

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Antimikrobiální aktivita silic z vybraných druhů rostlin
čeledi *Lamiaceae***

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Olga Zítková

Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů

Vedoucí práce: Ing. Pavel Nový, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Antimikrobiální aktivita silic z vybraných druhů rostlin čeledi *Lamiaceae*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Pavlu Novému, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vedení při vypracování diplomové práce.

Antimikrobiální aktivita silic z vybraných druhů rostlin čeledi *Lamiaceae*

Souhrn

Jedním z hlavních problémů dnešní doby je nadměrné užívání antibiotických léčiv a s tím spojený rozvoj rezistence vůči těmto látkám. V poslední době se pozornost upírá k antimikrobiálním látkám přírodního původu, které by mohly být alternativou k běžně používaným antibiotikům nebo potravinářským aditivům. Cílem této práce bylo vybrat vhodné druhy siličnatých rostlin, které jsou nedostatečně nebo vůbec prozkoumané.

Pomocí vodní destilace byly získány silice z druhů *Glechoma hederacea* L., *Galeopsis segetum* a *Leonurus cardiaca* L. a následně byla testována jejich antimikrobiální aktivita bujónovou mikrodiluční metodou in vitro proti bakteriím *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* a kvasince *Candida albicans*. Chemické složení silic bylo pak zanalyzováno pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Antimikrobiální aktivita byla potvrzena pouze u silice *G. segetum* s minimální inhibiční koncentrací 2048 $\mu\text{g/ml}$ proti *B. cereus*. Majoritní složkou této silice β -karyofylénoxid (35,19 %), zatímco v *G. hederacea* byl nejvíce zastoupen phytol (23,29 %), spathulenol (17,48 %) a hexahydrofarnesyl aceton (14,79 %) a *L. cardiaca* obsahovala nejvíce kyseliny palmitové (38,82 %) a hexahydrofarnesyl acetonu (11,10 %).

Klíčová slova: *Lamiaceae*, antimikrobiální aktivita, hluchavkovité, silice, rezistence

Antimicrobial activity of essential oils from selected plant species of the family *Lamiaceae*

Summary

One of the main problems of today is the excessive use of antibiotic drugs and the associated development of resistance to these substances. Attention has recently been paid to antimicrobial substances of natural origin that could be an alternative to commonly used antibiotics or food additives. The aim of this work was to select suitable species of silica plants that are insufficiently or even explored.

Glechoma hederacea L., *Galeopsis segetum* and *Leonurus cardiaca* L. were obtained by means of water distillation and their antimicrobial activity was tested in vitro by the broth microdilution method against bacteria *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. The chemical composition of the oils was then analyzed by gas chromatography with mass spectrometry.

Antimicrobial activity was confirmed only for *G. segetum* silica with a minimum inhibitory concentration of 2048 µg / ml against *B. cereus*. The majority of this beta-caryophyllin oxide (35.19%), while in *G. hederacea* the most represented were phytol (23.29%), spathulenol (17.48%) and hexahydrofarnesyl acetone (14.79%) and *L. cardiaca* containing most palmitic acid (38.82%) and hexahydrofarnesyl acetone (11.10%).

Keywords: *Lamiaceae*, antimicrobial activity, essential oils, resistance

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce a hypotéza	2
3	Přehled literatury	3
3.1	Význam silic	3
3.1.1	Historie silic	3
3.1.2	Chemické vlastnosti	4
3.1.3	Antimikrobiální aktivita silic (Mechanismus účinku)	6
3.1.4	Využití silic.....	8
3.2	Původci onemocnění	10
3.2.1	Antibiotická rezistence	12
3.2.2	Charakteristika vybraných mikroorganismů.....	13
3.3	Léčivé rostliny	16
3.3.1	Čeľad' Lamiaceae	16
3.4	Extrakce silic	20
3.5	Analýza chemického složení - Plynová chromatografie	22
3.6	Mikrodiluční metoda	24
4	Materiál a metody	26
4.1	Rostlinný materiál	26
4.2	Přístroje a pomůcky	26
4.3	Chemikálie	27
4.4	Extrakce silic	27
4.5	Mikroorganismy	27
4.6	Kultivační média	27
4.7	Antimikrobiální aktivita	28
4.7.1	Příprava zásobních roztoků přírodních látek	28
4.7.2	Příprava inokula	28
4.7.3	Příprava antibiotik pro testování	29
4.7.4	Příprava roztoků přírodních látek pro testování	29
4.7.5	Příprava mikrotitrační destičky	29
4.7.6	Příprava inokula pro testování	30
4.7.7	Zaočkování destičky	30
4.8	Chemické složení	31
5	Výsledky	32
5.1	Extrakce silic	32
5.2	Antimikrobiální aktivita	32

5.3 Chemické složení	33
6 Diskuze	35
7 Závěr	39
8 Seznam literatury	40
9 Seznam zkratek	46
10 Seznam obrázků	47
11 Seznam tabulek	48

1 Úvod

Jedním z hlavních problémů dnešní společnosti je vznik antibiotické rezistence u patogenních mikroorganismů, které se běžně vyskytují v lidském prostředí a potravinách a mohou způsobit vážná až smrtelná onemocnění. Z důvodu zvyšující se rezistence mikroorganismů vůči antibiotickým látkám jsou esenciální oleje zamýšleny jako možná prevence, léčba nebo až náhrada antibiotik. A právě proto se řada autorů zabývá účinky esenciálních olejů, a to zejména účinky antimikrobiálními, virucidními, antiparazitickými, antimutagenními, antikarcinogenními nebo protizánětlivými. Dalším předmětem výzkumu je využití esenciálních olejů jako bezpečné ochrany k prodloužení doby údržnosti potravin a zkoumání ovlivnění organoleptických vlastností potravin.

Esenciální oleje též silice jsou složité chemické sloučeniny, tvořené terpeny, terpenoidy a aromatickými sloučeninami. Jedná se o sekundární metabolity rostlin, pro které je charakteristické silné aroma. Existuje mnoho způsobů jejich získávání, nejčastěji jde o lisování nebo parní destilaci. Je známo, že složení oleje je ovlivněno mnoha faktory, jako je podnebí, půda, způsob pěstování a sklizně, stav rostliny i použitá část rostliny. Všechny tyto faktory mohou do značné míry způsobit variabilitu ve složení oleje a ovlivnit jeho účinky.

U mnohých rostlin, využívaných v lidovém léčitelství nebyly dosud ověřeny jejich účinky a složení. V lidovém léčitelství se využívá řada siličnatých rostlin, jejichž antimikrobiální účinky a nebyly dosud dostatečně zkoumány a u některých není známo ani složení jejich silic. Právě toto tradiční využití rostlin tedy může posloužit jako dobré vodítko při hledání nových silic se zajímavými biologickými účinky.

2 Cíl práce a hypotéza

Cílem práce bylo vybrat vhodné druhy siličnatých rostlin (dosud vůbec nebo nedostatečně testovaných), z nich vydestilovat silice a otestovat jejich antimikrobiální aktivitu a zanalyzovat jejich chemické složení.

Hypotéza: Na základě využití rostlin čeledi *Lamiaceae* v lidovém léčitelství lze předpokládat antimikrobiální aktivitu jejich silic.

3 Přehled literatury

3.1 Význam silic

Také známé pod názvem esenciální oleje nebo éterické oleje, jsou aromatické olejovité kapaliny z rostlinného materiálu, jako jsou květy, pupeny, semena, listy, větvičky, stonky, dřevo, plody a kořeny (Burt et al., 2004). Esenciální oleje jsou produkovány rostlinami, jako sekundární metabolity, pro které je charakteristické silné aroma. Silice jsou získávány z různých aromatických rostlin, které se obvykle nacházejí v mírných nebo teplých zemích, kde jsou často součástí tradičního lékopisu (Nazzaro et al., 2013). Silice mohou být získány pomocí exprese, fermentace, enfleurage nebo extrakce. Pro komerční účely se nejčastěji používá parní destilace (Burt, 2004). V přírodě hrají esenciální oleje důležitou roli v ochraně rostlin. Mohou také přitahovat nebo odpuzovat některé druhy hmyzu (Bakkali et al., 2008).

Už v minulosti se vědělo, že některé esenciální oleje mají antibakteriální vlastnosti stejně jako koření, ale až teprve nedávno se věda začala zajímat o tyto látky. Kromě antibakteriálních vlastností silic bylo prokázáno, že vykazují i antivirové, antimykotické, antitoxigenní, antiparazitické a insekticidní účinky (Burt, 2004). Kvůli jejich antimikrobiálním účinkům jsou stále častěji využívány jako alternativa k chemickým látkám (Bakkali et al., 2008). Další důvody, které vedou k jejich využívání, jsou poměrně snadné získávání a biodegradace, při které nedochází k znečištění životního prostředí (Mlejová et al., 2010).

V současnosti je známo přes 3000 esenciálních olejů, z nichž 300 je určeno ke komerčním účelům (Burt, 2004).

3.1.1 Historie silic

Ačkoliv se koření používalo již od starověku, z esenciálních olejů byl znám pouze olej z terpentýnu zmíněný v řecké a římské historii. Destilace jako metoda získávání silic byla poprvé použita na východě (Egypt, Indie a Persie) více než před 2000 let. První písemné zmínky o destilaci silic jsou připisovány katalánskému lékaři Villanovi (cca 1235 – 1311). Do 13. století byly esenciální oleje vyráběny v lékárnách, ale jejich použití nebylo příliš rozšířené do 16. století. Podle francouzského lékaře Du Chesneho byla v 17. století příprava

esenciálních olejů všeobecně známá a lékárny byly zásobeny 15 – 20 druhy olejů. V průběhu 19. – 20. století se používání esenciálních olejů v medicíně stalo druhotný. V dnešní době mají silice největší využití v potravinářství (jako příchutě), v kosmetice (vůně a aroma) a jako léčiva (Burt, 2004).

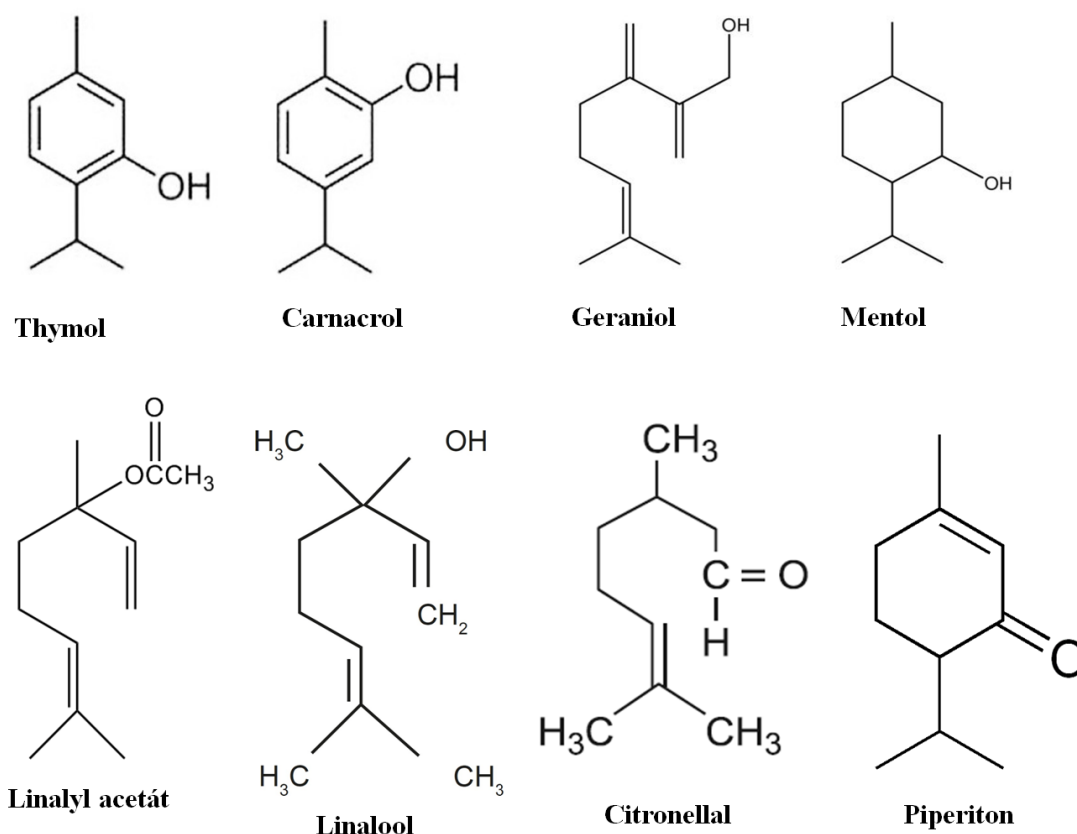
3.1.2 Chemické vlastnosti

Esenciální oleje jsou tedy kapalné, čiré nebo barevné, rozpustné v tucích a organických rozpouštědlech, které mají nižší hustotu než voda (Nazzaro et al., 2013). Jsou to velmi složité přírodní směsi, které mohou obsahovat asi 20 – 60 složek v poměrně odlišných koncentracích. Silice jsou charakterizovány dvěma nebo třemi hlavními složkami ve vysokých koncentracích (20 – 70%) a dalšími složkami přítomných ve stopovém množství. Obecně platí, že hlavní složky určují biologické vlastnosti silic. Esenciální oleje jsou tvořeny dvěma skupinami sloučenin – terpeny a terpenoidy, a aromatické a alifatické sloučeniny. Všechny jsou charakterizované nízkou molekulovou hmotností (Bakkali et al., 2008).

