ve vlasové pokožce (Karelhadek.eu, 2024). Dále je široce využíván v parfumerii, kosmetice a potravinářském průmyslu. Využívá se i jako rostlinný repelent proti hmyzu (Kakaraparthi et al., 2014). Simic et al. (2008) ve své studii uvádí antimikrobiální aktivitu EO z *C. winterianus* proti půdním patogenům, houbám způsobujících kažení potravin při skladování, producentům mykotoxinů a také rostlinným, zvířecím a lidským patogenům.

1.3.5 Hřebíčkovce kořenný (*Syzygium aromaticum*)

Taxonomické zařazení (Biolib.cz):

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)

Řád: myrtotvaré (*Myrtales*)

Čeleď: myrtovité (*Myrtaceae*)

Rod: hřebíčkovce (*Syzygium*)

Druh: hřebíčkovce kořenný (*Syzygium aromaticum*)

Charakteristika

Hřebíčkovce kořený (*S. aromaticum* L.) patří do čeledi myrtovité (*Myrtaceae*), která zahrnuje více než 3000 druhů a náležících do 130–150 rodů, jako jsou např. rod myrta, eukalyptus, hřebíčkovce a guava. *S. aromaticum* je aromatická rostlina původně rozšířená na ostrovech v Moluckém souostroví ve východní Indonésii, dnes je široce pěstována i v jiných tropických a subtropických oblastech, jako je např. Madagaskar, Srí Lanka a Čína. Jedná se o stálezelený strom, dorůstající výšky 8–15 m a vyžadující velmi teplé klima (Grulich, 2011; Haro-González, 2021).

Nejvýznamnější částí hřebíčkovce jsou jeho květy. Jsou vonné, rozvíjejí se z červených, silně aromatických pupat, které po usušení známe jakožto koření – „hřebíček“. Ročně je možné ze vzrostlého stromu sklídit 2–4 kg sušeného hřebíčku (Pazdera, 2015).

Využití hřebíčkového esenciálního oleje

Ze sušených pupat *S. aromaticum* se už po staletí získává EO, který napomáhá při bolestech zubů a využívá se v zubním lékařství jako antiseptikum (Harding, 2016).

S. aromaticum je bohatý na těkavé látky a antioxidanty, jako je např. eugenol, thymol, β -karyofylen a α -humulen (Haro-González, 2021). Eugenol je hlavní vonnou silicí, která představuje alespoň 50 % oleje a vyznačuje se svými antiseptickými a anestetickými účinky, avšak ve větším množství je jedovatá (Grulich, 2011; Haro-González, 2021).

EO z hřebíčku obsahuje vysoké množství fenolických sloučenin s různými biologickými účinky, včetně antibakteriálních, antifungálních, insekticidních a antioxidačních vlastností. Využívá se při výrobě potravin, léčiv, hygienických produktů, kosmetiky a parfémů. Výtěžnost a kvalita EO ze *S. aromaticum* je ovlivňována např. i fenologickou fází rostliny. Nejvyšší EO z hřebíčku je získáván z pupat dospělých stromů (Haro-González, 2021).

1.3.6 Skořicovník pravý (*Cinnamomum verum*)

Taxonomické zařazení (Biolib.cz):

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: nižší dvouděložné (*Magnoliopsida*)

Řád: vavřínotvaré (*Laurales*)

Čeleď: vavřínovité (*Lauraceae*)

Rod: skořicovník (*Cinnamomum*)

Druh: skořicovník pravý (*Cinnamomum verum*)

Charakteristika

Skořicovník pravý (*Cinnamomum verum*) je aromatická stálezelená dřevina typicky se vyskytující na Srí Lance, Madagaskaru, v jižní Indii a dalších částech jihovýchodní Asie (Harding, 2016). Dorůstá do výšky 15 m a má tmavě hnědou mělce rýhovanou borku (Grulich, 2011).

Skořicovník se využívá jako zdroj koření, konkrétně jeho silicemi prosycená vnitřní strana borky, která se využívá sušená vcelku či mletá. Skořicovník působí baktericidně, zlepšuje chuť k jídlu, pomáhá při trávení, využívá se v kosmetice a parfumerii, a má mnoho dalších léčebných účinků (Grulich, 2011).

Využití skořicového esenciálního oleje

Skořicový EO určený pro aromaterapeutické využití se získává parní destilací především z listů. Z kůry se taktéž může EO vyrábět, ale pro aromaterapii je příliš dráždivý. EO z listů má jemnou, kořeněnou a hřejivou vůni a je k pokožce mnohem šetrnější (Grulich, 2011; Harding, 2016).

Mezi nejdůležitější sloučeniny skořicového EO patří cinnamaldehyd, eugenol, karyofylen, kyselina skořicová a cinnamyl acetát. Výzkumy prokázaly mnoho farmakologických účinků, včetně potenciálu k léčbě bolesti hlavy a migrény (Barbarossa et al., 2022). Olej je účinný při stimulaci krevního oběhu a zahřívání těla. V aromaterapii se využívá k úlevě od depresí a duševního vyčerpání (Harding, 2016).

1.4 Houby (*Fungi*)

1.4.1 Obecná charakteristika

Houby (*Fungi*) představují jednu z největších skupin eukaryotických heterotrofních organismů. Jedná se o kosmopolitní organismy, které hrají klíčovou roli v mnohých ekosystémech. Původně byla tato skupina považována za rostliny, kam byla také řazena (Kalina a Váňa, 2005).

Nejedná se o fotosyntetizující organismy, jelikož v buňce nejsou přítomny chloroplasty, které touto schopností disponují. Jejich základními stavebními jednotkami jsou houbové buňky tvořící houbová vlákna, tzv. hyfy, které svým růstem a větvením dávají vznik podhoubí (myceliu) (Kalina a Váňa, 2005). Houby absorbují živiny přes buněčnou stěnu. Rozmnožují se jak pohlavně, tak nepohlavně. Pohlavní rozmnožování zahrnuje spojení gamet v plodnicích, zatímco nepohlavní rozmnožování zahrnuje tvorbu spor či dělení houbových vláken (Keizer, 1999; Sedlářová a spol., 2021).

Primární funkce hub spočívá v rozkladu organické hmoty a opakované recyklaci živin v ekosystémech. Některé houby se vyznačují mutualistickým soužitím s rostlinami, mnohé z nich patří mezi patogenní organismy. Z hlediska člověka mají velký význam v potravinářství (slouží jako zdroj potravy), dále v průmyslu (produkce chemických látek) a lékařství (zdroj léčiv) (Keizer, 1999).

1.4.2 Mikroskopické houby

Mikroskopické houby, tzv. mikrohouby, jsou mikroskopické eukaryotické organismy, zahrnující vláknité houby, kvasinky a rzi. Jejich buněčné stěny jsou tvořeny chitinem. Vyskytují se jak na pevnině, tak ve vodním prostředí, včetně moří. Nalezneme je např. i na rostlinách, hmyzu, v bacheru dobytka, vlasech a kůži. Mikrohouby se odlišují od makrohub mj. absencí velkých, mnohobuněčných plodnic. Tělo mikroskopických hub je tvořeno vlákny, tzv. hyfami, které větvením vytvářejí mycelium (Cannon a Sutton, 2004).

1.4.3 Charakteristika vybraných mikroskopických hub

Fusarium

Rod *Fusarium* náleží do skupiny vřeckovýtrusných hub. V současné době je popsáno zhruba 70 druhů, jejich počet se však neustále mění. Jsou významnými

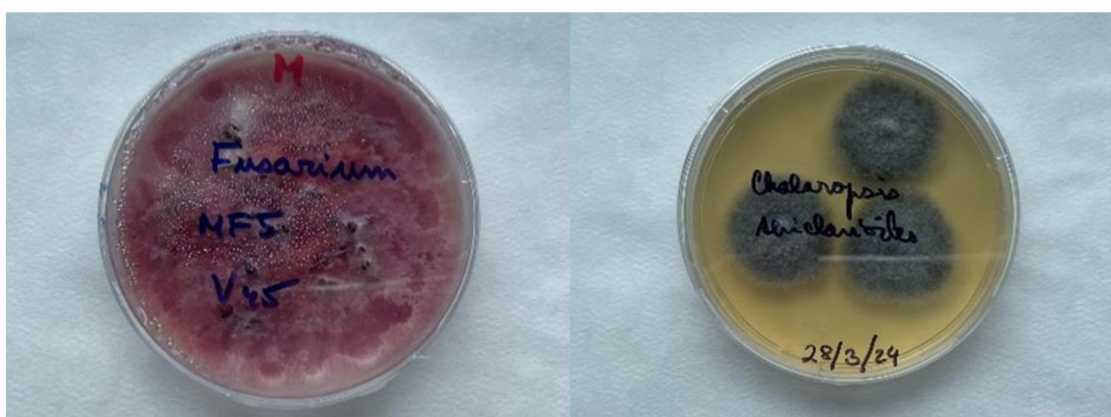
mykotoxinogenními druhy hub. Několik druhů z nich je dokonce patogenních pro člověka (Hof, 2020).

Houby rodu *Fusarium* patří mezi rychle rostoucí houby na různých standardních živných médiích, jako je např. bramborový dextrózový agar (PDA). Kolonie jsou zpočátku bílé a později se zbarvují do růžových, oranžových a červených či hnědých odstínů (Hof, 2020).

Choroby rostlin způsobené druhy *Fusarium* mají značný negativní dopad na zemědělskou produkci po celém světě. Tento rod hub je známý svou schopností infikovat různé rostliny s možností produkovat mykotoxiny. Mykotoxiny mohou být produkovány již v zrnech (př. u kukuřice, pšenice, ječmene a ovsu) před sklizní. Tyto toxiny mohou být přítomny i v různých ovocných plodech či zelenině (Sharma et al., 2017; Hof, 2020).

Chalaropsis thielavioides

Ch. thielavioides, dříve klasifikována jako *Thielaviopsis thielavioides*, je vřeckovýtrusná houba patřící do řádu *Pleosporales*. Je známa jako příčina posklizňového černání kořenové zeleniny, včetně mrkve a brambor (Paulin-Mahady et al., 2002). Infekce způsobená *Ch. thielavioides* může negativně ovlivnit skladování a distribuci sklizených produktů. Mrkve, bez ohledu na to, zda pocházejí z ekologického či konvenčního zemědělství, téměř vždy na svém povrchu obsahují spory *T. basicola* a *Ch. thielavioides*. Infekce se projevují jako tmavě zelené až černé houbové povlaky zeleniny po prodloužené inkubaci v plastových sáčcích. Tyto houby produkují nepohlavní reprodukční orgány (Weber a Tribe, 2004).



Obrázek 1.1: *Fusarium* sp. a *Chalaropsis thielavioides* (foto: autor)

Paecilomyces

Druhy hub z rodu *Paecilomyces* patří mezi vřeckovýtrusné houby. Kolonie rodu *Paecilomyces* může nabývat v závislosti na kultivačním médiu různých barevných odstínů od bílé přes krémovou až do oranžové či růžové (Brabb et al., 2012).

Do rodu *Paecilomyces* náleží entomopatogenní druhy hub, které mohou napadat a posléze usmrcovat hmyz. Např. Wright et al. (2003) ve své studii zjistil, že zástupce tohoto rodu je schopen během 4 dnů od inokulace usmrtit celou populaci termitů.

Některé druhy *Paecilomyces* jsou rovněž známy svou schopností produkovat biologicky aktivní látky, jako jsou antibiotika a enzymy. Z tohoto důvodu mají význam zejména v oblasti lékařství a zemědělství. Některé druhy mohou zapříčinit závažné lidské infekce (Castelli et al., 2008).

Trichoderma

Rod *Trichoderma* je velmi rozmanitý, zahrnuje mnoho druhů hub s různými biologickými vlastnostmi a schopnostmi, což z něj činí předmět rozsáhlého výzkumu a zájmu. Vytvářejí světle zelené konidie a vyznačují se rychlým růstem. Konidiofory jsou často větvené a tvoří charakteristickou repetitivní strukturu (Schuster et al., 2020).

Tyto houby jsou schopné rozkládat celulózové odpadní materiály. Nedávné výzkumy ukazují, že nejenže působí jako bio kontrolní činidla, ale také podporují odolnost, růst a vývoj rostlin, což může vést ke zvýšení výnosu plodin. Jejich bio kontrolní aktivita, zahrnující mykoparazitismus, produkci antibiotik a soutěžení o živiny, také vyvolává obranné nebo systémové rezistenční reakce u rostlin (Naher et al., 2014). Schopnost bojovat proti půdním patogenům, bezobratlým a bakteriím zprostředkovávají různé antimikrobiální sloučeniny a její agresivní růstový způsob (Verma et al., 2007; Naher et al., 2014).



Obrázek 1.2: *Paecilomyces* sp. a *Trichoderma* sp. (foto: autor)

Cíl práce

Hlavním cílem této diplomové práce je porovnat antifungální účinnost vybraných esenciálních olejů vůči izolovaným mikroskopickým houbám z přirozeného substrátu a porovnat metody použité k hodnocení.

V rámci práce jsem se zaměřila na problematiku hub kontaminujících kořenovou zeleninu. Dílčími cíli bylo vyizolovat nejčtenější druhy hub, které kořenovou zeleninu napadají, a následně porovnat antifungální aktivitu vybraných esenciálních olejů vůči vybraným houbám pomocí metody diskové difuze a mikrodiluční metody.

