

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality zemědělských produktů**



**Antimikrobiální aktivita silic z vybraných druhů českých  
léčivých rostlin**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Nela Štrosová**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: Ing. Pavel Nový, Ph.D.**

© 2018 ČZU v Praze

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Antimikrobiální aktivita silic z vybraných druhů českých léčivých rostlin vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne: 13. 4. 2018

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Ing. Pavlu Novému, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a především vstřícnost při konzultacích a vypracování diplomové práce.

Můj vděk patří i mé rodině za psychickou i finanční podporu během studia.

## Souhrn

Diplomová práce se zabývala antimikrobiální aktivitou a chemickým složením silic z českých léčivých rostlin, u kterých dosud nebyla antimikrobiální aktivita dostatečně prozkoumána. K testování byly vybrány rostliny Andělíka lékařská (*Archangelica officinalis*), Kopretina řimbaba (*Tanacetum parthenium*), Srdečník obecný (*Leonurus cardiaca*), Lžičník lékařský (*Cochlearia officinalis*), Popenec obecný (*Glechoma hederacea*) a Řepík lékařský (*Agrimonia eupatoria*).

Pomocí vodní destilace bylo vyextrahováno celkem 7 různých silic, které byly testovány pomocí bujónové mikrodiluční metody proti grampozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus*, gramnegativním bakteriím *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a kvasince *Candida albicans*. Žádná ze silic nevykazovala antimikrobiální aktivitu proti těmto patogenům v rozmezí koncentrace 2 – 1024  $\mu\text{l/ml}$ .

Chemické složení silic bylo analyzováno pomocí plynové chromatografie. Hlavními složkami silice z plodu Andělíky lékařské byl  $\beta$ -Phellandrene (86,27 %). Majoritní složkou silice z kořene Andělíky lékařské byly  $\alpha$ -copaen-11-ol (9,97 %), humulene epoxide 2 (7,82 %), limonen (6,93 %) a  $\alpha$ -Pinene (6,46 %). Převážnou část silice Kopretiny řimbaby tvořil kafr (57,4 %). Silice z natě Popence obecného obsahovala převážně eucalyptol (29,21 %), sparthulenol (10,6 %), thymol (2,78 %) a anethole (2,63 %). Hlavní složku silice Lžičníku lékařského tvořila výhradně sloučenina 2-butyl isothiocyanate (84,63 %). U Srdečníku obecného byl hlavní složkou silice Caryophyllene oxid (15,28 %), hexadecanová kyselina (11,64 %) a humulen epoxid II (9,32 %). Silice Řepíku lékařského obsahovala  $\alpha$ -Pinene (19,83 %), Caryophyllene oxide (8,55 %), Hexahydrofarnesyl aceton (7,59 %) a humulen (7,57 %).

V této práci bylo také dle dostupných studií, poprvé testováno chemické složení silice z natě Lžičníku lékařského.

**Klíčová slova:** silice, antimikrobiální, léčivky, chemické složení, MIC

## Summary

This diploma thesis deal with antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from Czech medicinal herbs, which have not yet been tested or tested insufficiently for antimicrobial activity. Plants selected for testing included Andělíka lékařská (*Archangelica officinalis*), Kopretina řimbaba (*Tanacetum parthenium*), Srdečník obecný (*Leonurus cardiaca*), Lžičník lékařský (*Cochlearia officinalis*), Popenec obecný (*Glechoma hederacea*) a Řepík lékařský (*Agrimonia eupatoria*).

The essential oils were extracted from the herbs by hydrodistillation. A total of 7 essential oil from 6 plant species were tested by using a broth microdilution method against Grampositive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*, Gramnegative bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. None of the essential oil was active against these pathogens within the range of the testing concentrations of 2 – 1024  $\mu\text{l/ml}$ .

The chemical composition of the essential oils was analyzed by gas chromatography. The main composition of essential oil Andělíka lékařská was  $\beta$ -Phellandrene (86,27 %). The majority of the essential oils of roots Andělíka lékařská were  $\alpha$ -copaen-11-ol (9,97 %), humulene epoxide 2 (7,82 %), limonen (6,93 %) a  $\alpha$ -Pinene (6,46 %). The predominant part of the Kopretina řimbaba was formed by camphor (57.4%). Essential oil from the Popenec obecný were contained by eucalyptol (29,21 %), sparthulenol (10,6 %), thymol (2,78 %) and anethole (2,63 %). The main component of the Lžičník lékařský was the compound of 2-butyl isothiocyanate (84.63%). The Caryophyllene oxide (15.28%), %, hexadecanoic acid (11,64 %) a humulen epoxid II (9,32 %) were the major constituents of essential oil Srdečník obecný. The main composition of essential oil Řepík lékařský was  $\alpha$ -Pinene (19.83%).

In this work, according to available studies, the chemical composition of the essential oil of the Lžičník lékařský was tested for the first time.

**Key words:** essential oil, antimicrobial, herbs, chemical composition, MIC

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce a hypotéza.....	2
3	Přehled literatury.....	3
3.1	Využití bylin.....	3
3.2	Silice.....	4
3.2.1	Chemické složení silic .....	5
3.2.2	Metody získávání silic .....	6
3.3	Antimikrobiální aktivita .....	8
3.3.1	Disková difuzní metoda .....	9
3.3.2	Klínová metoda.....	11
3.3.3	E – test .....	11
3.3.4	Diluční metody .....	12
3.3.5	Diluční metoda v bujonu.....	13
3.4	Antimikrobiální aktivita silic v plynné fázi .....	14
3.5	Vybrané rostliny.....	15
3.5.1	Andělíka lékařská (Archangelica officinalis Hoffm.).....	15
3.5.2	Srdečník obecný (Leonurus cardiaca).....	16
3.5.3	Popenec obecný (Glechoma hederacea) .....	18
3.5.4	Řepík lékařský (Agrimonia eupatoria) .....	20
3.5.5	Kopretina Řimbaba ( <i>Tanacetum parthenium</i> ) .....	22
3.5.6	Lžičník lékařský (Cochlearia officinalis) .....	23
3.6	Plynová chromatografie .....	25
3.7	Testované mikroorganismy .....	26
3.7.1	Grampozitivní bakterie .....	26
3.8	Gramnegativní bakterie .....	27
3.8.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	28

3.8.2	<i>Escherichia coli</i> .....	28
3.9	Kvasinky .....	29
3.9.1	<i>Candida albicans</i> .....	30
4	Materiál a metody .....	31
4.1	Použité přístroje a pomůcky .....	31
4.2	Testovaný materiál .....	32
4.3	Příprava kultivačních médií .....	32
4.3.1	Mueller-Hintonův Broth agar .....	32
4.3.2	Mueller-Hintonův agar pufrovaný .....	33
4.3.3	RPMI médium.....	33
4.4	Modelové mikroorganismy .....	33
4.5	Metoda extrakce silic .....	34
4.6	Příprava zásobních vzorků silic .....	34
4.7	Kontrolní antibiotika .....	35
4.8	Příprava inokula .....	35
4.9	Mikrotitrační destička – antimikrobiální aktivita.....	35
4.10	Mikrotitrační destička – vzájemné ovlivnění silic.....	36
4.11	Chemické složení silic .....	37
5	Výsledky .....	38
5.1	Extrakce silic .....	38
5.2	Vzájemné ovlivnění silic.....	38
5.3	Antimikrobiální aktivita .....	38
5.4	Chemické složení silic.....	39
6	Diskuze .....	42
7	Závěr .....	45
8	Seznam literatury .....	46

# 1 Úvod

V současné době je celosvětovým trendem prozkoumávat nové alternativy k omezení výskytu onemocnění a upřednostňovat metody, které snižují negativní účinky na zdraví člověka. V souvislosti s touto problematikou se často hovoří o rostlinách, které jsou již po staletí jedním z nejvýznamnějších zdrojů přírodních léčiv.

Silice jsou olejovité směsi aromatických látek z rostlinného materiálu. Jsou tvořeny až z několika stovek různých chemických látek. Každá z těchto látek má určitou funkci a vzájemným působením je dosahováno biologického účinku silice. Jedná se především o účinky antibakteriální, antikarcinogenní, antimykotické a protizánětlivé. Silice také mohou prodlužovat trvanlivost potravin. Silice obsažené v bylinkách jsou odpovědné za různé vůně, které rostliny vypouštějí. Jsou široce používány v kosmetickém průmyslu, v parfumerii a také v aromaterapii. Silice umožňující rostlině řídit nebo regulovat své prostředí například přitahovat hmyz nebo odpuzovat dravce.

Silice používané na základě jejich známých antimikrobiálních vlastností mají dobře zdokumentovanou aktivitu, ovšem existuje jen málo publikovaných údajů pro mnoho dalších esenciálních olejů. Nabízí se tedy možnost testovat silice, které dosud testovány nebyly nebo teprve čekají na své objevení.



## **2 Cíl práce a hypotéza**

Cílem práce je otestovat zanalyzovat chemické složení a otestovat antimikrobiální aktivitu silic získaných z vybraných druhů léčivých rostlin, které nebyly dosud vůbec nebo pouze nedostatečně testovány.

**Hypotéza:** Silice, jakožto součást obranných mechanismů rostlin, působí často antimikrobiálně. Lze proto předpokládat, že i některé silice z námi vybraných dosud netestovaných rostlin budou vykazovat antimikrobiální aktivitu.

## 3 Přehled literatury

### 3.1 Využití bylin

Byliny neboli léčivé rostliny jsou nejvýznamnějším zdrojem přírodních léčiv (Tapsell a kol., 2006). Byliny jsou obecně definovány jako nedřevěné rostliny, které po odkvetení zahynou. Tato definice byla rozšířena na jakoukoli rostlinu, jejíž část nebo celek může být použita při léčebných procedurách, kuchařských přípravcích, výživových doplncích nebo jako barvicí nebo kosmetické prostředky. S vědomím, že chemické léky nejsou vždy všemocné a mohou mít vážné vedlejší účinky, bylinkářství a starodávné léky opět získávají na popularitě (Shivanand, Nilam, 2010).

Od nepaměti se rostliny využívaly v lidovém léčitelství a hrají důležitou roli v kulturním dědictví. Byliny a koření se také využívají jako konzervační látky. Staré egyptské papýry z roku 1555 př. n. l. zaznamenávají použití koriandru, fenyklu, jalovce, kmínu, česneku a tymiánu. Ve starověkém Řecku a Římě byly byliny používány více než koření. Hippokrates měl sbírku 300 léčivek, které obsahovaly česnek, skořici, rozmarýn a další, které byly lokálně dostupné. Údajně používal česnek k léčbě rakovina dělohy. Máta byla velmi ceněna pro své pozitivní účinky na trávicí systém a lékořice byla používána jako sladidlo, ale také byly používány jako byliny pro své protizánětlivé účinky na astma a vředy v ústech. Vzhledem k tomu, že nebyla možnost zjistit příčinu onemocnění nebo určit, která bylina tuto nemoc vyléčí, všechny poznatky byly získávány zkoušením a poté předáváním těchto znalostí. V Indii se tradiční systém léčitelství Ayurvéda vyvinul před více než před 5000 lety s ústně předávanými znalostmi. Ayurvéda je nejstarší zachovalý systém léčby na světě skládající se ze systému výživy, bylinné terapie, relaxace, jógy, meditace, různých procedur včetně masáží, detoxikace a regenerace organismu, aromaterapie a terapie barvami (Tapsell a kol., 2006).

Dnes se s léčivkami hojně pracuje i v moderní medicíně a také v gastronomii, dodávají pokrmům chuť i aroma. Spekuluje se o tom, že by byliny mohli být zařazeny mezi funkční potraviny. Středomořské diety jsou spojovány se sníženým výskytem některých chronických nemocí, jako jsou srdeční onemocnění a rakovina. Konzumuje se zde větší množství česneku, rozmarýnu, bazalky, tymiánu a dalších bylinek, což může pomoc vysvětlit některé z ochranných účinků pozorovaných u populace s tradičním středomořským stravováním. Většina studií potvrzuje pozitivní účinky česneku na kardiovaskulární systém. Spotřeba

česneku nebo extraktů česneku je spojena se snížením celkového cholesterolu, cholesterolu s nízkou hustotou (LDL) a hladiny triglyceridů.

U léčivек se tedy předpokládají ochranné účinky na zdraví srdce. Stejně jako ovoce a zelenina, byliny a koření obsahují mnoho různých tříd antioxidantů. Bylo prokázáno, že příjem bylin může významně přispívat k celkovému příjmu antioxidantů rostlinného původu. Flavonoidy obsažené v rostlinách mají antioxidační účinky a byly rozsáhle studovány. Nejvíce těchto látek obsahuje heřmánek, lékořice, cibule, rozmarýn, šalvěj a tymián (Tapsell a kol., 2006).

Pokud se sušené byliny nechají projít varem, vzniká odvar. Odvar se může popíjet jako čaj nebo se používají v mnoha domácích kosmetických přípravcích a lécích. Mohou se objevit v přírodních a ekologických domácích produktech, jako jsou zahradní hnojiva a odpuzovače hmyzu. Pokud se léčivky začlení do jiných složek a zhotoví se z nich krém, jsou považovány za rostlinnou mast. Někdy se také používají bylinné komprese, kdy kus látky namočený v odvaru je aplikován na tělo zevně (Shivanand, Nilam, 2010).

Bylinkáři dnes věří, že léčivky pomáhají lidem budovat dobré zdraví pomocí přírodních zdrojů. Na rozdíl od chemicky syntetizovaných, vysoce koncentrovaných léčiv, které mohou vyvolat řadu vedlejších účinků, bylinky mohou účinně povzbudit obranyschopnost těla. Byliny nebereme jako léky, ale spíše nabízejí způsob, jak dát tělu to dobré z přírody. Rostliny se také hojně využívají v kosmetice. V bylinné kosmetice známé také jako přírodní kosmetika převažují přírodní aktivní složky nad syntetickými (Shivanand, Nilam, 2010).