Vzhledem k esenciálním olejům jsou nejdůležitější skupinou přírodních produktů terpeny a terpenoidy (Baser et al., 2010).

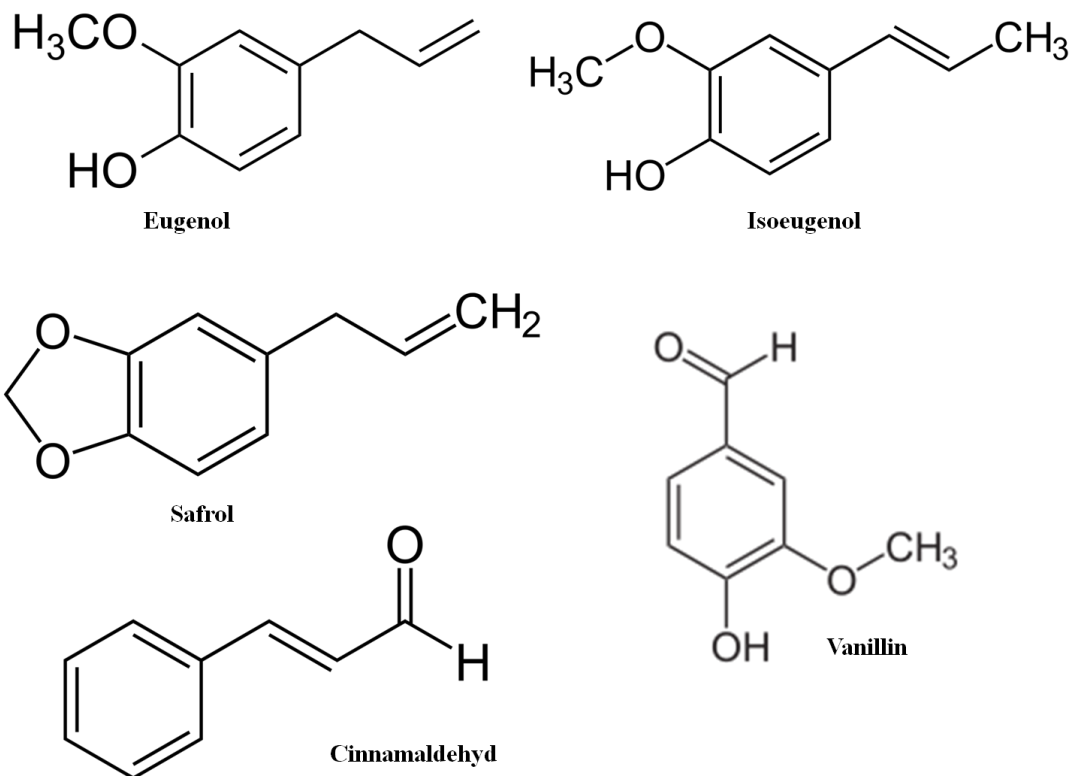
Molekula terpenu je složena z několika 5uhlíkatých jednotek navázaných isoprenem (Bakkali et al., 2008). Molekuly terpenu se syntetizují v cytoplasmě rostlinné buňky, kde jejich syntéza probíhá v mechanismu kyseliny mevalonové. Hlavní terpeny jsou monoterpeny (C₁₀) a seskviterpeny (C₁₅), ale mohou se vyskytovat i delší řetězce, jako jsou diterpeny (C₂₀), triterpeny (C₃₀) a tak dále (Nazzaro et al., 2013). Monoterpeny jsou tvořeny spojením dvou isoprenových jednotek. Většina esenciálních olejů obsahuje 90% monoterpenů (Aridogan et al., 2002). Mezi neznámější terpeny patří p-cymen, limonen, terpinen, sabinen a α -, β -pinen. Většina terpenů nevykazuje vysokou antimikrobiální aktivitu. Jedna z nejdůležitějších složek silice tymiánu p-cymen nevykazuje antimikrobiální aktivitu proti spoustě gramnegativních patogenů. Jiné terpeny jako limonen, α -pinen, β -pinen, γ -terpinen, (+)-sabinen vykazují buď nízkou, nebo žádnou antimikrobiální aktivitu proti mnohým rodům bakterií. In vitro testy naznačují, že pokud se terpeny využívají jako singulární sloučeniny, tak vykazují neúčinnou antimikrobiální aktivitu (Nazzaro et al., 2013).

Terpenoidy jsou terpeny s přidanými molekulami kyslíky nebo jejich methylové skupiny byly přesunuty nebo odstraněny specifickými enzymy. K nejpoužívanějším terpenoidům patří thymol, carvacrol, linalool, mentol, geraniol, linalyl acetát, citronellal a piperiton. Antimikrobiální aktivita většiny terpenoidů souvisí s jejich funkčními skupinami. Hydroxylová skupina fenolických terpenoidů a přítomnost delokalizovaných elektronů jsou důležité pro antimikrobiální aktivitu terpenoidů (Nazzaro et al., 2013).



Obrázek č. 1: Terpenoidy

Aromatické sloučeniny, odvozené od fenypropanu, se vyskytují méně často než terpeny (Bakkali et al., 2008). Eugenol, izoeugenol, vanilin, safrol a cinnamaldehyd jsou nejvíce studované fenypropany. Většina antimikrobiálních účinků těchto molekul je dána jejich volnými hydroxylovými skupinami, ale také závisí na typu a počtu substitucí na aromatickém kruhu. Obecně řečeno, fenypropany vykazují řadu antibakteriálních účinků (Nazzaro et al., 2013).



Obrázek č. 2: Fenylpropany

3.1.3 Antimikrobiální aktivita silic (Mechanismus účinku)

Léčivé rostliny, používané v tradičním léčení na infekční onemocnění, se zdají být bohatým zdrojem bioaktivních látek. Během posledního desetiletí byly léčivé rostliny a rostlinné extrakty testovány na antimikrobiální aktivitu (Reichling et al., 2009). Zelenina, koření a ovoce s vysokým obsahem esenciálních olejů je vynikající zdroj přírodních látek s antimikrobiální aktivitou (Nazzaro et al., 2013).

Mnohé z antimikrobiálních sloučenin jsou neustále vylučovány rostlinami a jiné jsou syntetizovány jako mechanismy obrany proti patogenům. Antimikrobiální aktivita esenciálních olejů, podobně jako ostatní přírodní extrakty, závisí na jejich chemickém složení a množství jednotlivých složek. Tyto molekuly mohou být v rostlině přirozeně přítomné v aktivní formě nebo mohou být aktivovány specifickými enzymy, když je rostlina vystavena určitému biotickému nebo abiotickému stresu. (Nazzaro et al., 2013).

Obecně platí, že esenciální oleje působí jako inhibitor růstu bakteriálních buněk a také inhibují produkci toxických bakteriálních metabolitů. Většina esenciálních olejů má silnější účinek na gramozitivní bakterie než na gramnegativní druhy bakterií. Tento účinek je

způsoben rozdíly ve složení buněčné membrány (De Martino et al., 2009). Studie naznačují, že silice s vysokou koncentrací thymolu a carvacrolu např. oregano a tymián, inhibují grampozitivní bakterie více než gramnegativní bakterie (Edris et al., 2007).

Aktivita esenciálních olejů může ovlivnit jak vnější obal buňky, tak cytoplazmu. Membrána představuje hranici mezi cytoplasmem a vnějším prostředím, umožňuje import a export metabolitů a iontů nezbytných pro všechny činnosti uvnitř buňky (Mrozik et al., 2004). Hydrofobicita, která je typická pro esenciální oleje, je odpovědná za narušení bakteriálních struktur, které vedou ke zvýšení propustnosti kvůli neschopnosti oddělit esenciální oleje od bakteriální buněčné membrány. Permeabilita buněčné membrány je zásadní pro mnoho buněčných funkcí, včetně udržování energetického stavu buňky, membránové procesy přenosu energie, transport rozpuštěných látek a metabolické regulace (Nazzaro et al., 2013). Změny v propustnosti membrány a vady v transportu molekul a iontů vedou k nevyváženosti uvnitř buňky. To následně vede ke koagulaci cytoplazmy, denaturaci enzymů a buněčných proteinů a ztrátě metabolitů a iontů (Burt et al., 2003). Z toho vyplývá, že hydrofobní povaha esenciálních olejů jim umožňuje proniknout do mikrobiálních buněk a způsobit změny ve struktuře a funkčnosti. To by mohlo vysvětlit, proč jsou esenciální oleje obecně nejúčinnější proti grampozitivním mikroorganismům (Nazzaro et al., 2013). Vnější obal některých gramnegativních bakterií je odolnější vůči působení esenciálních olejů a jejich složek. Gramnegativní buněčná stěna neumožňuje vstup hydrofobních molekul stejně snadno jako u grampozitivních bakterií (Burt et al., 2003). Vzhledem k široké škále molekul přítomných v přírodních extraktech nemůže být antimikrobiální aktivita přičítána jedinému mechanismu. Místo toho se na odlišných místech uvnitř a na povrchu buňky podílejí různé biochemické a strukturální mechanismy (Carson et al., 2002). Dochází tak k modifikaci buněčné membrány, cytoplazmy, enzymů a proteinů. Tyto mechanismy tak mohou zcela změnit konformaci mikrobiální buňky (Burt et al., 2003).

Bezohledné užívání antimikrobiálních látek mělo za následek vznik řady rezistentních bakterií, hub a virů vůči léčivům. Z toho lze usuzovat, že v následujících letech se věda zaměří na rostoucí odolnost patogenních mikroorganismů a její překonání účinnějšími antimikrobiálními látkami (Reichling et al., 2009).

Antimikrobiální aktivita esenciálních olejů je základem mnoha aplikací, zejména v oblasti konzervování potravin, aromaterapie a doplňkové medicíny (Reichling et al., 2009).

3.1.4 Využití silic

Rostoucí obavy spotřebitelů ohledně potenciálně škodlivých syntetických přísad vedly k zájmu o látky přírodního původu. Což mělo za následek používání aromatických rostlin, jejich výtažků a esenciálních olejů jako funkčních složek v krmivářském, potravinářském, farmaceutickém průmyslu. V současné době tato odvětví hledají účinné, bezpečné a nákladově efektivní látky s jasně definovanými způsoby působení a osvědčenými výhodami. Velice blízko k naplnění těchto požadavků mají právě esenciální oleje. Přestože stále není dostatek znalostí o mechanismu účinku různých složek v aromatických rostlinách, mohou být použity jako nové sloučeniny pro zdraví a výživu lidí a zvířat. Je také důležité vzít v úvahu, že zlepšení zdravotního stavu zvířat může vést k lepší bezpečnosti a kvalitě potravin, což je prospěšné pro spotřebitele (Christaki et al., 2012).

Silice jsou hojně využívány v kosmetickém průmyslu, kde se uplatňují jako prostředky k úpravě a korekci našich pachů, k ochraně pokožky a k čištění, nikoliv jako léčiva, zdravotnické přípravky a biocidy. K těmto přípravkům patří parfémy, mýdla, tělová mléka, šampony, balzámy, ústní vody atd. (Bowles, 2003). Nejpoužívanější silice jsou citrusové, silice z květů jako je jasmín, růže, ylang – ylang (Červený, 1999).

Krmivářský průmysl

Do stravy zvířat mohou být také zahrnuty krmivové přídatné látky získané z rostlin, také nazývané fytogenika nebo fytobiotika, nebo rostlinné látky, pro zlepšení produktivity zvířat a vlastností výsledných krmiv a živočišných produktů (Christaki et al., 2012). Mezi těmito přírodními přísadami byly aromatické rostliny, jejich výtažky a éterické oleje. Zkoumaly se jejich výhody nad antibiotiky jako růstové promotory. Tyto látky jsou bez reziduí a považovány za bezpečné (Brenes et Roura, 2010).

V dnešní době se zvyšuje zájem o používání bylin a koření ve výživě zvířat s cílem nahradit používání antibiotik a ionoforových antikocidiálních látek, a to zejména po zákazu

doplňkových látek z antibiotických krmiv v zemích Evropské unie v roce 2006 (Greathead et Roura, 2003).

Potravinářský průmysl

Aromatické rostliny, známé jako byliny a koření, se na Středním východě používaly již od roku 5000 př. n. l. právě kvůli svým konzervačním a léčivým vlastnostem, krom toho zvyšují vůni a chuť jídla (Christaki et al., 2012). Dnes se používají především jako dochucovadla potravin a nápojů. Silice ovlivňují a dráždí chuťové a čichové receptory, a sliznici trávicího traktu, tím dochází k uvolnění trávicí šťávy a zlepšení trávení. Do potravin mohou být přidány za účelem prodloužení trvanlivosti nebo k úpravě vzhledu (barvy), vůně a chuti (Červený, 1999). Užívání koření jako složky potravin přesně definuje vyhláška Ministerstva zemědělství č. 331/1997 Sb.