2 Metodika

V rámci realizace své diplomové práce jsem se zaměřila na problematiku hub infikujících kořenovou zeleninu. Využití esenciálních olejů se jeví jako perspektivní strategie pro zpomalení procesu infekce a následné degradace. Tento přístup je zvláště relevantní vzhledem k současným environmentálním výzvám a potřebě udržitelného zacházení s potravinami.

2.1 Izolace mikroskopických hub z přirozeného substrátu

K provedení izolace houbových organismů byla využita náhodně vybraná sada vzorků kořenové zeleniny (celer, mrkev a petržel), pocházející z několika obchodů s potravinami. Ze zkoumané zeleniny bylo v laboratoři náhodně odebráno sterilním skalpelem několik cca 1 cm velkých povrchových vzorků (Obrázek 2.1). Pro izolaci hub byla uplatněna metoda inkubace zeleniny ve vlhkých komůrkách a na agarovém médiu. Inkubace trvala 12 dní.



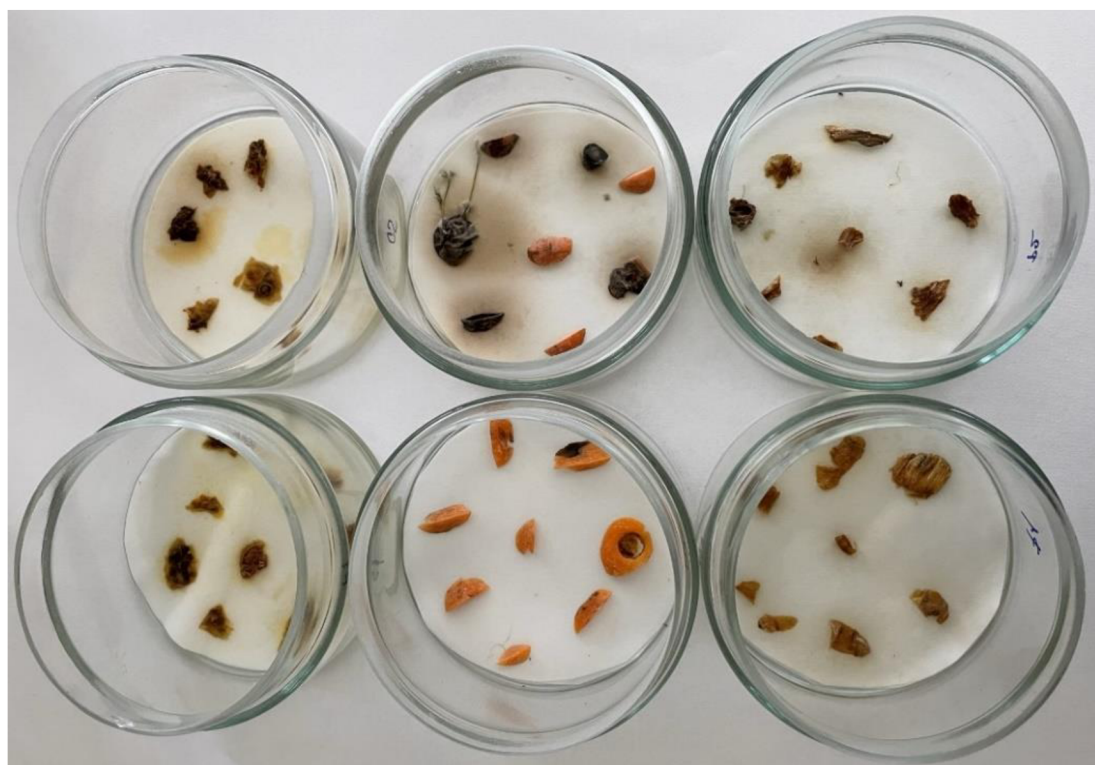
**Obrázek 2.1: Příprava vzorků zeleniny pro inkubaci na agarových plotnách
(foto: autor)**

2.1.1 Inkubace zeleniny ve vlhkých komůrkách

Vlhké komůrky byly tvořeny vysokými sterilními skleněnými Petriho miskami (ø 11,5 cm). Nad dno těchto komůrek byl umístěn filtrační papír, který byl zavlhčen destilovanou vodou a následně na něj bylo vyskládáno 8 vzorků zeleniny (Obrázek 2.2). Vlhké komůrky byly uskladněny v termostatu při teplotě cca 25 °C po dobu 12 dní. Dle potřeby byly opětovně zavlhčovány. Pro každý druh zeleniny byly založeny 2 vlhké komůrky, celkem tedy 6 komůrek (Obrázek 2.3).



Obrázek 2.2: Vlhké komůrky s vyskládanými vzorky petržele, mrkve a celeru (foto: autor)

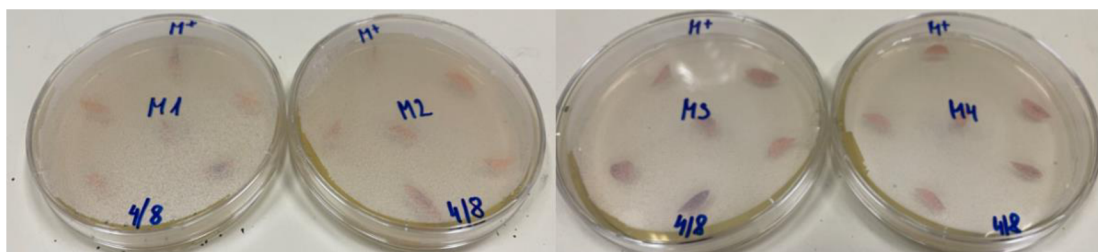


Obrázek 2.3: Vlhké komůrky se vzorky zeleniny po 12 dnech inkubace (foto: autor)

2.1.2 Inkubace zeleniny na agarových plotnách

Na agarové médium MEA (Malt extract agar) bylo vyskládáno vždy po 6 vzorcích zeleniny na jednu misku. Pro každý druh zeleniny byly založeny 4 Petriho misky s agarem (Obrázek 2.4). Celkem tedy bylo založeno 12 misek. Inkubace probíhala za stejných podmínek jako u metody vlhkých komůrek v termostatu při 25 °C po dobu 12 dní.

Na Obrázku 2.3 vidíme agarové plotny s inkubovanými vzorky mrkve (vlevo nahoře), petržele (vpravo nahoře) a celeru (dole vlevo) po 12denní inkubaci. Vpravo dole jsou vyfoceny založené vlhké komůrky se vzorky zeleniny a již zmíněné agarové plotny s inkubovanou zeleninou.



Obrázek 2.2: Agarové plotny se vzorky mrkve (foto: autor)

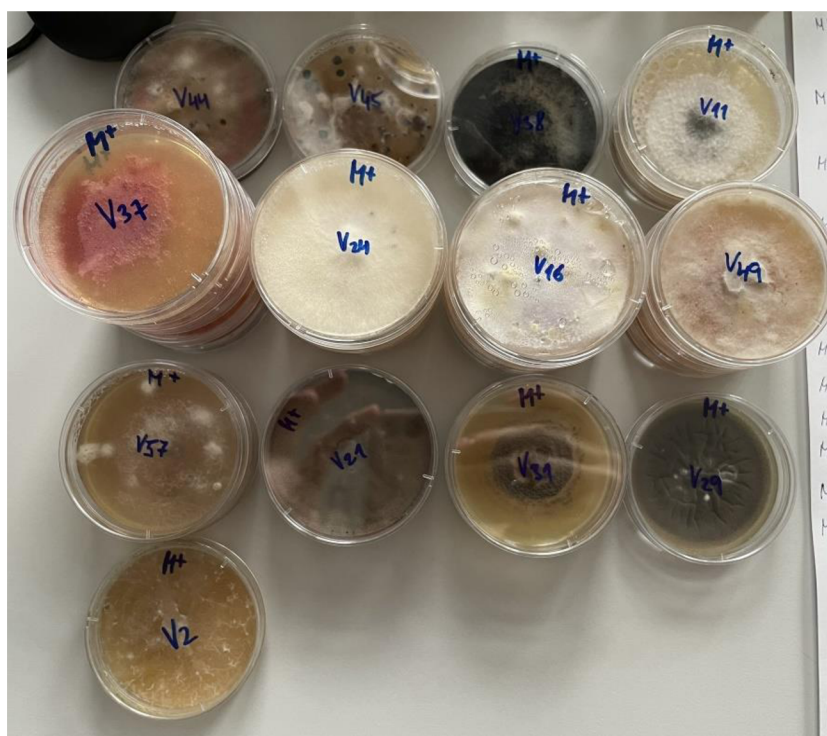
2.1.3 Výběr a determinace kmenů mikroskopických hub

Po 12 dnech byly narostlé kolonie hub izolovány na nové agarové plotny (MEA) a postupně přeočkováním „přečišťovány“. Následně byly čisté kmeny hub rozřazeny do morfortypů a identifikovány pod světelným mikroskopem.

Celkem bylo izolováno 58 kmenů hub, které byly následně rozřazeny do 13 morfortypů (Obrázek 2.4) a pro potřeby diplomové práce byly vybrány 4 nejčtenější morfortypy, což byly zástupci rodu *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Trichoderma* sp. a druhu *Ch. thielavioides*. Vybrané morfortypy byly rozočkovány a namnoženy pro další použití v pokusech.



Obrázek 2.3: Nahoře a vlevo dole – agarové plotny, dole vpravo – založené vlhké komůrky (foto: autor)



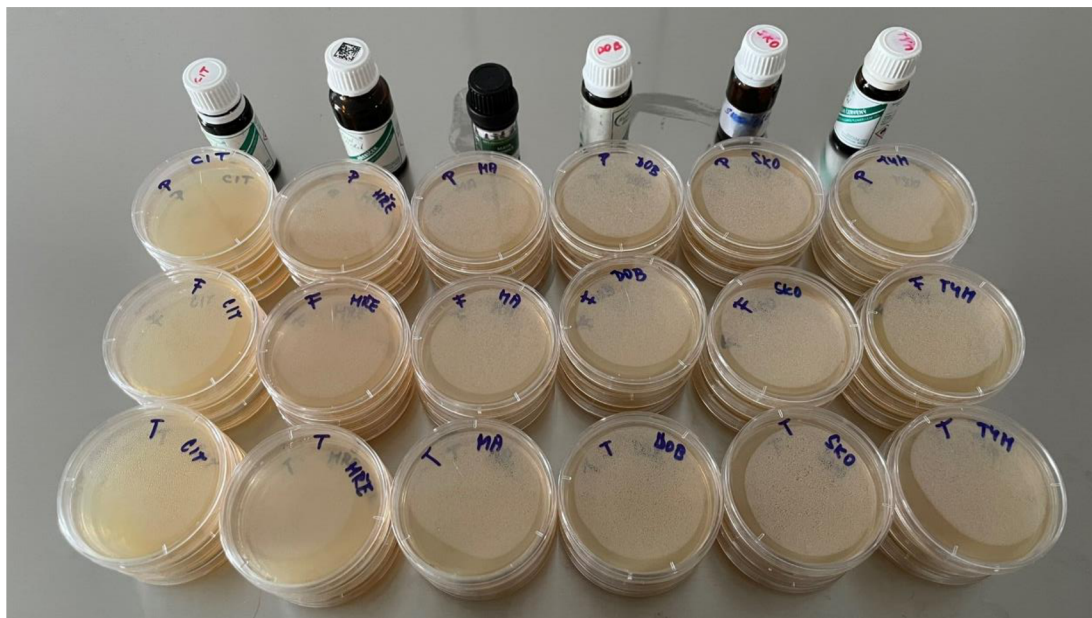
Obrázek 2.4: Izolované kmeny hub rozřazené do 13 morfortypů (foto: autor)

2.2 Testování antifungální aktivity

Na základě rozsáhlého pilotního pokusu (nepublikovaného) bylo pro testování antifungální aktivity vybráno 6 esenciálních olejů – citrónový, dobromyslový, hřebíčkový, mátový, tymiánový a skořicový. Antifungální účinek těchto olejů byl testován na 4 nejčtenějších morfortypech hub izolovaných ze zeleniny v předchozí části experimentu – *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Trichoderma* sp. a *Ch. thielavioides*. Testování antifungální aktivity bylo provedeno prostřednictvím metody diskové difuze a dále mikrodiluční metodou.

2.2.1 Metoda diskové difuze

Tato metoda je založena na měření zóny inhibice růstu mikroorganismů na agarové plotně kolem centrálně uloženého disku napuštěného nezředěným EO. Suspenze 4 vybraných mikroskopických hub (získaných z předchozí izolace) byly připraveny zředěním ve sterilní destilované vodě na MacFarland optickou hustotu 0,5. Připravené suspenze hub (0,1 ml) byly rozetřeny na kultivační médium MEA v Petriho miskách (ø 60 mm). Do středu Petriho misky byl následně vložen disk (ø 5 mm), napuštěný 3 µl EO. Celkem bylo založeno 72 misek (6 olejů x 4 houby x 3 opakování) (viz Obrázek 2.5). Následně byly Petriho misky kultivovány ve tmě při 25 °C po dobu 4 dnů, a poté byly odečteny zóny inhibice okolo disků s olejem (v mm).