### **3.2 Silice**

Silice, jinak nazývané také jako esenciální, těkavé nebo éterické oleje jsou aromatické olejovité sloučeniny z rostlinného materiálu. Mohou se nacházet v květinách, pupenech, semenech, listech, větvičkách, kůře, dřevě, kořenech nebo oddencích (Burt, 2004).

Z hlediska chemického jsou rostlinné silice látky těkavé, nestálé, většinou bez barvy s různou viskozitou. Esenciální oleje jsou složeny z jednotlivých chemických komponent především terpenického charakteru, obsahují však i řadu neterpenoidních uhlovodíků. Ve vodě jsou v podstatě nerozpustné, s vodou se nemísí, dobře se ale rozpouštějí v rostlinných olejích, v medu, lihu, éteru a dalších organických rozpouštědlech. Silice z rostlin jsou produktem jejich sekundárního metabolismu, při němž dochází k degradaci látek metabolismu primárního tedy tuků, cukrů a bílkovin (Kantová, Kant, 2004).

Pojem "esenciální olej" poprvé použil v 16. století švýcarský reformátor medicíny, Paracelsus von Hohenheim, který pojmenoval účinnou složku drogy Quinta essentia. Je známo více jak 3000 silic, z nichž se 300 užívá ke komerčním účelům. Již dlouho je známo, že některé silice nebo jejich složky mají antimikrobiální, antivirové, antimykotické, antitoxigenní, antiparazitické vlastnosti. Tyto charakteristiky jsou pravděpodobně příbuzné funkci těchto sloučenin v rostlinách. Silice jsou velmi koncentrované a silné, proto se před užitím například v aromaterapii značně ředí (Burt, 2004).

Tyto těkavé oleje jsou obecně bezbarvé a při pokojové teplotě tekuté. Mají charakteristický zápach a hustotu mají menší než 1. Mají index lomu a velmi vysokou optickou aktivitu. Silice obsažené v bylinkách jsou odpovědné za různé vůně, které rostliny vypouštějí. Jsou široce používány v kosmetickém průmyslu, v parfumerii a také v aromaterapii. Silice umožňující rostlině řídit nebo regulovat své prostředí tzv. ekologická role; přitažlivost hmyzu, odpuzování dravce, inhibice klíčivosti semen nebo komunikace mezi rostlinami (Wissal a kol., 2006).

Z rostlin lze silici získat destilací vodní parou, extrakcí těkavými organickými rozpouštědly, extrakcí tuky nebo lisováním. Destilace jako metoda získávání silic byla poprvé použita v Egyptě před více než 2000 lety (Burt, 2004).

### **3.2.1 Chemické složení silic**

Silice jsou tvořeny různými strukturami a zejména jejich počet a složení jsou velmi variabilní. Esenciální oleje jsou lokalizovány v cytoplazmě určitých sekretů rostlinných buněk, které leží v jednom nebo více orgánech rostliny. Jmenovitě jde o sekreční chlupy nebo trichomy, epidermální buňky, vnitřní sekreční buňky a sekreční kapsy. Tyto oleje jsou složité směsi, které mohou obsahovat více než 300 různých sloučenin. Jsou tvořeny organickými těkavými sloučeninami obecně o nízké molekulové hmotnosti. Tlak jejich par při atmosférickém tlaku a při pokojové teplotě je dostatečně vysoký, takže jsou částečně přítomné v plynném stavu.

Silice můžeme zahrnout do různých chemických tříd. Patří sem alkoholy, ethery nebo oxidy, aldehydy, ketony, estery, aminy, amidy, fenoly, heterocykly a zejména terpeny. Alkoholy, aldehydy a ketony nabízejí širokou škálu aromatických tónů, jako je ovocný (E-nerolidolid), květinový (Linalool), citrusový (Limonene), bylinný ( $\gamma$ -selinén) atd. Nejvíce doposud identifikovaných sloučenin esenciálních olejů patří do skupiny terpenů, jako jsou funkcionalizované deriváty alkoholů (geraniol,  $\alpha$ -bisabolol), ketony (menton, p-vetivon)

aldehydů (citronellal, sinensal), estery ( $\gamma$ -terpinyl acetát, cedrylacetát) a fenoly (thymol) (Wissal a kol., 2006).

Esenciální oleje také obsahují neterpenické sloučeniny biogenerované cestou fenylypropanoidů, jako je eugenol, cinnamaldehyd a safrol.

Látky obsažené v silicích vznikají dvěma biochemickými drahami – hlavní je tzv. mevalonátová cesta (tvoří se látky terpenické), další je tzv. šikimátová cesta (vznikají například kumariny, furokumariny a fenolické látky).

Vysoká variabilita složení esenciálních olejů jak z kvalitativního tak kvantitativního hlediska je ovlivněna různými faktory, které lze rozdělit do dvou kategorií:

a) Vlastní faktory vztahující se k rostlině a interakce s okolním prostředím - typ půdy a podnebí, dále například zralost rostliny

b) Vnější faktory související s metodou extrakce a životním prostředím.

Faktory, které určují výtěžek a složení esenciálních olejů jsou četné a v některých případech je obtížné izolovat tyto faktory od sebe navzájem, protože vzájemně spolu souvisejí a navzájem se ovlivňují (Wissal a kol., 2006).

### **3.2.2 Metody získávání silic**

Převážná většina silic se vyrábí z rostlinného materiálu odlišnými druhy destilace nebo lisováním za studena v případě citrusových plodů.

#### **3.2.2.1 Macerace v oleji**

Vyluhování vonných látek do vhodného rozpouštědla, jakým je například tuk, patří k nejstarším metodám získávání vonných látek. Rostlinné oleje jsou vhodnými nosiči nejen éterických olejů, ale tvoří i základ olejových macerátů. Výluh rostliny v oleji se nazývá olejový macerát, do kterého z ní přechází účinné, lipofilní, v olejích rozpustné látky. Tento způsob extrakce se tradičně nazývá macerace. V aromaterapii jsou maceráty jedinečnou a neodmyslitelnou součástí masážních a regeneračních olejů, krémů, balzámů a mastí (Hüsni Can Baser, Buchbauer, 2010).

### **3.2.2.2 *Mechanické lisování***

Některé rostlinné silice je lepší získávat lisováním, nikoliv destilací. Tato metoda se využívá zejména pro citrusové plody. Esenciální oleje se v oplodí citrusů nacházejí v blízkosti povrchu kůry, a tak jsou lehce získávány pouhým zmáčknutím a jemným propíchnutím slupky, čímž se naruší olejové váčky ve slupce citrusu. Olej poté vytéká ze slupky ven, kde je zachycován do nádoby s filtrem. Lisování může být prováděno formou vymačkání nebo strojového zpracování. První metoda je tradičnější a pomáhá vytvořit velmi čistou silici (Kantová a Kant, 2004).

### **3.2.2.3 *Superkritická fluidní extrakce***

Jedná se o metodu získávání silice, kde extrakčním činidlem je tekutina v superkritickém stavu. Superkritická tekutina, která se nachází ve stavu nad svým kritickým bodem, tj. nad svou kritickou teplotou ( $T_c$ ) a kritickým tlakem ( $p_c$ ). Jde o proces, při kterém nedochází k žádné chemické reakci ani k uvolňování tepla. Oxid uhličitý je udržován pod tlakem v kapalném stavu v uzavřeném systému s materiálem, z něhož se uvolňuje silice. Protože za normálních podmínek je  $CO_2$  plyn, za snížení tlaku se změní na páru a po extrakci se odpaří a zůstává čistá silice. Tento způsob se dnes považuje za dokonalejší než destilace (Hüsni Can Baser, Buchbauer, 2010).

### **3.2.2.4 *Mikroextrakce tuhou fází (SPME)***

Mikroextrakce tuhou fází je izolační metoda, při níž dochází k sjednocení procesu vzorkování a extrakce. Principem této metody je sorbce složky vzorku na stacionární fázi pokrývající křemenné vlákno, které se nachází uvnitř kovové jehly.

Tato technika redukuje použití organických rozpouštědel a podstatně zkracuje dobu extrakce, jelikož umožňuje automatizaci postupu při přípravě vzorku. Významnými znaky SPME jsou jednoduchost, nízké pořizovací a provozní náklady, rychlost a také selektivita a citlivost ve spojení s vhodnou detekční metodou (Mlejová a kol., 2010).

### **3.2.2.5 *Destilace vodní parou***

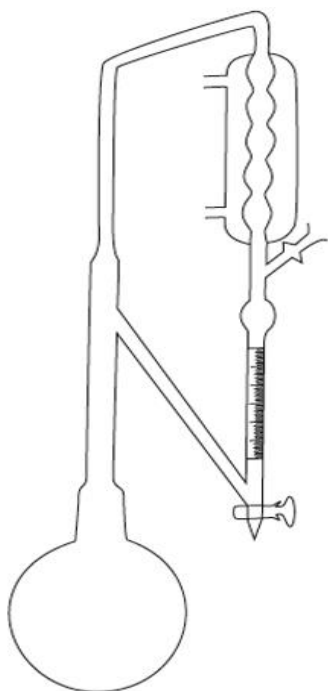
Při destilaci s vodní párou se materiál zahřívá v destilační aparatuře a vodní pára s sebou strhává uvolňující se silici, která se po ochlazení usazuje jako olejovitá vrstva na povrchu vody. Touto metodou se vyrábějí hlavně silice z plodů, listů, kořenů, oddenků a květů. Tato technika je hlavní metodou při používání extrakcí vonných silic v průmyslu, protože má

výhodu, že je nejvíce efektivní a cenově dostupná, a navíc zachovává integritu rostlinných olejů.

Proces probíhá v aparatuře, která se skládá ze čtyř částí: nádrž na rostliny, zařízení na výrobu páry, chladič a nádrž na olej. Kilogramy či tuny květů, rostlin nebo částí rostlin se nasypou do nádrže z mědi, případně ušlechtilé oceli. Zahříváním vzniká pára a tlak. Pára je přiváděna k rostlinnému materiálu a dochází k postupnému uvolňování silice (Hüsni Can Baser, Buchbauer, 2010).

### 3.2.2.6 Vodní destilace

Vodní destilace nebo také hydrodestilace je relativně jednoduchá metoda získávání silice z rostlinné hmoty. Jedná se o jednu z nejstarších metod extrakce, která je v praxi stále hojně používána. Přírodní produkt je ponořen do vody a zahřívá se k varu. Silice je vytažena vodní párou do Clevengerovy aparatury. Když destilát kondenzuje zpět do kapaliny, esenciální olej se snadno oddělí od vody, protože se spolu nemísí (Hüsni Can Baser, Buchbauer, 2010).



Obrázek 1 Clevengerova aparatura ([www.popups.uliege.be](http://www.popups.uliege.be))

## 3.3 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální účinnost rostlinných olejů a extraktů je uznávána již řadu let. Rostlinné oleje a výtažky se používají pro širokou škálu účelů. Konkrétně antimikrobiální účinnost rostlinných olejů a extraktů tvoří základ mnoha aplikací, včetně konzervování surových a

zpracovaných potravin, farmaceutických přípravků a alternativní medicíny. Zatímco některé oleje používané na základě jejich renomovaných antimikrobiálních vlastností mají dobře zdokumentovanou aktivitu in vitro, existuje jen málo publikovaných údajů pro mnoho dalších olejů (Hammer, Carson, 1999).

Antimikrobiální efekt silic byl prokázán v mnoha studiích proti velké škále mikroorganismů, avšak mechanismus tohoto účinku nebyl zcela popsán. Nabízí se vysvětlení, že mechanismus účinku je dán obsahem chemických sloučenin a jejich účinkem. Silice se skládají z mnoha různorodých látek a nelze potvrdit antimikrobiální aktivitu všech chemických látek, jen díky jedné chemické látce, která tuto aktivitu vykazuje. Několik výzkumů potvrdilo, že antimikrobiální aktivitu způsobuje proniknutí látek přes bakteriální membrány buňky a ty tak vykazují inhibiční aktivitu na funkčních vlastnosti buňky. Fenolové složky silic mají antimikrobiální účinek a působí proti bakteriím způsobujícím alimentární onemocnění. Tyto složky narušují membránu buňky a způsobují propouštění látek z buňky, což vede ke ztrátě jejich intracelulárních složek (Calo et al., 2015).

K testování antimikrobiální aktivity silic vůči mikroorganismům se používá agar nebo bujón. V případě, že je použit agar jedná se o diskovou difuzní metodu. Bujón se používá při mikrodiluční a makrodiluční metodě (Schwalbe a kol., 2007).

Pro kultivační testy citlivosti k antibiotikům se využívá speciální Mueller – Hintonův agar. Má nižší obsah ztužovačů pro lepší difúzi antibiotika agarem (Špaček, Buchta, 2013).

### **3.3.1 Disková difuzní metoda**

Jedná se o nejčasnější a velmi jednoduchou metodu pro hodnocení účinků antibiotik na bakterie za použití jamek vyříznutých na agarové desky. Je to metoda kvalitativní, nejde o měření stupně citlivosti. Antibiotický roztok nalitý do jamky difunduje do agarů a inhibuje růst bakterií, které jsou očkované na povrch agarů nebo jsou v agaru bakterie přímo rozmíchané. V roce 1943 použili Foster a Woodruff papírové proužky impregnované antibiotiky jako alternativní zdroj difúze. Dnes se jamky s antibiotiky nahradili papírovými disky impregnovanými antibiotiky (Schwalbe a kol., 2007).

Výsledkem testu je, že kmen je citlivý nebo je rezistentní, podle toho, je-li průměr inhibiční zóny kolem disku na tuhé půdě alespoň stejný, nebo naopak menší, než stanovená hranice dle tabulek hraničních hodnot rezistence. Zjišťuje se, zda citlivost kmene odpovídá alespoň break-pointu (t. j. léčebně účinné, v organismu pacienta dosažitelné koncentraci antibiotika).