Přirozenou součástí silic jsou i antioxidační a antimikrobiální složky (Berger, 2007). Antioxidanty v potravinách zabraňují žluknutí tuků, změně zápachu a barvy. K nejčastěji využívaným rostlinám patří rozmarýn, hřebíček, zázvor či kurkuma (Peter, 2001). Může se použít celá rostlina nebo jen silice. Konkrétní sloučeniny vyskytující se v těchto rostlinách jsou rosmanol, karneol, eugenol nebo gingerol (Franz et al., 2010). Antimikrobiální sloučeniny působí jako inhibitory růstu mikroorganismů, spíše zpomalují kažení potravin (Christaki et al., 2012). Nachází se v silicích rostlin hořčice, česneku, pálivé červené paprice, hřebíčku a tymiánu a jedná se o sloučeniny allylthiokyanát, alicin, kapsaicin, eugenol, carvacrol, tymol a borneol (Peter, 2001). Potenciální použití esenciálních olejů jako přírodních antimikrobiálních látek a antioxidantů bylo zaznamenáno u masa, ryb, ovoce, zeleniny a mléčných výrobků. Literatura poukazuje na možnost nalezení potenciálních synergií pro zvýšení efektivity esenciálních olejů (Sánchez-González et al., 2011). Několik autorů uvádí synergický účinek nisinu a esenciálního oleje nebo čistých složek esenciálních olejů. Kombinace tymiánové silice a nisinu vykazovala synergickou účinnost proti *Listeria monocytogenes* u mletého hovězího masa při skladování v ledničce (Solomakos et al., 2008).

Farmaceutický průmysl

Esenciální oleje a jejich těkavé složky jsou široce používány k prevenci a léčbě lidských onemocnění. Diskutuje se jejich případná úloha a způsob působení s ohledem na prevenci a léčbu rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění včetně aterosklerózy a trombózy, i jejich bioaktivita jako antibakteriálních, antivirových, antioxidačních a antidiabetických činidel. Rovněž jsou popsány jejich aplikace jako přírodní přísady pro penetraci kůže jako transdermální podávání léčiva a terapeutické vlastnosti esenciálních olejů v aromatické a masážní terapii (Edris et al., 2007). Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) téměř 80% populace planety, zejména v rozvojových zemích, stále využívá rostlinné produkty ve svém léčení (Gurib-Fakim, 2006).

Hlavním způsobem šíření infekcí mezi lidmi je přenos rukama. Většina aseptických látek poškozuje pokožku, což vede ke zvýšenému riziku přenosu patogenních mikroorganismů. V souvislosti s touto problematikou byl testován esenciální olej z čajovníku (TTO). Výsledky ukazují, že opakované užívání přípravků obsahujících TTO nevede k dermatologickým problémům ani ke změnám původní ochranné bariéry pokožky. Testovány byly mycí přípravky obsahující TTO a čistý TTO proti bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Všechny přípravky vykazovaly antibakteriální aktivitu, avšak účinnost TTO se zdála být závislá na formě přípravku a testované koncentraci (Edris et al., 2007).

3.2 Původci onemocnění

Mikroorganismy, které se v potravíně mohou nacházet, patří bakterie, kvasinky, plísně. Potravní patogeny jsou jednou z hlavních příčin onemocnění a úmrtí v rozvojových zemích. Ve vyspělých zemích jsou potravní patogeny zodpovědné za infekční gastrointestinální onemocnění (Demnerová, 2012).

V dnešní době je sledování zdraví lidské populace v popředí zájmu společnosti. Vlivem evoluce patogenů, ale také díky změnám v zemědělských postupech a zavádění nových technologií zpracování a výroby potravin, se neustále vyskytují nová onemocnění. Z toho vyplývá, že je nutné se zaměřit na studium chování tvorby biofilmů, a hledání prostředků,

kteřé potlačí růst mikroorganismů v potravinách a přitom neovlivní negativně finální výrobek (Demnerová, 2012).

Bakterie

Jedná se o mikroskopické jednobuněčné organismy, které jsou přítomny v jakémkoliv prostředí. Nevadí jim extrémní podmínky, jako jsou vysoké či nízké teploty. K růstu a množení jim stačí jakýkoliv povrch se živnou půdou. Bakterie se dělí podle Gramova zbarvení, které závisí na typu buněčné membrány, na grampozitivní a gramnegativní bakterie.

Do první skupiny patří grampozitivní bakterie, pro které je charakteristické modrofialové zbarvení. Zbarvení je způsobeno velkou koncentrací základní složky v buněčné membráně zvané peptidoglyken. Mimoto je to zapříčiněno také nepřítomností tenké membránové struktury a liposacharidové molekuly. Mezi zástupce grampozitivních bakterií patří například rody *Listeria*, *Bacillus*, *Micrococcus* a *Clostridium*.

Druhá skupina je tvořena gramnegativními bakteriemi, které disponují převážně liposacharidovou stěnou, vedle toho jsou ve svrchní části pokryty jemnou buněčnou vrstvičkou. Proto při Gramově barvení se barví do červeného odstínu. K zástupcům se řadí bakterie rodu *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* a *Helicobacter*.

Bakterie vyvolávají bakteriální nákazy a bakteriální otravy z potravin. Bakteriální nákazy jsou vyvolané přímo patogenem (salmonelóza, kamylobakteriíza, listeriíza), naopak bakteriální otravy jsou vyvolané požitím potravin, které obsahují mikrobiální jedy (stafylokoková enterotoxikáza, botulismus) nebo jedy, které vyprodukují mikroorganismy v trávicím ústrojí po požití nakažené potravin (Clostridium perfringens typ A, Bacillus cereus). Nejčastější chorobou vyvolanou bakteriemi je salmonelóza, která způsobuje smrt především v rozvojových zemích. Obecně se za nebezpečnější považují gramnegativní bakterie než zástupci skupiny grampozitivních bakterií.

Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné houbové mikroorganismy. Kvasinky jsou hojně využívány v potravinářství a biotechnologiích. Používají se například při výrobě vína, piva nebo chleba. Využívá se jejich schopnost kvašení. Existují i patogenní druhy například zástupci rodu *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, kteří vyvolávají různá kožní, slizniční onemocnění.

Plísně

Jako plísně jsou označovány mikroskopické vláknité eukaryotní houbové mikroorganismy. Tyto houbovité organismy vytvářejí vlákna mycelia, prorůstají substrát a pokrývají ho vláknitým povlakem. Plísně jsou většinou saprofytické, mohou být užitečné nebo škodlivé. Různé druhy těchto hub jsou využívány ve farmaceutickém, chemickém potravinářském průmyslu. Nejznámější je využití druhu *Penicillium notatum*, který produkuje antibiotika (Šilhánková, 2002).

3.2.1 Antibiotická rezistence

Antibiotika byla vždy považována za jeden ze zázraků 20. století. Skutečným zázrakem je vzestup rezistence vůči antibiotikům v nemocnicích, komunitách a životním prostředí (Davies et al., 2010). Antibiotická léčba je jedním z nejzávažnějších problémů současné medicíny, právě z důvodu stoupající odolnosti bakteriálních patogenů k účinku antibiotik (Kolář et al., 2010). Mnoho komensálních bakteriálních druhů, které byly považovány za relativně neškodné obyvatele lidského mikrobiomu, se nedávno objevily jako multidrogrezistentní choroboplodné mikroorganismy (Penders et al., 2013).

Velkou roli v rostoucím problému antibiotické rezistence hrají plasmidy. Plasmidy jsou genetické prvky, které se mohou přenášet mezi bakteriemi. Mají schopnost kódování genů pro různé faktory, které přispívají k patogenezi, včetně antibiotické rezistence, toxinů, sekrečních systémů a invazivních faktorů. Tyto plasmidy byly objeveny u kmenů *Enterobacteriaceae*, které jsou rezistentní na klinicky relevantní antibiotika, jako jsou cefalosporiny s prodlouženým spektrem, fluorochinolony a aminoglykosidy (Sommer et al., 2011)

Získávání genů antibiotické rezistence nepatogenními bakteriemi je nebezpečné ze dvou důvodů. Za prvé, tyto bakterie vytvoří rezervoáry genů rezistence k antibiotikům, které mohou být přeneseny do virulentních bakterií. Za druhé antibiotické rezistentní bakterie mohou chránit citlivé, případně patogenní, proti působení antibiotik (Sommer et Dantas, 2011).

Lidé mohou získat rezistentní bakterie nebo geny rezistence k antibiotikům přímo ze styku se zvířaty, z potravin živočišného původu nebo životního prostředí. Tyto bakterie mohou následně kolonizovat lidský mikrobiom nebo mohou přenášet rezistenční geny na jiné bakterie při průchodu trávicím traktem. Používání antibiotických látek v potravinách pro člověka by mělo být zamezeno nebo minimalizováno, aby se zachovala účinnost těchto látek při léčbě infekce u lidí (Penders et al., 2013).

3.2.2 Charakteristika vybraných mikroorganismů

Bacillus cereus

Bacillus cereus je fakultativně anaerobní, grampozitivní tyčinkovitá bakterie. Je rozšířen v přírodě, často izolován z půdy a rostlin, ale také je dobře přizpůsoben k životu ve střevním traktu hmyzu a savců střevě (Arnesen et al., 2008). Vytváří endospory, které jsou odolné vůči teple, dehydrataci a jinému fyzickému namáhání. *Bacillus cereus* je běžně přítomen v prostředí výroby potravin a snadno se šíří do všech druhů potravin (Kotiranta et al., 2000).

Bakterie vyvolává dva typy gastrointestinálních onemocnění průjmové a emetické, které jsou způsobeny odlišnými typy syndromů. Emetický toxin cereulid, způsobující zvracení, byl charakterizován jako malý kruhový peptid. K intoxikaci dochází požitím infikované potraviny, kde je již přítomen toxin. Zatímco průjmové onemocnění je způsobeno jedním nebo více bílkovinami enterotoxinů, u kterých se předpokládá, že vyvolávají průjem narušením membrány epiteliálních buněk v tenkém střevě. K intoxikaci dochází požitím spor nebo životaschopných vegetativních buněk, které produkují enterotoxiny (Arnesen et al., 2008). Oba typy onemocnění se obecně považují za mírné a samoodeznívající, ačkoliv se mohou objevit vážnější a dokonce smrtelné případy (Dierick a kol., 2005).

Escherichia coli

Escherichia coli je gramnegativní, fakultativně anaerobní, nesporulující pohyblivá, tyčinkovitá bakterie (Shaw et al., 2012). *E. coli* patří do skupiny Enterobakterií (Toress et al., 2012). *E. coli* je nejběžnějším druhem bakterie obývající trávicí trakt teplokrevných živočichů, představuje 50% hmotnosti suché stolice. Podílí se na syntéze vitamínu K (Shaw et al., 2012). Ačkoliv většina kmenů *E. coli* není považována za patogenní, mohou být vhodnými patogeny způsobující infekce.

Patogenní kmeny způsobují dva druhy onemocnění. Prvním je extraintestinální onemocnění, kdy jsou napadány močové cesty, dochází k infekci a hnisání ran. Druhým je intestinální onemocnění, které se projevuje akutními průjmy. Průjmy jsou způsobeny výskytem enteropatogenních *E. coli* v zažívacím traktu (Toress et al., 2012).

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa je oportunní, gramnegativní a nefermentující bakterie, která je běžnou příčinou lidských infekcí. Tento patogen způsobuje širokou škálu infekcí včetně infekcí močových cest, dýchacích cest, dermatitidy, infekcí měkkých tkání, bakteriémie a různých systémových infekcí. Nejnáchylnější k infekcím jsou pacienti s těžkými popáleninami (Asadpour, 2018). *P. aeruginosa* je schopna snadno se přizpůsobit podmínkám prostředí, rychle rozvinout odolnost vůči antibiotikům, a to i v průběhu léčby, a produkovat řadu faktorů virulence. Epidemiologické studie ukázaly, že infekce způsobené antibiotickou rezistencí *P. aeruginosa* jsou spojeny se zvýšením morbidit, mortality, potřeby chirurgických zákroků, délkou nemocničního pobytu a celkovými náklady na léčbu infekce (Lister et al., 2009).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus je grampozitivní, fakultativně anaerobní, kokovitá bakterie s tendencí vytvářet shluky připomínající hrozny (Wijaya et al., 2006). *St. aureus* je nejčastěji izolovaným lidským bakteriálním patogenem (David et Daum, 2010). Jedná se o nebezpečný a všestranný patogen, který způsobuje velké množství různých onemocnění. Většinou způsobuje infekce kůže a dýchacích cest. Nicméně, může také způsobit řadu dalších velmi

těžkých až života ohrožujících onemocnění, jako je infekční endokarditida, syndrom toxického šoku, syndrom opařené kůže nebo osteomyelitidy (Otto, 2014).