Obrázek 2.5: Petriho misky připravené na rozetření suspenze hub a vložení disku s EO (foto: autor)

2.2.2 Mikrodiluční metoda

Metoda je založena na měření změn zákalu v jamkách mikrodestiček, způsobených různou intenzitou růstu testovaného organismu.

Příprava mikrodestiček:

1. Do 1. řady (A) bylo napipetováno 184 μ l růstového bujonu a přidáno 16 μ l EO.
2. Dále do následujících řad (B–H) bylo napipetováno 100 μ l růstového bujonu. Vedle sebe v každé řadě byla založena 3 opakování pro každou houbu (1-2-3, 4-5-6, 7-8-9, 10-11-12). Pro každý olej byla založena 1 destička, aby nedošlo ke zkreslení výsledků různou těkavostí olejů.
3. Do každé jamky v řadě A–E bylo napipetováno 10 μ l připraveného inokula. Pro každý rod houby byly zaočkovány vždy 3 jamky vedle sebe v příslušné řadě.
4. Ředění koncentrace EO bylo provedeno následovně. Po promíchání suspenze v jamkách bylo z celé 1. řady odebráno 100 μ l, které byly přidány do 2. řady, dále se proces opakoval až do 6. řady (F). Z 6. řady bylo odstraněno 100 μ l. V 7. řadě (G) se ponechal bujon bez přídavku EO a poté se přidalo inokulum. V 8. řadě (H) byl ponechán pouze bujon.

Koncentrace esenciálního oleje v řadách:

Řada A (8 %), B (4 %), C (2 %), D (1 %), E (0,5 %), F (0,25 %), G a H (0 %).

Tabulka 2.1: Schéma destičky v řadách (vlastní zpracování)

Koncentrace EO (%)	<i>Fusarium</i> sp.			<i>Paecilomyces</i> sp.			<i>Trichoderma</i> sp.			<i>Chalaropsis thielavoides</i>			C I T R O N E L A
A–8	F	F	F	P	P	P	T	T	T	CH	CH	CH	
B–4													
C–2													
D–1													
E–0,5													
F–0,25													
G–0													
H–0													

3 Výsledky

3.1 Metoda diskové difuze

Výsledkem metody diskové difuze je plocha inhibičních zón okolo disku napuštěného esenciálním olejem na agarové plotně (cm²). Výsledky této metody byly hodnoceny v programu STATISTICA prostřednictvím jednofaktorové analýzy ANOVA a Tukeyho testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Tabulka 3.1 shrnuje všechny výsledky získané v rámci testování EO metodou diskové difuze. Výsledky antifungální aktivity EO na jednotlivé testované houby jsou podrobněji popsány v následujících kapitolách.

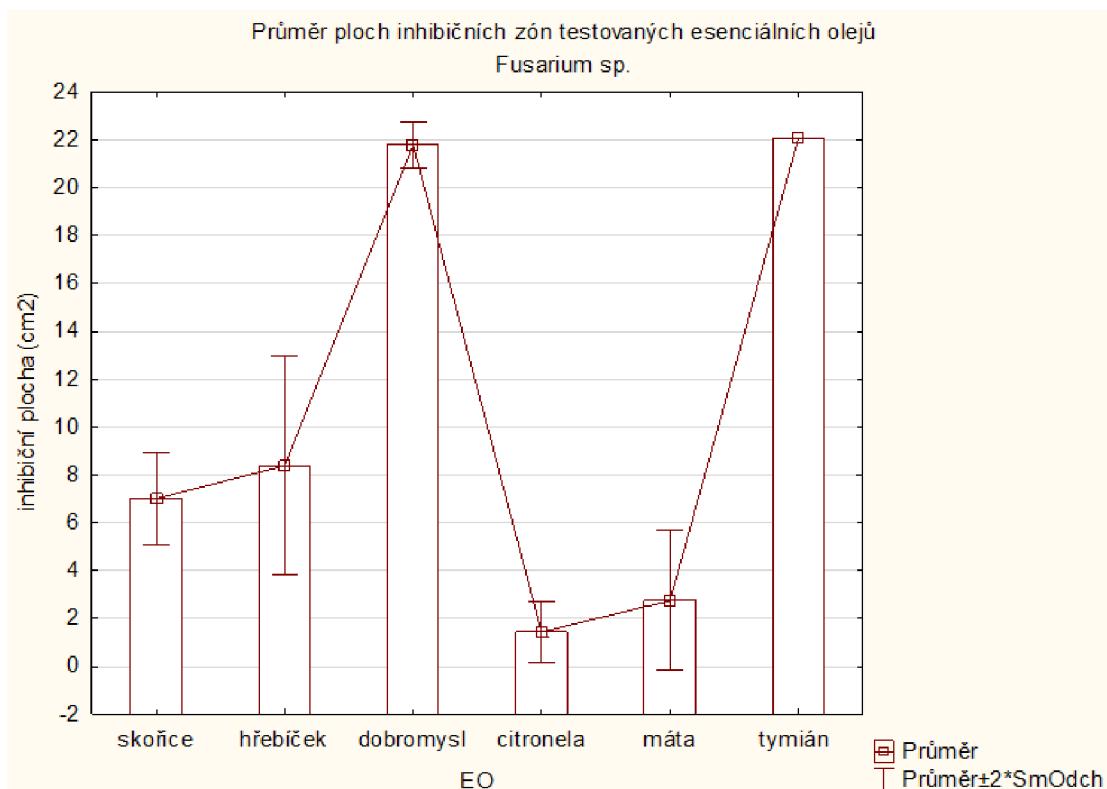
Tabulka 3.1: Průměr ploch (cm²) inhibičních zón jednotlivých EO (\pm SD) (vlastní zpracování)

Houby EO	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Paecilomyces sp.</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Chalaropsis thielavioides</i>
skořice	7,01 \pm 0,55 b	14,73 \pm 3,07 a	3,64 \pm 0,20 a	22,06 \pm 0 a
hřebíček	8,40 \pm 1,33 b	10,23 \pm 0,97 a	8,17 \pm 0,86 ab	8,50 \pm 0,75 b
dobromysl	21,79 \pm 0,27 c	22,06 \pm 0,00 b	15,87 \pm 4,52 b	9,29 \pm 0,73 b
citronela	1,44 \pm 0,37 a	1,12 \pm 0,22 c	0,39 \pm 0,09 a	7,52 \pm 0,95 b
máta	2,75 \pm 0,84 a	0,69 \pm 0,06 c	0,21 \pm 0,01 a	0,28 \pm 0 c
tymián	22,06 \pm 0 c	22,06 \pm 0,00 b	17,82 \pm 4,24 b	10,27 \pm 1,36 b

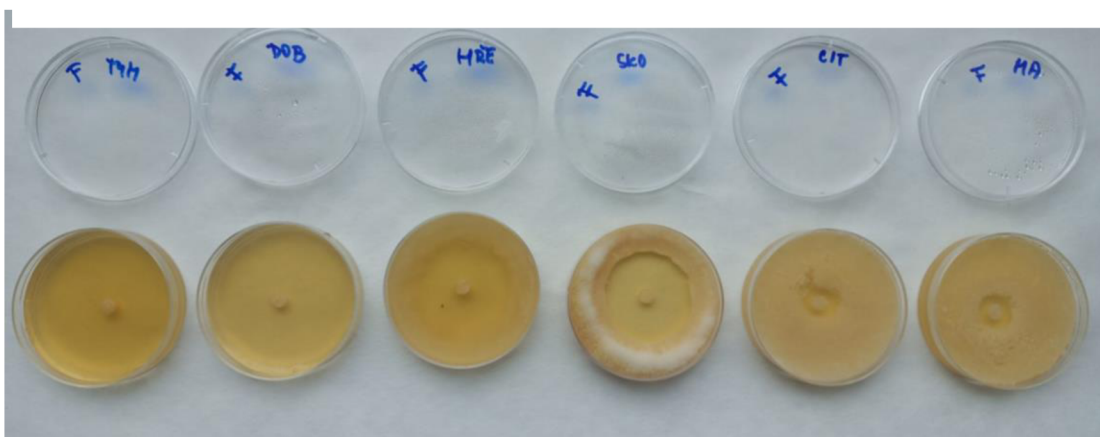
a,b,c – statisticky průkazné rozdíly mezi variantami ve sloupci ($p < 0,05$)
SD – směrodatná odchylka

3.1.1 Vliv esenciálních olejů na růst *Fusarium sp.*

Porovnání antifungálního účinku EO vůči houbě *Fusarium sp.* znázorňuje Graf 3.1. Z grafu je patrné, že nejvyšší antifungální aktivitu vykazoval EO z dobromysli a z tymiánu. Naopak nejnižší účinek vykazoval EO z citronely a z máty. EO z hřebíčku a ze skořice měly z testovaných EO střední antifungální účinek. Výsledky dále ilustruje Obrázek 3.1, kde je zřetelný nárůst houbového mycelia na miskách s EO z citronely a máty, zatímco na plotnách, kde byl aplikován dobromyslový a tymiánový olej houba nerostla. Rozdíly v účinnosti EO byly statisticky průkazné (viz Tabulka 3.1).



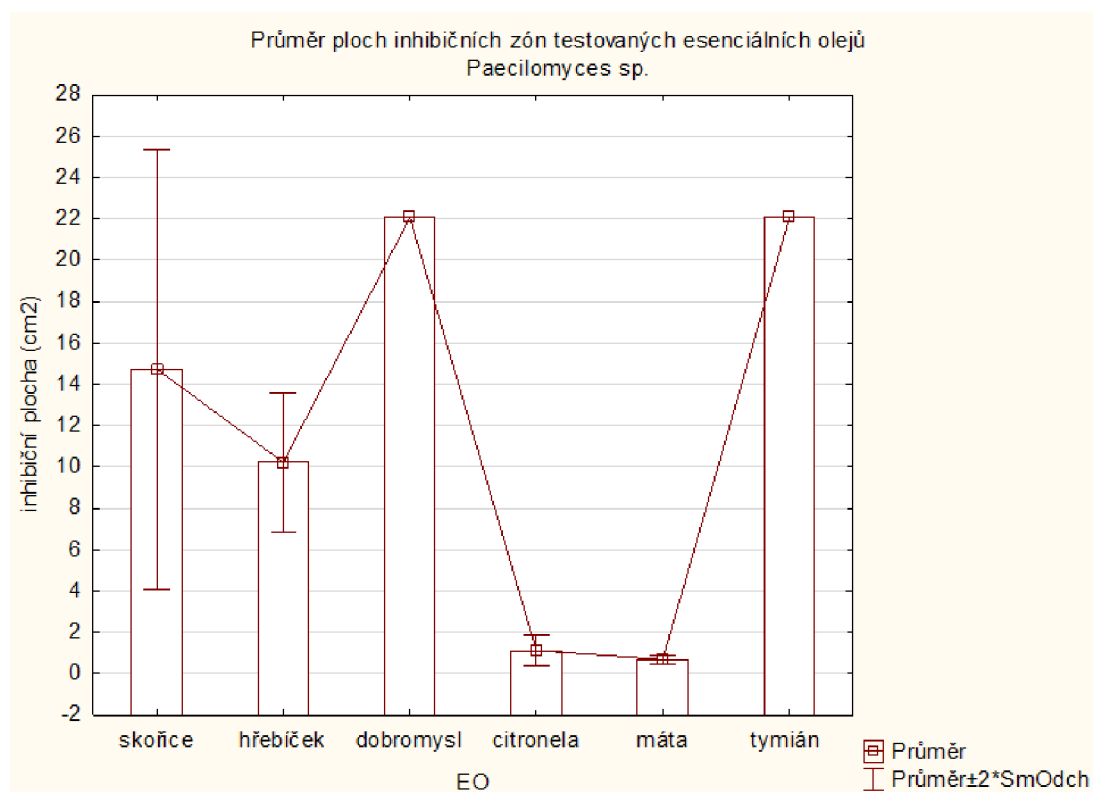
Graf 3.1: Průměr ploch inhibičních zón testovaných EO u *Fusarium sp.* (cm²) (vlastní zpracování)



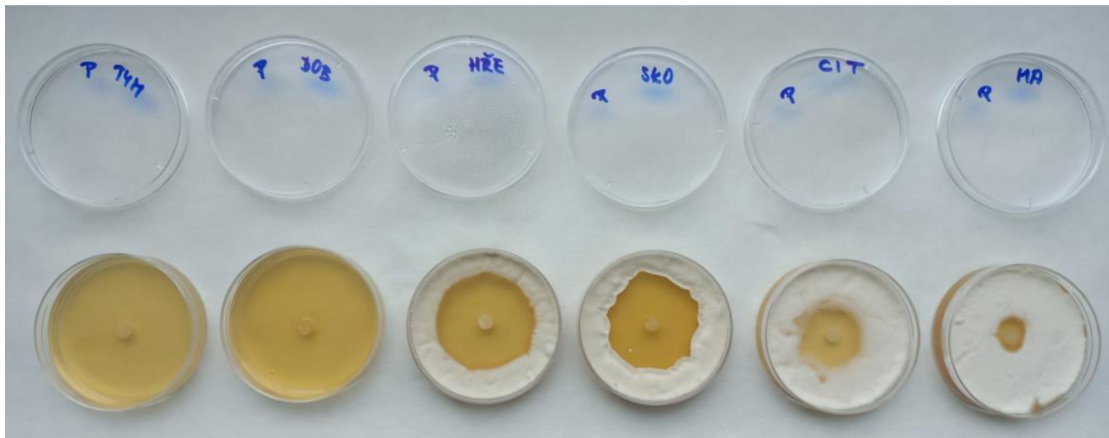
Obrázek 3.1: Agarové plotny s inhibiční aktivitou vybraných EO na růst houby *Fusarium sp.* Zleva: tymiánový, dobromyslový, hřebíčkový, skořicový, citronelový a mátový EO (foto: autor)

3.1.2 Vliv esenciálních olejů na růst *Paecilomyces sp.*

Graf 3.2 znázorňuje porovnání antifungálního účinku EO vůči houbě *Paecilomyces sp.* Antifungální aktivita vybraných olejů na houbu *Paecilomyces sp.* byla velmi podobná, jako aktivita při testování houby *Fusarium sp.* Nejvyšší antifungální aktivitu vykazovaly opět EO z dobromysli a tymiánu. EO z citronely a máty měly opět nejnižší účinek. Hřebíčkový a skořicový EO projevily opět střední antifungální účinnost vůči testované houbě. Výsledky jsou zřejmé i na Obrázku 3.2, kde je viditelná úplná antifungální aktivita tymiánového a dobromyslového EO, zatímco na miskách s máto-
vým a citronelovým EO je patrný nárůst houbového mycelia. Rozdíly v účinnosti EO byly statisticky průkazné (viz Tabulka 3.1).