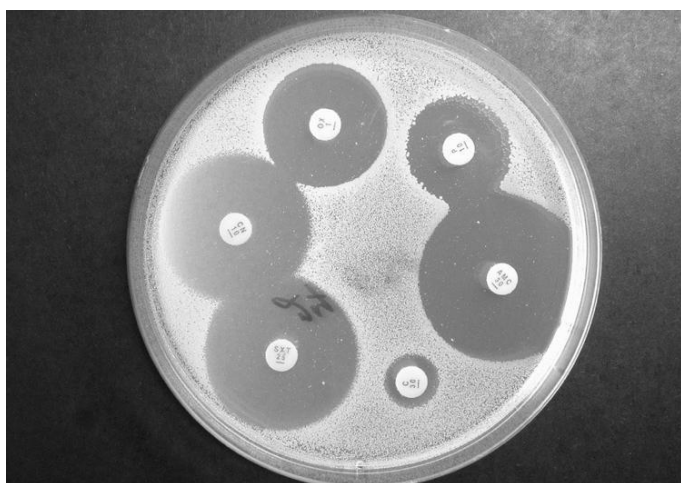


Menší průměr inhibiční zóny signalizuje, že podávání tohoto antibiotika by bylo neúčinné, kmen je tedy rezistentní. Velikosti inhibičních zón se měří po inkubaci pomocí šuplery (Špaček, Buchta, 2013).

I přes svou jednoduchost je diskový difúzní test založen na sofistikovaných fyzikálně chemických principech, které řídí dynamiku difúze antibiotik současně s růstem bakterií v agaru. Mnoho proměnných souvisejících s drogami a organismy přímo ovlivňuje velikost zóny. Aby bylo dosaženo smysluplných výsledků, musí být co nejvíce proměnných při testu striktně standardizováno. Na velikost zóny má vliv citlivost kmene, fyzikální vlastnosti antibiotika a půdy, tloušťka půdy, rychlost množení kmene. Čím se kmen množí pomaleji, tím je zóna při stejné citlivosti kmene větší (Schwalbe a kol., 2007).

Když antibiotický disk přichází do kontaktu s inokulovaným agarovým povrchem molekuly, antibiotika difundují z disku na agar a vytvářejí tak dynamicky se měnící gradient koncentrací antibiotik. Zatímco testovaný organismus se začíná množit a růst, postupuje směrem k maximálnímu nárůstu. V tomto okamžiku je hustota buněk dostatečně vysoká, takže antibiotikum v bezprostředním okolí může být absorbováno, čímž se udržují koncentrace na subinhibičních úrovních a umožňuje růst testovacího organismu (Schwalbe a kol., 2007).

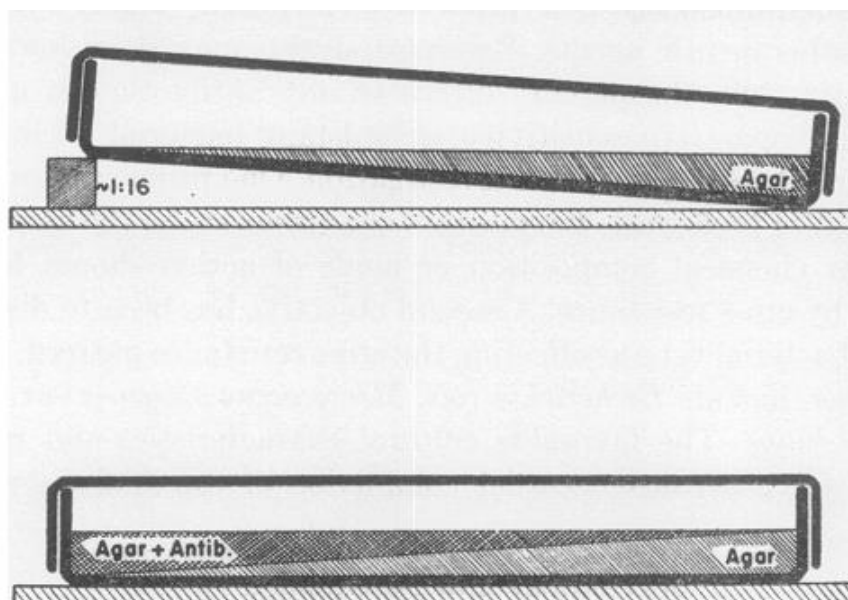
Kromě molekulárních vlastností léčiva, jako je molekulová hmotnost, iontový náboj a rozpustnost ve vodě, je difúzní koeficient léčiva ovlivněn také viskozitou a hloubkou agaru, teplotou a inkubačními podmínkami. Kromě vlastností organismu je růst ovlivněn i nutriční schopností testovacího média, hustotou a růstové fáze inokula (Schwalbe a kol., 2007).



**Obrázek 2** Disková difúzní metoda ([www.mikrobiologie.lf3.cuni.cz](http://www.mikrobiologie.lf3.cuni.cz))

### 3.3.2 Klínová metoda

V 50. letech minulého století Bryson a Szybalski rozpoznali omezení difúzních metod v důsledku nedefinovaných a nestabilních gradientů. Vyvinuli proto klínovou metodu pro vytvoření gradientu v agarové desce, která by byla stabilní a dostatečně dlouhá na to, aby vybrala rezistentní populace bakterií u definovaných koncentrací antibiotik reprodukovatelným způsobem. Vrstva obyčejného Mueller – Hintonova agaru se nalije do Petriho misky, vhodný je čtvercový nebo obdélníkový tvaru a agar se nechá ztuhnout pod úhlem. Ztuhlá vrstva se převrství druhou vrstvou agaru obsahující definované množství antibiotika a sendvičový agar se nechá ztuhnout na vodorovném povrchu. Antibiotikum difunduje vertikálně směrem dolů a vytváří gradient koncentrací antibiotik v celé délce klínu. Gradient koncentrace se kalibruje výpočtem koncentrace léčiva v celkovém objemu agaru v různých částech podél klínu (Schwalbe a kol., 2007).



Obrázek 3 Klínová metoda (Szybalski, Bryson, 1952).

### 3.3.3 E – test

E – test je modifikací diskového difuzního testu poskytující kvantitativní výsledky. Je to vlastně komerční varianta klínové metody. Kvantitou se rozumí minimální inhibiční koncentrace (MIC) (Schwalbe a kol., 2007). MIC je definována jako nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, při které ještě nepozorujeme růst bakterie (EUCAST, 2000).

Místo papírového disku se na agar aplikuje plastový proužek, který je napuštěn antibiotikem tak, že se jeho koncentrace od jednoho konce proužku zvyšuje směrem k druhému. Tomu graficky odpovídá kalibrovaná stupnice hodnot MIC, vyznačená na proužku. Po inkubaci je tvar inhibiční zóny spíše elipsoidního tvaru, než kulatého a v místě kde inhibiční zóna protíná proužek, se na stupnici odečítá hodnota MIC. Podle velikosti MIC a hraničních interpretačních hodnot pro dané antibiotikum je kmen hodnocen i interpretován. E – test je ale finančně nákladnější než disková metoda, proto není vhodný pro rutinní stanovení MIC. Výjimkou je, v opodstatněných případech, závažný nebo komplikovaný průběh infekce, selhání předchozí léčby či sledování rezistence (Špaček, Buchta, 2013).



Obrázek 4 E – test ([www.flickr.com](http://www.flickr.com))

### 3.3.4 Diluční metody

Princip dilučních metod spočívá v rozpuštění antibiotika v tekutém nebo pevném médiu. Na rozdíl od diskového difuzního testu tyto metody měří MIC, některé umožňují i stanovení minimální baktericidní koncentrace (MBK). Jsou to metody kvantitativní, lze je plně automatizovat a standardizovat. Antibiotika jsou zde ředěna geometrickou řadou (Špaček, Buchta, 2013).

MBK je definována jako nejnižší koncentrace antibiotika, která inhibuje růst 99,9% populace mikroorganismů. Udává se v ml/mg nebo mg/l. Platí, že MBK může být stejná nebo vyšší než MIC, nemůže být nižší (EUCAST, 2000).

Diluční metody lze tedy provádět v agaru nebo bujónu. V případě bujónu se hovoří o makrodiluční metodě nebo o mikrodiluční metodě (Špaček, Buchta, 2013).

#### **3.3.4.1 Diluční metoda v agaru**

Testování vybraných kmenů se provádí na Mueller-Hintonově agaru s definovanou koncentrací iontů. Každá plotna obsahuje příslušnou koncentraci testovaného antibiotika. Výška agaru je 4 mm, pH je 7,4. Inokulum testovaného kmene odpovídá standardu 0,5 McFarlanda. Jednotlivé plotny jsou naočkovány speciálním inokulátorem a na jedné plotně může být otestováno až 36 různých kmenů. Po naočkování se plotny inkubují při doporučené teplotě stanovenou dobu (nejčastěji 18 – 20 hod při 37°C). Současně s testovanými kmeny je nutné provést test citlivosti i pro daný referenční kmen, jehož hodnota MIC je známá. Mezi výhody této metody patří, že je referenční pro ostatní systémy, lze otestovat najednou větší počet kmenů k danému antibiotiku. Na druhou stranu je náročnější na provedení a nepraktická pro rutinní provoz (Franklin a kol., 2012)

#### **3.3.5 Diluční metoda v bujónu**

Má dvě možnosti provedení. Makrodiluční metoda ve zkumavkách s testovaným objemem větším než 1 ml, nebo mikrodiluční metoda prováděná v mikrotitračních destičkách. Ty obvykle mají 96 jamek s objemem 0,1 ml. Jako růstové médium se užívá Mueller - Hintonův bujón. Pro snadnější přípravu a provedení je široce rozšířená metoda mikrodiluční (Špaček, Buchta, 2013).

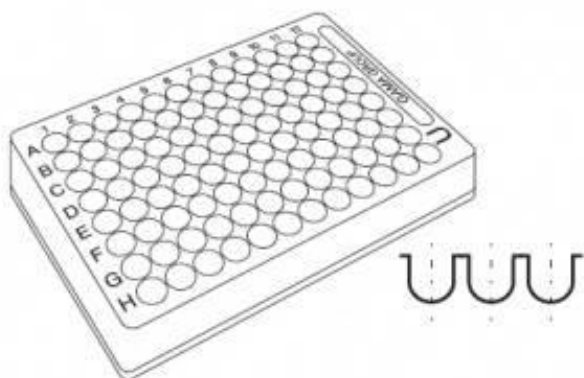
Mueller-Hintonův bujón je speciálně připravené médium pro testování citlivosti. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ho doporučuje pro testování nejčastěji se vyskytujících aerobních bakterií nalezených v potravinách a klinických vzorcích. Médium vykazuje poměrně dobrou reprodukovatelnost šarže k dávce pro testování citlivosti. Má nízký obsah inhibitorů sulfonamidu, trimethoprimu a tetracykinu a poskytuje uspokojivé složení pro většinu patogenů. Množství kationtů v bujónu by mělo být standardizováno. Jedná se výhradně o kationty  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ . Testování citlivosti antibiotik jako jsou aminoglykosidy a tetracykliny je výrazně ovlivněno bez přítomnosti těchto iontů (Schwalbe a kol., 2007).

Koncentrace inokula zde opět odpovídá 0,5 stupnice McFarlanda, destička se očkuje jehlovým inokulátorem a inkubuje se za standardních podmínek. Test zahrnuje negativní kontrolu, ve které je pouze čisté médium. Nejnižší koncentrace antimikrobiálního činidla, která bude inhibovat růst testovaného mikroorganismu, odpovídá negativní kontrole a zde se

odečítá MIC. Před odečítáním a zaznamenáním výsledků se doporučuje destičku jemně protřepat. Kromě toho by v testu měla být také zahrnuta pozitivní kontrola pro kontrolu růstu bez antibiotik. Toto je zapotřebí k tomu, aby se zjistilo, jestli jsou kultivační podmínky vhodné pro růst organismu. Kontrola sterility, která je také zahrnuta do testu obsahuje vše kromě inokula testovaných kmenů. Tato kontrolní řada nebo zkumavka by měla zůstat čistá. Růst v této zkumavce je indikátorem kontaminace. V takovém případě je test neplatný a měl by být opakován (Schwalbe a kol., 2007).

Po testu MIC se z každé zkumavky, která nevykazuje růst, přenese 50  $\mu$ l suspenze a naočkuje na Petriho misky s agarem. Plotny se inkubují přes noc při 37° C. Počet kolonií rostoucích z každé zkumavky se spočítá. Na té plotně, kde došlo redukci kolonií o 1000krát, ve srovnání s počtem kolonií počátečního inokula, se zaznamená jako MBC (Schwalbe a kol., 2007).

Výhodou této metody je možnost testovat jeden kmen současně k více antibiotikům. Dle uspořádání až ke 12 různým antibiotikům s různým rozptylem koncentrace na jedné destičce (Špaček, Buchta, 2013).



Obrázek 5 Mikrotitrační destička ([www.gama.cz](http://www.gama.cz))

### 3.4 Antimikrobiální aktivita silic v plynné fázi

Nedorostová a kol. (2009) zjistili antimikrobiální aktivitu silic v jejich plynné fázi. Jedná se o metodu volatility disku, kdy se 15 ml teplého média nalije do plastové Petriho misky a do víka se nalije 5 ml média. Po ztuhnutí se médium v miskovité části naočkuje Tris pufrem s obsahem 106 KTJ/ ml studovaného mikroorganismu. Médium ve víku Petriho misky slouží jako těsnění a brání adsorpci silice na plastové víko Petriho misky. Poté bylo do sterilních

prázdných papírových disků přidáno osm dávek silice ve snižující se koncentraci (32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25) a umístěno na médium ve víku každé Petriho misky. Petriho misky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 18 až 24 hodin.

U třinácti z 27 silic došlo k potvrzení antimikrobiální aktivity v plynné fázi. Byly účinné alespoň proti jednomu bakteriálnímu kmenu v rozmezí testovaných koncentrací (Nedorostová a kol., 2009)

## **3.5 Vybrané rostliny**

### **3.5.1 Andělíka lékařská (*Archangelica officinalis Hoffm.*)**

#### **Botanická charakteristika**

Andělíka lékařská patří do čeledi Apiaceae. Je to dvouletá až víceletá rostlina s mohutným větveným kořenem, tlustým řepovitým oddenkem a přímou, rýhovanou, načervenalou, nahoře větvenou lodyhou. Dorůstá do výšky až 2 metry. Přízemní listy jsou velké, řapíkaté, dvakrát až třikrát zpeřené. Lodyžní listy jsou střídavé, pochvami přisedlé k lodyze. Květy jsou oboupohlavné, pětičetné, zelenobílé. Bylina kvete od července do srpna. Plody jsou dvounažky s křídlatými žebry. Dozrávají od srpna do září. Celá rostlina je výrazně aromatická (Žáček, 1981).