St. aureus produkuje toxiny známé jako enterotoxiny. Tyto toxiny jsou vysoce teplotně stabilní a odolné vůči vaření a proteolytickým enzymům. Dávka toxinu nižší než 1,0 g/kg v kontaminovaných potravinách způsobí příznaky stafylokokové intoxikace. Lidská intoxikace je způsobena požitím enterotoxinů produkovaných v potravinách, které nebyly dostatečně zahřány na 60°C a více (Forsythe, 2008).

Jeho význam jako lidského patogenu se zvýšil v minulém století v důsledku rozvoje antimikrobiální rezistence na penicilin a následně na methicilin (MRSA) (Wijaya et al., 2006). *St. aureus* se snadno přizpůsobuje měnícím se podmínkám prostředí a získává antibiotické rezistentní geny prostřednictvím řady různých mechanismů. Vývoj jeho rezistence vůči antibiotikům je hrozbou pro lidstvo (Haaber et al., 2017).

Candida albicans

Candida albicans je nejčastějším lidským patogenem houbového původu. Přestože je tento oportunní mikroorganismus přirozenou součástí střevní mikroflóry lidí, může u imunopresivních pacientů způsobit život ohrožující infekci (Sellam et Whiteway, 2016).

Kandidová infekce je hlavní příčinou nozokomiálních infekcí krve v nemocnicích po celém světě. Rizikovými faktory pro výskyt kandidové infekce jsou parentální výživa, širokospektrální antibiotika, imunosuprese vyvolaná radioterapií nebo chemoterapií, poškození mukózních vrstev v důsledku chirurgického zákroku a zdravotnické vybavení, jako jsou katetry a injekce, které umožňují vstup do krevního řečiště. Epidemiologické studie ukazují, že právě *C. albicans* je nejčastěji izolovaným druhem zodpovědným za chronické infekce u hospitalizovaných pacientů na JIP (Dadar et al., 2018).

Jedním z klíčových rysů *C. albicans* jako patogenu je její schopnost adaptability. Hostitelská mikroprostředí mají heterogenní zdroje uhlíku, které je *C. albicans* schopna využívat ve svůj prospěch (Dantas et al., 2016).

Rozsáhlé používání fungicidních přípravků při léčbě infekcí *C. albicans* vedlo k vývoji její resistance (Zida et al., 2016).

3.3 Léčivé rostliny

V průběhu 20. století euforie a důvěra v synteticky vyráběné léky a přípravky zaznamenala výrazný útlum. Vedle předností syntetických léčiv se začaly objevovat i jejich stinné stránky. Z toho důvodu se předmětem zájmu vědy stávají přípravky z rostlinných extraktů, ale i samotné léčivé rostliny. Vědci se soustředí na výzkum látek obsažených v rostlinách, převážně na sekundární metabolity. Mezi nejdůležitější látky obsažené v léčivých rostlinách jsou éterické oleje, alkaloidy, hořčiny, flavonoidy, třísloviny a další (Wenzel, 2014). Nicméně existuje nespočetné množství jednotlivých látek a obrovská variace ve složení esenciálních olejů. Všechny rostliny mají schopnost vytvářet těkavé sloučeniny, poměrně často jen ve stopovém množství. Za „esenciální olejové rostliny“ se považují ty druhy, které jsou hlavním předmětem obchodního zájmu. Typické čeledi siličnatých rostlin jsou *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myristicaceae*, *Myrtaceae* (Baser et al., 2010).

3.3.1 Čeleď Lamiaceae

Léčivé byliny ze skupiny *Lamiaceae* mají širokou škálu biologických a farmakologických aktiv, takže se používají ke zlepšení chuti a organoleptických vlastností různých druhů potravin. Také jejich esenciální oleje mají antimikrobiální, spasmolytické, antikarcinogenní a jiné účinky (Velicanski et al., 2013).

Tato čeleď je velmi rozsáhlá zahrnuje byliny, polokeře i keře, vzácněji stromy. Jedná se hlavně o jednoleté, dvouleté i vytrvalé rostliny. Stonky jsou většinou čtyřhranné, listy stojí vstřícně a křížmostojně, bez palistů, často chlupaté a žláznaté. Květy jsou souměrné, oboupohlavné. Kalich pětičetný, trubkovitého až zvonkovitého tvaru. Může být pravidelný nebo dvoupyský, kdy horní pysk je trojcípý a dolní dvoucípý. Dalším poznávacím znakem jsou trichomy vyskytující se na celé rostlině nebo na konkrétních částech, jako je stonek, listy nebo květy. Trichomy mohou být krycí, ale hlavně typické trichomy jsou žláznaté. V těchto žláznatých trichomech jsou obsaženy silice (Pazourek, 1992).

Přes 400 druhů rostlin z čeledi *Lamiaceae* je dnes používáno v moderní medicíně jako aromatické byliny. Mezi nimi je rod *Salvia*, který je největším rodem čeledi a je rozšířen po celém světě. Některé rostliny tohoto rodu jsou ekonomicky důležité, neboť se využívají v parfumerii a kosmetice. *S. officinalis* je připisován dlouhý seznam léčivých přípravků (Tepe et al., 2005). Co se týče esenciálního oleje, obsahuje obrovské množství mono- a seskviterpenů. V esenciálním oleji *S. officinalis* jsou obvykle α - a β -thujony, 1,8-cineol, kafr v některých případech i linalool, β -pinen, limonen nebo cis-sabinyl acetát, zatímco *S. stenophylla* poměrně často najdeme seskviterpeny, například karyofylén nebo α -bisabolol (Baser et al., 2010).

Mezi *Lamiaceae* je mnoho léčivých rostlin. V naší lidové medicíně je využívána zejména mateřídouška (*Thymus*), máta (*Mentha*), meduňka lékařská (*Melissa officinalis*), šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*), dobromysl obecná (*Origanum vulgare*) a další (Slavík et al., 2000f)

***Glechoma hederacea* L.**

Glechoma hederacea L. také známý pod názvem popenec břečťanovitý je vytrvalá, třiceticentimetrová bylina s plazivým oddenkem (Janča et Zentrich, 1995d). Listy jsou srdčité až srdčitě okrouhlé, ledvinovité s chloupky. Typicky pyskatý květ sedí v úžlabí středních a horních listů. Drobné květy jsou modrofialové barvy, ale lze i najít jedince s růžovými a bílými odstíny. Plodem jsou hladké tvrdky. Kveté od konce dubna do poloviny července (Slavík et al., 2000f).

U nás je popenec břečťanovitý hojně rozšířen na celém území od nížin do hor. Roste na loukách, v lužních lesích, na březích vod, stráních, pastvinách, parcích, v zahradách (i jako plevelná rostlina), okrajích cest. Vyhovují mu vlhké až mokré hlinité, hlinitojílovité i písčitohlinité, humózní půdy (Slavík et al., 2000f).

Sbírá se kvetoucí nať. Rostlina obsahuje především třísloviny, hořčinu glechomin, silice, pryskyřice, cholin, saponiny, organické kyseliny a minerální soli (Janča et Zentrich, 1995d).

Odvar z popence má silné protizánětlivé účinky, zejména v trávicím, dýchacím a vyměšovacím ústrojí. Detoxikuje játra a chrání jaterní parenchym (Janča et Zentrich, 1995d).



Obrázek č. 3: *Glechoma hederacea* L.

Galeopsis segetum

U nás známá jako konopice bledožlutá je jednoletá rostlina dorůstající výšky okolo padesáti centimetrů (Janča et Zentrich, 1995b). Lodyha je hustě pokryta jemnými pýřivými chloupky a bohatě větvená. Listy jsou též pokryty chloupky, podlouhlého vejčitého tvaru, na okrajích zoubkované (Slavík et al., 2000f). Květy mají pětizubý kalich a žlutobílou korunu. Plodem jsou čtyři tvrdky. Kvete od června do začátku září (Janča et Zentrich, 1995b).

V České republice málo rozšířena. Najdeme ji na polích, v křovinách, lomech, kamenných stepích, rumištích a pasekách. Vyhovují jí sušší půdy s kamenitým, písčitým nebo šterkovitým profilem. Občas se pěstuje (Slavík et al., 2000f)

Sbírá se kvetoucí nat', která se suší ve stínu. Důležitými obsahovými látkami jsou kyselina křemičitá a křemičitany, třísloviny, saponiny, hořký glykosid, silice, pektinové látky, vosk, pryskyřice, éterické oleje, flobafen a minerální látky (Janča et Zentrich, 1995b).

V lidovém léčitelství se droga používá na podporu regenerace organismu, napomáhá hojení v oblasti plic, sliznic i na pokožce, rozpouští hleny, působí močopudně a protizánětlivě. V minulosti se konopice podávala při léčbě plicní a střevní tuberkulózy (Slavík et al., 2000f).



Obrázek č. 4: *Galeopsis segetum*

***Leonurus cardiaca* L.**

Leonurus cardiaca L. neboli srdečník obecný, lidově zvaný buřina srdečník, je vytrvalá rostlina dorůstající výšky okolo jednoho metru. Lodyha je vzpřímená, pokryta chloupky a bohatě větvená. Přízemní listy dlaniťe pěti až sedmi laločnaté na dlouhých řapících, horní lodyžní listy třílaločné na krátkých řapících, nepravidelně zubaté. Květy růžové až fialové barvy jsou pyskaté se dvěma pysky. Plodem jsou trojhranné lesklé tvrdky, nahoře s chloupky. Kveté od června do září (Slavík et al., 2000f).

V České republice je rozšířena zejména v teplejších oblastech na vysychavých půdách, mezích, rumišťích, v příkopech a podél cest. Roste na neutrálních, živných, hlinitých půdách.

Sbírá se kvetoucí nať, která se suší za teplot do 45°C. Rostlina obsahuje bufanolidové glykosidy, hořčinu leontin, alkaloidy stachydrin a leocardin, třísloviny, kyselý saponin, flavonoidy, antokyany, organické kyseliny – citronová, jablečná, mléčná a vinná, křemičitany a sílice.

Podle lidového léčitelství srdečník tlumí srdeční arytmie, celkově zklidňuje srdeční činnost, mírně snižuje krevní tlak, snižuje klimakterické potíže, jako jsou návaly a pocení. (Janča et Zentrich, 1995d).



Obrázek č. 5: *Leonurus Cardiacus* L.

3.4 Extrakce silic

Buňky obsahující esenciální oleje se mohou nacházet v různých částech rostlin. Jsou známy dva typy buněk – povrchové buňky například žlázové chloupky na povrchu rostliny, které jsou běžné pro mnoho bylin, jako je oregano, máta, levandule. Druhým typem jsou buňky nacházející se v rostlinné tkáni jako jednotlivé buňky obsahující sekreci (citrusové plody) nebo jako vrstvy buněk obklopující mezibuněčný prostor. To, mohou být například pryskyřicové kanály borovice (Başer et Buchbauer, 2010).

Kvalitu získané silice ovlivňuje příprava biomasy, která má být destilovaná, teplota a tlak páry. Mezi tři nejběžnější metody získávání silic patří exprese, což je pravděpodobně nejstarší metoda a používá se výhradně pro výrobu citrusových olejů. Druhá metoda je hydrodestilace

nebo parní destilace, ta je nejčastější. Poslední ze tří metod je suchá destilace, která se používá zřídka (Başer et Buchbauer, 2010). V posledních desetiletích zkoumání nových technologií vedlo ke vzniku inovativních a efektivnějších procesů extrakce za účelem zkrácení doby extrakce, snížení spotřeby energie, zvýšení výtěžnosti, zlepšení kvality esenciálních olejů (El Asbahani et al., 2015).

Hydrodestilace se používá jako standardní destilační metoda pro extrakci esenciálních olejů, obvykle pomocí zařízení typu Clevenger (Gavahian et Farahnaky, 2018). Destilační aparatura je složena ze spodní baňky, kde se nachází směs rostlinného materiálu a vody, a kondenzátoru, kde je zachytávána silice. Součástí aparatury je i třísměrný ventil, který umožňuje vodě kolovat, nebo oddělení silice od vodní fáze (Başer et Buchbauer, 2010). Při destilaci je rostlinný materiál ponořený přímo ve vodě uvnitř baňky a celý přiveden k varu (Gavahian et Farahnaky, 2018). Pomocí zvýšeného tlaku, zahřívání, dochází k praskání buněčných stěn a uvolňování esenciálních olejů (Başer et Buchbauer, 2010), které se odpařují a proudí směrem ke kondenzátoru (Gavahian et Farahnaky, 2018). Parní proud zde působí jako nosič esenciálního oleje (Başer et Buchbauer, 2010). Princip extrakce je založen na azeotropické destilaci. Ve skutečnosti, při extrakci za atmosférického tlaku, molekuly vody a esenciálního oleje tvoří heterogenní směs. Směs esenciální olej – voda se současně destiluje, jako by byla jediná sloučenina. Výhodou vody je, že je nemísitelná s většinou terpenických molekul esenciálních olejů a tak po kondenzaci může být snadno oddělena (El Asbahani et al., 2015).