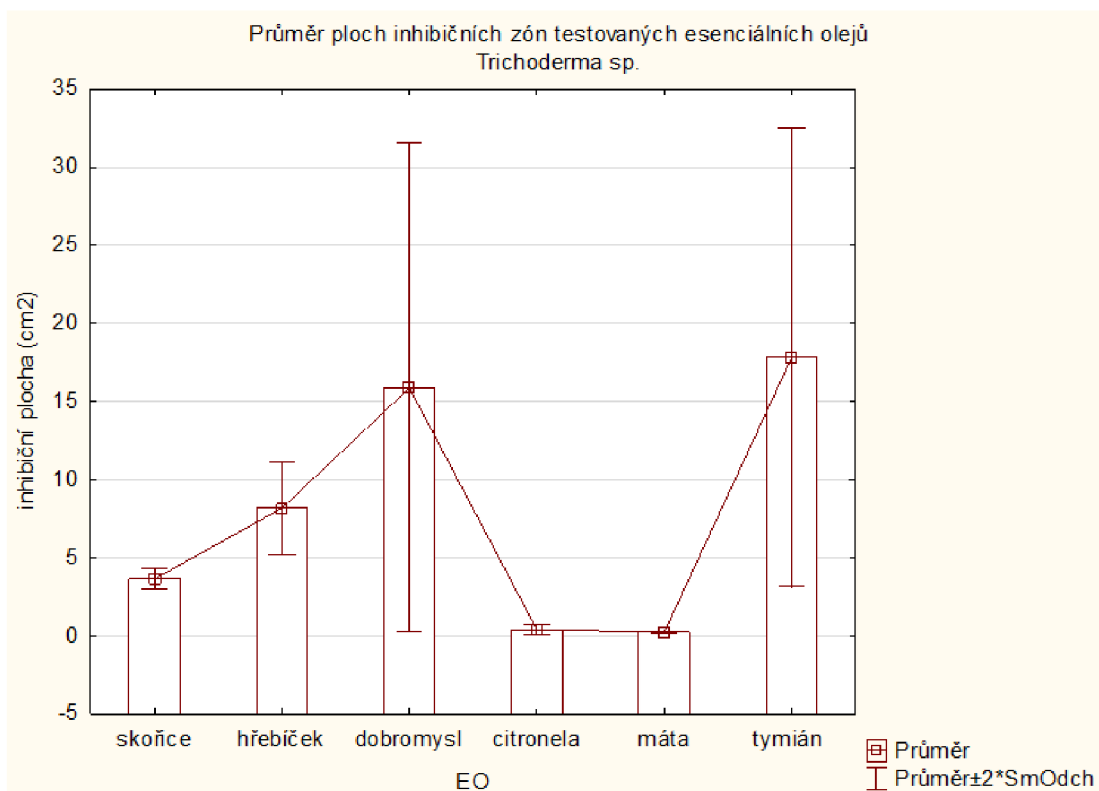
Graf 3.2: Průměr ploch inhibičních zón testovaných EO u *Paecilomyces sp.* (cm²) (vlastní zpracování)



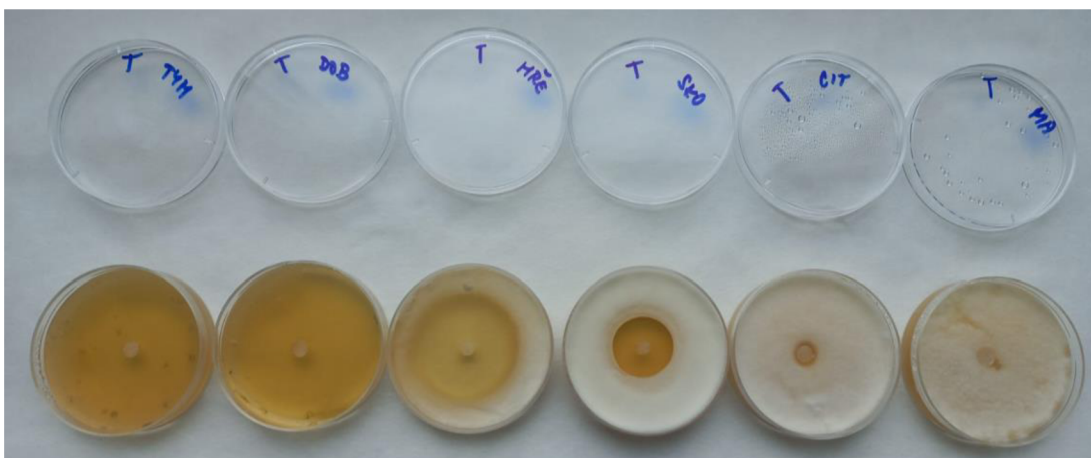
Obrázek 3.2: Agarové plotny s inhibiční aktivitou vybraných EO na růst *Paecilomyces* sp. Zleva: tymiánový, dobromyslový, hřebíčkový, skořicový, citronelový a mátový EO (foto: autor)

3.1.3 Vliv esenciálních olejů na růst *Trichoderma* sp.

Porovnání antifungální aktivity EO vůči houbě *Trichoderma* sp. je znázorněno v Grafu 3.3. Z grafu je zřejmá nejvyšší antifungální aktivita opět dobromyslového a tymiánového EO. Zatímco hřebíčkový EO vykazoval opět střední antifungální aktivitu, účinek skořicového EO byl výrazně nižší než u předešlých testovaných hub. Nejnižší antifungální účinky vykazovaly opět mátový a citronelový EO. Výsledky jsou dále ilustrovány v Obrázku 3.3, kde je vidět narostlé houbové mycelium téměř přes celou miskou u citronelového a mátového EO. Na miskách s aplikovaným tymiánovým a dobromyslových EO houba opět nerostla. Rozdíly v účinnosti EO byly statisticky průkazné (viz Tabulka 3.1).



Graf 3.3: Průměr ploch inhibičních zón testovaných EO u *Trichoderma* sp. (cm²) (vlastní zpracování)

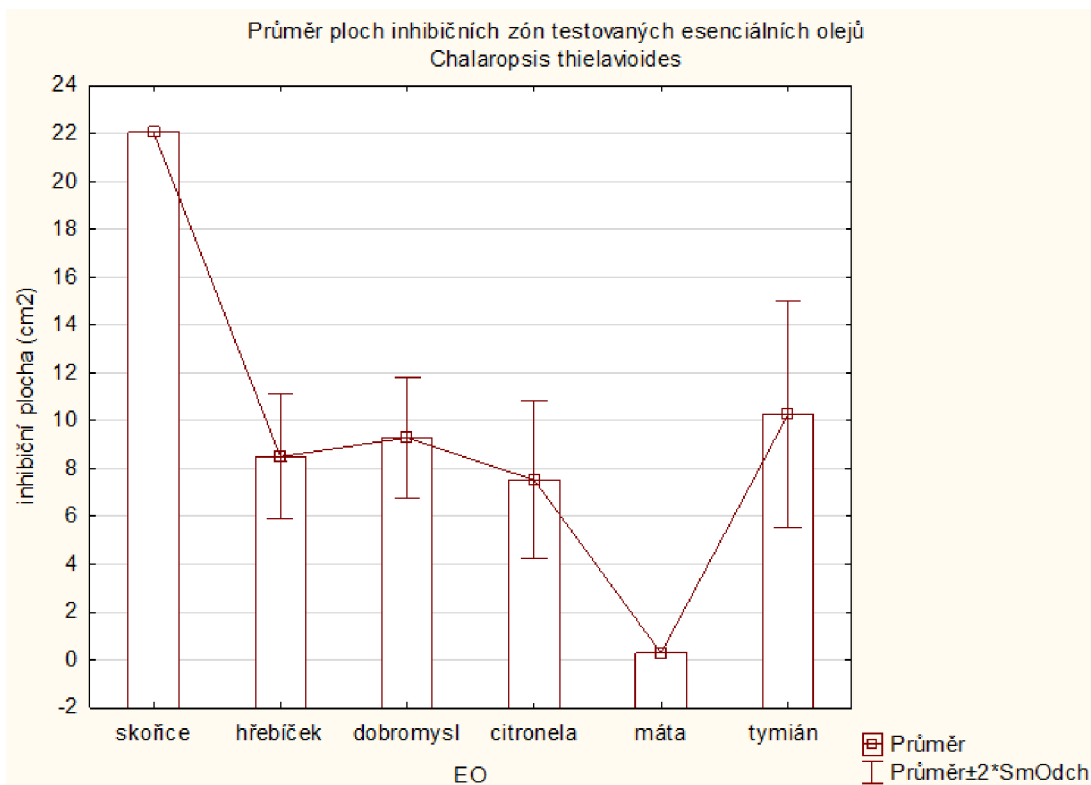


Obrázek 3.3: Agarové plotny s inhibiční aktivitou vybraných EO na růst *Trichoderma* sp. Zleva: tymiánový, dobromyslový, hřebíčkový, skořicový, citronelový a mátový EO (foto: autor)

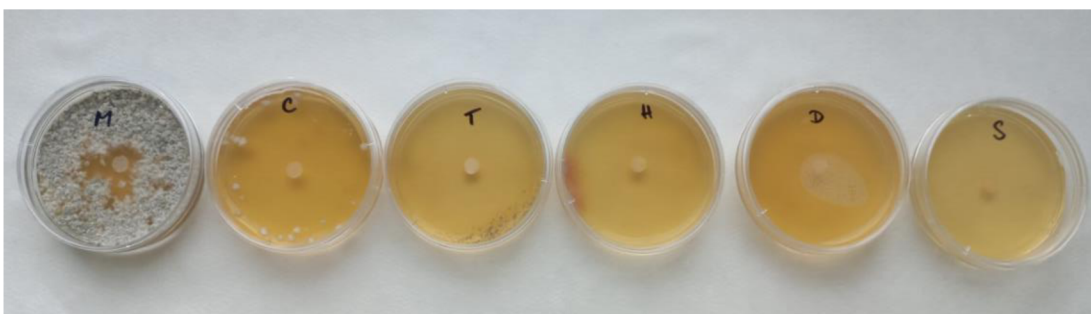
3.1.4 Vliv esenciálních olejů na růst *Chalaropsis thielavioides*

Antifungální účinek EO vůči houbě *Ch. thielavioides* je zobrazen v Grafu 3.4. Je patrné, že narozdíl od výsledků antifungálního účinku u předešlých testovaných hub, nejvyšší antifungální aktivitu projevila skořicový EO. Naopak nejnižší aktivitu

vykazoval opět mátový EO. Tymiánový, dobromyslový, citronelový a hřebíčkový EO vykazovaly střední antifungální aktivitu. Tyto výsledky jsou ilustrovány i na Obrázku 3.4, kde je patrný nárůst mycelia právě na mátovém EO. Na misce s aplikovaným skořicovým EO houba nevyrostla. Rozdíly v účinnosti EO byly statisticky průkazné (viz Tabulka 3.1).



Graf 3.4: Průměr ploch inhibičních zón testovaných EO u *Ch. thielavioides* (cm²) (vlastní zpracování)



Obrázek 3.4: Agarové plotny s inhibiční aktivitou vybraných EO na růst *Ch. thielavioides*. Zleva: mátový, citronelový, tymiánový, hřebíčkový, dobromyslový a skořicový EO (foto: autor)

3.2 Mikrodiluční metoda

Mikrodiluční metoda byla využita pro stanovení míry inhibice koncentrací jednotlivých EO v rozmezí 8 – 0,25 %. V rámci této metody byly testovány stejné EO i houby jako v případě předchozí metody diskové difuze. Výsledky jsou rozděleny podle druhu esenciálních olejů, kde je hodnocena míra inhibice jednotlivých koncentrací oleje na testované kmeny hub.