#### **Výskyt**

Andělíka roste divoce v Grónsku, na Islandu a ve Skandinávii, odkud pochází. Do jižnějších krajů se dostala ve 14. století a dnes roste divoce na vlhčích místech, na okraji cest a potoků střední a severní Evropy a v Asii (Žáček, 1981).

#### **Sklizeň**

Oddenky a kořeny se sklízí na podzim nebo na jaře. Sklizený materiál se očistí, vypere a silnější kořeny se rozpůlí. Suší se v sušárně při teplotě kolem 35 °C. Nať a listy se získávají pouze z mladých částí rostliny. Nažky se sklízí ze dvou až tříletých rostlin. Zralé okolíky se nechávají uschnout a nažky se poté oddělí. Drogu se uchovává v uzavíratelných obalech (Opletal a Volák, 1999).

#### **Využití**

Andělíka lékařská se používána jako zelenina, koření i lék. Andělikou se aromatizuje šňupací tabák, dále se používá do výrobků v parfumerii a lékárnictví. Jedlou částí jsou kořeny, oddenky, mladé listy, lodyhy i nažky. Mladé výhonky slouží jako surovina k aromatizaci salátů, polévek, omáček a zeleninových pokrmů. Květní lodyhy rozkrájené na kousky jsou kandovány a využívány v cukrářství ke zdobení moučnicků. Mletý kořen je přidáván do cukroví. Dále je používána při výrobě hořkých likérů a jako součást kořenících směsí při výrobě vermutů (Opletal a Volák, 1999).

### **Obsahové látky**

Andělíka lékařská je bohatá na obsah hořčin, silic, kyseliny, flavonoidy a pryskyřice (Peter, 2004).

### **Biologická aktivita**

Andělíku lze využít jako účinnou součást čajových směsí upravujících poruchy zažívání, trávení, nechutenství, a to zejména na podkladě nedostatečné tvorby žaludečních šťáv (Jaroš, 1992). Dále tlumí menstruační bolesti, reguluje činnost žláz s vnitřní sekrecí, potlačuje migrény a závratě, zpevňuje cévní stěny, stimuluje činnost srdce a chrání sliznice dýchacích cest. V trávicím traktu působí spasmolyticky a tlumí nadýmání (Janča a Zentrlich, 1994). Kořeny andělíky se používají též jako součást čajových směsí ke zklidnění u stavů podráždění, mírné úzkosti, lehké nespavosti (Peter, 2004).



**Obrázek 6** Andělíka lékařská (*Archangelica officinalis*) ([www.vitalia.cz](http://www.vitalia.cz))

### **3.5.2 Srdečník obecný (*Leonurus cardiaca*)**

#### **Botanická charakteristika**

Srdečník obecný je prastará léčivá bylina, vzhledem připomíná šedo zelenou kopřivu. Bylina je 50 – 150 cm vysoká. Čepel přízemních a dolních lodyžních listů je okrouhlá, dlanitoklaná, horní listy vejčité kopinaté, trojlaločné až trojklané, pravidelně hrubě zubaté (Patočka, 2015).

### **Výskyt**

Roste na rumišťích a různých skládkách odpadu, v příkopech podél cest, kolem zdí i na starých zdech a mezích. Srdečník roste prakticky v celé Evropě vyjma jejích nejsevernějších oblastí, na východě až po východní Sibiř a Himaláji. Také v ČR je dosti hojný, zejména v teplejších oblastech (Patočka, 2015).

### **Sklizení**

Sbírá se kvetoucí nať zvaná Herba Leonuri, která se suší co možná nejrychleji za teplot do 45 °C (Patočka, 2015).

### **Využití**

Srdečník lze využít jako okrasnou rostlinu. Kvetou celá kvetoucí nať, u větších rostlin jen její horní část. Srdečník je stará léčivá rostlina, původem ze Sibiře. Tam byla založena jeho tradice jako léku na choroby srdce, která mu také dala jméno (Patočka, 2015).

### **Obsahové látky**

V nadzemní části srdečníku jsou látky, které patří do skupiny terpenů: monoterpeny (iridoidy), diterpeny (clerodanové, furanolabdanové a labdanové typy), triterpeny (ursolová a oleanolová kyselina), sloučeniny obsahující dusík (leonurin, stachydrin), fenylypropanoidy (lavandulifoliosid), i flavonoidy, těkavé oleje, fenolové kyseliny, steroly a taniny, bufalikolidové glykosisy, alkaloidy stachydrin a leocardin, kyselý saponin, antokyany, organické kyseliny, křemičitany a stopy sílice (Morteza – Semnani, 2008).

### **Biologická aktivita**

Srdečník tlumí srdeční arytmie zejména nervového původu, celkově zklidňuje srdeční činnost, mírně snižuje krevní tlak a působí sedativně. Je proto užíván při nespavosti, úzkosti nebo nadměrné vznětlivosti. Uplatnění nachází také v gynekologii, neboť snižuje klimakterické potíže a může napomoci k vyvolání opožděné nebo vynechané menstruace. Užívá se při zánětech srdeční svaloviny, při skleróze věnčitých tepen a při bolestech hlavy. Osvědčil se



zejména u srdečních neuróz – píchání u srdce, srdeční slabost, vysoký tlak, úzkost a bušení srdce. Dále bylina vykazuje proti alergické, analgetické, proti epileptické, proti křečové, proti nádorové, antivirové, stahující, sedativní účinky, také vyvolává pocení, podporuje vykašlávání, může se použít jako projímadlo, diuretikum, při vnějším užití na hojení ran (Patočka, 2015).

Přítomnosti taninů působící na sliznice, dále může být rostlina použita i při průjmeh. Za antioxidační účinky byliny jsou zodpovědné polyfenolické sloučeniny, hlavně flavonoidy a deriváty kyseliny hydroxyskořicové. Ochranný účinek leonurinu je hlavně v důsledku snížení produkce reaktivního kyslíkového radikálu, na jehož základně je zachována správná funkce mitochondrií, a v důsledku toho probíhá inhibice apoptózy buněk (Morteza – Semnani a kol., 2008).



Obrázek 7 Srdečník obecný (*Leonurus cardiaca*) ([www.kvetenacr.cz](http://www.kvetenacr.cz))

### 3.5.3 Popenec obecný (*Glechoma hederacea*)

#### Botanická charakteristika

Popenec obecný patřící do čeledi Lamiaceae, běžně známý jako břechťan. Je to vytrvalá, aromatická, stálezelená, plazivá bylina. Květy *G. hederacea* jsou z trychtýřovitého tvaru. Mohou být modré, fialové i růžové (Judzentiene a kol., 2015).

## **Výskyt**

Rostlina je přirozeně široce rozšířena ve většině Evropy, na Sibíři a v západní Asii (Judzentiene a kol., 2015).

## **Sklizeň**

Sklízí se mladé listy, které se konzumují čerstvé nebo se suší (Judzentiene a kol., 2015).

## **Využití**

Popenec se hojně používá v kulinářství. Mladé listy mají specifickou aromatickou a hořkou chuť a hodí se k přípravě polévek, salátů, při výrobě sýrů, jako koření v dušených a jiných pokrmech. Bylinný čaj z čerstvých nebo sušených listů je bohatým zdrojem kyseliny askorbové. Popenec se také používal jako dochucovadlo a konzervační přísada při výrobě piva. Dále je bylina známá pro své lékařské účinky (Judzentiene a kol., 2015).

## **Obsahové látky**

Popenec obecný obsahuje hořčinu glechomin, silice, třísloviny, pryskyřice, cholin, saponiny, organické kyseliny, vitamín C a minerální látky, zejména draselné (Judzentiene a kol., 2015).

## **Biologická aktivita**

Rostlina se používá jako expentorancium, diuretikum, tonikum, stimulant chuti k jídlu a má také antihelmintické vlastnosti. Výtažky z rostliny jsou užitečné při léčbě bolesti hlavy, zánětu sliznic, u příznaků chřipky, nachlazení, při problémy s ledvinami, játry, onemocnění žlučníku, močových cest a trávení. Popenec se uplatňuje i pro přípravu homeopatických prostředků (Judzentiene a kol., 2015).



Obrázek 8 Popenec obecný (*Glechoma hederacea*)([www.biolib.cz](http://www.biolib.cz))

### 3.5.4 Řepík lékařský (*Agrimonia eupatoria*)

#### Botanická charakteristika

Řepík lékařský je vytrvalá bylina z čeledi růžovitých (Rosaceae), roste do výšky 15 - 150 cm. Má jednoduchou nebo chudě větvenou lodyhu, se třemi typy chlupů, listy přetřhaně lichozpeřené, na líci zelené, na rubu šedoplstnaté, v dolní části lodyhy růžicovitě sblížené. Květenstvím je hrozen s asi padesáti květy, korunní lístky jsou obejčité, na vrcholu zaokrouhlené, žluté. Plodem je češule s přímo až rovnovážně odstálými háčky (Kovář, 2007).

#### Výskyt

Rostlina roste na suchých loukách a na okraji lesů, také na okrajích cest, sadů, vinic. Kvete od července do září. Areál sahá od Kanárských ostrovů přes severní Afriku, Evropu až na západní Sibiř. Byl zavlečen i na Azorské ostrovy, do Severní Ameriky, jižní Afriky a na Nový Zéland. U nás se vyskytuje roztroušeně až hojně v teplejších oblastech, v chladnějších územích jen vzácně, v horách chybí (Kovář, 2007).

#### Sklizeň

Pro léčivé účely je sbírána nať. Protože řepík špatně klíčí, nevytrhávají se celé rostliny, ale seřezávají se výše nad zemí, aby rostlina mohla znovu obrážit (Kovář, 2007).

### **Využití**

Řepík lékařský je dobře známou léčivou rostlinou. Přidává se i do relaxačních koupelí. Dříve se používal i jako barvířská rostlina. Stejně účinky jako řepík lékařský má i jeho blízký příbuzný řepík vonný (*Agrimonia procera*), který je však mnohem vzácnější. Oba druhy lze snadno zaměnit, ale z terapeutického použití je tato záměna málo významná (Arndt, 2008).

### **Obsahové látky**

Rostlina obsahuje mnoho účinných látek, které mohou pozitivně ovlivňovat organismus. Mezi nejvýznamnější látky v něm obsažené patří třísloviny, flavonoidy a hořčiny. Dále obsahuje v menším množství kyselinu křemičitou, silice, vitamin C a dále silicinamid kyseliny nikotinové, železo, cholin a malé množství saponinů (Arndt, 2008).

### **Biologická aktivita**

Řepík lékařský má mírně svíravé a močopudné účinky. Dále jsou uváděny příznivé účinky proti některým bakteriím. Třísloviny spolu s flavonoidy a silicí mají adstringentní a protizánětlivé účinky (Arndt, 2008).

Používá se vnitřně i zevně ve formě odvaru, ale dává se například i do mastí. Připravuje se i ve formě bylinného sirupu. Vnitřně se dále užívá při lehkých nespecifických průjemových onemocněních a zažívacích obtížích doprovázených nechutenstvím. Zevně se ještě používá k obkladům a koupelím při lehkých povrchových zánětech kůže, drobných poraněních a hemoroidech (Arndt, 2008).



**Obrázek 9** Řepík lékařský (*Agrimonia eupatoria*) ([www.celostnimediceina.cz](http://www.celostnimediceina.cz))

### **3.5.5 Kopretina Řimbaba (*Tanacetum parthenium*)**

#### **Botanická charakteristika**

Řimbaba je statná chlupatá trvalka dorůstající až 90 cm. Lodyha je přímá, větvená. Listy zpeřené nebo peřenolaločné, žlutozelené barvy (Johnson a kol., 1985).

#### **Výskyt**

Domovinou Řimbaby je jihovýchodní Evropa. Nyní je rozšířená v celé Evropě). U nás ji najdeme v teplejších oblastech (Johnson a kol., 1985).

#### **Sklizeň**

Sbírá se kvetoucí nať na počátku květu. Ta se suší ve stínu. Listy se užívají syrové a sbírají se po celé vegetační období (Johnson a kol., 1985).

#### **Využití**

Kopretina Řimbaba je běžně používanou léčivou bylinkou. Využívá se při léčbě onemocnění, jako jsou migréna a artritida. V jednom průzkumu se u více než 70 % z 270 pacientů trpících

migrénou, kteří každý den po dlouhou dobu konzumovali listy Řimbaby, snížila frekvence migrén nebo se dosáhlo alespoň menší bolesti a rychlejšího průběhu. Kopretina řimbaba je též častou okrasnou květinou zahrádek (Johnson a kol., 1985).

### **Obsahové látky**

Kopretina řimbaba obsahuje třísloviny, hořčiny, slizy, silice (Johnson a kol., 1985).

### **Biologická aktivita**

Rostlina se používá jako analgetikum při léčbě horečky, menstruační bolesti, uvolňuje křeče svalového i nervového původu. Zlepšuje látkovou výměnu. Dále se užívá při zánětu tlustého střeva. V neposlední řadě se užívá po porodu k vypuzení placenty, vyčištění a regeneraci dělohy. Řimbaba má vnější i vnitřní protirevmatické působení. Dále se užívá proti střevním parazitům. Zevně se používá při zánětu ucha (Johnson a kol., 1985).



**Obrázek 10** Kopretina Řimbaba (*Tanacetum parthenium*) (www.magazinzahrada.cz)

### **3.5.6 Lžičník lékařský (*Cochlearia officinalis*)**

#### **Botanická charakteristika**

Lžičník lékařský je dvouletá, celoročně zelená rostlina z čeledi brukvovité, vysoká 20-40 cm. Lodyhu má holou s vystouplými, rozvětvenými listy. Přízemní listy v růžici jsou kulaté, na bázi uťaté nebo slabě srdčité, vejčité, více nebo méně řídce zubaté, lesklé. Květní hrozen je

hustý, květy má velké, čistě bílé, kalich 2 mm dlouhý, prašníky světle žluté, plodný hrozen se výrazně prodlužuje. Stopky plodů jsou dlouhé (Dítě, 2014).

