

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Využití biologicky aktivních látek z rostlin pro prodloužení
úchovy vybrané kořenové zeleniny**

Diplomová práce

Autor práce: Marie Krondlová

Vedoucí práce: doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Využití biologicky aktivních látek z rostlin pro prodloužení úchovy vybrané kořenové zeleniny“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D. za odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Matěji Božíkovi za cenné rady, věcné připomínky při vypracování této práce, též Ing. Adéle Fraňkové, Ph.D. za pomoc a rady při zpracování této diplomové práce.

Využití biologicky aktivních látek z rostlin pro prodloužení úchovy vybrané kořenové zeleniny

Souhrn

V současné době je kladen důraz na vysokou úroveň zpracování zemědělských produktů, speciálně na jejich lepší uchování. Zároveň je zde snaha o jejich ošetřování bez umělých chemických látek. Mezi často konzumovanou zeleninu patří kořenová, která díky různým rizikovým faktorům, jako je například poměrně dlouhé vegetační období, čelí mnoha možnostem poškození a znehodnocení. Zde tak vzniká příležitost využít vlastnosti přírodních látek, konkrétně silic. Jejich účinky se využívají v různých oborech, protože jsou považovány za bezpečné jak pro životní prostředí, tak pro lidské zdraví či v rámci ošetřování potravinářských komodit. Tato práce se zaměřuje na testování antibakteriální aktivity několika z nich. Práce se věnovala především silici saturejkové, skořicové, hřebíčkové, tymiánové a silici z dobromyslu obecného. Jako zástupci kořenové zeleniny byly do práce vybrány petržel zahradní kořenová, mrkev obecná a celer miřík. Antibakteriální aktivita silic byla měřena pomocí bujonové mikrodiluční metody. Zelenina byla naočkována patogenními bakteriemi, hniloba se však nerozvinula na daných místech. Proto byl následně odebrán izolát z petržele a celeru, ze kterých bylo identifikováno pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI TOF několik dalších mikroorganismů. Vůči kterým byla opět testována v podmínkách *in vitro* minimální inhibiční koncentrace daných silic.

Prokazatelným pozitivním výsledkem bylo nalezení nejčastější minimální inhibiční koncentrace, a to 0,128 mg/ml, u skořicové silice. Silice se takto osvědčila proti osmi ze sedmnácti testovaných mikroorganismů. Ostatní testované silice prokázaly určitou inhibiční aktivitu proti alespoň jedné bakterii v *in vitro* podmínkách.

Klíčová slova: silice, kořenová zelenina, patogenní organismy, antibakteriální aktivita, MALDI TOF

The application of plant-derived biologically active substances for shelf-life improvement of root vegetable

Summary

High level of agricultural products processing and especially better storage of products currently represent one of the hottest topics. At the same time, there is a lot of effort to grow crops without chemical substances. Root vegetables, which are consumed a lot, are prone to many harmful and damaging influences. There are several risk factors, including a long vegetation period. This creates an opportunity to use natural substances, in particular essential oils. Their effects are used in various different fields because they are safe for the environment as well as for the human health and the area of food commodities treatment. This study focuses on antibacterial activity testing of several essential oils: satreja, cinnamon, clove, thyme and oregano. Carrot, garden parsley and celery were chosen as representatives of root vegetables. The antibacterial activity was measured by the broth microdilution method. Even though the vegetables were inoculated with pathogenic bacteria, putrefaction did not develop in the specific places. Therefore an isolate from the parsley and the celery was then used to identify several other microorganisms by the MALDI TOF mass spectrometry. Consequently, the minimum inhibitory concentration of essential oils was again tested against these bacteria in in vitro conditions.

There was a demonstrable positive result: the most frequent minimum inhibitory concentration of the cinnamon essential oil was 0.128 mg/ml. At this level the essential oil inhibited eight out of the seventeen tested microorganisms. The other tested essential oils showed some inhibition activity at least against one bacterium in in vitro conditions.

Keywords: essential oil, root vegetables, pathogenic microorganisms, antibacterial activity, MALDI TOF

Obsah

1.	Úvod	7
2.	Literární řešerše	8
2.1.	Kořenová zelenina	8
2.1.1.	Skladování	9
2.1.2.	Mrkev obecná (<i>Daucus carota</i>).....	11
2.1.3.	Petržel zahradní kořenová (<i>Petroselinum crispum</i> convar. <i>radicosum</i>)	14
2.1.4.	Celer miřík (<i>Apium graveolens</i>).....	16
2.2.	Přírodní látky v ochraně rostlin	18
2.2.1.	Silice.....	19
2.3.	Testy <i>in vitro</i>	28
2.4.	MALDI-TOF	29
3.	Materiál a metody	31
3.1.	Materiál.....	31
3.2.	Stanovení minimální inhibiční koncentrace	32
3.2.1.	Chemikálie.....	32
3.2.2.	Testované mikroorganismy	32
3.2.3.	Mikrodiluční bujónová metoda.....	32
3.3.	Inokulace	33
3.4.	Identifikace pomocí MALDI – přímý přenos bakterií.....	34
4.	Výsledky	35
4.1.	Minimální ihibiční koncentrace.....	35
4.2.	Inokulace	35
4.3.	Maldi test	35
4.3.1.	MIC z Maldí testu.....	39
5.	Diskuze	40
6.	Závěr	44
7.	Použitá literatura	45

1. Úvod

Zelenina představuje důležitou složku lidské výživy, proto je společností kladen velký důraz na neustálé zlepšování celého procesu jejího zpracování – od vypěstování po skladování. Po sklizni působí na potraviny řada různých faktorů – např. obsah vody v plodinách, fyziologická zralost, struktura kůry, odrůda, způsob ošetření. Přestože se proces zpracování v průběhu let zdokonaluje, stále se vyskytují posklizňové ztráty zahradnických produktů. V méně rozvinutých zemích, kde se příliš nevyužívají posklizňové technologie, mohou ztráty činit až 50 % produkce (Antunes et Cavaco, 2010). K dosažení vysoké kvality plodin přispívají moderní technologie, pokročilá manipulační technika či skladovací zařízení. Hlavním cílem je udržet zeleninu v dobrém stavu a zamezit působení nebezpečných látek a mikroorganismů. Jednou z variant, která by ke zmíněným cílům měla napomáhat, je využití vlastností rostlinných látek.

2. Literární rešerše

Tato práce hledá inovace v rámci využití biologicky aktivních látek na hnilobu kořenové zeleniny. Nejprve je třeba definovat pojmy a přiblížit vlastnosti sledovaných plodin. Vyhláška č.157/2003 Sb. stanovuje požadavky na čerstvou i zpracovanou zeleninu. Pojem zelenina zahrnuje různé jedlé části rostlin. Mohou to být listy, celá nať, kořeny, cibule, stonky, řapíky, květy, soukvětí, bulvy, hlízy či výhony. Zelenina pochází z rostlin jednoletých, dvouletých i vytrvalých. Jedná se o byliny, které tvoří trvalé dřevité nadzemní orgány. Rozděluje se do několika skupin: cibulová, kořenová, košťálová, kořeninová, lahůdková, lusková, plodová a salátová. Čerstvá zelenina obsahuje podle druhů 87–95 % vody a využívá se hlavně díky pestré škále vitamínů, které v sobě obsahuje (Pekárková, 2004; Kopec, 2010).

V českých a moravských zelinářských oblastech mají největší zastoupení především tyto plodiny: hlávkové zelí, cibule, mrkev, květák, rajčata, zelený hrášek, celer a petržel. Český statistický úřad uvádí, že v roce 2016 bylo z 10 202 ha obdělané plochy sklizeno celkem 227 907 t zeleniny, což ve srovnání se sklizní z roku 2015, kdy sklizeň dosáhla 183 603 t, představuje zvýšení o 21 %. Během několika posledních let se však produkce zeleniny spíše snižovala v rámci České republiky či celkově Evropské unie. Pokles je zapříčiněn úbytkem pěstitelských ploch a nepřízní počasí. Snížení pěstitelských ploch se týká zejména cibule, mrkve, kvěťáku, zelí a rajčat. K poklesu produkce zeleniny došlo v hlavních pěstitelských zemích – především ve Španělsku, Německu, Polsku a Francii (Horáková, 2017).