Míra inhibice je rozdělena do 3 kategorií, kdy inhibice v rozmezí 100–75 % odkazuje na vysokou inhibiční aktivitu EO, inhibice v rozmezí 75–50 % značí střední inhibiční účinek a inhibice nižší než 50 % odkazuje na nízkou, nevýznamnou inhibiční aktivitu daného EO (viz Tabulka 3.2).

Tabulka 3.2: Rozdělení inhibiční aktivity EO podle hodnot (%)

	100–75 %	Vysoká inhibiční aktivita EO
	75–50 %	Střední inhibiční aktivita EO
	pod 50 %	Nevýznamná inhibiční aktivita EO

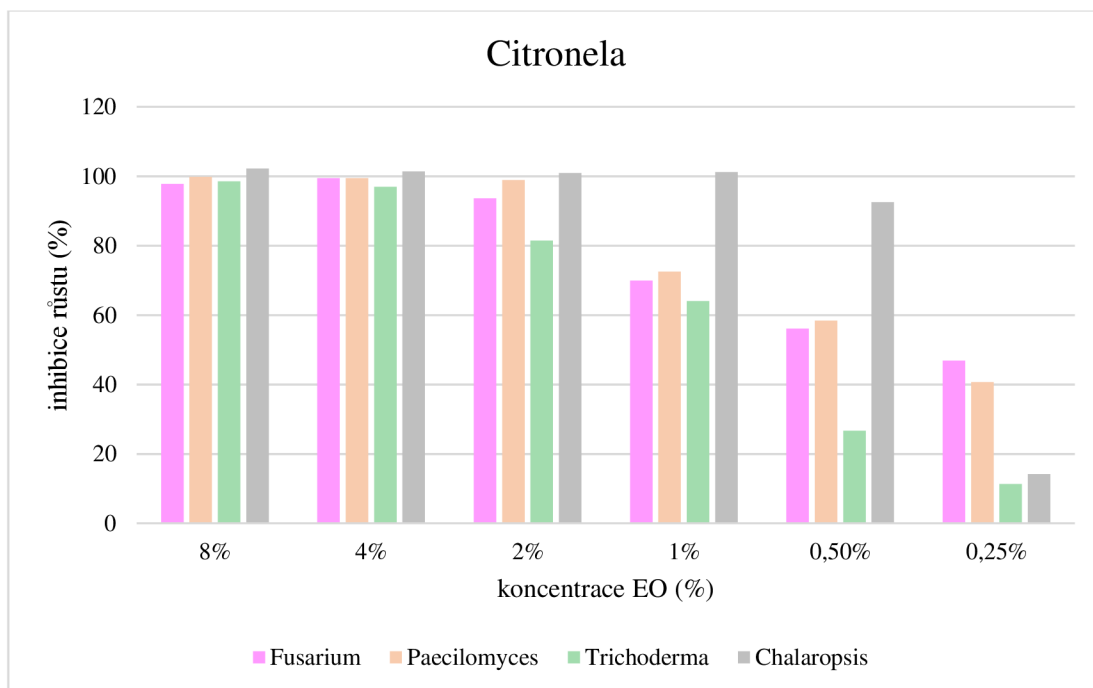
3.2.1 Antifungální aktivita citronelového EO

Výsledky antifungální aktivity citronelového EO shrnuje Tabulka 3.3. Z výsledků je patrné, že při koncentraci vyšší než 2 % vykazoval olej vysokou inhibiční aktivitu vůči všem testovaným houbám. Při nižší koncentraci docházelo k rozdílným inhibičním účinkům oleje na testované houby. Houba *Ch. thielavioides* byla vůči účinkům citronelového oleje v porovnání s ostatními testovanými houbami nejcitlivější. Při 0,5 % koncentraci EO stále vykazoval k této houbě vysokou inhibiční aktivitu (viz Graf 3.5).

Tabulka 3.3: Inhibiční aktivita citronelového EO na růst hub (%) (vlastní zpracování)

Citronela Koncentrace EO (%)	Inhibice růstu (%)			
	<i>Fusarium</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Chalaropsis thielavioides</i>
8 %	97,75	99,81	98,45	102,18
4 %	99,40	99,44	96,89	101,33
2 %	93,61	98,84	81,44	100,85
1 %	69,91	72,53	63,99	101,21
0,50 %	56,10	58,40	26,65	92,50
0,25 %	46,83	40,74	11,27	14,15

Legenda: červená barva – vysoká inhibice (procento inhibice je 75–100 %), žlutá barva – střední inhibice (procento inhibice je 50–75 %), zelená barva – neinhibuje (inhibice <50 %)



Graf 3.5: Inhibice růstu vybraných hub při různých koncentracích citronelového EO (vlastní zpracování)

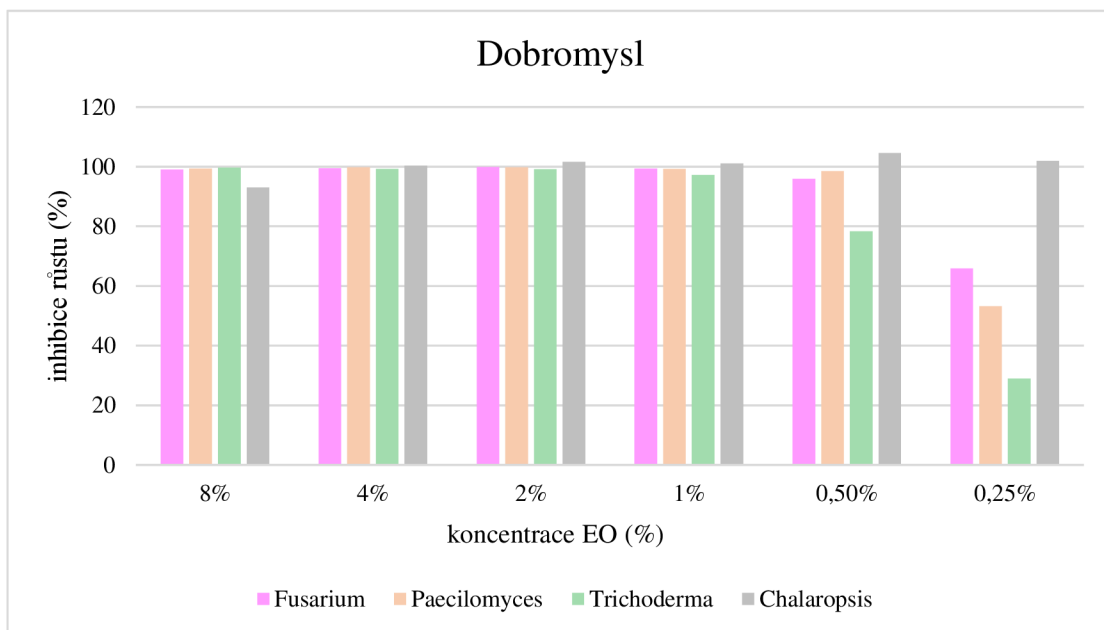
3.2.2 Antifungální aktivita dobromyslového EO

Tabulka 3.4 shrnuje výsledky antifungální aktivity dobromyslového EO. Z Grafu 3.6 je patrné, že EO z dobromysli má při koncentraci vyšší než 0,5 % vysokou antifungální účinnost. Nejcitlivější houba v porovnání s ostatními testovanými houbami vůči účinkům oleje byla opět *Ch. thielavioides*, a to ve všech testovaných koncentracích oleje. Rozdíly v účinku oleje u ostatních testovaných hub byly pouze při koncentraci 0,25 %. Zatímco olej vůči *Fusarium* sp. a *Paecilomyces* sp. vykazoval střední inhibiční aktivitu, vůči *Trichoderma* sp. projevil pouze nízkou inhibiční účinnost.

Tabulka 3.4: Inhibiční aktivita dobromyslového EO na růst hub (%) (vlastní zpracování)

Dobromysl Koncentrace EO (%)	Inhibice růstu (%)			
	<i>Fusarium</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Chalaropsis thielavioides</i>
8 %	99,04	99,36	99,65	93,02
4 %	99,49	99,79	99,19	100,30
2 %	99,85	99,82	99,08	101,63
1 %	99,34	99,29	97,16	101,04
0,50 %	95,89	98,51	78,34	104,61
0,25 %	65,92	53,21	28,95	101,93

Legenda: červená barva – vysoká inhibice (procento inhibice je 75–100 %), žlutá barva – střední inhibice (procento inhibice je 50–75 %), zelená barva – neinhibuje (inhibice <50 %)



Graf 3.6: Inhibice růstu vybraných hub při různých koncentracích dobromyslového EO (vlastní zpracování)

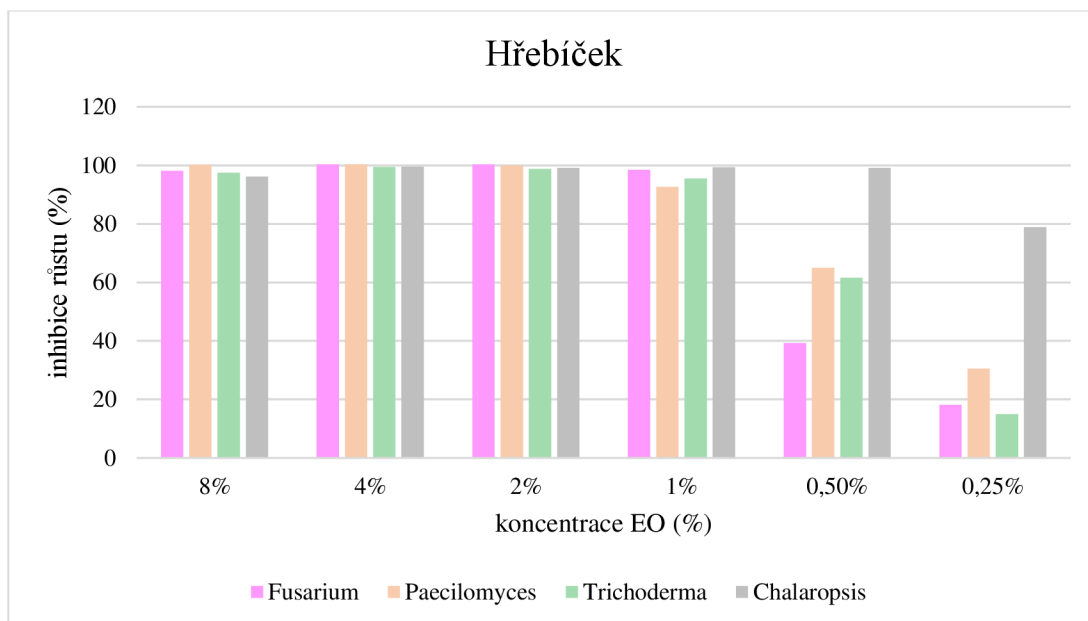
3.2.3 Antifungální aktivita hřebíčkového EO

Antifungální aktivita hřebíčkového EO je shrnuta v Tabulce 3.5. Z Grafu 3.7 je patrné, že olej projevil vůči všem testovaným houbám vysokou inhibiční aktivitu při koncentraci vyšší než 1 %. Při nižších koncentracích olej působil na testované houby rozdílně. Zatímco při koncentraci 0,25 % vykazoval olej vůči *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp. a *Trichoderma* sp. nízkou inhibiční aktivitou, na *Ch. thielavioides* olej působil stále vysokým inhibičním účinkem.