### **Výskyt**

Těžiště výskytu se nachází v západní Evropě: na Britských ostrovech, v Holandsku, Belgii, Dánsku, na sever do Skandinávie kromě krajního severu (zde roste už *Cochlearia arctica*), také na severu evropské části Ruska, na jih ve Francii a alpské oblasti. Ve Španělsku a Itálii je považován za naturalizovaný, nepůvodní druh. Vyskytuje se na mokvavých skalách, prameniště s proudící vodou, na březích potoků a vápnatých slatinách (Dítě, 2014).

### **Sklizení**

Kvete od května do července. Sbírají se především mladé listy. Jako zelenina se používají také mladé klíčící rostliny (Dítě, 2014).

### **Využití**

Lžičník je značně aromatická rostlina. Má pikantní chuť a uplatňuje se tak v kuchyni jako koření nebo surovina do salátů. Pro léčebné účely se začal používat ve 12. století, v Evropě se stal známý jako takzvaný švýcarský čaj. V minulosti byla používána námořníky k boji proti kurdějím, nemoci způsobené nedostatkem vitamínu C (Vos a kol., 2013).

### **Obsahové látky**

Rostlina obsahuje značné množství kyseliny askorbové a glukosinoláty (de Vos a kol., 2013). Dále obsahuje minerální látky, glykosidicky vázanou silici s obsahem síry, glykokochlearin, enzymy, hořčiny a třísloviny (Skružná, 2000).

### **Biologická aktivita**

Lžičník se používá jako diuretikum, derivans a stomachikum (Skružná, 2000).



**Obrázek 11** Lžičník lékařský (*Cochlearia officinalis*)([www.polgara.cz](http://www.polgara.cz))

### 3.6 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie patří do skupiny metod, jejímž principem je dělení látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – stacionární a mobilní. U plynové chromatografie je mobilní fází nosný plyn. Pro nutnost přeměny analytů v plyny je nutné, aby analyzované látky byly tepelně stálé, měly dostatečný tlak syté páry a jejich relativní molekulová hmotnost byla menší než 1000 Da. Touto metodou nelze separovat makromolekuly, organické a anorganické soli (Klouda, 2003).

Vzorek se dávkuje do proudu plynu, který jej dále unáší kolonou. Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev obsahující vodík, dusík, helium či argon. Plyn je volen podle schopnosti unášet vzorek a zároveň musí být plyn ke vzorku inertní. Čistící zařízení zachycuje vlhkost a nečistoty v nosném plynu. Odstraňuje zejména stopy reaktivního kyslíku, který nevratně poškozuje stacionární fázi v koloně. Stálý nebo programově se měnící průtok nosného plynu zajišťuje regulační systém. Dávkování vzorku probíhá injekční stříkačkou přes pryžové septum. Technika zajišťuje odpaření vzorku v co nejkratším čase. Známe různé metody nástřikování. Nástřik do kolony je základní metodou u náplňových kolon. Dávkuje se zde 1 - 10 µl vzorku a horní část kolony se vyhřívá na teplotu 10 – 30 °C. Vzorek se rychle nastříkne, teplota kolony se zvýší a tak dojde k odpaření vzorku. Další způsoby nástřiku



split - s děličem toku nebo splitless - bez děliče toku. V případě, že je využito splitu dojde k nástřiku koncentrovaného vzorku o objemu 0,1  $\mu$ l - 2  $\mu$ l, kdy se pomocí děliče do kolony dostane pouze definované množství nástřikovaného vzorku. Druhý způsob nástřiku splitless je využívám pro nástřik vzorků, které jsou méně koncentrované, bývají v objemu 0,5  $\mu$ l - 5  $\mu$ l a je u nich nutná stopová analýza. Vzorek je přeměněn na plyn a je unášen kolonou, kde dojde k separaci látek na základě jejich schopnosti ulpívat ve stacionární fázi. Na konci kolony se nachází detektor, který ze signálu detektoru na základě času a intenzity vyhodnotí druh a kvantitativní zastoupení látek. Vyhodnocovací zařízení zpracuje signál z detektoru a zakreslí jej jako chromatografickou křivku – chromatogram. Podstatnou součástí zařízení je termostat, který zajišťuje dostatečnou teplotu pro udržení vzorku v plynném stavu. Je-li ve vzorku obsažené široké spektrum látek s různými teplotami varu, je možné termostat nastavit, aby upravoval teplotu pro analýzu. Termostat běžně pracuje s teplotami v rozmezí 50 °C až 300 °C (Klouda, 2003).

## **3.7 Testované mikroorganismy**

### **3.7.1 Grampozitivní bakterie**

G+ bakterie se nejčastěji vyskytují jako tyčky nebo koky. Rozmnožují se příčným dělením. Tvoří termorezistentní endospory. Buněčná stěna Grampozitivních (G+) bakterií je silná, přibližně 20 nm, a je tvořena silnou vrstvou peptidoglykanu, kterou pronikají lineární řetězce teichoových kyselin spojené s cytoplazmatickou membránou. Teichoové kyseliny jsou hlavním povrchovým antigenem (G+) bakterií. Buněčná stěna těchto bakterií neobsahuje lipidy ani bílkoviny. Výjimkou jsou jen mykobakterie a korynebakterie, jejichž buněčná stěna může obsahovat mnoho lipidů a vosků. G+ bakterie se Gramovým barvením barví do modra až fialova (Kaprálek, 1999).

Hlavními zástupci G+ bakterií jsou stafylokoky, streptokoky, enterokoky, rod *Clostridium*, *Micrococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Erysipelothrix*, *Rhodococcus* a *Arcanobacterium* (Buňková, Doležalová, 2007).

V následujícím textu jsou blíže charakterizovány (G+) bakterie, které byly použity k testování antimikrobiální aktivity silic.

#### **3.7.1.1 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* je Grampozitivní, nesporulující bakterie. Tvoří nepohyblivé koky o průměru 1 $\mu$ m, v nepravidelných shlucích. Lze však spatřit i dvojice nebo zcela krátké řetízky.

Kolonie jsou okrouhlé, hladké, lesklé o průměru 3 - 4mm, karotenovými pigmenty slabě oranžově zbarvené, řidčeji žluté, někdy i bílé nebo šedé. Stafylokoky jsou fakultativně anaerobní, nenáročné, osmoticky resistantní. Rostou i na půdě s obsahem 7,5 % NaCl. *Staphylococcus aureus* produkuje řadu enzymů a toxinů, jež se uplatňují v patogenezi stafylokokových onemocnění (Votava, 2003).

Často kolonizuje lidskou kůži a je přítomný v nosní dutině cca 25 - 30 % dospělých. V tomto stavu může *S. aureus* existovat bez narušení hostitele a vzniku symptomů. Jakmile je však pacientova kůže poškozena zraněním nebo chirurgickým zákrokem či pokud je oslaben jeho imunitní systém, může kolonizující *Staphylococcus aureus* způsobit infekci. *Staphylococcus aureus* často způsobuje lokalizované kožní infekce, jako jsou folikulitida, furunkly nebo impetigo. Může také způsobovat abscesy a šířit se do kostí (osteomyelitis), plic (stafylokoková pneumonie), krve (bakteriémie nebo sepse), srdce (endokarditida, která může poškodit srdeční chlopně) a do dalších orgánů (Horáček, 2000).

### 3.7.1.2 *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* je Grampozitivní, sporulující, pohyblivá, silná, neopouzdrěná, rovná tyčka velká 2-5 mm x 1,2 mm tvořící vlákna. Roste na běžných kultivačních médiích, na krevním agaru vyrůstá ve velkých, drsných koloniích s nepravidelnými okraji, obklopených zónou  $\beta$ -hemolýzy. Většina členů tohoto rodu jsou saprofytické mikroorganismy, vyskytující se převážně v půdě, ve vodě, ve vzduchu a na rostlinách. Některé jsou patogeny hmyzu. *Bacillus cereus* je přirozeně rezistentní k penicilinům díky produkci  $\beta$ -laktamázy (Helgason a kol., 2000).

Mezi faktory virulence patří produkce celé řady toxinů a enzymů. Jedná se zejména o emetický toxin, diarhogenní enterotoxiny, hemolysiny (typ I, II a III), 2 typy fosfolipázy C, sfingomyelinázu a enzymy s proteolytickou, lipolytickou a amylolytickou aktivitou, které se uplatňují při kažení potravin (Granum, Lund, 1997).

Konzumace potravin kontaminovaných bakteriemi *Bacillus cereus* může vyústit ve dvě různé formy alimentárního onemocnění – emetický a diarhogenní syndrom (Granum, Lund, 1997).

## 3.8 Gramnegativní bakterie

Stěna Gramnegativních (G-) bakterií je sice tenčí než stěna G+ bakterií (asi 10 nm), ale na druhou stranu je podstatně složitější. Je tvořena tenkou vrstvou peptidoglykanu, nad níž je membrána se strukturou podobnou jiným biologickým membránám. Označujeme ji jako

vnější membránu a skládá se z dvojité vrstvy fosfolipidů a bílkovin. V důsledku se tyto bakterie barví při Gramově barvení růžově (Beveridge, 1990).

G- bakterie tvoří spory a množí se příčným dělením. Některé druhy tvoří pouzdra či pochvy. Pohybují se pomocí bičíků nebo plazivě po substrátu. Mnozí zástupci G- bakterií jsou patogeny, obecně se považují za nebezpečnější než zástupci skupiny G+ bakterií. Pravděpodobně je to způsobeno obsahem některých složek jejich buněčné stěny, zejména pak v lipopolysacharidové vrstvě (Kaprálek, 1999).

Mezi nejdůležitější skupiny gramnegativních bakterií patří proteobakterie. Sem patří rody *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Legionella*. Další skupinou jsou sinice a spirochéty (Buňková, Doležalová, 2007).

V následujícím textu jsou blíže charakterizovány (G-) bakterie, které byly použity k testování antimikrobiální aktivity silic.

### **3.8.1 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* je Gramnegativní, pohyblivá, aerobní tyčka o průměru 1mm x 3mm. Má polární bičíky. Test na oxidázu a katalázu má pozitivní. Povrch může být pokryt hlenovou substancí. Bakterie je extrémně adaptabilní nenáročná bakterie, její teplotní rozmezí se pohybuje mezi 10 °C – 42 °C s optimem 35 °C. Využívá nitrát jako terminální akceptor elektronů. Bakterie roste na běžných kultivačních médiích. Na krevním agaru mnoho izolátů tvoří zónu pravé β-hemolýzy jako výsledek produkce 2 hemolysinů.

Jako potenciální patogen vyvolává řadu onemocnění, jako je zánět močových cest, středního ucha či hnisání popálenin (Harmsen a kol., 2010).

*Pseudomonas aeruginosa* je podmíněně patogenní. Odhaduje se, že vyvolává 10 % nosokomiálních infekcí. Dále způsobuje infekce ran, močové infekce, korneální infekce, pneumonie a sepse. U nozokomiálních kmenů dochází k rychlému rozvoji rezistence (Harmsen a kol., 2010).

### **3.8.2 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* je Gramnegativní, pohyblivá, nepigmentovaná, někdy opouzdřená tyčka, veliká 2 x 0,7 mm. Má bičíky a fimbrie. V moči lze často spatřit její vláknité formy. Kolonie o průměru 3 - 4 mm jsou okrouhlé, hladké. Kmeny, které produkují polysacharidové pouzdro, tvoří mukózní kolonie. Na médiu s přísadkou laktózy roste v sytě červených koloniích s

kovovým leskem, je tedy laktóza fermentující. Některé kmeny jsou  $\beta$ -hemolytické (Belánger a kol., 2011).

*E. coli* patří do čeledi *Enterobacteriaceae* a na základě antigenních vlastností ji lze rozdělit do více než 240 sérovarů. Podle schopnosti adherence, produkce toxinů a dalších faktorů virulence se vyčleňují a dále dělí patogenní *E. coli* do několika skupin. Biotypy patogenních *E. coli* se od sebe liší jak řádově velikostí infekční dávky od  $10^1$  až po  $10^8$ , tak průběhem onemocnění i možnými komplikacemi.

*Escherichia coli* je nejčastějším původcem primárních močových infekcí. Osidluje sliznice poškozené zánětem nebo nádorovým onemocněním. Některé kmeny způsobují průjmová onemocnění, buďto zánětlivé, nebo nezápětlivé povahy (Belánger a kol., 2011).

### 3.9 Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotní mikroorganismy, které patří mezi houby. V přírodě žijí jako saprofyti i jako paraziti. Rozmnožují se převážně pučením. Některé kvasinky tvoří pravé mycelium nebo pseudomycelium. Kvasinkové buňky jsou 3 - 4 krát větší než buňky bakteriální. Tvar buněk je dán především rodovou příslušností, ale je také ovlivňován kultivačními podmínkami. Ke změnám tvaru a velikosti buněk dochází během různých fází růstu. Za základní tvar kvasinek se považuje rotační elipsoid, který se zpravidla mění protažením do délky, zejména při omezeném dělení nebo v podmínkách vedoucích k degeneraci buněk (Janderová, Bendová, 1999).

Taxonomicky jsou kvasinky zařazovány mezi houby. Proti eukaryotním buňkám se liší především rozmnožováním. K pohlavnímu rozmnožování dochází pouze za určitých výjimečných podmínek, většinou se kvasinky množí vegetativně (Janderová, Bendová, 1999).

Kvasinky jsou hojně využívány v potravinářství a biotechnologiích. Používají se při výrobě vína, piva nebo chleba. Využívá se jejich schopnosti kvašení. Jsou ale mezi nimi i původci nemocí, jako je např. *Candida albicans* (Janderová, Bendová, 1999).

V následujícím textu je blíže charakterizována *Candida albicans*, která byla použita k testování antimikrobiální aktivity silic.