V České republice činí spotřeba zeleniny 80,2 kg na osobu za rok. Tento údaj se řadí v rámci Evropy k nižším hodnotám, protože naopak ve středomořských státech spotřeba zeleniny dosahuje až 130 kg na osobu za rok. Příčinou jsou klimatické podmínky, které umožňují pěstovat některé druhy delší dobu. Spotřeba zeleniny českých konzumentů se během posledních let pomalu zvyšuje. Je to díky tomu, že se rozvinul cestovní ruch, a ten má vliv na stravovací návyky, což se pak odráží na spotřebě jednotlivých komodit (Kopec, 2010; Buchtová, 2014).

2.1. Kořenová zelenina

Kořenová zelenina se pěstuje pro podzemní části rostliny – kořen, hlízu, bulvu. Její pole zabírají přibližně 18 % výměry zelinářských polí v České republice. V roce 2015 činila

plocha osetá kořenovou zeleninou 1 260 ha z celkové plochy s produkcí zeleninou, což bylo 8 919 ha. S výjimkou celeru, který není náročný na pěstování, se pěstuje v řepářských oblastech. Ty se vyskytují v Polabí, dolním Poohří, Hornomoravském úvalu a jižní části Slezské nížiny. Charakteristická je pro ně nadmořská výška 250–350 m, průměrná roční teplota vzduchu 8–9 °C a úhrn srážek 500–650 mm (Diderot, 1999; Horáková, 2015).

Do skupiny kořenové zeleniny se řadí např. celer bulvový (*Apium graveolens* L. var. *Rapaceum*), černý kořen tzv. hadí mord španělský (*Scorzonera hispanica* L.), červená řepa (*Beta vulgaris* L. subs. *esculenta*), petržel kořenová (*Petroselinum sativum* Hoffm.), pastinák setý (*Pastinaca sativa* L.), mrkev obecná (*Daucus carota* L.), zázvor lékařský (*Zingiber officinale*) (Diderot, 1999).

Tyto rostliny obsahují řadu vitamínů, minerálních látek a antioxidantů, konkrétně flavonoidů. Nejvíce zástupců skupiny patří do čeledi miříkovité (*Apiaceae*), která obsahuje specifické silice. V petrželi jsou obsaženy silice bohaté na fenylypropany, v celeru a v mrkvi jsou silice s vysokým obsahem terpenů. Hořčičná silice obsažená v křenu a ředkvi působí proti mikrobům díky obsahu látek sinigrin a sinalbin. Kořenová zelenina může také obsahovat obranné metabolity, z nichž např. psoralen nebo bergapten ve větším množství mohou způsobit alergické příznaky. Tyto látky se vyskytují v mrkvi v množství nižším než 2 mg/kg, naopak v celeru dosahují obsahu až 300 mg/kg (Kopec, 2010).

2.1.1. Skladování

Čerstvá zelenina je vybavena dvěma typy mechanismů obrany proti mikroorganismům: 1. fyzický – v podobě kůry, která tvoří bariéru chránící vnitřek plodu, 2. chemický – tzv. fytoanticipiny, což jsou látky detoxifikující enzymy patogenů. Je to např. triterpenoid avenacin, což je saponin ovsa. V současnosti výzkumy ukazují, že hlavní příčinu posklizňových ztrát představuje rozpad vyvolaný biologickými činiteli. Zranění plodů způsobuje narušení tkání, které následně ohrožuje integritu komodit a poskytuje příznivé podmínky pro invazi rozpadových činitelů. Plodiny tedy čelí široké škále kažení působením mikroorganismů, včetně virů, bakterií a plísní (Antunes et Cavaco, 2010, Řepková, 2013).

Následné skladování probíhá ve skladech, které existují v několika podobách a používají se podle uskladňované komodity. Existují sklady chlazené pouze větráním venkovním vzduchem, kde teplota, relativní vlhkost vzduchu jsou odvozeny z přívodu venkovního vzduchu do roštové podlahy. Dalšími jsou chlazené sklady bez úpravy atmosféry, u nichž je teplota nastavená na $\pm 0,5$ °C, relativní vlhkost je v rozsahu 92–94 % a rychlost vzduchu je vyvolaná výparníkovým ventilátorem s minimální lineární rychlostí. Mezi dnes

nejrozšířenější formy skladování patří sklady s řízenou atmosférou, které významně podporují skladovatelnost a omezují fyziologická onemocnění. Používají se technologie označované termínem ULO – ultra nízký obsah kyslíku (Ultra Low Oxygen) a DCA – dynamicky řízená atmosféra (Dynamic Control Atmosphere). V případě druhů zeleniny citlivějších na chlad dochází k poškození fyziologických funkcí buněk mnohem dříve, než dojde ke zmrznutí buněčné šťávy. Tyto plodiny se nesmějí skladovat při teplotách nižších než 10 °C. Jedná se např. o lilek, fazole, okurky, dýně, papriky, rajčata, cukety (Anonym, 2012; Anonym, 2015).

Mezi faktory, které ovlivňují skladovatelnost, patří ztráta vody odpařením, dýchání rostlinných buněk a s tím spojená tepelná výměna. Ta se u jednotlivých druhů může lišit. Tuna brokolice vyprodukuje desetkrát více tepla než tuna zelí. Rychlost dýchání je ovlivněna teplotou prostředí. Nižší teplota zmírní vadnutí, které hraje zásadní roli v rozhodování spotřebitelů o koupi zeleniny. Komodity s vyšší rychlostí respirace mají kratší dobu skladovatelnosti. Možnosti prodloužení údržnosti jsou např. ozařování, tepelné působení či chemické prostředky. Chemický průmysl ale věnuje větší pozornost rozvoji prostředků pro postřiky, které se aplikují na plodiny již v terénu. Vývoj antimikrobiálních chemikálií roste z důvodu poptávky spotřebitelů. Důraz je kladen na alternativní regulaci škůdců a chorob. Také jsou široce používány růstové regulátory: zatímco ethylen urychluje zrání a stárnutí plodin, auxiny a gibbereliny zrání zpomalují. Např. na citrusy se auxin aplikuje, aby se udržel dojem jejich vitality, zatímco ethylen má podpořit zbarvení kůry (Snowden, 2010).

Obecné pravidlo skladování spočívá v nízké teplotě, která pomůže zachovat čerstvost a požadované sensorické vlastnosti plodin. Kořenová zelenina patří k druhům, které je možné bez větších problémů uchovávat. Přes zimu se uskladňuje při teplotě okolo 0,5 °C a vlhkosti 85–95 %. Nejhůře snáší poškození způsobené vysoušením. Proto by měla být uskladněna v pytlích nebo přikryta tak, aby byla umožněna cirkulace plynů bez zbytečné ztráty vlhkosti. V okamžiku uskladňování by zelenina neměla být vlhká. Mrkev, zvláště nepraná, vydrží v papírových pytlích po dobu několika týdnů. Další variantou uskladnění je uchovávání kořenů v písku, kde vydrží déle než půl roku (Václavík, 2008; Anonym, 2012).

Chlazení může proběhnout před nebo po balení. U mnoha komodit je toto nejkritičtější fáze zpracování. Teplota by totiž neměla klesnout pod hodnotu kritickou pro danou plodinu. Nízkou teplotou se snižuje rychlost dýchání, omezuje se ztráta vlhkosti a rozvoj nežádoucích organismů. Chlazení by mělo proběhnout co nejdříve po sklizni. Vakuové chlazení probíhající ve speciální komoře je vhodné pro listovou zeleninu, protože snížený tlak způsobuje rovnoměrné odpařování vlhkosti. Pro kořenovou zeleninu se tento způsob chlazení nevyužívá, protože neobsahuje vodu lehce odpařitelnou (Snowden, 2010).

Další fází celkového zpracování zeleniny je balení, jehož hlavním účelem je ochránit produkt. V posledních letech se v oblasti balení klade důraz na tzv. aktivní obaly, jejichž základem jsou systémy, které samy reagují na změny podmínek uvnitř i vně obalu úpravou svých vlastností, a tím zamezují poškození kvality produktu. Základním principem aktivních obalů je sorpce, odstraňování nežádoucích složek z vnitřního prostoru obalu nebo naopak uvolnění stabilizačních činidel (Vermeiren et al., 1999).

Pro jednotlivé druhy zeleniny existují různé typy balení, využívají se např. pytle, sítě, přepravky. Kartony se používají pro křehčí druhy zeleniny, jako je např. salát. Mrkev se před odesláním do obchodů balí do menších tašek z polyethylenu, které jsou poté pro přepravu uzavřeny do větších tašek. Dále se jako obaly používají sítě pro cibuli, děrované tašky z polyethylenu pro brambory či lepenkové krabice určené pro brokolici, které by měly být voděodolné a opatřené větracími otvory (Snowden, 2010).