Tabulka 3.5: Inhibiční aktivita hřebíčkového EO na růst hub (%) (vlastní zpracování)

Hřebíček Koncentrace EO (%)	Inhibice růstu (%)			
	<i>Fusarium</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Chalaropsis thielavioides</i>
8 %	98,07	100,14	97,41	96,17
4 %	100,34	100,26	99,37	99,48
2 %	100,29	99,91	98,71	99,13
1 %	98,41	92,64	95,52	99,30
0,50 %	39,26	65,01	61,57	99,13
0,25 %	18,20	30,57	15,06	78,87

Legenda: červená barva – vysoká inhibice (procento inhibice je 75–100 %), žlutá barva – střední inhibice (procento inhibice je 50–75 %), zelená barva – neinhibuje (inhibice <50 %)



Graf 3.7: Inhibice růstu vybraných hub při různých koncentracích hřebíčkového EO (vlastní zpracování)

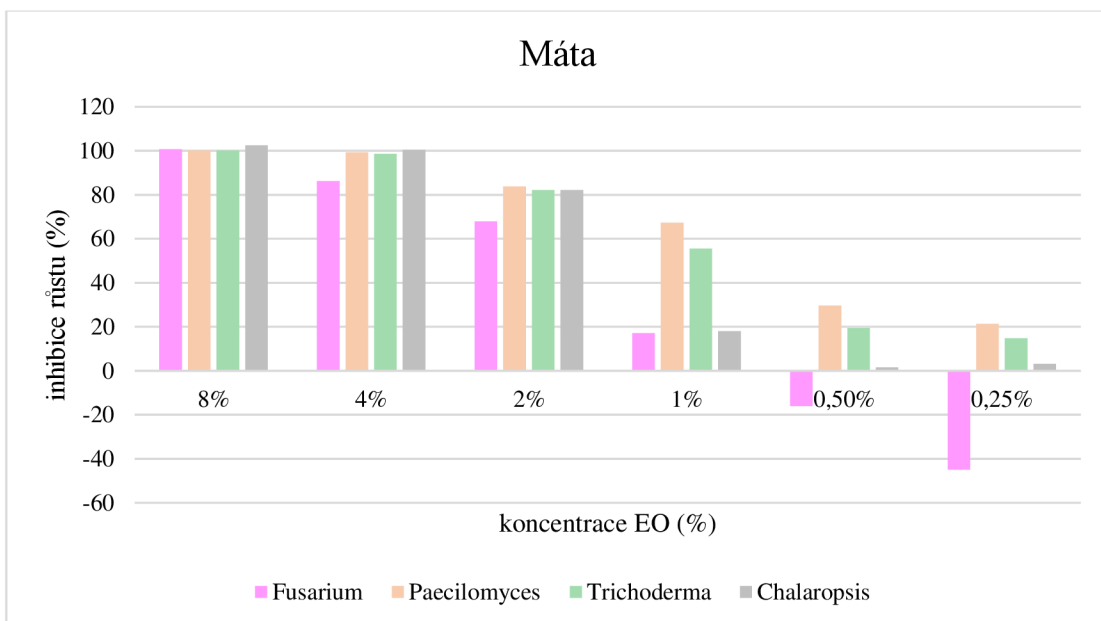
3.2.4 Antifungální aktivita mátového EO

Výsledky antifungální aktivity mátového EO jsou shrnuty v Tabulce 3.6. Antifungální aktivita mátového oleje je oproti ostatním testovaným olejům viditelně nižší. Z Grafu 3.8 je patrné, že koncentrace EO vyšší než 4 % působí na všechny testované houby vysokým inhibičním účinkem. Při koncentraci 2 % působí olej nejmenším inhibičním účinkem na houbu *Fusarium* sp. Při koncentraci nižší než 0,5 % vykazuje antifungální aktivita mátového EO vůči *Fusarium* sp. zápornými hodnotami, což znamená, že houba při této koncentraci rostla lépe než v kontrolní variantě bez EO (Obrázek 3.5). Koncentrace oleje 0,50 % a nižší působila na všechny testované houby nízkou nevýznamnou antifungální aktivitou.

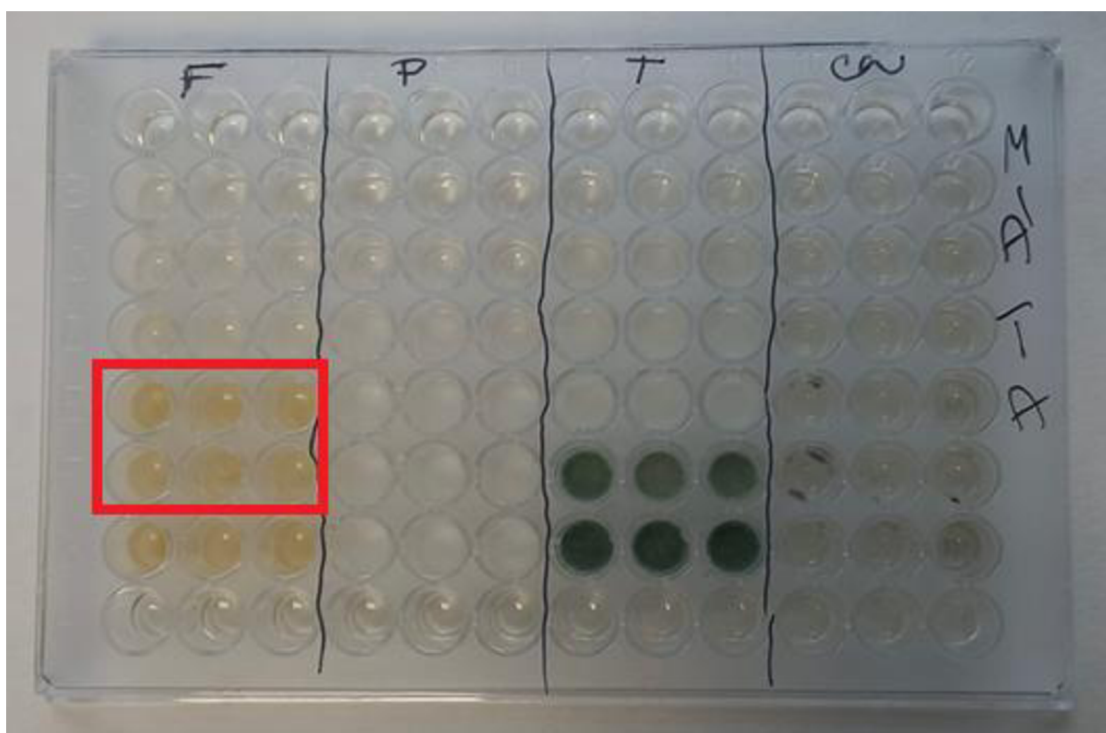
Tabulka 3.6: Inhibiční aktivita mátového EO na růst hub (%) (vlastní zpracování)

Máta Koncentrace EO (%)	Inhibice růstu (%)			
	<i>Fusarium</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Chalaropsis thielavioides</i>
8 %	100,74	100,19	100,12	102,51
4 %	86,15	99,34	98,61	100,44
2 %	67,96	83,74	82,12	82,19
1 %	17,09	67,29	55,48	18,03
0,50 %	-15,95	29,63	19,52	1,64
0,25 %	-44,89	21,31	14,76	3,17

Legenda: červená barva – vysoká inhibice (procento inhibice je 75–100 %), žlutá barva – střední inhibice (procento inhibice je 50–75 %), zelená barva – neinhibuje (inhibice <50 %)



Graf 3.8: Inhibice růstu vybraných hub při různých koncentracích mátového EO (vlastní zpracování)



Obrázek 3.5: Mikrodiluční destička – vyznačeny komůrky s *Fusarium* sp. při 0,50 % a 0,25 % koncentraci (foto: autor)

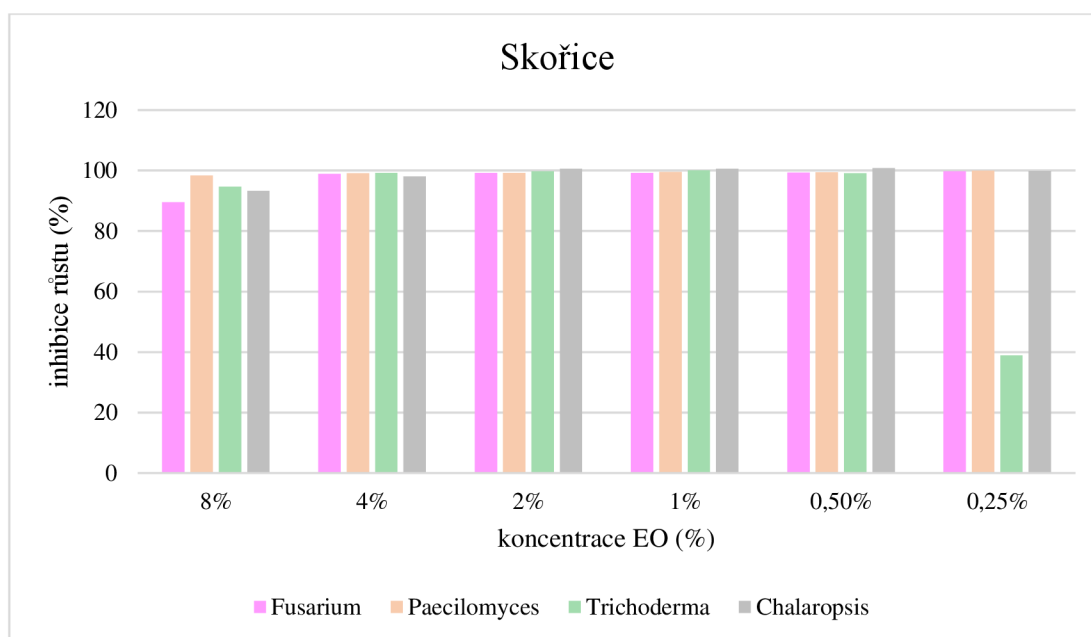
3.2.5 Antifungální aktivita skořicového EO

Výsledky antifungální aktivity skořicového oleje jsou shrnuty v Tabulce 3.7. Z Grafu 3.9 je patrné, že skořicový EO vykazoval vysokou inhibiční aktivitu. Konkrétně projevil vysokou inhibici růstu ve všech testovaných koncentracích na všechny testované houby, kromě koncentrace 0,25 % vůči houbě *Trichoderma* sp.

Tabulka 3.7: Inhibiční aktivita skořicového EO na růst hub (%) (vlastní zpracování)

Skořice Koncentrace EO (%)	Inhibice růstu (%)			
	<i>Fusarium</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Chalaropsis thielavioides</i>
8 %	89,57	98,30	94,68	93,26
4 %	98,88	99,08	99,25	98,07
2 %	99,20	99,22	99,68	100,55
1 %	99,16	99,48	100	100,55
0,50 %	99,32	99,41	99,11	100,83
0,25 %	99,72	99,96	38,92	99,86

Legenda: červená barva – vysoká inhibice (procento inhibice je 75–100 %), zelená barva – neinhibuje (inhibice <50 %)



Graf 3.9: Inhibice růstu vybraných hub při různých koncentracích skořicového EO (vlastní zpracování)

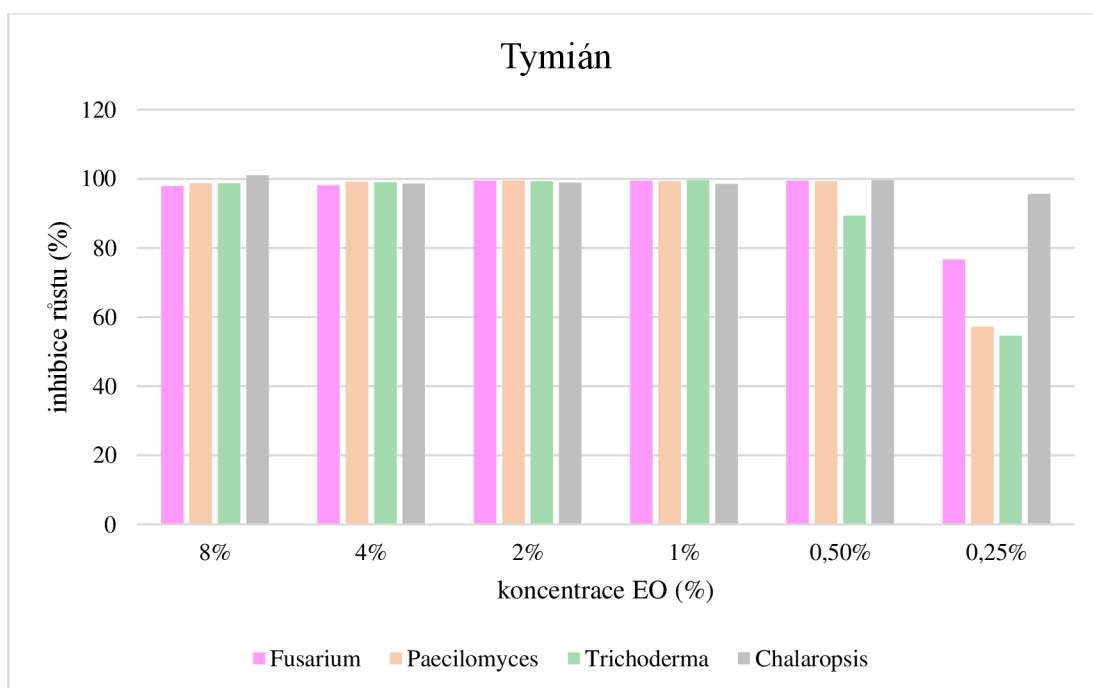
3.2.6 Antifungální aktivita tymiánového EO

Výsledky antifungální aktivity tymiánového EO shrnuje Tabulka 3.8. Stejně jako v případě skořicového oleje i EO z tymiánu vykazoval nejvyšší inhibiční účinek vůči všem testovaným houbám do koncentrace 0,50 % (viz Graf 3.10). Střední aktivitu vykazoval tymiánový EO při koncentraci 0,25 % vůči houbám *Paecilomyces* sp. a *Trichoderma* sp.

Tabulka 3.8: Inhibiční aktivita tymiánového EO na růst hub (%) (vlastní zpracování)

Tymián Koncentrace EO (%)	Inhibice růstu (%)			
	<i>Fusarium</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Chalaropsis thielavioides</i>
8 %	97,86	98,71	98,65	100,97
4 %	98,13	99,15	98,91	98,60
2 %	99,44	99,41	99,21	98,81
1 %	99,36	99,23	99,61	98,49
0,50 %	99,40	99,23	89,31	99,57
0,25 %	76,62	57,16	54,65	95,58

Legenda: červená barva – vysoká inhibice (procento inhibice je 75–100 %), žlutá barva – střední inhibice (procento inhibice je 50–75 %)



Graf 3.10: Inhibice růstu vybraných hub při různých koncentracích tymiánového EO (vlastní zpracování)

4 Diskuse

Z výsledků obou použitých metod – diskové difuzní metody a mikrodiluční metody je zřejmé, že vysokou antifungální aktivitu prokazují EO především z tymiánu, dobromysli a skořice. Zatímco z výsledků metody diskové difuze je patrné, že nejvyšší antifungální aktivitu prokazují tymiánový a dobromyslový olej, při mikrodiluční metodě vykazuje nejvyšší antifungální účinek vůči testovaným houbám skořicový olej společně s tymiánovým.