### 3.9.1 *Candida albicans*

*Candida albicans* je aerobní, růstově nenáročná, dimorfní houba. Na Sabouraudově agaru vyrůstá do 48 hodin v krémovitých smetanově bílých, hladkých, vypouklých koloniích charakteristické vůně. Identifikace je založená na fermentativních testech - zymogram, nebo na asimilačních testech - auxanogram. V Gramově barvení se barví pozitivně (Janderová, Bendová, 1999).

Kvasinkovité formy se množí pučením. Jemná vlákna vyrůstající z blastokonidií se nazývají zárodečné klíčky. Schopnost tvorby zárodečných klíčků se nazývá germinace. Při růstu v nepříznivých podmínkách tvoří *Candida albicans* spory (Janderová, Bendová, 1999).

*Candida albicans* je podmíněně patogenní kvasinka. Za normálních podmínek ji nacházíme v zažívacím traktu, na sliznicích, na kůži. U lidí s oslabenou imunitou jako je např. diabetes mellitus, malignity, léčba kortikoidy, antibiotiky nebo cytostatiky, vyvolává onemocnění zvané kandidóza. Mikroorganismus může cestovat krevním oběhem do mnoha tělních orgánů. Příznaky kvasinkové nákazy u dospělých jsou často natolik všeobecné, že je lékař bez dalších diagnostických opatření jen velmi těžko může přičíst kvasinkové nákaze (Tong, Tang, 2017).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Použité přístroje a pomůcky

- Digitální váhy, Kern
- Magnetické míchadlo s ohřevem, Ika
- Magnetické míchadlo, Variomag
- Vortex, Chromservis
- Biologický termostat, MK servis s.r.o.
- Flow box, KRD
- Lednice, Bösh
- pH metr,
- Autokláv, Chironax estra s.r.o.
- Automatické pipety, Eppendorf
- Denzitometr, Merci
- Kahan, Fuego
- Sterilní vaničky na multikanálové pipety, Costar
- Laboratorní sklo - kádinky, Erlenmayerovy baňky, varné baňky, penicilínky, varné kamínky, odměrný válec, vialky
- Clevengerova aparatura
- Topné hnízdo, LTHS
- Plastové pomůcky – lžičky, špičky na pipety, mikrotitrační destičky, víčka na mikrotitrační destičky, zkumavky, mikrozukumavky, petriho misky, klávovací pytle, gumové rukavice

- Stojánky
- Injekční stříkačky a jehly
- Kultivační média – Mueller-Hinton Broth, Oxoid, RPMI 1640, Appendix A
- N - hexan, Merc
- Ethanol 96 %, HCl, NaCl, KCl, Trisbase
- Tween, Sigma
- Demineralizovaná voda, Merci

## 4.2 Testovaný materiál

Pro testování antimikrobiální aktivity byly použity silice z těchto rostlin:

- Aňďelika lékařská (*Archangelica officinalis Hoffm.*), plod i kořen
- Srdečník obecný (*Leonurus cardiaca*), nať
- Popenec obecný (*Glechoma hederacea*), nať
- Řepík lékařský (*Agrimonia eupatoria*), nať
- Kopretina Řimbaba (*Tanacetum parthenium*), nať
- Lžičník lékařský (*Cochlearia officinalis*), nať

Rostliny byly získány od firmy F – DENTAL Hodonín s.r.o.

## 4.3 Příprava kultivačních médií

### 4.3.1 Mueller-Hintonův Broth agar

Na digitálních váhách bylo naváženo 10,5 g směsi a doplněno 500 ml demineralizované vody. Obsah kádinky byl řádně promíchán na magnetickém míchadle a následně zahřán na magnetickém míchadle se záhřevem. Rozmíchané médium bylo rozlito do Erlenmayerových

baněk a penicilínek. Následovala sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po vychladnutí bylo médium skladováno v lednici.

#### **4.3.2 Mueller-Hintonův agar pufrovaný**

Při přípravě pufrovaného Mueller-Hinton média byl nejprve připraven pufr. Na přípravu pufru bylo použito 4g NaCl, 0,1g KCl, 3,05 g Trisbase. Navážená směs byla doplněna 500 ml demineralizované vody a pomocí HCl se upravilo pH na pH metru na 7,6. Do takto připravené směsi bylo přidáno 10,5 g směsi Mueller-Hinton Broth. Následovalo řádné promíchání a zahřátí na magnetickém míchadle se záhřevem. Po rozlití média do Erlenmayerových baněk a penicilínek proběhla sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po vychladnutí bylo médium skladováno v lednici.

#### **4.3.3 RPMI médium**

Bylo rozpuštěno 10,4 g RPMI v 900 ml demineralizované vody. Do této směsi bylo přidáno 34,53 g MOPS (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid) a mícháno do rozpuštění. Během míchání bylo pomocí 1M NaOH upraveno pH na 7 (25 °C). Objem byl doplněn do jednoho litru. Po rozlití média do Erlenmayerových baněk a penicilínek proběhla sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po vychladnutí bylo médium skladováno v lednici.

### **4.4 Modelové mikroorganismy**

Pro testování antimikrobiální aktivity byly použity grampozitivní (G+), gramnegativní (G-) bakterie a jedna kvasinka. Jedná se o kmeny referenční z American Type Culture Collection.

G+ bakterie:

- *Staphylococcus aureus* – ATCC 29213
- *Bacillus cereus* – ATCC 11778

G- bakterie:

- *Escherichia coli* – ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC 27853

Kvasinka:

- *Candida albicans* – ATCC 10231



Uvedené bakteriální kmeny byly uchovávány v Mueller-Hintonově médiu v chladničkové teplotě.

#### **4.5 Metoda extrakce silic**

Suchý rostlinný materiál byl odvážen do 2l varné baňky se zábrusem a v poměru 1:10 doplněn demineralizovanou vodou. Ke směsi byly přidány varné kamínky. Varná baňka byla umístěna do topného hnízda s Clevengerovou aparaturou, kde byla demineralizovaná voda a chladič byl připojen na přívod a odvod vody. Následně proběhla destilace. Standardní čas destilace byl 3 hodiny. Po proběhnutí destilace byl změřen objem silice v aparatuře a poté byla silice vypuštěna do skleněné vialky.

U silic, kterých bylo velmi malé množství, byl pro vypuštění z aparatury použit hexan, který se se silicemi mísí. Hexan byl pipetován přímo do aparatury v množství do 1 ml a následně byla rozpuštěná silice vypuštěna do skleněné vialky.

#### **4.6 Příprava zásobních vzorků silic**

Po získání silic byly připraveny zásobní roztoky silic, které byly pak dále využívány k testování. V případě silic, u kterých byl použit pro vypuštění z aparatury hexan, se hexan nechal odpařit ve Flow boxu. Postupné odpařování bylo kontrolováno vážením, kdy byl sledován váhový úbytek. Tento postup se týkal vzorků Anděliky kořen, Popence obecného, Srdečníku obecného a Řepíku lékařského.

Po odpaření hexanu ze vzorků bylo příslušné množství silice rozpuštěno směsí ethanol + Tween v poměru 2:1, aby bylo dosaženo 100krát vyšší koncentrace než bylo použito k testování.

Před každým novým pokusem byly ze zásobních vzorků silic připraveny vzorky k pipetování do mikrotitrační destičky o koncentraci 1024  $\mu\text{l}/\text{ml}$ , s koncentrací Tweenu 1% a ethanolu 0,5%. Pro každou silici byly připraveny dva vzorky. Jeden rozpuštěný v Mueller-Hintonově médiu pro bakterie a druhý v RPMI médiu pro *Candida albicans*. U bakterií bylo odpipetováno v dubletu 19,5  $\mu\text{l}$  silice a 1280,5  $\mu\text{l}$  Mueller-Hintona média. Pro *Candida albicans* bylo odpipetováno 7  $\mu\text{l}$  silice a 693  $\mu\text{l}$  RPMI média.

## 4.7 Kontrolní antibiotika

Pro každý test bylo připraveno kontrolní antibiotikum. V případě bakterií byl použit Tetracyklin, který má čistotu 88 % a byl rozpouštěn v 96 % ethanolu. Pro testování kvasinky *Candida albicans* bylo použito antibiotikum Tioconazole, který dosahuje čistoty 96,5 % a jako rozpouštědlo byla použita demineralizovaná voda. Množství bylo dáno tak, aby počáteční koncentrace v 1. jamce destičky pro antibiotikum Tetracycline u *Pseudomonas aeruginosa* byla 64 µl/ml, u *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* 16 µl/ml a u *Bacillus cereus* 2 µl/ml. Pro antibiotikum Tioconazole u *Candida albicans* byla počáteční koncentrace 32 µl/ml.

Z důvodů odchylek vah a minimální navážky byla navážena 100x vyšší hmotnost antibiotika a rozpuštěná v daném rozpouštědle. Roztoky byly promíchány na Vortexu. V případě antibiotika Tioconazole bylo z tohoto roztoku odpipetováno 10 µl a rozpustilo v 990 µl RPMI média. Takto byl získán roztok antibiotika o koncentraci 32 µl/ml. U antibiotika Tetracycline bylo pipetováno 14 µl a bylo rozpuštěno v 1386 µl pufrovaného Mueller-Hintonova média. Vznikl roztok antibiotika o koncentraci 64 µl/ml. Z tohoto roztoku bylo pipetováno 325 µl a zředěno 975 µl pufrovaného Mueller-Hintonova média. Vznikl roztok o koncentraci 16 µl/ml. Pro roztok o koncentraci 2 µl/ml bylo pipetováno z roztoku o koncentraci 64 µl/ml 30 µl a zředěno 930 µl pufrovaného Mueller-Hintonova média. Hotové roztoky byly řádně promíchány na Vortexu.

## 4.8 Příprava inokula

Inokulum bylo připravováno 6 – 8 hodin před samotným zaočkováním mikrotitrační destičky. Do 15 ml zkumavky bylo injekční stříkačkou sterilně odeberáno přibližně 10 ml Mueller-Hintonova média a bylo zaočkováno příslušným modelovým mikroorganismem. Takto připravená inokula byla uchována v termostatu při 37 °C.

## 4.9 Mikrotitrační destička – antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita silic byla stanovena pomocí mikrodiluční metody. Použity byly 96 jamkové mikrotitrační destičky. Všechny vzorky byly testovány v tripletu.

Do řad 1, 3 - 12 mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 µl média. V případě bakterií bylo použito pufrované Mueller-Hintonovo médium a u *Candida albicans* RPMI médium. Ve druhé řadě, jamky A – G byly pipetovány příslušné silice v objemu 200 µl. Ve druhé řadě, jamka H bylo pipetováno antibiotikum v objemu 200 µl pro daný mikroorganismus.

Pomocí multikanálové pipety bylo provedeno ředění dvojkovou řadou s tím, že 12 řada zůstala čistá – kontrola sterility. První řada byla určena pro pozitivní kontrolu.

Pro naočkování bylo z narostlého inokula odebráno injekční stříkačkou přibližně 1 – 2 ml a přidalo do 10 ml příslušného média, aby vzrostla hodnota na denzitometru o 0,5 McFarlanda. Takto připravené médium bylo přelito do Petriho misky. K zaočkování byl použit inokulátor. Pomocí inokulátoru bylo do Petriho misky dvakrát přeneseno inokulum do kultivačního média v jamkách 1 až 11 mikrotitrační destičky. Tímto bylo dosaženo přibližně  $4 \times 10^5$  KTJ/ml v každé jamce při objemu 100  $\mu$ l. Mezi očkovaním byl inokulátor vždy namočen do 96 % ethanolu a opálen nad kahanem.

Zaočované destičky byly inkubovány v termostatu při 37 °C 24 hodin. U *Candida albicans* byla doba inkubace 48 hodin. Po inkubaci proběhlo vyhodnocení antimikrobiální aktivity.

#### **4.10 Mikrotitrační destička – vzájemné ovlivnění silic**

Tímto testem se prokazovalo, jestli nedochází k vzájemnému ovlivnění silic z důvodu tékání v mikrotitrační destičce.

Pro testování jednoho mikroorganismu byly použity dvě mikrotitrační destičky. V první mikrotitrační destičce, řady 1, 3, 4, 6, 7, 9 – 12 bylo pipetováno 100  $\mu$ l příslušného média. V řadách 2, 5 a 8 byly médium zaplněny pouze řady D a E. Vzorky silic byly pipetovány do prázdných jamek, vedle sebe po třech, v objemu 100  $\mu$ l. Vzorek Andělíka plod byl pipetován do jamek 2A – 2C. Vzorek Andělíka kořen byl pipetován do jamek 5A – 5C. Vzorek Řepík lékařský byl pipetován do jamek 8A – 8C. Vzorek Kopretina řimbaba byl pipetován do jamek 2F – 2H. Vzorek Srdečník obecný byl pipetován do jamek 5F – 5H. Vzorek Lžičník lékařský byl pipetován do jamek 8F – 8H.

U druhé mikrotitrační destičky bylo do jamek 2A – 2C pipetováno v objemu 200  $\mu$ l kontrolní antibiotikum pro daný mikroorganismus. Vzorek Popenec obecný byl pipetován do jamek 5H – 7H v objemu 100  $\mu$ l. Zbylé jamky destičky byly pipetovány médium v objemu 100  $\mu$ l. Kontrolní antibiotika byly pomocí multikanálové pipety rozředěny dvojkovou ředící řadou.

Takto připravené destičky byly zaočkovány pomocí inokulátoru, jako v předešlém testu. Zaočované destičky byly inkubovány v termostatu při 37 °C 24 hodin. U *Candida albicans* byla doba inkubace 48 hodin. Po inkubaci proběhlo vyhodnocení.