Hydrodestilace má však několik nevýhod dlouhá doba extrakce, chemické změny terpenických molekul, styk s vroucí vodou, ohřev a ztráta některých polárních molekul ve vodní extrakci (El Asbahani et al., 2015).

Hydrodestilace je energeticky náročný proces, je široce využívána v několika průmyslových odvětvích, včetně destilace fermentovaných roztoků a extrakce silic (Gavahian et Farahnaky, 2018).



Obrázek č. 6: Clevenger

3.5 Analýza chemického složení - Plynová chromatografie

Většina metod používaných při analýze silic se opírá o chromatografické postupy, které umožňují oddělení a identifikaci jednotlivých látek. Analytická plynová chromatografie je technikou separace složek směsí za účelem získat informace o jejich molekulovém složení a koncentraci (Poole, 2012).

Princip separace látek pomocí plynové chromatografie je takový, že kolonou stacionární fáze prochází stále nosný plyn. Vzorek se nastříkne do temperované nástřikové komory, injektoru,

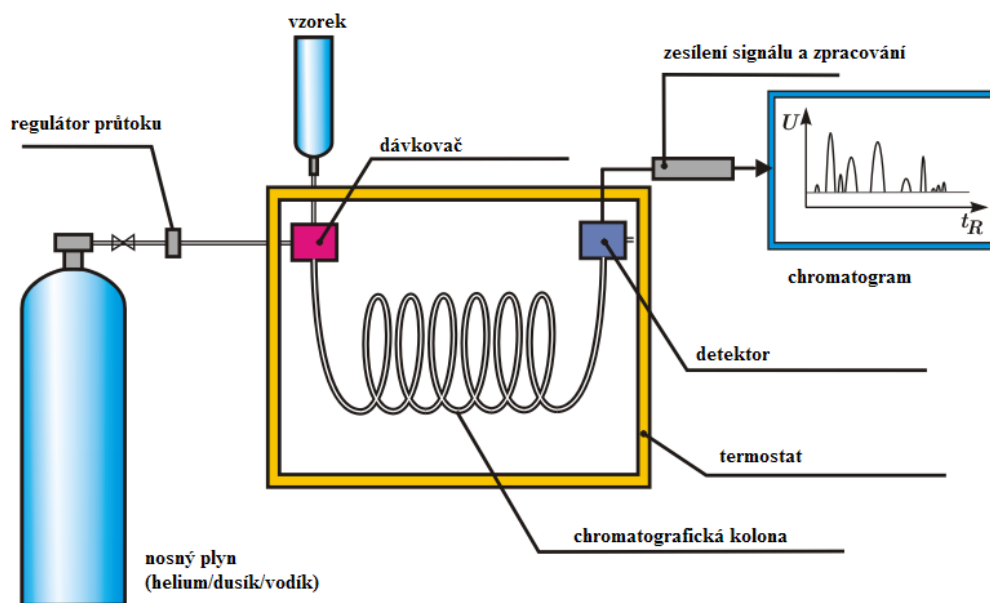
kde se odpaří a ve formě par je unášen nosným plynem až do kolony. Analyzované látky vzorku se sorbují a začátku kolony ve stacionární fázi a pak se eluují, vymývají, nosným plynem. Složky vzorku jsou unášeny mobilní fází, nosným plynem, postupně ke konci kolony a separační proces se tak opakuje (Sankar, 2005). Analyty jsou separovány na základě jejich relativních tlaků a afinit ke stacionární fázi (McNair et al., 2009). Na výstupu chromatografické kolony detektor indikuje okamžitou koncentraci separovaných látek v nosném plynu. Signál detektoru se vyhodnocuje a z jeho časového průběhu, chromatogramu, se určí druh a kvantitativní zastoupení složek. Ze získaných chromatogramů lze vyhodnotit retenční parametry jednotlivých signálů, plochy a výšky píků a lze tak identifikovat látky (Sankar, 2005).

Nosný plyn musí být chemicky inertní. Běžně se používají plyny obsahující dusík, helium, argon a oxid uhličitý. Při volbě nosného plynu se zohledňuje viskozita, účinnost, čistota, reaktivita, typ použitého detektoru, cena. Průtok nosného plynu se volí tak, aby se dosáhlo nejlepšího rozdělení látek na koloně (Sankar, 2005).

Na vnitřní straně kolony je umístěna stacionární fáze. V plynové chromatografii se používají kolony náplňové anebo kapilární. Náplňové kolony jsou trubice naplněné sorbety anebo nosiči pokrytými kapalnou fází. Jako náplň se pro adsorpční chromatografii používají silikagel, grafitizované saze, alumina, jako molekulová síta se používají hlinitokřemičitany. Kapilární kolony se vyrábějí nejčastěji z taveného křemene anebo oceli. Hlavní nároky na stacionární kapaliny jsou dobrá rozpustnost separované látky, teplotní stálost, a malá těkavost. Volba stacionární fáze hraje důležitou roli při volbě vhodné kolony pro konkrétní vzorek (Sankar, 2005).

Detektory reagují na přítomnost složky v nosném plynu. Detektory musí být dostatečně citlivé, aby zachytily i co nejmenší složky. Používají se teplotně vodivostní a ionizační detektory (Sankar, 2005).

Mezi hlavní výhody této techniky patří jednoduché a rychlé provedení analýzy, účinná separace látek a malé množství vzorku potřebného k analýze. Plynová chromatografie je nevhodná pro tepelně labilní vzorky. K dosažení kvalitních výsledků je třeba použít nejvhodnější analytickou kolonu a odpovídající chromatografické parametry (Mc Nair et al., 2009).



Obrázek č. 7: Schéma plynové chromatografie

3.6 Mikrodiluční metoda

Jednou z nejstarších metod testování antimikrobiální citlivosti je makrodiluční bujónová metoda, která se provádí ve zkumavkách. Hlavní nevýhodou této metody byla nudná, ruční příprava antibiotických roztoků pro každý test, možnost chyb při přípravě antibiotických roztoků a relativně velké množství činidel a prostor potřebný pro každý test (Jorgensen et al., 2009).

Miniaturizací a mechanizací testu došlo k používání malých jednorázových platových destiček. Standardní destička obsahuje 96 jamek, z nichž každá má objem 0,1 ml. Do mikrotitrační destičky se aplikuje v bujónu rozpuštěná antimikrobiální látka, ředěná geometrickou řadou. V každé destičce lze testovat 12 druhů látek po 8 koncentracích. Inokulum se připravuje o standardním zákalu. Používá se MHB a zákal 1,5 – 3 stupně

McFarlandovy stupnice. Růst bakterie se projevuje zákalem obsahu jamky nebo sedimentem. Minimální inhibiční koncentrace je taková nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která zamezí danému mikroorganismu růst, to znamená, že v jamce nevznikne ani zákal ani sediment. Takto stanovenou MIC opět porovnááme s MIC referenčních kmenů (Jorgensen et al., 2009).

4 Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

Výběr rostlin proběhl vyhledáním zmínky o obsahu silic v Herbářích léčivých rostlin (Janča et Zentrich, 1994, 1995a, 1995b, 1997). Ze seznamu rostlin obsahujících silice byly vybrány rostliny rostoucí na území České republiky. Dále byly vyřazeny ty rostliny, které již jsou dostatečně prozkoumány z hlediska jejich biologické aktivity a složení. K tomu bylo použito vyhledávání ve vědecké databázi Web of Science.

Glechoma hederacea L., *Galeopsis segetum Neck.*, *Leonurus cardiaca L.*

Aromatické rostliny byly zakoupeny z komerčního zdroje - Bylinkářství Maya.

4.2 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy, běžné váhy, pH metr, autokláv, inkubátor, flow-box, ultrazvuková lázeň, vibrační míchadlo, plynový kahan, topné hnízdo, optický denzimetr pro měření McFarlandovy stupnice (Biosan DEN-1B), Agilent GC 7890B s detektorem MS Q-TOF (Agilent, Santa Clara, FL, USA), nepolární kolona HP-5MS (30 m x 250 μ m x 0.25 μ m) od Agilent (Santa Clara, FL, USA), Agilent GC 7890A s detektorem FID (Agilent, Santa Clara, FL, USA)

Kádinky, odměrné válce, skleněné vialky, magnetické míchadlo, plastová korýtka, injekční stříkačky, plastové zkumavky s uzávěrem, zkumavky Eppendorf, stojánky na zkumavky, laboratorní lžičky, automatické pipety o objemech 10, 20, 100, 200, 1000 μ l a pipetovací špičky o odpovídajícím objemu, injekční stříkačky na 5ml, injekční stříkačka Hamiltonka na 1 μ l, 50 μ l, inokulační destičky s hroty, mikrotitrační destičky s 96 jamkami s víčkem, Petriho misky, klávací pytle, gumové rukavice.

4.3 Chemikálie

Destilovaná voda, Tween 80 (Sigma-Aldrich), ethanol 96 %, ethanol 70 %, 35 % HCl, NaCl, KCl, Tris Base, n-Hexan \leq 95% (VWR Chemicals), DMSO (VWR Chemicals)

4.4 Extrakce silic

Silice byla získána z vysušeného rostlinného materiálu destilací vodní párou pomocí systému Clevenger po dobu 3 hodin. Jako sběrné rozpouštědlo byl použit n-Hexan (VWR Chemicals). Následně bylo rozpouštědlo odpařeno. Silice byla uložena ve skleněné vialce při teplotě 4°C.

4.5 Mikroorganismy

Testy antimikrobiální aktivity byly provedeny proti standardním sbírkovým kmenům z American type culture collection (ATCC).

Grampozitivní bakterie *Bacillus cereus* ATCC 11778

Staphylococcus aureus ATCC 29213

Gramnegativní bakterie *Escherichia coli* ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Kvasinka *Candida albicans* ATCC 10231

4.6 Kultivační média

Tris-buffered saline na přípravu 1 litru: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 6,1 g Tris Base (Sigma-Aldrich).

Následně upravit na pH 7,6 pomocí 35 % kyseliny chlorovodíkové, poté autoklávovat při 121 °C po dobu 15 minut, a nakonec uložit při 4 °C.

Pro *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* bujón Mueller-Hinton od firmy OXOID – příprava: 21 g na 1 litr tris-buffered saline a poté autoklávováno při 121 °C po dobu 15 minut, následně uložit při 4 °C.

Pro *Candida albicans* bujón RPMI od firmy Sigma-Aldrich – 10,4 g na 1 litr tris-buffered saline a poté autoklávováno při 121 °C po dobu 15 minut, následně uložit při 4 °C.

4.7 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita silic byla měřena pomocí mikrodiluční metody (CLSI, 2012).

Všechny vzorky byly testovány po třech opakování ve třech nezávislých testech.

4.7.1 Příprava zásobních roztoků přírodních látek

Zásobní roztoky testovaných přírodních látek pro mikrodiluční metodu byly připraveny rozpuštěním jejich navážky *G. hederacea* L. 12,71mg, *G. segetum* 27,83 mg , *L. cardiaca* L. 7,52 mg v roztoku 96% etanolu a Tweenu smíchaného v poměru 2:1. Zásobní roztok byl zvortexován, následně umístěn na 5 minut v ultrazvukové lázni, znovu zvortexován a uskladněn při 4°C. Navážku a objem rozpouštědla shrnuje tabulka.

Tabulka č. 1: Navážka a objem rozpouštědla na přípravu zásobních roztoků přírodních látek.

	navážka	objem rozpouštědla
<i>G. hederacea</i>	12,71g	271,78μl
<i>G. segetum</i>	27,83g	124,12 μl
<i>L. cardiaca</i>	7,52g	73,44 μl

4.7.2 Příprava inokula

Zásobní inokula testovaných mikroorganismů byla založena a uchována pro další použití. Každé ze zásobních inokul bylo tvořeno médiem a příslušným organismem a inkubováno 24

hodin při 37 +/- 0,2°C v případě bakterií, a při 25 +/- 0,2°C po dobu 24 hodin pro *Candida albicans*. Zásobní inokula byla uchována při 4°C.

Pro každý test bylo připraveno nové inokulum ze zásobního roztoku, které bylo inkubováno 24 hodin při 35 +/- 0,2°C v případě bakterií a při 25 +/- 0,2°C po dobu 24 hodin pro kvasinku.

4.7.3 Příprava antibiotik pro testování

Na každý test bylo připraveno kontrolní antibiotikum. Jako kontrolní antibiotikum pro testování bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Bacillus cereus* byl použit Tetracycline (Sigma-Aldrich) o čistotě 88%, rozpuštěný v 96% ethanolu. Pro kvasinku *Candida albicans* bylo jako kontrolní antibiotikum použito Tioconazole (Sigma-Aldrich) o čistotě 96,5% rozpuštěný v DMSO. Počáteční koncentrace antibiotik v 1. jamce destičky byla stanovena pro *P. aeruginosa* 64 µg/ml, *S. aureus* a *E. coli* 16 µg/ml, *B. cereus* 2 µg/ml a pro *C. albicans* 32 µg/ml. Kvůli přesnosti vah bylo naváženo 100x vyšší množství antibiotik a rozpuštěno v příslušném rozpouštědle. Následně bylo odebráno 10 µl roztoku antibiotika smícháno s 990 µl bujónu, v případě bakterií MHB a pro kvasinku RPMI bujón, a zvortexováno.