Následující část se bude podrobněji věnovat třem vybraným druhům zeleniny, které byly použity v experimentální části práce. Jedná se o mrkev, celer a petržel. Tyto druhy kořenové zeleniny se často před konzumací tepelně ošetřují.

2.1.2. Mrkev obecná (*Daucus carota*)

Mrkev spadá do čeledi miříkovitých (*Apiaceae*), pochází z Evropy a Asie. Odrůdy, se kterými se v současnosti setkáváme, vznikly v 19. století především ve Francii. Mrkev má brázditou a dutou lodyhu, listy objímají rozšířenou bázi stonek. Květenství se skládá z okolíku složeného z dvaceti až čtyřiceti okolíčků (Schlett, 2008).

Jako části rostliny určené ke konzumaci se využívají zdužnatělé nerozvětvené kořeny bez postranních kořínků. Mezi blahodárné účinky na lidské zdraví patří zlepšení zraku nebo snížení obsahu cholesterolu i rizika onemocnění rakovinou plic. Odrůdy mrkve s válcovitým nebo kulovitým kořenem se označují jako karotky, obsahují větší množství karotenů a vyznačují se jemnější dužinou. U hodnocení kvality mrkve je důležitá čerstvost, protože ztráty způsobené výparem činí u mrkve s natí 4 % obsahu vody a u kořenů bez natě dokonce více než 8 % vody (Kopec, 2010).

Mrkev představuje významný zdroj vitamínu A a jeho prekurzoru betakarotenu, dále je zdrojem vitamínů E (tokoferol), C (kyselina askorbová), niacinu (vitamin B3), kyseliny pantotenové (vitamín B5) a kyseliny listové. Z minerálních látek obsahuje selen, draslík, sodík, vápník, hořčík, železo, fosfor, síru, měď, mangan a zinek. Z bioaktivních složek jsou v mrkvi hojně zastoupeny karotenoidy, dále obsahuje potravinovou vlákninu a pektin. Mrkev obsahuje také silice limonen a geraniol (Schlett, 2008).

Fyziologické choroby

Nežádoucím znakem je někdy se objevující nahořklost a natrpklost, způsobena přítomností terpenoidů. Chutnost mrkve záleží na obsahu cukrů. Čím je jich více, tím je lepší celková chutnost. Nahořklost lze odstranit tím, že kořen vystavíme na kratší dobu působení teplot 16 až 20 °C.

Mezi rozšířené vady mrkve patří také pukání kořenů, které většinou vzniká úderem během sklizně a manipulačních prací. Dalším faktorem, který ovlivňuje pukání mrkve, je voda. Ta často způsobuje praskání i jiných plodin – např. rajčat. Kvalitu mrkve ovlivňuje i nadměrné hnojení dusíkem, které má za následek o 33 % vyšší výskyt praskání kořenů. Na plodiny působí také teplota a typ půdy. Mrkev v oblastech s teplejším klimatem a těžší půdou má vyšší výskyt vady. Naopak méně vadných kořenů pochází z polí s písčitou půdou (Hartz et al., 2005).

Další chorobu představuje šedá skvrnitost mrkvových kořenů. Na kořenech se objevují šedočerné skvrny, které se liší od hnilobných skvrn tím, že pletiva ve skvrnách zůstávají pevná, zatímco v případě hniloby měknou. Nemoc se vyskytuje na slévavých půdách (Benada a Špaček, 1961).

Virózy

V teplejších letech způsobují ztráty především v semenných porostech virózy, které se projevují jako mozaiky, žloutnutí listů a celkové inhibice růstu. Jsou to např. virová tenkolistost mrkve (Carrot thin leaf virus – CTLV), virová červenolistost mrkve (Carrot red leaf virus – CRLV) a virová strakatost mrkve (Carrot mottle virus – CMoV) (Kazda et al., 2003).

Bakteriózy

Častou chorobou mrkve je skvrnitost listů. Může být zapříčiněna bakterií *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*. Mezi její znaky patří žluté skvrny, které se objevují převážně na špičkách listů, mohou se zabarvit do tmavohnědé barvy a rozšířit se na řapíky a lodyhy. K šíření bakterie a rozvoji choroby dochází v podmínkách teplot 25–30 °C a vysoké vzdušné vlhkosti. Bakteriální problémy mrkve mohou způsobovat i bakterie *Pseudomonas marginalis*, *P. viridiflava*, *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*, *E. chrysanthemi* a další druhy (Koike et al., 2007).

Mykózy

Podobné příznaky mohou vykazovat i houbovitá onemocnění. Konkrétně se jedná o alternariovou skvrnitost (*Alternaria dauci*, *A. alternata*), černou hnilobu (*Alternaria radicina*) a cercosporovou skvrnitost (*Cercospora carotae*).

Alternaria dauci se objevuje na nejstarších listech rostliny v podobě drobných žlutých teček, které se rychle zvětšují, hnědnou, černají, až nakonec listy odumírají. Během období vegetace se houba šíří konidiiem působením deště a větru (Kazda et al., 2003).

Další mykotickou chorobou je černá hniloba, kterou způsobuje *Alternaria radicina*. Houba má podobu suchých, černých, propadlých míst na kořenu. Šíří se, až napadne celý kořen. Ke zvýraznění příznaků nemoci většinou dojde až v průběhu skladování. Černá hniloba se vyskytuje ve všech produkčních oblastech mrkve. Napadá i petržel a další rostliny čeledi miříkovitých (Koike et al., 2007).

Cercosporová skvrnitost je jedna z nejrozšířenějších listových chorob mrkve, je rozšířena zejména v některých částech Severní Ameriky. Na plodinách vznikají ztráty z důvodu předčasného odumírání listů a následného poškození kořenů. První příznaky tvoří malé tečky na listech o velikosti 1–3 mm. Onemocnění je způsobeno houbou *Cercospora carotae*, která produkuje hyalinní, vláknité spory (Koike et al., 2007).

Sklerotiniová hniloba je rozšířena po celém světě, nejvhodnější jsou pro ni podmínky mírného klimatu. Je způsobena hlízenkou hlíznatou (*Sclerotinia sclerotiorum*), má jedno z nejširších rozpětí hostitelských rostlin, od okrasných rostlin až po užitkovou zeleninu např. čeledi tykvovité (*Cucurbitaceae*), růžovité (*Rosaceae*) či kopřivovité (*Urticaceae*). K infekci rostlin dochází v průběhu vegetace, více se hniloba rozvíjí až v průběhu skladování, kdy šíření nákazy napomáhají špatně větrané prostory. Některé kmeny *Sclerotinia sclerotiorum* rostou již při 0 °C a ve skladech se podílejí na mokré hnilobě kořenů. Symptomy jsou měknutí části pletiva kořene, následuje měkká hniloba, na napadeném pletivu vyrůstá bílé vatovité mycelium. V něm se po několika dnech tvoří černající tvrdé útvary sklerocia (Mishra, 2005; Kazda et al., 2003).

Úrodu mrkve dále ohrožuje *Sclerotium rolfsii* způsobující tzv. bílou hnilobu. Infikované tkáně se mohou ukázat na i na jiných rostlinách z čeledi miříkovitých. Tento patogen způsobuje příznaky ve formě bělavého povrchového mycelia, v němž se vytvářejí kulovitá černá sklerocia (Koike et al., 2007).

Padlí *Erysiphe heraclei*, *Erysiphe umbelliferarum*, *Leveillula* postihují nadzemní části rostlin, mají podobu bělavých moučnatých povlaků, které se postupně zbarvují do špinavě hnědošedé barvy a způsobují deformace a kroucení listů. Napadené části rostlin jsou křehké a

špatně rostou. Jejich šíření podporuje velmi teplé, suché počasí v průběhu léta (Kazda et al., 2003).

Houbovitě onemocnění kořenomorka fialová se vyskytuje po celém světě. Je problémem v Evropě, na Novém Zélandu, v Tasmánii i v Severní Americe. Původcem choroby je houba *Helicobasidium purpureum*, případně její imperfektní stadium *Rhizoctonia violacea*. Označuje se jménem červená hniloba nebo fialová vločkovitost. Patogen ovlivňuje významné hospodářské plodiny, jako je cukrová řepa, okopaniny, chřest, mrkev, petržel, pastinák, celer. Napadené části jsou neprodejně, onemocnění způsobuje nepříjemnou chuť zeleniny. Symptomy se projevují během celého vegetačního období, nejvíce však na konci, ve formě horizontálních tmavohnědých lézí, které postupují k odumření vrcholu kořene. Na povrchu skvrn je viditelné uzlované mycelium fialové barvy (Dalton et al., 1981).