#### **4.11 Chemické složení silic**

Chemické složení silic bylo analyzováno pomocí GC-MS za použití Agilent 7890B GC připojeného k hmotnostnímu detektoru Agilent Q-TOF vybaveného kolonou HP-5MS (30m x 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m) od společnosti Agilent (Santa Clara, CA, USA). Jako rozpouštědlo byl použit hexan a objem vzorku 1  $\mu$ l se vstříkoval ve split režimu (poměr 20: 1) do nástřikové jednotky zahřáté na 250  $^{\circ}$ C. Počáteční teplota byla nastavena na 60  $^{\circ}$ C po dobu 3 minut. Teplota stoupala rychlostí 3  $^{\circ}$ C/ min až na teplotu 231  $^{\circ}$ C a poté byla udržována konstantní po dobu 10 minut. Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokovou rychlostí 1 ml/ min. Analýza hmotnostních spekter byla provedena v režimu úplného skenování a energie elektronového ionizace byla nastavena na 70 eV. Identifikace jednotlivých složek vycházela ze srovnání jejich hmotnostních spekter a relativních retenčních indexů s knihovnou spekter (National Institute of Standards and Technology Library, NIST, USA) a literaturou (Adams, 2007). U některých látek byla identifikace potvrzena použitím autentických standardů. Kvantifikace jednotlivých složek byla provedena na základě relativního procentuálního zastoupení ploch peaků.

## 5 Výsledky

Bylo vydestilováno celkem 7 silic z 6 druhů rostlin s výtěžností od 0,01 – 0,96 %. Bylo zanalyzováno jejich složení a otestována jejich antimikrobiální aktivita.

### 5.1 Extrakce silic

Vodní destilací plodu Anděliky lékařské bylo získáno 950  $\mu$ l čiré silice, což odpovídá výtěžnosti 0,96 %. Z kořene Anděliky lékařské bylo vydestilováno 30  $\mu$ l čiré silice, což odpovídá výtěžnosti 0,03 %. Z rostliny Kopretina řimbaba bylo s výtěžností 0,21 % získáno 220  $\mu$ l čiré zelené silice. Z natě Lžičníku lékařského bylo získáno 280  $\mu$ l žluté, kalné silice vonící po popcornu. Výtěžnost byla 0,14 %. Z natě Řepíku lékařského bylo vydestilováno 20  $\mu$ l žluté silice, což odpovídá výtěžnosti 0,01 %. Z natě Srdečnicku obecného bylo s výtěžností 0,02 % získáno 40  $\mu$ l silice sytě žluté barvy. Tato silice tuhla při pokojové teplotě. Výtěžnost z natě Popence obecného byla 0,03 %, tím bylo získáno 60  $\mu$ l žluté silice. Výtěžnost silic shrnuje následující tabulka č. 1.

**Tabulka 1** Výtěžnost silic

Rostlina	Navážka (g)	Výtěžnost ( $\mu$ l)	Výtěžnost (%)	Barva silice
Andělíka plod	98,9	950	0,9606	čirá
Kopretina řimbaba	103,1	220	0,2133	zelená, čirá
Lžičník nat'	195,1	280	0,1435	žlutá, kalná, voní po popcornu
Andělíka kořen	96,9	30	0,0309	čirá
Řepík nat'	192,2	20	0,0104	žlutá
Srdečník nat'	191,6	40	0,0208	sytě žlutá, tuhne při nižší teplotě
Popenec nat'	196,9	60	0,0304	žlutá, čirá

### 5.2 Vzájemné ovlivnění silic

Při tomto testu nebyla prokázána žádná interakce mezi jednotlivými silicemi.

### 5.3 Antimikrobiální aktivita

U vybraných druhů rostlin nebyla prokázána antimikrobiální aktivita v rozmezí koncentrací 2 - 1024  $\mu$ l/ml.

Účinnost antibiotik vůči kmenům ATCC odpovídala udávaným koncentracím dle CLSI (2013). MIC u jednotlivých kmenů jsou shrnuty v tabulce 2.

**Tabulka 2** MIC u referenčních antibiotik

<b>Kmen</b>	<b>MIC (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<i>S. aureus</i>	0,5
<i>B. cereus</i>	0,125
<i>E. coli</i>	1
<i>P. aeruginosa</i>	16
<i>C. albicans</i>	32

#### **5.4 Chemické složení silic**

Převážnou část silice z plodu Anděliky lékařské tvořil  $\beta$ -Phellandrene (86,27 %).

Hlavními komponenty silice z kořene Anděliky lékařské byly  $\alpha$ -copaen-11-ol (9,97 %), humulene epoxide 2 (7,82 %), limonen (6,93 %) a  $\alpha$ -Pinene (6,46 %).

Majoritními složkami silice Kopretiny řimbaby byly kafr (57,44 %) a trans-chrysanthenyl acetát (31,52 %).

Silice z natě Popence obecného obsahovala eucalyptol (29,21 %), sparthulenol (10,6 %), thymol (2,78 %) a anethole (2,63 %).

Hlavní složku silice Lžičníku lékařského tvořila převážně sloučenina 2-butyl isothiocyanate (84,63 %). Minoritními složkami silice byly pentacosane (5 %) a tricosane (4,99 %).

U Srdečníku obecného byl hlavní složkou silice Caryophyllene oxid (15,28 %), hexadecanová kyselina (11,64 %) a humulen epoxid II (9,32 %).

Silice Řepíku lékařského obsahovala  $\alpha$ -Pinene (19,83 %), Caryophyllene oxide (8,55 %), Hexahydrofarnesyl aceton (7,59 %) a humulen (7,57 %).

Chemické složení silic je shrnuto v tabulce 3.

**Tabulka 3** Procentuální zastoupení složek silic

RI	složka	<i>A. a.</i> plod	<i>A. a.</i> kořen	<i>A. e.</i> nať	<i>C. o.</i> nať	<i>G. h.</i> nať	<i>L. c.</i> nať	<i>T. p.</i> nať
928	2-Butyl isothiocyanate				84,63			
930	$\alpha$ -Pinene <sup>s</sup>	5,46	6,46	19,83				1,27
945	Camphene	0,22	1,20					5,81
971	Sabinene	0,37						
974	$\beta$ -Pinene	0,48		1,05				
976	Octen-3-ol <sup>s</sup>					1,79		
988	Myrcene	1,07	1,26					
1001	$\alpha$ -Phellandrene	2,85	2,10					
1007	3-Carene		3,55					
1024	p-Cymene <sup>s</sup>	1,29	5,45					
1027	Limonene		6,93	2,43				0,95
1028	$\beta$ -Phellandrene	86,27						
1030	Eucalyptol <sup>s</sup>					29,21		
1098	Linalool <sup>s</sup>			1,77		2,16	1,64	
1113	1-octen-3-yl acetate					1,49		
1125	$\alpha$ -Campholenal			0,73				
1144	(+)-Camphor <sup>s</sup>			1,14	1,87	1,52	0,70	57,44
1147	trans-Verbenol		4,00					
1154	(-)-menthone <sup>s</sup>			2,68		0,97	1,10	
1161	trans-Pinocamphone					2,57		
1173	(-)-Menthol			1,33		1,57	1,08	
1185	cryptone	1,01						
1237	trans-Chrysanthenyl acetate						0,69	31,52
1244	(-)-Carvone <sup>s</sup>			1,11		1,05	0,43	
1254	Piperitone			0,94				
1285	Anethole <sup>s</sup>			4,67		2,63	2,11	0,72
1287	Bornyl acetate		4,12					

RI	složka	<i>A. a.</i> plod	<i>A. a.</i> kořen	<i>A. e.</i> nat'	<i>C. o.</i> nat'	<i>G. h.</i> nat'	<i>L. c.</i> nat'	<i>T. p.</i> nat'
1292	Thymol <sup>s</sup>					2,78	0,75	
1376	Copaene	0,26	3,44	1,03			0,41	
1384	β-Bourbonene?					1,57	0,62	
1418	Caryophyllene <sup>s</sup>			2,13		1,17	4,11	
1436	trans-α-Bergamotene			0,72			0,89	
1454	Humulene <sup>s</sup>	0,29	2,36	7,57			5,24	
1480	γ-Muurolene						6,28	
1486	β-Ionone			3,50		3,99	2,80	
1500	α-Muurolene		2,68					
1510	β-Bisabolene		3,61					
1525	δ-Cadinene		2,34	3,50			1,82	
1544	α-Copaen-11-ol		9,97					
1576	Spathulenol					10,06	3,48	
1582	Caryophyllene oxide		2,06	8,55		3,75	15,28	
1608	Humulene epoxide 2		7,82	4,22		1,84	9,32	
1847	Hexahydrofarnesyl acetone			7,59	1,39	7,32	8,45	
1919	Farnesyl acetone			1,28				
1976	Hexadecanoic acid						11,64	
2300	Tricosane <sup>s</sup>				4,99			
2500	Pentacosane <sup>s</sup>				5,00			
1816	Heptacosane						3,15	
Celkem		99,55	69,34	77,76	97,88	77,45	82,00	97,71

RI, retenční index; *A. a.*, *Archangelica officinalis*; *A. e.*, *Agrimonia eupatoria*; *C. o.*, *Cochlearia officinalis*; *G. h.*, *Glechoma hederacea*; *L. c.*, *Leonurus cardiaca*; *T. p.*, *Tanacetum parthenium*; s, identifikace pomocí standardu



## 6 Diskuze

Ačkoliv se u silic dá obecně očekávat alespoň slabá antimikrobiální aktivita, v této studii se jí však v rozmezí testovaných koncentrací nepodařilo potvrdit. To může být ovlivněno značnou variabilitou silic v rámci jednoho druhu z různých zdrojů.

Hlavní složku silice Lžičníku lékařského tvořila látka 2-Butyl isothiocyanate (84,63 %). Gilbert a Nursten v roce 1972 zveřejnili studii, kde se látka 2-Butyl isothiocyanate vyskytovala v křenu a japonském wasabi. Napsali také, že tato látka má trpkou, ale přesto výraznou vůni po listové zelenině. Dawson a kol. (1987) se ve své studii zabývali reakcí Mšice skvrnitě na výstražné feromony a výsledkem bylo, že by látka 2-Butyl isothiocyanate mohla napomáhat zvýšit odezvu Mšice na tyto feromony. Chemické složení silice této léčivky není dosud prozkoumáno, ale v porovnání se studii, které se zabývaly složením silic z rostlin ze stejné čeledi (*Brassicaceae*), jsou mezi hlavními složkami uváděny různé formy isothiokyanátů (60,13 %) a sloučeniny obsahující ve své molekule dusík (11,25 %) (Miyazawa a kol., 2002). Silice rostlin z řádu *Brassicales* obsahovaly také různé varianty isothiokyanátů (Afsharypuor a kol., 1998). Antimikrobiální účinek v daném rozmezí koncentrací nebyl u této rostliny prokázán. Meurer-Grimes a kol. (1996) ve své studii popisují, že extrakty ze semen *Brassicaceae* nevykazovaly antimikrobiální aktivitu. Lžičník lékařský je známý pro své povzbuzující, dezinfekční a diuretické účinky a pro vysoký obsah vitamínu C (Skružná J, 2008), proto by bylo vhodné podrobit rostlinu dalšímu zkoumání.

Z kořene Anděliky lékařské bylo vydestilováno 30  $\mu$ l čiré silice. Hlavními komponenty silice byly  $\alpha$ -copaen-11-ol (9,97 %), humulene epoxide 2 (7,82 %), limonen (6,93 %) a  $\alpha$ -Pinene (6,46 %). Toto složení se velmi liší od dosud dostupných informací. Fraternala a kol. (2014) uvádí jako hlavní složky silice  $\alpha$ -pinene (21.3%), d-3-carene (16.5%), limonen (16.4%) a  $\alpha$ -phellandrene (8.7%) a uvádí také uspokojuvající antimikrobiální aktivitu proti patogenům *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Eubacterium limosum*, *Peptostreptococcus anaerobius* a *Candida albicans*. To, že antimikrobiální aktivita nebyla v této práci potvrzena, může být způsobeno právě rozdílným složením silice.

Většinou část silice z plodu Anděliky lékařské tvořil  $\beta$ -Phellandrene (86,27 %). Minoritními částmi silice byly  $\alpha$ -Pinene (5,46 %) a  $\alpha$ -Phellandrene (2,85 %). Tyto výsledky obstojně odpovídají hodnotám ze studie z roku 2007, kde se Nivinskiene a kol.

zabývali složením silic z různě starých plodů a uvádí zde, že hlavními komponenty v plodech byly  $\beta$ -phellandrene (33.6–63.4%).  $\alpha$ -Pinene (4.2–15.8%) a sabinene (20.4%). Jako další uvádí složky  $\alpha$ -phellandrene, myrcene and germacrene D. Efekt antimikrobiální aktivity je spíše popsán pro silici z kořene Anděliky lékařské a mohl by být předmětem dalšího zkoumání.

Výtěžnost u Popence obecného byla 0,0304 %. Tato hodnota se shoduje s udávanou hodnotou méně než 0,05 % (Judzentiene a kol., 2015). Majoritními složkami silice jsou eucalyptol s procentuálním zastoupením 29,21 % a spathulenol (10,6 %). Radulović a kol. (2010) uvádí obsah eucalyptolu v Popenci obecném (4,6 %) a v Popenci chlupatém tvoří eucalyptol převážnou část silice (42,6 %). V další studii uvádí hlavní složku germacrene D (14 – 18,9 %), sabinene ( $\leq$  9,6 %) a eucalyptol ( $\leq$  7,1 %) (Judzentiene a kol., 2015). Mockute a kol. (2007) popisují hlavní složky silice germacrene D (14.1–20.7%),  $\gamma$ -elemene (9.0–16.0%),  $\beta$ -elemene (8.7–12.9%). Rozdílné složení je pravděpodobně způsobeno různými chemotypy rostliny. Antimikrobiální aktivita nebyla u této silice prokázána. Eucalyptol a spathulenol mají prokázané antimikrobiální účinky (Skočibušić, Bezić, 2004), avšak v koncentracích řádově v mg/ ml (Sökmen a kol., 2003), zatímco při tomto pokusu byly použity koncentrace do 1024  $\mu$ g/ ml.