4.7.4 Příprava roztoků přírodních látek pro testování

Pro každý test byl připraven roztok silice, ze zásobního roztoku a média, pro bakterie MHB pufr a pro kvasinku RPMI pufr. Směs byla opět zvortexována. Počáteční koncentrace roztoku silice byla 1024 µg /ml pro *G. hederacea*, *L. cardiaca* a *G. segetum*.

4.7.5 Příprava mikrotitrační destičky

Na mikrotitrační destičce byly testovány tři silice a antibiotikum v 8 koncentracích. Do 1. sloupečku mikrotitrační destičky bylo napipetováno po 100 µl příslušného média, tento sloupeček sloužil jako kontrola čistoty média. Do 1. jamky 3., 5. a 7. sloupečku bylo přeneseno 200 µl roztoků silic a do 1. jamky 10. sloupečku bylo napipetováno 200 µl antibiotika. Do zbytku jamek bylo přeneseno po 100 µl příslušného média, tyto jamky sloužily jako kontrola růstu mikroorganismu. Poté bylo pomocí multikanálové pipety z jamek 1. řádku odpipetováno 100 µl a přeneseno do jamek 2. řádku, promícháno a znova

odpipetováno 100 μ l a přeneseno do dalšího řádku, takto se postupovalo až do posledního řádku. Následně bylo z posledního řádku odebráno 100 μ l a dáno pryč. Ve všech jamkách takhle připravené mikrotitrační destičky bylo po 100 μ l příslušných roztoků.

4.7.6 Příprava inokula pro testování

Do 15 ml zkumavky bylo převedeno přibližně 5 ml příslušného média pro bakterie MHB a pro kvasinku RPMI. Pomocí denzimetru (Biosan DEN-1B) byla změřena denzita používaného media a bylo přidáno takové množství inokula, aby se hodnota zvýšila o 0,5 McFarland zákalového standardu, což by mělo odpovídat $1 - 2 \times 10^8$ KTJ/ml.

4.7.7 Zaočkování destičky

Zaočkování destičky bylo provedeno pomocí inokulátoru s jehlami ponořením do upraveného inokula a přenesením do kultivačního média v jamkách 2 až 12 mikrodiluční destičky, opakováno 2x. Tím bylo dosaženo přibližně 4×10^5 KTJ/ml v každé jamce destičky při objemu 100 μ l. Inokulátor byl po každém přenesení namočen v etanolu a sterilizován v plamenu kahanu. Zaočkované destičky byly překryty označenými víčky a uloženy do termostatu při teplotě $37 \pm 0,2$ °C po dobu 24 hodin v případě bakterií a $25 \pm 0,2$ °C po dobu 485 hodin v případě kvasinky.

Hodnocení růstu mikroorganismů bylo provedeno vizuálně. V tomto případě byla stanovena jako MIC nejnižší koncentrace, při níž nedošlo k viditelnému zakalení média.

V průběhu testování na základě viditelného částečného inhibičního účinku silice *G. segetum* o koncentraci 1024 μ g/ml proti *Bacillus cereus*, byla použita dvojnásobná koncentrace 2048 μ g/ml a následně byl testován baktericidní účinek silice. Na Petriho misku s agarem MHA bylo na předem označená místa napipetováno 20 μ l roztoku přímo z jamek mikrotitrační destičky, které vykazovaly MIC. Takto připravené misky byly inkubovány v termostatu dle požadavků daného mikroorganismu.

Tabulka č. 2: Ředící řady experimentu v µg/ml.

silice	<i>C. albicans</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
2048		2			
1024	32	1	64	16	16
512	16	0,5	32	8	8
256	8	0,125	16	4	4
128	4	0,0625	8	2	2
64	2	0,03125	4	1	1
32	1	0,015625	2	0,5	0,5
16	0,5	0,0078125	1	0,25	0,25
8	0,25	0,00390625	0,5	0,125	0,125

4.8 Chemické složení

Analýza chemického složení byla provedena pomocí plynové chromatografie na přístroji Agilent GC 7890B s detektorem MS Q-TOF (Agilent, Santa Clara, FL, USA) s nepolární kolonou HP-5MS (30 m x 250 µm x 0.25 µm) od Agilent (Santa Clara, FL, USA). Pro plynovou chromatografii byl připraven roztok silice a n-Hexanu (VWR Chemicals) v poměru 1:1000, z toho bylo pro analýzu použito 1 µl. Při vstupu do injektoru dosahovala teplota 250 °C s poměrem dělení 12:1. Nosným plynem bylo užito helium o rychlosti proudění 1 ml/min. Teplotní program byl nastaven na počátku analýzy na 60 °C po dobu 3 minut, poté se teplota zvyšovala o 3 °C až na 231 °C, kde byla teplota držena po 10 minut. Celková čas analýzy byl 70 minut. Ionizační energie byla nastavena na 70 eV a data byla získána v módu celkového skenování. Identifikace jednotlivých látek byla provedena porovnáním hmotnostních spekter a retenčních časů s National Institute of Standards and Technology Library (NIST, USA) a literaturou. Z ploch píků lze zjistit koncentrace jednotlivých sloučenin obsažených v analyzovaném vzorku.

5 Výsledky

5.1 Extrakce silic

Parní destilací sušeného materiálu rostliny *Galeopsis segetum* o hmotnosti 410,94 g bylo získáno 80 µl žlutozelené silice, což odpovídá výtěžnosti 0,0195 %. Z rostliny *Glechoma hederacea* o hmotnosti 443,15g bylo vydestilováno 40 µl silice žluté barvy, s výtěžností 0,009%. Ze sušeného materiálu rostliny *Leonurus cardiaca* o hmotnosti 399,9 g bylo získáno 50 µl silice žluté barvy s výtěžností 0,0125 %. Výtěžnost esenciálních olejů se pohybovala v rozmezí 0,009 až 0,195 % vztaženo na suchou hmotnost rostlinného materiálu. Maximální obsah silic byl zjištěn u *Galeopsis segetum* (0,0195 %) a naopak nejmenší obsah silic byl zjištěn u *Glechoma hederacea* (0,009 %). Hmotnost sušeného materiálu, vydestilované množství silice a výtěžnost silic shrnuje následující tabulka č. 3.

Tabulka č. 3: Hmotnost sušeného materiálu, množství vydestilované silice a výtěžnost silic z rostlinného materiálu.

	Hmotnost sušeného materiálu	Množství vydestilované silice	Výtěžnost silic
<i>Galeopsis segetum</i>	410,94 g	80 µl	0,0195 %
<i>Glechoma hederacea</i>	443,15 g	40 µl	0,009 %
<i>Leonurus cardiaca</i>	399,9 g	50µl	0,0125 %

5.2 Antimikrobiální aktivita

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla vyjádřena jako modus, případně medián ze 3 opakování ve 3 nezávislých testech. Z vybraných rostlin byla nejaktivnější silice *Galeopsis segetum*, která inhibovala růst *Bacillus cereus* (MIC při 2048 µg/ml). Ostatní testované silice nedosáhly MIC ani při 1024 µg/ml (tabulka č. 4). Účinnost antibiotik (MIC) proti kmenům

ATCC odpovídala udávaným koncentracím dle CLSI (2013). Baktericidní účinek silice *Galeopsis segetum* proti *Bacillus cereus* nebyl prokázán.

Tabulka č. 4: Minimální inhibiční koncentrace (MIC).

	<i>C. albicans</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>Galeopsis segetum</i>	-	2048	-	-	-
<i>Glechoma hederacea</i>	-	-	-	-	-
<i>Leonurus cardiaca</i>	-	-	-	-	-
Antibiotikum	1	0,125	32	8	0,5

Hodnoty jsou uvedeny v $\mu\text{g/ml}$. Pokud není vyplněná hodnota MIC, nebyla dosažena ani při 1024 $\mu\text{g/ml}$. Antibiotikum pro *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* a *E. coli* byl Tetracycline, antibiotikum pro *C. albicans* byl Tioconazole.

5.3 Chemické složení

V silici *Galeopsis segetum* bylo identifikováno 13 látek, což představuje 74,46 % celkového množství. Z nichž hlavní složkou je β -karyofylénoxid (35,19 %). Dalšími obsahovými látkami jsou například germacrene D (7,84 %), β -karofylén (7,32 %), α -humulen epoxid II (5,52 %). Zbytek identifikovaných látek je obsažen v množství < 5 %.

Další analyzovanou silicí byla *Glechoma hederacea*, u níž bylo identifikováno 9 obsahových látek, což představuje 74,77 % celkového množství. Hlavními látkami jsou phytol (23,29 %), spathulenol (17,48 %) a hexahydrofarnesyl aceton (14,79 %). Zbytek látek je obsažen v množství < 5 %.

Poslední analyzovanou silicí byla *Leonurus cardiaca*. Identifikováno bylo 17 látek, což představuje 77,65 % celkového množství. Největší podíl zastoupení má kyselina palmitová (38,82 %). Dále silice obsahuje hexahydrofarnesyl aceton (11,10 %) a phytol (6,69 %). Zbytek obsahových látek je v množství < 5 %.

Celkový přehled silic viz tabulka č. 5.

Tabulka č. 5: Chemické složení silic

Identifikovaná látka	RI	zastoupení v %		
		<i>Galeopsis segetum</i>	<i>Glechoma hederacea</i>	<i>Leonurus cardiaca</i>
1-Octen-3-ol ^a	976	2,90		
Limonene ^a	1027			0,64
Eucalyptol ^a	1030		4,69	
Linalool ^a	1098	0,59		
Menthol	1173	0,54		0,57
Thymol ^a	1292		1,80	1,32
Carvacrol	1300			0,92
α -Copaene	1376	0,65		
β -Bourbonene	1384	2,98		
β -Caryophyllene ^a	1418	7,32		0,48
α -Humulene ^a	1453	1,69		0,71
γ -Muurolene	1480			0,70
Germacrene D	1480	7,84		
β -Ionone	1486		2,48	0,67
δ -Cadinene	1525			0,67
Spathulenol	1576	2,47	17,48	2,89
Caryophyllene oxide	1582	35,19	3,95	4,98
Humulene epoxide II	1607	5,52	2,3	3,61
Hexahydrofarnesyl acetone	1846	3,80	14,79	11,10
Kyselina palmitová	1974			38,82
Phytol	2118	2,97	23,29	6,69
Kyselina stearová	2180			0,75
Heptacosane ^a	2700		3,99	2,13
Celkem		74,46	74,77	77,65

RI – Kovatsův retenční index (HP – 5MS); ^a – identifikace potvrzena pomocí autentického standardu;

6 Diskuze

Čeľad' *Lamiaceae* je pro vysoký obsah silic jednou z nejvyžívanějších čeledí na výrobu esenciálních olejů. Čeľad' je známá svými silnými léčivými vlastnostmi, některé rostliny jsou využívány v lidovém léčitelství nebo jako koření (Pandey et al., 2014). Z toho se dalo předpokládat, že i méně známé druhy by mohly být siličnaté a vykazovat antimikrobiální účinky. V této studii byly zkoumány rostliny *G. hederacea*, *G. segetum* a *L. cardiaca* jejich výtěžnost silic se pohybovala v rozmezí 0,009 až 0,0195%, což ve srovnání s ostatními zástupci jako je *Salvia officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. nebo *Melissa officinalis* L. je velice nízká výtěžnost.

V literatuře je udáváno, že pomocí hydrodestilace nadzemních částí *Leonurus cardiaca* byl získán nažloutlý olej s výtěžkem 0,2% (Morteza-Semnani et al., 2008). V této práci byla výtěžnost 0,0125 %. Jiná studie naopak potvrzuje výtěžnost 0,01 % *L. cardiaca* z nadzemních částí. Tyto odchylky mohou být způsobeny dobou sběru, chemotypem, podmínkami sušení, způsobem destilace, geografickými a klimatickými podmínkami (Morteza-Semnani et al., 2008). Jiná práce se zabývala extrakcí nadzemních částí příbuzných rostlin *Leonurus panzerioides* a *Leonurus turkestanicus*. Vysušené vzdušné části destilovali pomocí Clevengeru po dobu 2 hodin a výtěžnost olejů dosáhla hodnot 0,2 % pro *L. panzerioides* a 0,12 % pro *L. turkestanicus* (Mamadaliyeva et al., 2016). Z toho se dá usuzovat, že rod *Leonurus* nepatří k siličnatým druhům čeledi *Lamiaceae*.

Rod *Leonurus* se stal předmětem velice obsáhlé studie v Íránu, kde zkoumali i obsah esenciálních olejů 150 jedinců *L. cardiaca* ze šesti přírodních oblastí Íránu. Výnosy esenciálních olejů se pohybovaly od 0,02 až po 0,053 mg / 100 g sušiny. Obsahy esenciálních olejů tohoto druhu mohly být ovlivněny klimatickými nebo generickými faktory (Soorni et al., 2014). Složení esenciálních olejů v práci prezentováno není.