„Cavity spot“ je onemocnění mrkve, které se vyskytuje v Evropě, Austrálii a v USA. Může být napadeno až 10–20% sklizně. Onemocnění je způsobeno rodem *Pythium*. První příznaky jsou světle žluté skvrny na kořenu, které se rozšiřují do vodnatých dutin, a následně se připojí sekundární houbové patogeny s černými skvrnami např. *Pythium intermedium*, *P. sylvaticum*, *Fusarium* spp. a *Cylindrocarpon destructans*. Na petrželi se onemocnění ukazuje jako malé propadlé skvrny červenohnědé barvy. Napadení proniká několik milimetrů do kořene. Do petržele proniká hlouběji než do mrkve (Koike et al., 2007; ICBP, 2008).

2.1.3. Petržel zahradní kořenová (*Petroselinum crispum* convar. *radicosum*)

Petržel zahradní patří rovněž do čeledi miříkovitých. Existují varianty naťové a kořenové. Původně pochází z jihovýchodní Evropy, přední Asie. Jsou to jednoleté až dvouleté, popřípadě vytrvalé rostliny s lodyhou přímou, dutou. Listy jsou vonné, lesklé, dlouze řapíkaté. Plody jsou žabernaté dvounažky. Listové formy jsou méně náročné na pěstování, protože kořenové vyžadují slunce, humózní a vlhčí půdu, která se nehnojí chlévským hnojem. Vysoký obsah dusíku způsobuje špatnou skladovatelnost. V podmínkách mírné zimy bez problémů prezimuje (Bulánková, 2005).

Petržel obsahuje bioaktivní látky, v nati je 7 % silic, které podporují činnost ledvin, snižují krevní tlak a zlepšují funkci celého trávicího traktu. Dále jsou v kořeni vitamíny B, C, E a minerální prvky. Kyselina listová, obsažená v nadzemních částech rostliny, podporuje správnou tvorbu tkání a dělení buněk. Celkově účinkuje při prevenci onemocnění tlustého střeva, zpevňuje dásně při paradontóze, léčí chudokrevnost a má příznivý vliv na cholesterol (Al-Daraji et al., 2012).

Virózy

Mezi virová onemocnění petržele patří mozaikový virus celeru (*Apium virus Y*), dále byl zaznamenán virus mozaiky vojtěšky či virus žluté skvrnitosti pastináku. Mozaikový virus způsobuje žlutozelené mramorování a rostliny mohou zakrhnout. Nerozšiřuje se osivem, ale je přenášený mechanicky, zemědělskými postupy (Minchinton et al., 2006).

Petržel většinou trpí viry, které napadají celer. Mezi ně patří virus mozaiky okurky (*Cucumis virus 1*), západní mozaika celeru (*Apium virus 1*) a některé jeho kmeny, virus žloutenky astry (*Callistephus virus 1*) či Beta virus (Benada a Špaček, 1961).

Bakteriózy

Bakteriální skvrnitost listů u petržele a celeru má za následek bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *apii* a *Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola*. Zpočátku se objevují na okrajích listů malé vodnaté útvary, které hnědnou a během sucha mají papírovou texturu. K rozvoji dochází při vyšších teplotách i vlhkosti vzduchu. Skvrny se objevují na listech 7–10 dní po infekci (Bull et al., 2011; Minchinton et al., 2006).

Dalším rizikem je měkká hniloba *Erwinia* spp. a *Stenotrophomonas maltophilia* s prvotními příznaky vadnutí listů a stonků, které rychle postupují ke chlorotickým nebo tmavě hnědým skvrnám, které vytvářejí pásy o velikosti 2–5 mm (Engelhard, 1986).

Bacillus cereus je rozšířenou bakterií, která do rostliny vniká průduchy a vytváří v ní dutiny naplněné bakteriálním slizem. Symptomy jeho projevu jsou žlutavé skvrny na listech, které mají tmavší okraj a jsou ohraničeny listovými žilkami. Dosahují velikosti okolo 23 mm (Benada a Špaček, 1961).

Mykózy

Houbové onemocnění listů petržele způsobují druhy *Alternaria petroselini*, *A. selini* a *A. smyrna*. Infekce začíná jako černé skvrny na okrajích listů, postupně se skvrny rozšiřují po celém listu, nejnáchylnější jsou buď velmi mladé, nebo naopak velmi staré listy. Toto onemocnění je spojeno s vyšší teplotou okolo 28 °C a vlhkým počasím. Spory mohou být šířeny větrem, deštěm a manipulací. Existuje i možnost, že je onemocnění obsaženo přímo v semenech (Minchinton et al., 2006).

Šedá plíseň vzniká z *Botrytis cinerea*, hraje roli v posklizňové fázi. Její rozšíření je závislé na chladných deštivých podmínkách.

Padlí *Erysiphe heraclei* může poškodit i celer. Projevuje se jako světle žluté oblasti na horní části listu. V pokročilých stádiích dochází ke zhnědnutí lézí. Starší rostliny mají větší tendenci podlehnout padlí (Kazda et al., 2003).

Houby rodu *Fusarium*, spolu s *Pythium* a *Rhizoctonia*, často způsobují hnilobu v kořenové části, která pak trouchniví. Většinou přežívají v rostlinných zbytcích, plevelu nebo jako spory v půdě. Jejich schopnost vyvolat onemocnění závisí na mnoha faktorech, od vyšších teplot až po nízký obsah dusíku a fosforu, vysoký obsah draslíku s nízkým pH půdy či nízkou intenzitou světla.

Rez petrželová (*Puccinia rubiginosa*) je rozšířena po celé severní polokouli, ale její význam je nízký. Jejím výhradním hostitelem je petržel zahradní a vyznačuje se protáhlými, úzkými uredosporami a teleutosporami.

Septoriová skvrnitost listů petržele (*Septoria petroselini*) se vyskytuje na zvadlých listech, stoncích i semenech. Projevuje se zažloutnutím listů a vytvářením skvrn na okrajích. Na obou stranách listů se objevuje velké množství pyknid.

Stemphylium radicum se vyskytuje v Dánsku, Francii, Holandsku, Německu a má podobné symptomy jako napadení mrkve *Alternaria radicum* (Benada a Špaček, 1961).

2.1.4. Celer miřík (*Apium graveolens*)

Pochází z oblasti od Středozemního moře. Již v době před našim letopočtem ho lidé používali pro jeho léčebné účely, proti nachlazení, špatnému trávení, onemocnění jater a ledvin. Dnes jsou již prokázány jeho účinky v podobě spasmolytika, diuretika, antirevmatika, využívá se i při terapii artrózy, infekcí močových cest či k léčbě rakoviny. Obsahuje celou škálu vitamínů skupiny B i skupiny A, dále vitamín K a C, betakaroten, kyselinu listovou a minerální látky. Celer obsahuje i další látky – flavonoidy, terpenoidy, karotenoidy, saponiny. Lze využít jeho antimikrobiální, antioxidantní vlastnosti (Tůmová a Holcová, 2014).

Celer si v gastronomii získává větší oblíbenost, především v USA. Kalifornie se řadí mezi nejvýznamnější v produkci celeru, v roce 2005 činila výměra 25 400 ha plochy, k porovnání v roce 2014 se v České republice sklídilo 306 ha plochy (Horáková, 2015; Gaugovish, 2008).

Existují různé druhy celeru: řapíkatý, z kterého se využívá nadzemní část, listový a hlíznatý (bulvový, kořenový), kde se zpracovávají jak listy, tak i podzemní část rostliny tzv. bulvy. Pro hlíznatý celer je vhodnější těžší půda, řapíkatému a listovému celeru vyhovují lehčí půdy. Optimální pH je 6,5–7,5.

Celer má poměrně dlouhé vegetační období a tím se vystavuje nesčetnému množství patogenů, díky nimž vznikají významné kvalitativní i kvantitativní ztráty. Je to dvouletá rostlina, ale může dokončit svůj životní cyklus v jednom roce. Květenství je okolík. Celer má vysoké požadavky na živiny, zejména dusík. Výživové vstupy jsou okolo 300 kg dusíku, 75 kg fosforu a 250 kg draslíku na hektar. Pro pěstování celeru jsou nejvhodnější hlinité, středně těžké půdy, které mají vysoký obsah organické hmoty a také vápníku (Raid, 2004; Pekárková, 2004).