Další silicí, u které bylo stanoveno chemické složení, je Srdečník obecný. Caryophyllene oxid (15,28 %), hexadecanová kyselina (11,64 %) a humulen epoxid II (9,32 %) byly majoritními složkami této silice. Oproti výsledkům Morteza – Semnani a kol. (2008) se složení liší. Zde jsou uváděny jako hlavní složky epi-cedrol (9.7%),  $\alpha$ -humulen (9.2%), dehydro-1,8-cineole (8.9%), germacrene D (8.9%) a spathulenol (8.8%). Caryophyllene byl v silici obsažen pouze ze 4,6 %.

Silice Řepíku lékařského obsahovala  $\alpha$ -Pinene (19,83 %), Caryophyllene oxide (8,55 %), Hexahydrofarnesyl aceton (7,59 %) a humulen (7,57 %). Tyto výsledky se víceméně shodují se srovnávací studií z roku 2009, která stanovovala složení silice Řepíku lékařského z divoké přírody a pěstovaného na poli (Navaei, Mirza, 2009). Výsledky této práce se blíží složení Řepíku lékařského, který byl pěstován na poli. Antimikrobiální účinek nebyl potvrzen. Záznamy o antimikrobiální aktivitě jsou dostupné pouze pro extrakty z Řepíku lékařského, u kterých byla určena MIC v mg/ ml (Muruzović a kol., 2016). Z toho vyplývá, že jak složení tak i antimikrobiální aktivita by mohly být předmětem dalších studií.

Majoritními složkami silice Kopretiny řimbaby byly kafr (57,44 %) a trans-chrysanthenyl acetát (31,52 %). Složení silice je blízké hodnotám ze studie z roku 1999, kde se zabývali alergeny produkované právě Kopretinou řimbabou. Rostlina dánského původu obsahovala kromě kafru (26,7 %) a trans-chrysanthenyl acetátu (15,7%), také trans-chrysanthenol (7,2%). (Mohsenzadeh a kol., 2011) ve své studii uvádějí jako hlavní složky silice kafr (18.94%), bornyl acetate (18.35%), camphene (13.74%), bornyl isovalerate (3.15%) a borneol (10.93%). Tento rozdíl by mohl být způsoben odlišným zeměpisným umístěním studovaného druhu. V této studii také určili MIC pro stejné patogeny, které byly testovány i v této práci, a to pomocí diskové difuzní metody, kdy na disky aplikovaly 30  $\mu$ l silice. Z toho vyplývá, že vyšší koncentrace silice antimikrobiální aktivitu vykazuje, ovšem v rozmezí 2 – 1024  $\mu$ l/ ml nebyla antimikrobiální aktivita potvrzena.

## 7 Závěr

Cílem této práce bylo analyzovat složení a antimikrobiální aktivitu vybraných druhů českých léčivých rostlin. Antimikrobiální aktivita byla testována proti grampozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus*, gramnegativním bakteriím *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a kvasince *Candida albicans*. Z rostlin byly vybrány Andělíka lékařská, Kopretina řimbaba, Srdečník obecný, Lžičník lékařský, Popenec obecný a Řepík lékařský.

Ačkoliv se na základě výsledků této práce nedá vyloučit, že testované silice vykazují alespoň mírné antimikrobiální účinky, u žádné z nich nebyla v rozmezí koncentrace 2 – 1024  $\mu\text{l/ml}$  antimikrobiální aktivita prokázána, přestože v chemickém složení silic byly identifikovány látky s antimikrobiálními účinky. Chemické složení silic je velmi různorodé. U některých rostlin se složení shodovalo s již proběhlými studiemi, u jiných nikoliv.

V této práci bylo také dle dostupných studií, poprvé testováno chemické složení silice z natě Lžičníku lékařského.

## 8 Seznam literatury

Adams, R. P. (2017). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. Texensis Publishing.

Afsharypuor, S., Jeiran, K., & Jazy, A. A. (1998). First investigation of the flavour profiles of the leaf, ripe fruit and root of *Capparis spinosa* var. *mucronifolia* from Iran. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 72(5), 307-309 s.

Arndt T. (2008). Řepík lékařský (*Agrimonia eupatoria*), Celostní medicína [online]. [cit. 2018-03-12]. Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/repik-lekarsky-agrimonia-eupatoria.htm>

Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (Eds.). (2015). Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC Press. 1112 s. ISBN 978-1-4665-9047-2

Bélanger, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., Dozois, C. (2011). *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunology*. 62 (1). 1-10 s.

Beveridge, T. J. (1990). Mechanism of gram variability in select bacteria. *Journal of bacteriology*, 172(3), 1609-1620 s.

Buňková, L., & Doležalová, M. (2010). *Obecná mikrobiologie*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 190 s. ISBN 978-80-7318-973-0

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253 s.

Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food Control*, 54, 111-119 s.

Christensen, L. P., Jakobsen, H. B., Paulsen, E., Hodal, L., & Andersen, K. E. (1999). Airborne *Compositae* dermatitis: monoterpenes and not parthenolide are released from flowering *Tanacetum parthenium* (feverfew) plants. *Archives of Dermatological Research*, 291(7-8), 425-431 s.

CLSI (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA, CLSI document M100-S23; ISBN 1-56238-866-5.

Dawson, G. W., Griffiths, D. C., Pickett, J. A., Wadhams, L., & Woodcock, C. M. (1987). Plant-derived synergists of alarm pheromone from turnip aphid, *Lipaphis (Hyadaphis) erysimi* (Homoptera, Aphididae). *Journal of chemical ecology*, 13(7), 1663-1671 s.

de Vos, A. C., Broekman, R., de Almeida Guerra, C. C., van Rijsselberghe, M., & Rozema, J. (2013). Developing and testing new halophyte crops: A case study of salt tolerance of two species of the Brassicaceae, *Diplotaxis tenuifolia* and *Cochlearia officinalis*. *Environmental and experimental botany*, 92, 154-164 s.

Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines*, 3(4), 25 s.

Dítě D., *Cochlearia OFFICINALIS L. - lžičník lékařský / Lžičník lékařský*, (2014). botany.cz [online]. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/cochlearia-officinalis/>

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2000). Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Definitive Document E. Def 1.2. *Clinical microbiology and infection*, 6, 503-508 s.

Franklin R., Matthew A., Alder J., Michael N., George M. a kol., (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Approved Standard—Ninth Edition.*, Clinical and Laboratory Standards Institute, M07-A9, 32(2)

Fraternale, D., Flamini, G., & Ricci, D. (2014). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Angelica archangelica L.*(Apiaceae) roots. *Journal of medicinal food*, 17(9), 1043-1047 s.

Gilbert, J., & Nursten, H. E. (1972). Volatile constituents of horseradish roots. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23(4), 527-539 s.

Granum, P. E., Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS microbiology letters*, 157(2), 223-228 s.

- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 86(6), 985-990 s.
- Harmsen, M., Yang, L., Pamp, S. J., & Tolker-Nielsen, T. (2010). An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59(3), 253-268 s.
- Helgason, E., Økstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., ... & Kolstø, A. B. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2627-2630 s.
- Horáček, J. et al. *Základy lékařské mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2000. 309 s. ISBN 80-246-0006-4.
- Janča J. a Zentrich J. (1994). *Herbář léčivých rostlin: 1. díl*. 1. vyd. Praha: Eminent, 288 s. ISBN 80-858-7602-7
- Janderová, B., & Bendová, O. (1999). *Úvod do biologie kvasinek*. Karolinum, 108 s.
- Jaroš Z. (1992). *Léčivé látky z rostlin*. Vyd. 1. České Budějovice: Dona, 79 s. ISBN 80-854-6304-0.
- Jirásek V., Starý F. (1989). *Kapesní atlas léčivých rostlin*. 2. vydání. SPN, Praha, 329 s.
- Johnson, E. S., Kadam, N. P., Hylands, D. M., & Hylands, P. J. (1985). Efficacy of feverfew as prophylactic treatment of migraine. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 291(6495), 569-573 s.
- 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*, 2 s.
- Kaprálek, F. (1999). *Základy bakteriologie*. Karolinum, 241 s. ISBN 80-718-4811-5
- Klouda, P. (2003). *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- Kovář L. (2007). *AGRIMONIA EUPATORIA L. – řepík lékařský / repík lekársky*. In: botany.cz [online]. [cit. 208-03-13]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/agrimonia-eupatoria/>

Kantová J., Kant J. (2004). Přírodní léčiva: homeopatie, éterické oleje, krystaly, domácí léky. Slovart, 256 s. ISBN 80-7209-547-1

Meurer-Grimes, B., Mcbeth, D. L., Hallihan, B., & Delph, S. (1996). Antimicrobial activity in medicinal plants of the Scrophulariaceae and Acanthaceae. *International journal of Pharmacognosy*, 34(4), 243-248 s.

Miyazawa, M., Maehara, T., & Kurose, K. (2002). Composition of the essential oil from the leaves of *Eruca sativa*. *Flavour and fragrance journal*, 17(3), 187-190 s.

Mlejová V., Pavlíková P., Dobiáš P., Adam M., Ventura K. (2010). Aplikace mikroextrakce tuhou fází pro analýzu bylinných silic. *Chemické listy*, 104, 166–171 s.

Mohsenzadeh, F., Chehregani, A., & Amiri, H. (2011). Chemical composition, antibacterial activity and cytotoxicity of essential oils of *Tanacetum parthenium* in different developmental stages. *Pharmaceutical biology*, 49(9), 920-926 s.

Morteza – Semnani K., Saeedi M., Akbarzadeh M. (2008). The Essential Oil Composition of *Leonurus cardiaca* L. *Journal of Essential Oil Research*, 20, (2), 107-109 s.

Muruzović, M. Ž., Mladenović, K. G., Stefanović, O. D., Vasić, S. M., & Čomić, L. R. (2016). Extracts of *Agrimonia eupatoria* L. as sources of biologically active compounds and evaluation of their antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm activities. *Journal of food and drug analysis*, 24(3), 539-547 s.

Navaei, M. N., & Mirza, M. (2009). A Comparative Study of the Essential Oils of *Agrimonia eupatoria* Both Cultivated and Wild Growing Conditions in Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(3), 369-373 s.

Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., & Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food control*, 20(2), 157-160 s.

Nivinskiene, O., Butkiene, R., & Mockute, D. (2007). The seed (fruit) essential oils of *Angelica archangelica* L. growing wild in Lithuania. *Journal of Essential Oil Research*, 19(5), 477-481 s.



Opletal L., Volák J. (1999). Rostliny pro zdraví. 1. vydání. Aventinum, Praha, 176 s. ISBN 80-7151-074-2

Patočka J. (2015) Srdečník obecný – nevzhledný plevel, ale užitečná léčivka, Toxycology [online] [cit.2018-1-3] Dostupné z: <http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=798>

Peter V. (2004) Handbook of Herbs and Spices. 2nd ed. Cambridge, Woodhead Pub, 520 s. ISBN 978-185-5737-211

Radulović, N., Đorđević, N., Marković, M., & Palić, R. (2010). Volatile constituents of *Glechoma hirsute* Waldst. & Kit. and *G. hederacea* L.(Lamiaceae). Bulletin of the chemical society of Ethiopia, 24(1).

Schwalbe, R., Steele-Moore, L., & Goodwin, A. C. (Eds.). (2007). Antimicrobial susceptibility testing protocols. Crc Press, 432 s. ISBN 13-9781-4200-1449

Shivanand, P., Nilam, M., & Viral, D. (2010). Herbs play an important role in the field of cosmetics. International Journal of PharmTech Research, 2(1), 632-639 s.

Skočibušić, M., & Bezić, N. (2004). Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. Phytotherapy Research, 18(12), 967-970 s.

Skružná J. (2008) Lžičník lékařský, Medicom International s. r. o., Medicina.cz, [online]. [cit. 2018-03-27]. Dostupné z: <http://medicina.cz/clanky/2284/34/Lzicnik-lekarsky/>

Sökmen, A., Vardar-Ünlü, G., Polissiou, M., Daferera, D., Sökmen, M., & Dönmez, E. (2003). Antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea sintenisii* Hub. Mor.(Asteraceae). Phytotherapy Research, 17(9), 1005-1010 s.

Szybalski, W., & Bryson, V. (1952). Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents i.: cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics<sup>1</sup>, 2. Journal of bacteriology, 64(4), 489 s.

Špaček J., Buchta V., Jílek P. (2013) Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí, Grada, 360 s. ISBN 978-80-247-4554-1

Tapsell, L. C., Hemphill, I., Cobiac, L., Sullivan, D. R., Fenech, M., Patch, C. S., ... & Fazio, V. A. (2006). Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future, 185(4).

Tong, Y., Tang, J. 2017. *Candida albicans* infection and intestinal immunity. *Microbiological Research*. 198. 27-35 s.

Votava M. (2003) *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

Žáček Z. (1981). *Vůně koření*. 2. vydání. Merkur, Praha, 207 s. ISBN: 51-352-81

### **Seznam obrázků**

Obrázek 1 Clevengerova aparatura ([www.popups.uliege.be](http://www.popups.uliege.be))

Obrázek 2 Disková difuzní metoda ([www.mikrobiologie.lf3.cuni.cz](http://www.mikrobiologie.lf3.cuni.cz))

Obrázek 3 Klínová metoda (Szybalski, Bryson, 1952).

Obrázek 4 E – test ([www.flickr.com](http://www.flickr.com))

Obrázek 5 Mikrotitrační destička ([www.gama.cz](http://www.gama.cz))

Obrázek 6 Andělíka lékařská (*Archangelica officinalis*) ([www.vitalia.cz](http://www.vitalia.cz))

Obrázek 7 Srdečník obecný (*Leonurus cardiaca*) ([www.kvetenacr.cz](http://www.kvetenacr.cz))

Obrázek 8 Popenec obecný (*Glechoma hederacea*)([www.biolib.cz](http://www.biolib.cz))

Obrázek 9 Řepík lékařský (*Agrimonia eupatoria*) ([www.celostnimediceina.cz](http://www.celostnimediceina.cz))

Obrázek 10 Kopretina Řimbaba (*Tanacetum parthenium*) ([www.magazinzahrada.cz](http://www.magazinzahrada.cz))

Obrázek 11 Lžičník lékařský (*Cochlearia officinalis*)([www.polgara.cz](http://www.polgara.cz))