Je velmi málo známo o složení esenciálních olejů tohoto druhu *Leonurus*. Mockute a kol. (2006) analyzovali olej z divoké *L. cardiaca* rostoucí v Litvě a prezentovali, že polovina oleje se skládala ze seskviterpenů. V oleji této rostliny byl analyzován germacren D (26,6 – 35,1 %), zatímco dalšími hlavními složkami byly β -karofylén (5,8 – 9,0 %), a α -humulen (6,4 – 9,2

%). Hlavní složky, jako je epicedrol (9,7%), α -humulen (9,2%), dehydro-1,8-cineol (8,9%), germacren D (8,9%) a spathulenol byly identifikovány v oleji íránské *L. cardiaca*. Také se zjistilo, že *L. cardiaca*, což je poměrně rozšířený plevel v Kanadě, obsahuje jako hlavní sloučeniny β -karofylén (39,8 %), α -humulen (34,5 %), a α -pinen (5,6 %) (Morteza-Semnani et al., 2008). Germacren D dominoval v oleji *L. masrubiastrum* pěstovaného v experimentální zahradě v Kanadě (Mosckute et al., 2006). Olej z *L. japonicus* se skládal hlavně ze seskviterpenů a diterpenů s fytonem (19,02%), fytol (13,75%), β -karyofylenoxid (11,49%) (Xiong a kol., 2013). Je pozoruhodné, že v námi analyzovaném vzorku byl zaznamenán nulový obsah germacrenu D, a naopak byl zaznamenán vysoký obsah kyseliny palmitové. Tyto nesrovnalosti mohly vzniknout chybou při analýze. Z tabulky č. 5 lze vyčíst, že ve vzorku byl obsažen hexahydrofarnesyl aceton (11,10 %), phytol (6,69 %), β -karofylénoxid (4,98 %), humulon (3,61 %), spathulenol (2,86 %) a další.

Antibakteriální účinky silice *Leonurus cardiaca* nebyly v této práci potvrzeny. Dostupná literatura naopak píše o antimikrobiálních účincích rostliny *Leonurus cardiaca*, kdy byl testován chloroformový extrakt z listů rostliny. Tento extrakt inhiboval růst *Staphylococcus aureus*. Zatímco chloroformová frakce methanolického extraktu z nadzemních částí vykazuje aktivitu proti multirezistentnímu kmenu *Plasmodium falciparum*. Za tyto účinky jsou pravděpodobně zodpovědné diterpeny labdonového typu. Zatím neexistuje dostatečné množství informací pro úplné určení účinků a zdůvodnění použití v lidovém léčitelství (Wojtyniak et al., 2013).

Judzentiene et al. (2015) ve své práci uvádějí výtěžnost silic *G. hederacea* z nadzemních částí rostlin pomocí hydrodestilace menší než 0,05%. Destilací získali olej nažloutlé barvy s příjemnou a výraznou vůní po mátě a pepři. Při extrakci silice *G. hederacea* byla výtěžnost 0,009%.

Z chemického složení esenciálního oleje získaného hydrodestilací nadzemních částí rostliny *Glechoma hederacea* byly určeny jako hlavní složky germacren D (5,5 – 15,5 %), sabinen (6,3 – 12,3 %), 1,8-cineol (5,1 – 41,6 %), β -karyofylén spolu s jeho oxidem (7,3 – 19,3 %) a γ -elemenem (9,6 %) (Judzentiene et al., 2015). Hlavními složkami vzorku *Glechoma hederacea* v této práci byly phytol (23,29 %), spathulenol (17,48 %), hexahydrofarnesyl aceton (14,79 %) a eukalyptol (4,69 %). Judzentiene et al. (2015) ve své studii poukazují na

přítomnost chemického polymorfismu v populaci *G. hederacea* rostoucí v Litvě a zároveň prezentují pozoruhodné rozdíly ve složení oleje mezi kultivovanými a přirozeně pěstovanými rostliny ve stejné oblasti. U oleje získaného z volně rostoucích rostlin byly určeny jako převažující složky germacren D (20,7 %), γ -elemen (16 %), β -elemen (12,9) a β -okimen (8,5 %) a navíc phytol a isophytol (15,6 %), zatím co tyto sloučeniny nebyly stanoveny v silicích pěstovaných rostlin. Chemické složení esenciálního oleje z pěstovaného *G. hederacea* v Litvě se výrazně lišila od toho zkoumaného v Srbsku, kde hlavními byly palmitové složky (13,3 %) a kyselina linolová (9,3 %). Zatím co olej z *G. hederacea* pěstovaný v S. Americe měl podobné složení jako olej z divoce rostoucích rostlin v Litvě.

U silice *G. hederacea* nebyla zjištěna antimikrobiální aktivita. Coss et al. (2018) ve své práci o rostlinných tinkturách uvádí, že tinktura z *G. hederacea* vykazovala nulovou nebo velmi nízkou antimikrobiální aktivitu vůči testovaným mikroorganismům (*E. coli*, *S. aureus* a *E. hirae*), nemusí to nutně znamenat, že tato rostlina neobsahuje významné množství účinných látek odpovědných za antimikrobiální aktivitu. Výzkumné práce ostatních ukázaly, že výběr rozpouštědla a extrakčních technik ovlivňuje výtěžnost účinné látky z rostliny. Antimikrobiální aktivitu extraktů z *G. hederacea* také pozorovali Kumarasamy et al. (2002), kde zaznamenali pouze inhibiční účinek proti bakterii *Micrococcus luteus*. Zatím není k dispozici dostatečné množství informací k zdůvodnění použití *G. hederacea* v tradičním léčitelství.

Výtěžnost silice *G. segetum* byla v této práci 0,0195%. Získaný olej byl voskovité konzistence, žluté barvy a měl slabou vůni. Zatím neexistuje dostatek studií týkající se výtěžnosti, složení a antimikrobiální aktivity silice *G. segetum*. Tato studie zamýšlí přispět k rozšíření současných znalostí. Dostupné studie uvádějí výtěžnost příbuzné rostliny *G. bifida* 0,09%. Esenciální olej vykazoval stejné vlastnosti jako v této studii. Celkem bylo zjištěno 24 sloučenin, z toho bylo identifikováno 21, což představovalo 84,6 % (Olennikov et al., 2010). Chemická analýza *G. segetum* identifikovala 13 látek, což představuje 74,46 % celkového množství. Dominantní složka u *G. bifida* byly seskviterpeny. Největší obsah byl nalezen u β -karofylénu (22 %), spatulenolu (12,1 %), β -karyofylenoxidu (11 %) a germacrenu D (10,6 %). Výsledky byly podobné těm, které byly již získány dříve z esenciálních olejů rostlin *G. pubescent* a *G. tetrahit*. Jejichž hlavní složku také tvořily seskviterpeny, včetně germacrenu D, bicyclogermacrenu, β -karofylénu a β -farnesenu (Olennikov et al., 2010). Výsledky této

práce jsou podobné těm ze studií příbuzných rostlin. Hlavními složkami *G. segetum* byly zjištěny β -karofylénoxid (35,19 %), germacrene D (7,84 %), β -karofylén (7,32 %) a humulen epoxid II (5,52 %).

Esenciální olej z *Galeopsis segetum* byl jediný, u kterého byla v této studii zaznamenána antimikrobiální aktivita. Silice o koncentraci 2048 $\mu\text{g/ml}$ inhibovala růst *Bacillus cereus*. Je možné, že antimikrobiální aktivita silice souvisí s vyšším obsahem β -karofylénoxidu, β -karofylénu a α -humulenu, což jsou seskviterpeny obsažené ve známých aromatických rostlinách jako je hřebíček, konopí, borovice, tabák, bazalka, oregano, šalvěj, máta, zázvor atd. Seskviterpen β -karofylén je jeden z všudypřítomný seskviterpenů v rostlinné říši. Má antioxidační, antimikrobiální a chemoochranné účinky. Dalším rozšířeným seskviterpenem je α -humulen, nejznámější zdroj je chmel. β -karofylénoxid vykazuje silné antifugální a insekticidní aktivitu (Nguyen et al., 2017). Společně β -karofylénoxid, β -karofylén a α -humulen vykazují slibné biologické vlastnosti a mají určitý potenciál být použity v léčbě různých onemocnění v budoucnu.

7 Závěr

V této práci byla hodnocena antimikrobiální aktivita silic z vybraných rostlin z čeledi Lamiaceae vůči grampozitivním bakteriím *Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus*, gramnegativním *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* a kvasince *Candida albicans*. Vybrané byly rostliny *Galeopsis segetum*, *Glechoma hederacea* L. a *Leonurus cardiaca* L.

Ukázalo se, že nejaktivnější silicí z vybraných rostlin čeledi *Lamiaceae* byla silice *Galeopsis segetum*, která inhibovala růst *Bacillus cereus*. Dalším zajímavým předmětem výzkumu by mohla být antifugální aktivita nebo synergetický účinek silic. Rostliny čeledi *Lamiaceae*, využívané v lidovém léčitelství, vykazují antimikrobiální aktivitu, což potvrzuje hypotézu. Podle dostupných informací byla poprvé testována antimikrobiální aktivita a chemické složení silice *Galeopsis segetum*. Naše výsledky ukazují, že seskviterpeny β -karofylénoxid, β -karofylén a α -humulen mají určitou schopnost inhibovat růst *B. cereus*.

8 Seznam literatury

- Asadpour, L., Wolter, D. J., Hanson, N. D. 2018. Antibacterial Resistance, Biofilm Forming Ability, and Virulence Potential of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Patients in Northern of Iran: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* [online]. 22 (4).[cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1016/j.jgar.2018.01.018. ISSN: 22137165. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213716518300201>>
- Başer, K. (ed.), Buchbauer, G. (ed.). 2010. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC Press/Taylor & Francis. Boca Raton. 975 s. ISBN: 9781420063158.
- Berger, R. G. c2007. Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability. Springer. New York. ISBN: 35-404-9338-7.
- Bowles, E. J.: *The chemistry of aromatherapeutic oils*. Allen & Unwin, Australia 2003 ISBN 1 74114 051X.
- Brenes, A., Roura, E. 2010. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*. 158 (1-2). 1-14. [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2010.03.007. ISSN: 03778401. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840110000775>>
- Burt, S.A. a R.D. Reinders. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2003, **36**(3), 162-167 [cit. 2018-02-06]. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2003.01285.x. ISSN 0266-8254. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1472-765X.2003.01285.x>
- Carson, C. F., Mee, B. J., Riley, T. V., Coppola, R., De Feo, V. 2002. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 46 (6). 1914-1920. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002. ISSN: 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002>
- Coss, E., Kealey, C., Brady, D., Walsh, P., Xie, X. -F., Guo, L., Li, X. -H., He, C. -J., Dai, O. 2018. A laboratory investigation of the antimicrobial activity of a selection of western phytomedicinal tinctures: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. *European Journal of Integrative Medicine* [online]. 19 (5). 80-83. [cit. 2018-04-12]. DOI: 10.1016/j.eujim.2018.02.008. ISSN: 18763820. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876382018300441>>
- Colin F. Poole. 2012. Gas Chromatography Gas Chromatography [online]. Elsevier Science. Burlington. [cit. 2018-04-04]. ISBN: 978-012-3855-411.
- Červený, Libor. Syntetické vonné a chuťové látky. *Chem. Listy*, 93, 1999, 412-420
- Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Guiguemdé, R. T., Dhama, K., Gow, N. A. R. 2017. Anti- *Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. *Journal de Mycologie Médicale* [online]. 27 (1). 1-19. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.02.028. ISBN: 10.1016/j.micpath.2018.02.028. ISSN: 11565233. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1156523316302220>>

- David, M. Z., Daum, R. S., Hanson, N. D. 2010. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 23 (3). 616-687. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1128/CMR.00081-09. ISSN: 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00081-09>
- Davidson, P. M., Sofos, J. N., Branen, A. L. 2005. Antimicrobials in food [online]. 3rd ed. Boca Raton. [cit. 2018-04-04]. *Food science and technology* (Marcel Dekker, Inc.), 145. ISBN: 978-0-8247-4037-5.
- Davies, J., Davies, D. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 74 (3). 417-433. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1128/MMBR.00016-10. ISSN: 1092-2172. Dostupné z: <<http://mmbbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00016-10>>
- da Silva Dantas, A., Lee, K. K., Raziunaite, I., Schaefer, K., Wagener, J., Yadav, B., Gow, N., A. R. 2016. Cell biology of *Candida albicans* –host interactions: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 34 (3). 32-37. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1016/j.mib.2016.08.006. ISBN: 10.1016/j.mib.2016.08.006. ISSN: 13695274. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527416301230>>
- De Martino, L., De Feo, V., Nazzaro, F., Coppola, R. 2009. Chemical Composition and in Vitro Antimicrobial and Mutagenic Activities of Seven Lamiaceae Essential Oils. *Molecules* [online]. 14 (10). 4213-4230. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.3390/molecules14104213. ISSN: 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/14/10/4213>
- Demnerová, K. 2012. Mikrobiologická bezpečnost potravin: Současné strategie pro efektivní kontrolu. *Chemické listy*. (106). 920-925.
- Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., Hoedemaekers, G., Fourie, L., Heyndrickx, M., Mahillon, J. 2005. Fatal Family Outbreak of *Bacillus cereus*-Associated Food Poisoning: A review. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 43 (8). 4277-4279. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1128/JCM.43.8.4277-4279.2005. ISBN: 10.1016/j.micpath.2018.02.028. ISSN: 0095-1137. Dostupné z: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.43.8.4277-4279.2005>>
- Edris, A. E., Bonos, E., Giannenas, I., Florou-Paneri, P., Cháfer, M. 2007. Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research* [online]. 21 (4). 308-323. [cit. 2018-04-11]. DOI: 10.1002/ptr.2072. ISSN: 0951418X. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.2072>>
- El Asbahani, A., Miladi, K., Bardi, W., Sala, M., Aït Addi, E. H., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Elaissari, A. 2018. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. (483). 220-243. [cit. 2018-04-04]. ISSN: 0378-5173. Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517314009661>>
- Forsythe, S. J., James M. Miller. 2007. *The Microbiology of Safe Food* [online]. Second edition. Elsevier Science. Chichester. [cit. 2018-04-04]. ISBN: 978-047-0999-424.
- Franz, C., Baser, K. H. C., Windisch, W. 2010. Essential oils and aromatic plants in animal feeding - a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. 25