Virózy

Celer může trpět pukáním řapíků či srdečkovou chorobou, to je však důsledek nedostatku boru. Západní mozaika celeru, *Apium virus 1*, byla na našem území zjištěna v roce 1954. V některých oblastech Kalifornie způsobila až 50 % škod na sklizni, průměrně jsou však škody 16 %. Příznaky se objevují v rozmezí 9–16 dnů od momentu nakažení. Celer zaostává v růstu, zakrňují lístky a vznikají žlutozelené skvrny. Listové úkrojky jsou zúžené, pokrivené a zvlněné, na řapících vznikají podélné bílé pruhy. Existuje též jižní mozaika celeru, *Cucumis virus 1*, která se odlišuje tím, že nevytváří na listových čepelích rezavě zbarvené nekrotické skvrny (Benada a Špaček, 1961).

Mnoho chorob se vyskytuje pouze na území USA. Mezi ně patří kaliová mozaika celeru, *Apium virus 2*, která se projevuje jako žluté partie na listech, které se zvrásňují a kroutí. Podobné příznaky má též žloutenka celeru či kroužkovitá skvrnitost celeru (Benada a Špaček, 1961).

Mykózy

Mezi hlavní choroby celeru patří houbovitě onemocnění septoriová skvrnitost listů a strupovitost bulev.

U strupovitosti celerových bulev, způsobené bodkou celerovou (*Phoma apiicola*), jsou hlavní znaky šedohnědé okrouhlé skvrny na povrchu kořene. Pletivo v místě napadení měkne, trouchniví a praská. Takto napadené bulvy jsou drobnější a deformované. Následuje prasknutí a vznik rezavě hnědých stroupků. Nekrózy se zvětšují s růstem bulvy, pletivo v místě praská a listy zasychají. Takto napadený celer v průběhu skladování snadno podléhá dalším rizikům. U tohoto onemocnění existuje latentní forma, tedy že houba vnikne do hostitele a až poté, co se změní vnější podmínky ve prospěch parazita, se objeví symptomy onemocnění (Kazda et al., 2003).

Septorióza celeru (*Septoria apiicola*) se projevuje v červenci a může napadnout jakoukoliv nadzemní část rostliny. Nejčastěji se objevuje na starších listech jako šedavé skvrny se žlutým okrajem. Na napadeném pletivu proniká až do 0,5–2 cm hloubky. Při silném napadení dochází k odumírání listů, občas i celé natě, tomu napomáhá vysoká vlhkost a teplota nad 15 °C. Existují dvě formy choroby: maloskvrná a velkoskvrná, která je méně škodlivá a vyskytuje se převážně v zemích se subtropickým podnebím (Benada a Špaček, 1961; Kazda et al., 2003; Phillips, 2005).

Další ztráty způsobuje cercosporiíza celeru (*Cercospora apii*). U nás se vyskytuje pouze ojediněle, více poškozuje rostliny v USA. Choroba je přenosná osivem a parazit se může udržet též na zbytcích infikovaných rostlin v půdě. Po obou stranách listu se tvoří kruhovitě světle hnědé skvrny o velikosti 4–6 mm. Za vlhkých podmínek tmavý střed starých skvrn šedne, protože se v něm tvoří povlak s konidii (Chorin et al., 1954).

Rez celerová (*Puccinia apii*) má kosmopolitní výskyt. Od května se objevují na spodní části čepele listu na žlutavých skvrnách malé okrouhlé skupinky aecidií. Některé odrůdy jsou k chorobě náchylnější – např. ve Francii Pascal Plein blanc. Naopak některé jsou vůči rzi imunní – např. v Kanadě je za imunní považována odrůda Golden self-blanching (Benada a Špaček, 1961).

2.2. Přírodní látky v ochraně rostlin

Předchozí část se zabývala vybranými rostlinnými produkty a chorobami, kterými trpí. V následující části by měli být objasněny účinky a vlastnosti látek, které by mohly být řešením pro předchozí zmiňované problémy zeleniny. Popisované látky mají velkou škálu působení. V této práci byly některé z nich aplikované na kořenovou zeleninu, která byla napadena hnilobou, a následně byl zkoumán vliv působení.

Pojem přírodní aktivní látky označuje sekundární metabolity. Jedná se o látky, které mají poměrně ohraničený taxonomický výskyt, pro jejich tvorbu jsou nutné specifické podmínky a jsou součástí systému napomáhajícího rostlině přežít. Využitelné látky, jako jsou silice, pryskyřice či alkaloidy, pocházejí z rostlin semenných (*Spermatophyta*), pod které spadají nahosemenné (*Gymnosasperma*) a rovněž i z rostlin krytosemenných (*Angiosperperae*). Pro člověka je významný jejich fyziologický účinek, pro který se využívají jako léčiva (Suchý, 1988).

Antimikrobiální látky zahrnují například alkaloidy, fenolické látky, terpeny či neobvyklé cukry. Tyto látky u některých rostlin a rostlinných výtažků ukázaly vysoký

potenciál v prevenci rozkladu ovoce, které bylo zapříčiněno houbami (Antunes a Cavaco, 2010).

2.2.1. Silice

Silice, intenzivně vonící směsi rostlinných látek, jsou olejovité konzistence, ve vodě nerozpustné, většinou bezbarvé a snadno oxidovatelné, pryskyřičnatí a tmavnou. Bez extrémních teplot jsou zpravidla tekuté. Jsou opticky aktivní a mají vysoký index lomu, daný přítomností nenasycených látek s dvojnými a trojnými vazbami. Nazývají se též přírodní éterické nebo esenciální oleje. Obsahují složité směsi sekundárních metabolitů, které jsou biologicky aktivní s antimikrobiálními, alelopatickými, antioxidačními a bioregulačními vlastnostmi (Suchý, 1988).

Silice jsou tvořeny terpeny, zejména monoterpenickými uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony, fenoly, estery, ethery, které mohou být v různém poměru. Terpeny jsou organické sloučeniny, které jsou důležitou součástí silic a jejichž molekuly se skládají ze dvou či více isoprenových jednotek. Mezi monocyklické uhlovodíky patří limonen (citrusy), α -terpinen (koriandr), α -felandren (eukalyptus). Dále jsou bicyklické monoterpeny, např. pinen (jehličnaté rostliny), někdy se vyskytují i acyklické monoterpeny – ocimen, a bicyklické seskviterpeny – kadinen, či monocyklické – zingiberen (zázvor). Alkoholy se v silicích vyskytují jako acyklické (linalool), monocyklické (mentol) a bicyklické monoterpeny a seskviterpeny. V silicích jsou acyklické aldehydy, kam patří monoterpeny citral, citronellal. Cyklické aldehydy jsou benzaldehyd, skořicový aldehyd, vanilin. Ketony jsou buď monocyklické monoterpeny – menthon (máta peprná), karvon (kmín), piperiton (eukalyptus), nebo bicyklické – kafr, thujon nebo neterpenické – iron (kosatec). Fenoly se v silicích vyskytují přirozeně nebo se tvoří při destruktivní destilaci. K nejdůležitějším přírodním fenolům patří eugenol, tymol a karvakrol. Oxidy se vyskytují v eukalyptové silici či v merlíkové silici. Estery jsou nejčastěji octany terpineolu, borneolu nebo geraniolu. Patří sem také isothiokyanatany uvolňované z thioglykosidů a salicylan methylnatý (Suchý, 1988; Bacilková a Paulusová, 2012).

Je několik technologických způsobů získávání přírodních aromatických látek z rostlinných surovin. Jeden z nejstarších postupů je extrakce, při které se látky absorbují na tuk, do oleje nebo se pro oddělení používají nepolární rozpouštědla. Nejčastěji se používá destilace. Vonné látky jsou během ní parou unášeny do horní části kolony a chladiče, kde spolu s vodou kondenzují, silice jsou poté z vodní hladiny odděleny a vysušeny. Lisování je extrakční metoda používaná pro získání silic z čerstvé ovocné kůry. Ta se nejprve oddělí od

plodu a poté se na dřevěných lisech lisuje za studena pod proudem vody. Vzniká emulze, z níž se odstředěním získává silice (Trepková a Vonášek, 1997).