Nejméně inhibičně účinný EO se projevil v obou metodách máťový olej, ačkoliv při mikrodiluční metodě měl při koncentraci vyšší než 4 % vůči všem testovaným houbám vysokou inhibiční účinnost. Tento výsledek potvrzuje studie Pourbaige et al. (2013), která se zabývala antifungální aktivitou máťového EO a byl prokázán fakt, že máťový EO je účinný vůči testovaným houbovým patogenům a antifungální aktivita se zvyšuje se zvyšující se koncentrací oleje. Ačkoliv při mém měření antifungální aktivity mikrodiluční metodou máťový olej v koncentraci 0,25 % neinhiboval růst hub velmi dobře, ve studii Saharkhiz et al. (2012) máťový olej vykazoval proti kvasinkám rodu *Candida* při stejné koncentraci inhibiční účinek 43–51 %. Tento inhibiční rozdíl může být tedy dán rozdílností testovaného organismu, jelikož byla použita stejná metoda měření i stejné růstové médium (bujon).

Rozdíly ve výsledcích metody diskové difuze a mikrodiluční metody mohou být zapříčiněny zejména obsahem těkavých látek v EO. Při mikrodiluční metodě vykazovaly některé oleje vyšší inhibici růstu než za použití metody diskové difuze, i přes to, že byly použity v mnohem nižší koncentraci. Ve studii Cavanagh (2007) byla zkoumána role těkavých látek esenciálních olejů a jejich antifungální aktivita. Její studie potvrzuje, že některé EO mohou mít bioaktivní párovou (těkavou) fázi, která často působí i bez přímého kontaktu s cílovými mikroorganismy. Překvapivě bylo zjištěno, že inhibiční účinek na růst hub může být vyšší v případě využití nepřímého kontaktu olejů obsahujících tyto těkavé látky než při jejich přímém kontaktu.

Výsledky mikrodiluční metody prokazují, že největší inhibici růstu hub ze všech testovaných EO vykazuje skořicový olej, zatímco při diskové difuzní metodě prokazoval značně nižší antifungální aktivitu. Vyšší inhibiční aktivitu skořicového oleje při použití mikrodiluční metody mohlo zapříčinit bohaté množství, již zmíněných, těkavých látek obsažených v tomto oleji. Těkavé látky se v uzavřeném prostoru mikrodestičky efektivněji šířily, a tím silněji ovlivňovaly růst testovaných

hub. Toto tvrzení také potvrzuje studie od Yang et al. (2021), která se zabývá analýzou těkavých látek skořicového oleje a prokazuje spojitost mezi antifungálními účinky EO a jejich těkavými složkami.

Důvodem vysoké antifungální aktivity dobromyslového a tymiánového EO v obou metodách měření je především přítomnost thymolu a karvakrolu, které jsou jejich hlavními složkami. Studie Gutiérrez-Pozo et al. (2023) zabývající se antifungální aktivitou thymolu, karvakrolu a eugenolu potvrzuje vysokou antifungální účinnost EO obsahujících tyto látky. Studie dále poukazuje na významnou antifungální aktivitu hřebíčkového a skořicového oleje, přičemž zásadním důvodem této aktivity je obsah hlavní složky – eugenolu. Výsledky antifungální aktivity hřebíčkového oleje potvrzuje i studie od Chee a Lee (2007), ve které byla zkoumána antifungální aktivita oleje vůči kmenům hub napadajících kůži či nehty. Ve studii byla stanovena MIC 0,50 %, která se shoduje s výsledky mého měření mikrodiluční metody, kdy inhibice růstu při koncentraci oleje vyšší než 0,50 % byla vysoká.

Nízká antifungální aktivita mátového a citronelového EO vůči houbám za použití metody diskového difuzního testu je pravděpodobně zapříčiněna obsahem citralu, citronellalu, geraniolu či mentolu v kombinaci s agarovým médiem. Už v roce 1986 ve své studii Moleyar a Narasimham zjistili, že použitím agarového média se snižuje inhibiční účinek olejů obsahující tyto látky. Test antifungální aktivity byl proveden konkrétně vůči houbám *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* a *Penicillium digitatum*. Prováděn byl i antifungální test olejů bez agaru v kapalných třepaných kulturách a výsledky inhibice vyšly značně vyšší. Cavanagh (2007) také zmiňuje důležitost výběru média při určování citlivosti hub. Již dříve bylo zjištěno, že růst na různých médiích může významně změnit citlivost hub vůči antimykotickým látkám, jako jsou EO. Je proto důležité volit médium nejlépe odpovídající podmínkám, ve kterých se houby vyskytují v přirozeném prostředí, aby byly výsledky co nejrelevantnější.

Hodnoty inhibiční aktivity u *Ch. thielavioides* se u citronelového, dobromyslového, mátového a skořicového EO dostaly nad 100 % zřejmě z důvodu nepřesnosti při zakládání destiček. Jedním z konkrétních faktorů, který mohl způsobit chybu, je pravděpodobně použití jedné pipety. Při manipulaci mezi 96 komůrkami je možné, že se na špičce pipety zachytilo mikroskopické množství materiálu, které mohlo vést k nepřesnostem. Dalším důvodem může být specifický způsob růstu hub a aktuální nasměrování částí hub (fragmenty hyf) při měření spektrofotometrem.

5 Závěr

Z výsledků měření antifungální aktivity vybraných esenciálních olejů vůči testovaným houbám lze konstatovat, že všechny testované oleje antifungální aktivitu vykazovaly. Avšak při snižující se koncentraci se velmi rychle snižoval i inhibiční účinek. Nejvýznamnější antifungální aktivitou se prokázaly esenciální oleje z tymiánu, dobromysli a skořice, zatímco mátový olej vykazoval inhibiční účinek v nižších koncentracích nejslabší. Výsledky se v obou metodách mírně lišily, a to především z důvodu obsahu těkavých látek v olejích. Těkavé látky obsažené v esenciálních olejích se při mikrodiluční metodě v uzavřeném prostoru mikrodestičky efektivněji šířily, a tím silněji ovlivňovaly růst testovaných hub. Z tohoto důvodu při metodě diskové difuze došlo u mátového a citronelového oleje k nižší antifungální aktivitě i přes 100% koncentraci olejů, zatímco při mikrodiluční metodě vykazovaly oleje vysokou inhibiční účinnost i při značně nižší koncentraci.

Tato studie splnila cíle práce, kterým bylo zhodnocení inhibičních účinků zkoumaných olejů pomocí vybraných metod a jejich potenciálu jako možných prostředků pro kontrolu a potlačení růstu mikroskopických hub v potravinách.

Seznam použité literatury

Aromakh.cz (2024). *Dobromysl/oregáno. Éterický olej 10 ml*. [online]. Aromakh.cz. [cit. 17. 3. 2024] Dostupné z: https://www.aromakh.cz/dobromysloregano-etericky-olej-10-ml?gclid=Cj0KCQjwqdqvBhCPARIsANrmZhMrB-RURZ_9BllumD-wEfxE8twOgX4gcL3MwddHk3BEbyz9gTjae118aAoadEALw_wcB

Aromakh.cz (2024). *Tymián červený. Éterický olej 10 ml*. [online]. Aromakh.cz. [cit. 17. 3. 2024] Dostupné z: https://www.aromakh.cz/tymian-cerveney-etericky-olej-10-ml?gclid=Cj0KCQjwqdqvBhCPARIsANrmZhNd2xchq4tIhgxjkogUD-CSbGT1ZkJEQzcyWQBw7ffku7CXO47ViWgaAsdXEALw_wcB

Ashour, M., Wink, M., Gershenzon, J. (2010). Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. *Annual plant reviews volume: biochemistry of plant secondary metabolism*, 40: 258–303.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 2008, 46.2: 446-475.

Başer, K. H. C. a Buchbauer, G. (2010). Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton. ISBN ISBN 978-1-4200-6315-8. [cit. 3. 2. 2024]. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=2AEt-SKfB2nUC>.

Barbarossa, A., Sblano, S., Rosato, A., Carrieri, A., Corbo, F., Clodoveo, M. L., Francchiolla, G., Carocci, A. (2022). Synergistic action of Cinnamomum verum essential oil with sertraline. *Antibiotics*, 11.11: 1617.

Brauer, V. S., Rezende, C. P., Pessoni, A. M., De Paula, R. G., Rangappa, K. S., Nayaka, S. C., ... & Almeida, F. (2019). Antifungal agents in agriculture: Friends and foes of public health. *Biomolecules*, 9(10): 521.

Buckle, J. (2015). *Clinical Aromatherapy. Essential Oils in Healthcare*. Churchill Livingstone. ISBN 978-0-7020-5440-2.

Brabb, T., Newsome, D., Burich, A., Hanes, M. (2012). Infectious Diseases. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, 637–683.

Breitmaier, E. (2006). Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones. *John Wiley & Sons*.

Bora, L., Avram, S., Pavel, I. Z., Muntean, D., Liga, S., Buda, V., ... & Danciu, C. (2022). An up-to-date review regarding cutaneous benefits of *Origanum vulgare* L. essential oil. *Antibiotics*. 11(5): 549.

Cavanagh, H. M. (2007). Antifungal activity of the volatile phase of essential oils: a brief review. *Natural Product Communications*, 2(12).

Cannon, Paul F., Sutton, Brian C. (2004). Microfungi on Wood and Plant Debris. *Biodiversity of Fungi*. Elsevier. 217–239.

Castelli, M. V., Alastruey-Izquierdo, A., Cuesta, I., Monzon, A., Mellado, E., Rodriguez-Tudela, J. L., & Cuenca-Estrella, M. (2008). Susceptibility Testing and Molecular Classification of *Paecilomyces* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8): 2926–2928.

Dvořáková, M., Valterová, I., Vaněk, T. (2011). Monoterpenes in plants. *Chemické listy*, 105: 839–845.

Chiu, T., Poucet, T., Li, Y. (2022). The potential of plant proteins as antifungal agents for agricultural applications. *Synthetic and systems biotechnology*, 7(4): 1075-1083.

Gioffrè, G., Ursino, D., Labate, M. L. C., Giuffrè, A. M. (2020). The peel essential oil composition of bergamot fruit (*Citrus bergamia*, Risso) of Reggio Calabria (Italy): a review. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 835-845.

Grulich, V. (2011). *Cinnamomum verum* – skořicovník pravý/škoricovník. [online] Botany.cz. [cit. 5. 4. 2024]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/cinnamomum-verum/>

Gutiérrez-Pozo, M., Serna-Escolano, V., Giménez-Berenguer, M., Giménez, M. J., Zapata, P. J. (2023). The Preharvest Application of Essential Oils (Carvacrol, Eugenol, and Thymol) *Reduces Fungal Decay in Lemons*. *Agriculture*. 13(7), 1437.

Hanif, M. A., Nisar, S., Khan, G. S., Mushtaq, Z., Zubair, M. (2019). Essential oils. *Essential oil research: trends in biosynthesis, analytics, industrial applications and biotechnological production*, 3-17.

Harding, J. (2016). *Esenciální oleje od A do Z: všechno, co o nich potřebujete vědět*. Přeložil: Eva Fuková. Metafora, Praha. ISBN 978-80-7359-502-9.

Haro-González, J. N., Castillo-Herrera, G. A., Martínez-Velázquez, M., Espinosa-Andrews, H. (2021). Clove essential oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, chemical composition, food applications, and essential bioactivity for human health. *Molecules*, 26.21: 6387.

Hof, H. (2020). The medical relevance of *Fusarium* spp. *Journal of fungi*, 6(3): 117.

Horáčková, H. (2018) *Vliv seskviterpenů na detoxikační enzymy v jaterních řezech*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Hradci Králové, Farmaceutická fakulta.

Husičková, R. (2022). *Trichomy u vybraných zástupců rostlin*. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.

Hu, Y., Zhang, Z., Hua, B., Tao, L., Chen, W., Gao, Y., Suo, J., Yu, W., Wu, J., Song, L. (2022). The interaction of temperature and relative humidity affects the main aromatic components in postharvest *Torreya grandis* nuts. *Food chemistry*, 368, 130836.

Chee, H. Y. & Lee, M. H. (2007). Antifungal activity of clove essential oil and its volatile vapour against dermatophytic fungi. *Mycobiology*. 35(4), 241–243.

Jozífková, K. (2019) *Vláknité mikroskopické houby (plísňe) a mykotoxiny v bylinách*. Bakalářská práce. Univerzita Hradec Králové. Přírodovědecká fakulta.

Kakaraparthi, P. S., Srinivas, K. V. N. S., Kumar, J. K., Kumar, A. N., Rajput, D. K., Sarma, V. U. M. (2014). Variation in the essential oil content and composition of Citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.) in relation to time of harvest, and weather conditions. *Industrial Crops and Products*, 61: 240-248.

Kalina, T. a Váňa, J. (2005). Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Karolinum, Praha. ISBN 978-80-246-1036-8.