- (5). 327-340. [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1002/ffj.1967. ISSN: 08825734. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1967>>
- Gavahian, M., Farahnaky, A. 2018. Ohmic-assisted hydrodistillation technology: A review. In *Food Science & Technology* [online]. (72). 153-161. [cit. 2018-04-04]. DOI: org.10.1016/j.tifs.2017.12.014. ISSN: 0924-2244. Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224417306118>>
- Greathead, H., Roura, E. 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity: Main effects and modes of action. *Proceedings of the Nutrition Society* [online]. 62 (02). 279-290. [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1079/PNS2002197. ISSN: 0029-6651. Dostupné z: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0029665103000430>
- Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 27 (1). 1-93. [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1016/j.mam.2005.07.008. ISSN: 00982997. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299705000348>>
- Haaber, J., Penadés, J. R., Ingmer, H. 2014. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 17 (3). 32-37. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1016/j.tim.2017.05.011. ISBN: 10.1016/j.tim.2017.05.011. ISSN: 13695274. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X17301257>>
- Harold M. McNair, James M. Miller. 2009. *Basic gas chromatography* [online]. Second edition. Elsevier Science. Burlington. [cit. 2018-04-04]. ISBN: 978-047-0480-090.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., Florou-Paneri, P., Cháfer, M. 2012. Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds: A Review. *Agriculture* [online]. 2 (3). 228-243. [cit. 2018-04-11]. DOI: 10.3390/agriculture2030228. ISSN: 2077-0472. Dostupné z: <<http://www.mdpi.com/2077-0472/2/3/228>>
- Janča, J., Zentrich, J. A. 1994. *Herbář léčivých rostlin. Eminent*. Praha. ISBN: 80-858-7602-7.
- Jorgensen, J. H., Ferraro, M. J. 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 49 (11). 1749-1755. [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1086/647952. ISSN: 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/647952>
- Judzentiene, A., Stoncius, A., Budiene, J. 2015. Chemical composition of the essential oils from *Glechoma hederacea* plants grown under controlled environmental conditions in Lithuania. *Journal of Essential Oil Research* [online]. 27 (5). 454-458. [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1080/10412905.2015.1039663. ISSN: 1041-2905. Dostupné z: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10412905.2015.1039663>>
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Haapasalo, M., Chakraborty, S., Shahali, Y., Dhama, K., Gow, N. A. R. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections: A review. *Microbes and Infection* [online]. 2 (2). 189-198. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)00269-0. ISBN: 10.1016/j.micpath.2018.02.028. ISSN: 12864579. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457900002690>>
- Kumarasamy, Y., Cox, P. J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S. D., Guo, L., Li, X. -H., He, C. -J., Dai, O. 2002. Biological activity of *Glechoma hederacea*: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. *Fitoterapia* [online]. 73 (7-8). 721-723. [cit. 2018-

- 04-12]. DOI: 10.1016/S0367-326X(02)00237-X. ISSN: 0367326X. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X0200237X>>
- Lister, P. D., Wolter, D. J., Hanson, N. D. 2009. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 22 (4). 582-610. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1128/CMR.00040-09. ISSN: 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00040-09>
- Mamadaliyeva, N. Z., Bobakulov, K. M., Vinciguerra, V., Tiezzi, A., Abdullaev, N. D., Nahar, L., Azimova, S. S., Sarker, S. D. 2016. GC-MS and q-NMR based chemotaxonomic evaluation of two *Leonurus* species: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. *Phytochemical Analysis* [online]. 27 (5). 284-289. [cit. 2018-04-12]. DOI: 10.1002/pca.2629. ISSN: 09580344. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pca.2629>>
- Mlejová, V., Pavlíková, P., Dobiáš, P., Adam, M., Ventura, K., 2010: Aplikace vybraných mikroextrakčních technik při stanovení rostlinných silic. *Chem. Listy*, 104(3): 166-171.
- Mockute, D., Bernotiene, G., Judzentiene, A., Wan, F., Xie, X. -F., Guo, L., Li, X. -H., He, C. -J., Dai, O. 2006. Germacrene D Chemotype of Essential Oils of *Leonurus cardiaca* L. Growing Wild in Vilnius District (Lithuania): A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. *Journal of Essential Oil Research* [online]. 18 (5). 566-568. [cit. 2018-04-12]. DOI: 10.1080/10412905.2006.9699169. ISSN: 1041-2905. Dostupné z: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2006.9699169>>
- Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., Akbarzadeh, M. 2008. The Essential Oil Composition of *Leonurus cardiaca* L. *Journal of Essential Oil Research* [online]. 20 (2). 107-109. [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1080/10412905.2008.9699966. ISSN: 1041-2905. Dostupné z: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2008.9699966>>
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., Łabużek, S., Coppola, R., De Feo, V. 2004. Changes in whole cell-derived fatty acids induced by naphthalene in bacteria from genus *Pseudomonas*. *Microbiological Research* [online]. 159 (1). 87-95. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1016/j.micres.2004.02.001. ISSN: 09445013. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501304000187>>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* [online]. 6 (12). 1451-1474. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.3390/ph6121451. ISSN: 1424-8247. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8247/6/12/1451>
- Olenikov, D. N.; Dudareva, L. V.; Tankhaeva, L. M. Chemical composition of essential oils from *Galeopsis bifida* and *Phlomis tuberosa*. *Chemistry of natural compounds*, 2010, 46.2: 316-318.
- Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, R., Azizi, M., Bassami, M. R., Cháfer, M. 2010. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens: a review. *Food Chemistry* [online]. 120 (3). 765-770. [cit. 2018-04-11]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.11.008. ISSN: 03088146. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609012898>>
- Otto, M., Daum, R. S., Hanson, N. D. 2014. *Staphylococcus aureus* toxins: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Current Opinion in Microbiology*

- [online]. 17 (3). 32-37. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1016/j.mib.2013.11.004. ISSN: 13695274. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527413002191>
- Pandey, A. K., Singh, P., Tripathi, N. N. 2014. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [online]. 4 (9). 682-694. [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.12980/APJTB.4.2014C77. ISSN: 22211691. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221169115300897>
- Pazourek J., *Atlas anatomické stavby rostlin*. Praha: Karolinum, 1992. s. ISBN 8070666439
- Penders, J., Stobberingh, E. E., Savelkoul, P. H. M., Wolffs, P. F. G. 2013. The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Frontiers in Microbiology* [online]. 4 (3). -. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00087. ISSN: 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00087/abstract>
- Peter, Edited by K. V. *Handbook of herbs and spices*. 2nd ed. Boca Raton, Fla: CRC Press, 2001. ISBN 1855735628.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. 2011. Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings: A Review. *Food Engineering Reviews* [online]. 3 (1). 1-16. [cit. 2018-04-11]. DOI: 10.1007/s12393-010-9031-3. ISSN: 1866-7910. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12393-010-9031-3>
- Sankar, T. V. 2005. *Gas Chromatography - Principle and Applications*. Central Institute of Fisheries Technology. . 115-119. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/123456789/1238>
- Sellam, A., Whiteway, M., Ingmer, H. 2014. Recent advances on *Candida albicans* biology and virulence: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 17 (3). 32-37. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.12688/f1000research.9617.1. ISBN: 10.12688/f1000research.9617.1. ISSN: 13695274. Dostupné z: <https://f1000research.com/articles/5-2582/v1>
- Slavík, B., Štěpánková, J. (ed.). 2011. *Květena České republiky*. Academia. Praha. ISBN: 80-200-0306-1.
- Sommer, M. O. A., Dantas, G., Savelkoul, P. H. M., Wolffs, P. F. G. 2011. Antibiotics and the resistant microbiome. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 14 (5). 556-563. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1016/j.mib.2011.07.005. ISSN: 13695274. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527411000890>
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology* [online]. 25 (1). 120-127. [cit. 2018-04-11]. DOI: 10.1016/j.fm.2007.07.002. ISSN: 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002007000858>
- Soorni, A., Nazeri, V., Fatahi, R., Khadivi-Khub, A. 2014. Multivariate analysis of motherwort germplasm in Iran using morphological variables and essential oil content. *Plant Systematics and Evolution* [online]. 300 (5). 925-935. [cit. 2018-04-13]. DOI: 10.1007/s00606-013-0932-5. ISSN: 0378-2697. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00606-013-0932-5>
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A., Granum, P. E., Chakraborty, S., Shahali, Y., Dhama, K., Gow, N. A. R. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins: A review. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 32 (4). 579-606. [cit. 2018-04-04].

DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x. ISBN: 10.1016/j.micpath.2018.02.028. ISSN: 1574-6976. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>

Šilhánková, L. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Praha: Academia, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6

Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., Başer, H., van Wyk, B. -E. 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae): a review. Food Chemistry [online]. 90 (3). 333-340. [cit. 2018-04-11]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.09.013. ISSN: 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814603004783>

Velićanski, A., Cvetković, D., Markov, S. 2013. Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family. Romanian Biotechnological Letters. 1 (18).

Viljoen, A., van Vuuren, S., Ernst, E., Klepser, M., Demirci, B., Başer, H., van Wyk, B. -E. 2003. *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae)-the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy: a review. Journal of Ethnopharmacology [online]. 88 (2-3). 137-143. [cit. 2018-04-11]. DOI: 10.1016/S0378-8741(03)00191-0. ISSN: 03788741. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874103001910>

Wenzel, M. *Léčivé rostliny: nejlepší využití pro zdraví celé rodiny*. Grada Publishing, as, 2014. ISBN 978-80-247-5155-9

Wojtyński, K., Szymański, M., Matławska, I. 2013. *Leonurus cardiaca* L. (Motherwort): A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. Phytotherapy Research [online]. 27 (8). 1115-1120. [cit. 2018-04-12]. DOI: 10.1002/ptr.4850. ISSN: 0951418X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.4850>

Xiong, L., Peng, C., Zhou, Q. -M., Wan, F., Xie, X. -F., Guo, L., Li, X. -H., He, C. -J., Dai, O. 2013. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from Different Parts of *Leonurus japonicus* Houtt: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. Molecules [online]. 18 (1). 963-973. [cit. 2018-04-12]. DOI: 10.3390/molecules18010963. ISSN: 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/1/963>

Zida, A., Bamba, S., Yacouba, A., Ouedraogo-Traore, R., Guiguemdé, R. T., Yadav, B., Gow, N. A. R. 2017. Anti- *Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. Journal de Mycologie Médicale [online]. 27 (1). 1-19. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1016/j.mycmed.2016.10.002. ISBN: 10.1016/j.mib.2016.08.006. ISSN: 11565233. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1156523316302220>

9 Seznam zkratek

DMSO	dimethylsulfoxid
MHB	Müller – Hinton bujón
MHA	Müller – Hinton agar
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
MRSA	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MIC	minimální inhibiční koncentrace
TTO	tea tree oil

10 Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Terpenoidy

Obrázek č. 2: Fenylypropany

Obrázek č. 3: *Glechoma hederacea* L.

<<http://botany.cz/cs/glechoma-hederacea/>>

Obrázek č. 4: *Galeopsis segetum*

<<https://www.verspreidingsatlas.nl/0541>>

Obrázek č. 5: *Leonurus Cardiaca* L.

<https://www.zahrada-cs.com/foto/cz/30550/>

Obrázek č. 6: Clevenger, Zdroj: Olga Zítková, 2018

Obrázek č. 7: Schéma plynové chromatografie

<<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SchemaGC.png>>

11 Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Navážka a objem rozpouštědla na přípravu zásobních roztoků přírodních látek

Tabulka č. 2: Ředící řady experimentu v $\mu\text{g/ml}$

Tabulka č. 3: Hmotnost sušeného materiálu, množství vydestilované silice a výtěžnost silic z rostlinného materiálu

Tabulka č. 4: Minimální inhibiční koncentrace (MIC)

Tabulka č. 5: Chemické složení silic