Výskyt

Silice jsou v některých rostlinách obsaženy více než v jiných. Mezi čeledi s vysokým obsahem těchto látek se řadí borovicovité (*Pinaceae*), zázvorníkovité (*Zingiberaceae*), vavřínovité (*Lauraceae*), routovité (*Rutaceae*), myrtovité (*Myrtaceae*) či hluchavkovité (*Lamiaceae*). V tvorbě i ukládání silic se mohou jednotlivé čeledi od sebe lišit. Mohou se vytvářet v protoplazmě, rozpadem buněčných blan nebo hydrolyzou určitých glykosidů. Mohou být v rostlině uloženy formou žláznatých trichomů, siličných kanálků či mohou tvořit siličné buňky. Ukládají se v pletivu nebo se koncentrují v určitých orgánech, v kůře a listech, v oplodí nebo květech (Trepková a Vonášek, 1997).

Účinky

Lazar a kol. (2010) uvádí, že se prokázalo široké spektrum aktivity silic proti rostlinným patogenům, zejména proti těm, které odpovídají za posklizňové nemoci. Obecně platí, že silice jsou považovány za bezpečné jak pro životní prostředí, tak pro lidské zdraví i ošetření potravinářských komodit. Při dodržení správných podmínek se v mnoha případech ukázalo zvýšení doby použitelnosti a zlepšení kvality výrobků. Silice se také projeví jako potenciální alternativní fungicid. Například silice mateřídoušky úzkolisté (*Thymus serpyllum*), bohatá na tymol, karvakrol, je velmi účinným fumigantem proti zrnokazu fazolovému (*Acanthoscelides obsoletus*).

Autoři článku Lazar a kol. (2010) také uvádí, že u testovaných výtažků silic se ukázala častěji fungistatická než fungicidní aktivita. Antimykotická aktivita byla spojena s fenolickými sloučeninami. Konkrétně cinnamaldehydem v silici skořicové, eugenolem v hřebíčkové silici a citralem, a terpinen-4-olem v tea tree. Ukázalo se, že tymol a karvakrol byly účinné v inhibici hnědé hniloby způsobené kloubnatičkou jabloňovou (*Monilinia fructicola*) na třešni ptačí (*Prunus avium L.*) pomocí fumigace (Antunes a Cavaco, 2010; Lazar et al., 2010).

Antifungální aktivita silic proti posklizňovým patogenům se testovala v *in vitro* podmínkách v plynné fázi v rámci studie Laird a Philips (2012). Přestože sloučeniny mohou vykazovat silnou antifungální aktivitu *in vitro*, při aplikaci *in vivo* se mohou značně lišit. Příklad protichůdných výsledků se týká například růstu *Alternaria alternata*, kdy v podmínkách *in vitro* byla zcela eliminována tymiánovou silicí, ale při aplikaci na cherry

rajčatech se pouze snížil její růst. Podobné výsledky se ukázaly i při testování citrusové silice. Působení silic může být ovlivněno virulencí, množstvím inokula houbového patogenu, druhem, citlivostí, kmenem, pH média, inkubací.

Antifungální účinky plynné fáze silic skořice, hřebíčku, bazalky a zázvoru fungovaly proti *Aspergillus flavus* a *Penicillium islandicum*. Látky z tymiánu, šalvěje a muškátového oříšku byly aktivní proti *Aspergillus* sp. z klinických izolátů, a zároveň i proti přírodním izolátům *Penicillium* sp. Plynná fáze máty peprné (*Mentha piperita*) zcela inhibovala růst mnoha hub a kvasinek včetně opět *Aspergillus* sp. a *Penicillium* sp. a to pomocí difúzní metody a „kill-time“ testu (Laird a Philips, 2012).

Laird a Phillips (2012) dospěli k závěru, že silice v plynné fázi jsou antimikrobiálně účinnější než v kapalné fázi. Je to způsobeno přítomností lipofilních molekul ve vodné fázi, ty se přidružují k vytvoření micel, a tím je potlačen kontakt silic s mikroorganismem. To se ukázalo i ve studii Božíka a kol. (2017), že plynná fáze silic je účinná i antifungálně. Testovalo se konkrétně proti *Aspergillus* spp. na ovsu (Božík et al., 2016).

Hlavní nevýhodou použití silic v kapalné fázi je, že antimikrobiální látky jsou účinnější při zkouškách v laboratorních podmínkách než při testování v potravinách, kde je zapotřebí jejich vyšší koncentrace k dosažení stejného efektu. Je potřeba větší množství látky, takže ošetření je dražší a přímý kontakt zvyšuje riziko zhoršení sensorických vlastností (Lazar et al., 2010; Laird a Philips, 2012).

Účinek par silic se projevil také proti pěti humánním patogenům, které se často vyskytují v potravinách – *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Při použití diskového difúzního testu dosáhly nejlepších výsledků látky křenu selského (*Armoracia rusticana*). Dobré výsledky vyšly u máty rolní (*Mentha piperita*) a voňatky citronové (*Cymbopogon citratus*), které jsou účinné proti *Pseudomonas fluorescens* a snižují životaschopnost buněk až o 80 %. Pára máty rolní vykazuje aktivitu proti širokému spektru bakterií, inhibiční zóny pro *Pseudomonas fluorescens* se pohybují kolem 22 mm a pro *Bacillus subtilis* 35 mm. Antimikrobiální aktivita směsí v plynné fázi se projevuje antagonistickým nebo synergickým účinkem, což se posuzuje podle inhibiční koncentrace. Například u kombinace látek skořice a hřebíčku se antagonistický účinek projevuje proti *E. coli*, ale synergický účinek má směs na *Listeria monocytogenes* a *Yersinia enterocolitica* (Laird a Philips, 2012).

Tymián obecný (*Thymus vulgaris*) a dobromysl obecná (*Origanum vulgare*)

Tymián obecný, neboli mateřídouška, i dobromysl obecná patří do čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). Tymol a karvakrol jsou dva významné fenolové monoterpeny, které jsou součástí silic. Obě sloučeniny jsou synteticky dostupné, většinou jsou však používány silice s jejich originálním obsahem, protože další terpeny rozšiřují jejich účinek. Obě sloučeniny se získávají především z nadzemních částí rostlin. V poslední době se v zemědělství upřednostňuje dobromysl obecná, protože její pěstování je výhodnější než pěstování tymiánu. Nať z dobromysle se používá zejména jako koření – pod názvem oregano. Tymián má též i léčivé účinky, působí proti zažívacím problémům, nachlazení či jako diuretikum.

V oblasti Sardinie roste místní druh tymiánu, jehož silici tvoří ze 73–75,4 % karvakrol a 1 % tymolu. Účinek této silice byl prokázán na gram pozitivní bakterie *in vitro*, kde minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla 0,125–0,500 mg/ml a u hub MIC 0,125–0,500 mg/ml. Proběhla také studie s dobromyslí a kvasinkou *Candida albicans*, kde silice zcela inhibovala růst *in vitro* při koncentraci 0,25 mg/ml. Obě rostliny mají velký potenciál díky svým antiseptickým a konzervačním vlastnostem (Charai et al., 1996).

Skořicovník (*Cinnamomum*)

Tyto stromovité a keřovité rostliny patří do čeledi vavřínovitých (*Lauraceae*). Skořice se zpracovává z kůry skořicovníku čínského (*Cinnamomum cassia*), využívá se i skořicovník cejlonský (*Cinnamomum zeylanicum*). Typická nasládlá chuť a vůně pochází z cinnamaldehydu, což je sloučenina obsažená v silici. Obsah silice ve skořici je 5-6 % a většina antimikrobiálních složek koření jsou fenolové sloučeniny obsahující OH-skupinu, která pravděpodobně zodpovídá za antimikrobiální účinek (Cwíková et al., 2010).

Silice, která obsahuje 90 % aldehydu, působí proti bakteriím rodu *Streptococcus*, *Staphylococcus* ve zředěných koncentracích 1:40 000, 1:1 600, 1:24 000. Je účinná také proti bakteriím rodu *Vibrio* v koncentraci 1:8 000 až 1:16 000, dále zeslabuje růst *Elberthella thyposa*, *Neisseria* spp., *E. coli*, *Oidium albicans*. Cinnamaldehyd navozuje úbytek zásob ATP v buňkách *Saccharomyces cerevisiae*, způsobuje ireverzibilní únik metabolitů a enzymů přes cytoplazmatickou membránu, což vysvětluje fungicidní efekt. Ukázalo se, že přidavek dimethylsulfoxidu ke skořicové silici v dávce 10–150 mg/ml zvyšuje až 50× její antimikrobiální aktivitu. Silice může být použita jako přírodní antimikrobiální aditivum do některých potravinářských výrobků. Skořice také podporuje trávení a působí jako tonikum (Hili et al., 1997; Arndt, 2005).