Karelhadek.eu (2024). Katalog aromaterapeutických preparátů Karla Hadka. [online]. Karelhadek.eu. [cit. 17. 3. 2024]. Dostupné z: https://www.karelhadek.eu/upload/downloads/Katalog_nahled_.pdf

Keizer, G. J. (1999) *Encyklopedie hub*. 2. vyd. Rebo, Čestlice. ISBN 80-7234-117-0.

Kubátová, A. (2012). Houby v našich domácnostech aneb o čem doma víte i nevíte. *Časopis Živa*, 5: 224–228.

Leite, B. L., Bonfim, R. R., Antonioli, A. R., Thomazzi, S. M., Araújo, A. A., Blank, A. F., Quintans-Júnior, L. J. (2010). Assessment of antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Cymbopogon winterianus* leaf essential oil. *Pharmaceutical biology*, 48(10): 1164–1169.

Loza-Tavera, H. (1999). Monoterpenes in Essential Oils. Chemicals via Higher Plant Bioengineering. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Boston, MA. [online] [cit. 11. 2. 2024]. Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-4729-7_5#citeas

McKay, D. L., a Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(8): 619–633.

Moghaddam, M., Pourbaige, M., Tabar, H. K., Farhadi, N., Hosseini, S. M. A. (2013). Composition and antifungal activity of peppermint (*Mentha piperita*) essential oil from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(4): 506–512.

Moleyar, V., Narasimham, P. (1986). Antifungal activity of some essential oil components. *Food mikrobiology*. 3: 331-336.

Möllerová, J. (2008) *Origanum vulgare L. – dobromysl obecná/pamajorán obyčejný* [online] Botany.cz. [cit. 17. 3. 2024]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/origanum-vulgare/>

Naher, L., Yusuf, U. K., Ismail, A., Hossain, K. (2014). *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. *Pak. J. Bot*, 46(4): 1489-1493.

Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4): 86.

Oniga, I., Pușcaș, C., Silaghi-Dumitrescu, R., Olah, N. K., Sevastre, B., Marica, R., ... & Hanganu, D. (2018). *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*: Chemical composition and biological studies. *Molecules*. 23(8), 2077.

Paduch, R., Kandefor-Szerszeń, M., Trytek, M. *et al.* (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 55: 315–327

Paulin-Mahady, A. E., Harrington, T. C., McNew, D. (2002). Phylogenetic and taxonomic evaluation of *Chalara*, *Chalaropsis*, and *Thielaviopsis* anamorphs associated with Ceratocystis. *Mycologia*, 94(1): 62-72.

Pazdera, Z. (2015). *Mentha × piperita – Máta peprná*. [online]. Herbář Wendys. [cit. 17. 3. 2024] Dostupné z: <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/130-mentha-piperita-mata-peprna>

Pazdera, Z. (2015). *Thymus vulgaris – Mateřídouška tymián* [online]. Herbář Wendys. [cit. 17. 3. 2024] Dostupné z: <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/797-thymus-vulgaris-materidouska-tymian>

Pazdera, Z. (2015) *Syzygium aromaticum – Hřebíčkovec vonný*. [online]. Herbář Wendys. [cit. 17. 3. 2024] Dostupné z: <https://botanika.wendys.cz/index.php/19-fr>

polivka-uzitkove-a-pametihodne-rostliny-cizich-zemi/1004-hrebickovec-vonny-syzygium-aromaticum

Pezzani, R., Vitalini, S., Iriti, M. (2017). Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: An update. *Phytochemistry reviews*, 16: 1253-1268.

Prasath Reddy, V., et al. (2014). Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Med Aromat Plants*, 3.164: 2167–0412.

Přikrylová, V. (2018). *Úvod do studia terpenů*. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita. Pedagogická fakulta.

Rizwan, B. (2021). Therapeutic potential of *Thymus vulgaris*: A Review.

Rohloff, J. (1999). Monoterpene composition of essential oil from peppermint (*Mentha × piperita* L.) with regard to leaf position using solid – phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3782-3786.

Saharkhiz, M. J., Motamedi, M., Zomorodian, K., Pakshir, K., Miri, R., Hemyari, K. (2012). Chemical composition, antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of *Mentha piperita* L. *International Scholarly Research Notices*.

Şahin, F., et al. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food control*. 15.7: 549-557.

Sedlářová, M., Mieslerová, B., Drábková Trojanová, Z., Lebeda, A. (2021). Biotrofní houby a peronosporý planě rostoucích rostlin. Česká fytopatologická společnost, Praha. ISBN 978-80-903545-6-2.

Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S., Kundu, B. (2017). Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of bioscience and bio-engineering*, 123(3): 308–313.

Shah, P. P., Mello, P. M. D. (2004). A review of medicinal uses and pharmacological effects of *Mentha piperita*.

Schuster, A., Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87: 787–799.

Sikora, H., Lepič, D. (2021) Identifikace terpenů rostlin rodu *cannabis* v ovzduší. In *XXIII. Mezinárodní konference o separační chemii a analýze toxických látek*. 112. [online] [cit. 12. 3. 2024]. Dostupné z: https://lcms.cz/labrulez-bucket-strapi-h3hsga3/Sbornik_prispevku_z_XXIII_rocniku_Mezinarodni_konference_o_separacni_chemii_a_analyze_toxickyh_latek_c4c1097a71/Sbornik-prispevku-z-XXIII.-rocniku-Mezinarodni-konference-o-separacni-chemii-a-analyze-toxickyh-latek%22.pdf#page=112

Simic, A., Rančić, A., Sokovic, M. D., Ristic, M., Grujic-Jovanovic, S., Vukojevic, J., Marin, P. D. (2008). Essential oil composition of *Cymbopogon winterianus*. and *Carum carvi*. and their antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*, 46(6): 437–441.

Tisserand, R. (2013). Lemon on the rocks: keep your essential oils cool. *Robert Tisserand*. [online] [cit. 4. 4. 2024]. Dostupné z: <https://roberttisserand.com/2013/07/lemon-on-the-rockkeep-your-essential-oils-cool/>

Tisserand, R., Young, R. (2014). Essential oil composition. *Essential Oil Safety. A Guide for Health Care Professionals*. 2: 5–22. [online] [cit. 11. 3. 2024]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/book/9780443062414/essential-oil-safety#book-description>

Tuley De Silva, K. (1995). A manual on the essential oil industry, United Nations Industrial Development Organization, Vienna, Austria. [online] [cit. 1. 4. 2024]. Dostupné z: https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/A_manual_on_the_essential_oil_industry_0.pdf

Tullio, V., Nostro, A., Mandras, N., Dugo, P., Banche, G., Cannatelli, M. A., ... & Carlone, N. A. (2007). Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi

determined by broth microdilution and vapour contact methods. *Journal of applied microbiology*, 102(6), 1544–1550.

Uma, K., Huang, X., Kumar, B. A. (2017). Antifungal effect of plant extract and essential oil. *Chinese journal of integrative medicine*, 23(3): 233-239.

Váňová, J. (2008). *Biologická aktivita obsahových látek rostlin IX. Antimikrobiální aktivita některých sekundárních metabolitů*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.

Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. N., Valero, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1): 1-20.

Verma, R. S., Verma, S. K., Tandon, S., Padalia, R. C., Darokar, M. P. (2020). Chemical composition and antimicrobial activity of Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) essential oil extracted by different methods. *Journal of Essential Oil Research*, 32(5): 449–455

Weber, R. W., Tribe, H. T. (2004). *Thielaviopsis basicola* and *T. thielavioides*, two ubiquitous moulds on carrots sold in shops. *Mycologist*, 18(1): 6–10.

Wilkinson, J. M., Hipwell, M., Ryan, T., Cavanagh, H. M. (2003). Bioactivity of *Backhousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 76–81.

Wright, M. S., Connick Jr, W. J., Jackson, M. A. (2003). Use of *Paecilomyces* spp. as pathogenic agents against subterranean termites. *US patent*, 6660291.

Yang, K., Liu, A., Hu, A., Li, J., Zen, Z., Liu, Y., ... & Li, C. (2021). Preparation and characterization of cinnamon essential oil nanocapsules and comparison of volatile components and antibacterial ability of cinnamon essential oil before and after encapsulation. *Food control*. 123.

Zrubecká, A. (2021). *Aromaterapie podle ročních období*. 2. vydání. CPress, Brno.
ISBN 978-80-264-3687-4.

Seznam obrázků

Obrázek 1.1: <i>Fusarium</i> sp. a <i>Chalaropsis thielavioides</i> (foto: autor).....	22
Obrázek 1.2: <i>Paecilomyces</i> sp. a <i>Trichoderma</i> sp. (foto: autor).....	23
Obrázek 1.3 <i>Paecilomyces</i> spp. a <i>Trichoderma</i> spp. (foto: autor).....	23
Obrázek 2.1: Příprava vzorků zeleniny pro inkubaci na agarových plotnách (foto: autor) ..	25
Obrázek 2.2: Vlhké komůrky se vzorky zeleniny po 12 dnech inkubace	26
Obrázek 2.3: Vlhké komůrky s vyskládanými vzorky petržele, mrkve a celeru	26
Obrázek 2.4: Agarové plotny se vzorky mrkve (foto: autor).....	27
Obrázek 2.5: Nahoře a vlevo dole – agarové plotny, dole vpravo – založené vlhké komůrky (foto: autor)	28
Obrázek 2.6: Izolované kmeny hub rozřazené do 13 morfotypů (foto: autor).....	28
Obrázek 2.7: Petriho misky připravené na rozetření suspenze hub a vložení disku s EO (foto: autor)	29
Obrázek 3.1: Agarové plotny s inhibiční aktivitou vybraných EO na růst houby <i>Fusarium</i> sp. Zleva: tymiánový, dobromyslový, hřebíčkový, skořicový, citronelový a mátový EO (foto: autor)	32
Obrázek 3.2: Agarové plotny s inhibiční aktivitou vybraných EO na růst <i>Paecilomyces</i> sp. Zleva: tymiánový, dobromyslový, hřebíčkový, skořicový, citronelový a mátový EO (foto: autor)	34
Obrázek 3.3: Agarové plotny s inhibiční aktivitou vybraných EO na růst <i>Trichoderma</i> sp. Zleva: tymiánový, dobromyslový, hřebíčkový, skořicový, citronelový a mátový EO (foto: autor)	35
Obrázek 3.4: Agarové plotny s inhibiční aktivitou vybraných EO na růst <i>Ch. thielavioides</i> . Zleva: mátový, citronelový, tymiánový, hřebíčkový, dobromyslový a skořicový EO (foto: autor)	36
Obrázek 3.5: Mikrodiluční destička – vyznačeny komůrky s <i>Fusarium</i> sp. při 0,50 % a 0,25 % koncentraci (foto: autor)	41

Seznam grafů

Graf 3.1 Průměr ploch inhibičních zón testovaných EO u <i>Fusarium</i> sp. (cm ²).....	32
Graf 3.2 Průměr ploch inhibičních zón testovaných EO u <i>Paecilomyces</i> sp. (cm ²)	33
Graf 3.3 Průměr ploch inhibičních zón testovaných EO u <i>Trichoderma</i> sp. (cm ²)	35
Graf 3.4 Průměr ploch inhibičních zón testovaných EO u <i>Ch. thielavioides</i> (cm ²)	36
Graf 3.5 Inhibice růstu vybraných hub při různých koncentracích citronelového EO.....	38
Graf 3.6 Inhibice růstu vybraných hub při různých koncentracích dobromyslového EO.....	39
Graf 3.7 Inhibice růstu vybraných hub při různých koncentracích hřebíčkového EO.....	40
Graf 3.8 Inhibice růstu vybraných hub při různých koncentracích mátového EO.....	41
Graf 3.9 Inhibice růstu vybraných hub při různých koncentracích skořicového EO	42
Graf 3.10 Inhibice růstu vybraných hub při různých koncentracích tymiánového EO.....	43

Seznam tabulek

Tabulka 2.1: Schéma destičky v řadách (vlastní zpracování)	30
Tabulka 3.1: Průměr ploch (cm ²) inhibičních zón jednotlivých EO (±SD) (vlastní zpracování).....	31
Tabulka 3.2: Rozdělení inhibiční aktivity EO podle hodnot (%).....	37
Tabulka 3.3: Inhibiční aktivita citronelového EO na růst hub (%) (vlastní zpracování)	37
Tabulka 3.4: Inhibiční aktivita dobromyslového EO na růst hub (%) (vlastní zpracování) ..	38
Tabulka 3.5: Inhibiční aktivita hřebíčkového EO na růst hub (%) (vlastní zpracování).....	39
Tabulka 3.6: Inhibiční aktivita mátového EO na růst hub (%) (vlastní zpracování)	40
Tabulka 3.7: Inhibiční aktivita skořicového EO na růst hub (%) (vlastní zpracování).....	42
Tabulka 3.8: Inhibiční aktivita tymiánového EO na růst hub (%) (vlastní zpracování)	43

Seznam použitých zkratek

EO – esenciální oleje

F – *Fusarium* sp.

CH – *Chalaropsis thielavioides*

MEA – malt extract agar

P – *Paecilomyces* sp.

PDA – bramborový dextrózový agar

T – *Trichoderma* sp.