Lípie sladká (*Phyla dulcis*)

Lípie sladká (*Phyla dulcis*) je rostlina známá ve Střední Americe, kde se hojně využívá jako sladidlo. U silně aromatických listů rostliny se projevuje antimikrobiální aktivita. Opletal a Skřivanová (2010) uvádí, že nepolární hexanový extrakt je antimikrobiálně nejúčinnější, a proto se z něj separuje účinná látka karvakrol. Jako antimikrobiální látka byl karvakrol účinný v kombinaci s kyselinou skořicovou na čerstvých řezech melounu a plodů kiwi. Karvakrol také snižoval růst bakterie *Bacillus cereus* v potravinách. Protože má tento terpen ve vyšších koncentracích výraznou chuť a vůni, byl použit v nižší dávce. Bohužel *Bacillus cereus* se dokáže adaptovat na karvakrol, proto byl k němu úspěšně přidán cymen, který je významnou sloučeninou tymiánové silice. Je-li látka přidána v nižší než MIC dávce, riziko tvorby toxinu je nižší. Tomuto procesu lze zabránit tím, že se nepoužije jen čistá látka, ale např. silice, která je kombinací dvou či několika antimikrobiálních sloučenin (Opletal a Skřivanová, 2010).

Hřebíček (*Syzygium aromaticum*)

Hřebíčkovce kořený (*Syzygium aromaticum*, syn. *Eugenia caryophyllata*) je strom z čeledi myrtovitých (*Myrtaceae*), který pochází z tropických oblastí. Nejvíce aromatických látek obsahují jeho květní pupata, která se po vysušení využívají jako koření. Hřebíček obsahuje okolo 20 % silice, jejíž hlavní složkou je fenolická látka eugenol, dále eukalyptol, karyofylen, tymol, cinnamaldehyd a různé taniny. Eugenol je čirá světle žlutá olejovitá kapalina, která se díky svým antiseptickým, analgetickým, antibakteriálním a antioxidačním vlastnostem využívá v medicíně, v zubním lékařství a v potravinářství. Používá se proti ústním bakteriím, které způsobují zubní kaz a dále proti organismům patogenním pro lidské tělo, jako je *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Fusarium culmorum* a *Aspergillus carbonarius*. Biologická aktivita hřebíčkové silice se zkoumala na mnoha mikroorganismech včetně Herpes viru a viru hepatitidy C (Chaieb et al., 2007; Kennouche, 2015).

Hřebíčková silice obsahuje monoterpeny schopné zasahovat do metabolismu mediátorů zánětu. Používá se k lokální aplikaci pro úlevu od bolesti, pro podporu hojení při pohybových problémech. Látky se vstřebávají přes kůži v závislosti na velikosti aplikační plochy, době působení a koncentraci, a tak mohou působit místně i systémově (Jirásek, 2010).

Saturejka (*Satureja*)

Saturejka je středomořská rostlina z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). Rod saturejka zahrnuje druhy saturejka horská (*Satureja montana*), saturejka zahradní (*Satureja hortensis*) či *Satureja abyssinica*. *S. hortensis* je jednoletá rostlina vysoká 10–35 cm. Tato aromatická bylina má fialové nebo bílé květy. Nadzemní části některých druhů se používají v potravinářství jako čaj nebo přísada v kořenících směsích. Dále se používá například v Turecku v lidové medicíně pro léčbu různých infekčních chorob, křečí, bolesti svalů, nevolnosti a špatného trávení (Adiguzel et al., 2007).

Pomocí difúzních diskových testů byla testována antimikrobiální účinnost extraktů z této rostliny proti několika kmenům bakterií, izolátů kvasinek a hub. Výsledky ukázaly, že hexanový extrakt neměl antimykotický efekt, ale měl antibakteriální účinnost proti několika druhům *Bacillus*. Oproti tomu metanolový extrakt byl účinný proti *Candida albicans* a zároveň působil i antibakteriálně (Sahin et al., 2003).

Česnek kuchyňský (*Allium sativum* L.)

U česneku kuchyňského (*Allium sativum* L.), který se řadí do čeledi amarylkovitých (*Amaryllidaceae*), je dokázáno několik léčivých vlastností, některé z nich už v roce 1800 zdokumentoval Louis Pasteur. Silice, která je v zastoupení 0,2 %, se skládá z alicinu, citralu, geraniolu, linaloolu, α -felandrenu. Způsob zpracování pro farmaceutické účely ovlivňuje zastoupení účinných látek. Při drcení se uvolňuje okolo sto sirných sloučenin. Stroužky obsahují aliin, při mechanickém porušení se uvolňuje enzym alináza, který přeměňuje aliin na alicin. Ten se považuje za nejdůležitější biologicky aktivní komponent a je odpovědný za typickou vůni česneku. Spojením dvou molekul alicinu s disulfidovou vazbou vzniká ajoen s potenciálním antibiotickým účinkem (Tůmová a Jirásek, 2011).

Mezi další významné účinky česneku patří chemoprotektivní a antihyperglykemický efekt. Česnek také stejně jako cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.) ovlivňuje metabolismus eikosanoidů, což dává možnost k ovlivnění kardiovaskulárních onemocnění. Látky obsažené v česneku mají účinek antibakteriální, antivirový, antifugální a antiprotozoální. Organosírná sloučenina izolovaná z olejového macerátu byla identifikována jako iso-E-10-devinylajoen. Tato sloučenina působí proti grampozitivním bakteriím např. *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a kvasinkám. Látka je ve svých účincích slabší než E-ajoen a Z-ajoen, které vznikají při mechanickém rozdrcení cibule. Z těchto výsledků bylo vyvozeno, že trans izomerie a poloha dvojná vazba u iso E-10-devinylajoenu snižují antimikrobiální aktivitu. Surový extrakt z česneku je však silnější v potlačení růstu gramnegativních bakterií

než grampozitivních. Tento extrakt také tlumí růst kvasinek. Celkově lze konstatovat, že antimikrobiální aktivita sumárních extraktů z hlíz česneku vůči patogenním organismům je poměrně vysoká. Vzhledem k organoleptickým vlastnostem extraktu česneku je však využití v ochraně potravin složitější (Opletal a Skřivanová, 2010).

Blahovičnick (*Eucalyptus*)

Do rodu blahovičnick (*Eucalyptus*) se řadí více než 300 druhů rostlin. Rostliny pochází z Austrálie a mohou dorůstat až do výšky 100 m. Jsou schopné růst i v mírném podnebném pásu, kde neklesá teplota pod -5 °C. V Evropě se tyto tropické keře a stromy začaly pěstovat v 19. století. Daří se jim převážně v horských oblastech s dobře propustnou půdou a přímým slunečním světlem. Mají vypracovaný systém příjmu vody, rostou i v drsných suchých podmínkách a jsou schopné odebírat vodu i jiným rostlinám (Harding, 2009).

Silice zástupců rodu *Eucalyptus* jsou bohaté na sloučeninu 1,8-cineol. V podmínkách *in vitro* je výrazný antimikrobiální účinek vůči *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a zvláště vůči *Mycobacterium avium*. Také inhibují růst *Aspergillus aegyptus*, *Penicillium cyclopium*, *Trichoderma viride*, působí fungicidně vůči *Candida tropicalis*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium digitatum*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Cryptococcus rhodopenhansi*, *Saccharomyces cerevisiae* či *Mucor mucedo*. Kromě antimikrobiálního účinku tlumí i syntézu prostaglandinů, z čehož vyplývá antiflogistický efekt (Opletal a Šimerda, 2005).

Silicné drogy se mohou používat pro kontrolu příznaků respiračních infekcí. Tradiční využití v terapii si v současnosti udržela eukalyptová silice (*Eucalypti aetheroleum*). Při inhalování působí přímo na bronchiální sliznici a má spazmolytický, antiseptický a antiflogistický účinek. U potenciálních alergiků se namísto blahovičnickové silice upřednostňuje samostatný cineol (Jirásek, 2012).

Fenykl obecný (*Foeniculum vulgare*)

Tato dvouletá rostlina, která se vzhledově podobá kopru, patří do čeledi miříkovitých (*Apiaceae*). Obsahuje ftalidy, polyacetylény a kuramín, které mají protikarcinogenní účinek a vykazují antimikrobiální aktivitu. Jeho semena podporují chuť k jídlu a zklidňují žaludeční potíže. Jsou dva druhy fenyklu: sladký a hořký. Záleží na poměru fenchonu, který je hořký, a trans-anetholu, jenž je sladký. Podle převažující látky se určí sladkost či hořkost fenyklu (Kaur et Arora, 2009).

Odborníci se zaměřili na dva druhy fenyklu ze dvou míst v Itálii. Po testování silice z *Foeniculum vulgare Miller* zjistili velmi podobné chemické profily. Silice z oblasti Patii obsahovala 8,06 % fenchonu a z oblasti Palagonie 8,67 %, trans-anethol byl v zastoupení 0,09 % z Patii a 0,11 % z Palagonie. Obě silice inhibovaly nejlépe *Brevibacterium linens*, *Clostridium perfringens*, *Leuconostoc cremoris* a *Staphylococcus aureus*. Naopak se neprojevily proti *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Serratia marcescens* (Ruberto et al., 2000).

Kajeput střídavolistý (*Melaleuca alternifolia*)

Z kajeputu střídavolistého (*Melaleuca alternifolia*), který pochází z Austrálie a Nového Zélandu, se získávají látky, které se souhrnně označují jako tea tree. Kajeput střídavolistý patří do čeledi myrtovitých (*Myrtaceae*). Rod *Melaleuce* poskytuje několik významných léčivých látek, především ve formě silic. Pro terapeutické účely je nejdůležitější *Melaleuceae aetheroleum*. Silice obsahuje zhruba 100 terpenických látek a podle hlavních sloučenin se odvozují další sloučeniny, např. čteně se vyskytující chemotyp terpinen-4-ol, který obsahuje terpinen-4-olu 40,1 %, γ -terpinenu 23 %, α -terpinenu 10,4 %, 1,8-cineolu 5,1 %, terpinolenu 3,1 %, p-cymenu 2,9 %, α -pinenu 2,6 %, α -terpineolu 2,4 %, δ -kadinenu 1,3 %, limonenu 1 % a viridiflorenu 1 % (Opletal a Skřivanová, 2010).

Silice mají penetrační vlastnosti, jsou rozpustné v tucích a vykazují baktericidní a fungicidní účinek. Silicím z tea tree se věnovaly studie, které je testovaly proti třem klinicky významným mikroorganismům, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans*, a zjistilo se, že MIC byla 0,25 % (v/v) proti *E. coli* i *Staphylococcus aureus*, u *Candida albicans* činila MIC 0,125 % (v/v). Jejich pozorování potvrdilo aktivitu silic, které dokážou narušit permeabilitu membránových struktur mikroorganismů (Lis-Balchin et al., 2000).

Pozornost se věnuje i dalším zástupcům čeledi *Myrtaceae*, například složení silic rostlin balmín metlatý – Manuka (*Leptospermum scoparium*) a bílý čajovníkový strom – Kanuka (*Kunzea ericoides*). Monoterpenový profil těchto silic se od sebe liší svými chemovary, což jsou rozdíly způsobené různými podmínkami pro kultivaci. Přitom bylo zjištěno, že nejvyšší antimikrobiální aktivitu má silice pocházející z chemovaru East Cape na Novém Zélandu. Lis-Balchin a kol. (2000) experimentovali s těmito třemi silicemi, australskou tea tree (*Melaleuca alternifolia*) a s novozélandskou Manukou a Kanukou, a jejich účinky na hladkou svalovinu. Manuka měla spasmolytický účinek, zatímco ostatní dvě rostliny měly spasmogenní účinek. Dále v rámci antimikrobiální aktivity poukazují na to, že větší rozdíly jsou mezi rostlinami Manukou a Kanukou. Kanuka projevuje nízkou antifugální

aktivitu, ale naopak má skvělou antimikrobiální aktivitu. Manuka je vysoce antifugální, ne však do té míry jako *Melaleuca*. Vzorky silice Manuka byly ve své antioxidační aktivitě mnohem konzistentnější než vzorky Kanuka. *Melaleuca* je bez antioxidační aktivity. Tyto výsledky ukazují, že uvedené silice mají rozdílné aktivity (Cox et al., 1999; Lis-Balchin et al., 2000).

Bazalka pravá (*Ocimum basilicum*)

Jednoletá rostlina bazalka pravá (*Ocimum basilicum*) je z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*) a pochází z Asie. V jejích listech je obsažena silice, která představuje častou komoditu v léčitelství. Obsah silice je ovlivněn ročním obdobím, pohybuje se v rozmezí od 0,5 % do 0,8 %. Vyšší obsah je v zimním období, nižší v létě. Nejvíce zastoupená složka v silici je linalool, pohybující se od 56,7 až do 60,6 %. Následují α -cadinol (8,6–11,4 %), α -bergamoten a γ -kadin (Adiguzel et al., 2005; Hussain et al., 2007)

Výzkum potvrdil dobrou aktivitu proti bakteriálním kmenům *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pasteurella multocida* a patogenním houbám *Aspergillus niger*, *Mucor mucedo*, *Fusarium solani*, *Botryodiplodia theobromae*. Působí tedy proti gram pozitivním a gram negativním bakteriím, kvasinkám a houbám, které jsou běžnými patogeny přenášenými potravou. U bazalkové silice se potvrdila antimikrobiální aktivita proti uvedeným mikroorganismům, kromě *Flavimonas oryzihabitans* a *Pseudomonas* sp. Například silice bazalky anýzové odrůdy ukázala inhibiční efekt i vůči *Lactobacillus curvatus* a *Saccharomyces cerevisiae* (Hussain et al., 2007).

Bazalka pravá se hojně používá při léčbě křečů, žaludečních nevolností či kožních onemocnění. Dále se v lidovém léčitelství také aplikuje při horečkách, migrénách, nespavosti, depresích či hadím kousnutí (Adiguzel et al., 2005).

Pelargonie (*Pelargonium*)

U rodu *Pelargonium*, patřícím do čeledi kakostovitých (*Geraniaceae*), převažují ve složení různé typy tríslovin nebo jednoduché fenolové látky. Některé druhy *Pelargonium* by mohly být využity jako antimikrobiální prostředek při výrobě potravin, dále je jejich využití v oblasti parfumerie či barvířství.

Účinek silic a hydrodestilátů byl pozorován v médiu z brokolicového homogenátu (při koncentraci silice 1000 ppm) proti *Enterobacter aerogenes* a *Staphylococcus aureus*. Kompletní inhibice *Staphylococcus aureus* nastala v případě použití silice z pelargonie vonné (*Pelargonium graveolens*) z odrůd Sweet Mimosa, Royle Oak, Clorinda, Mabel Gray, u té byl

efekt nejvýraznější, a to i vůči *Enterobacter aerogenes*. Ukázalo se, že odpovídající hydrosoly, voda nasycená silicí, jsou bez jakéhokoliv významnějšího efektu (Lis-Balchin et al., 2002).

Rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis*)

Rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis*) je z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). V listech má silici v obsahu 1,0–2,5 %, jejími hlavními komponenty jsou kafr, 1, 8-cineol a α -pinen. Kromě monoterpenů obsahuje nať diterpenové fenolové látky, kyselinu karnosolovou, karnosol, rosmanol a řadu jejich derivátů. Z derivátů kyseliny skořicové jsou klasicky přítomny depsidy kyseliny kávové (až 8,4 % kyseliny rosmarinové v sušině listů).

Účinek zmíněné silice je poměrně silný proti řadě různých bakterií, kvasinek i proti mikromycetám. Biologická aktivita nespočívá jen v síle silice, ale ve všech obsahových látkách. Nejaktivnější je alkoholový extrakt. Účinek byl demonstrován na kyselině rosmové a rosmanolových derivátech, které jsou účinné proti *Streptomyces scabiei*. Je pravděpodobné, že právě díky diterpenům působí tak dobře antimikrobiálně. Sumární alkoholový extrakt z listů, který se používá jako potravní antioxidant do tuků, byl účinný proti *Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus muntans*, *Bacillus cereus*. Běžně se rozmarýn používá jako koření, ale narůstá i jeho využití ve farmaceutické a potravinářské oblasti (Opletal a Skřivanová, 2010).

2.3. Testy *in vitro*

V posledních letech narostl zájem o získávání biologicky aktivních látek z přírodních zdrojů. Z hlediska chemické struktury představují biologicky aktivní látky izolované z přírodních zdrojů velké rozmezí sloučenin – např. alkaloidy, isoprenoidy, steroidy, glykosidy, peptidy, eikosanoidy, polysacharidy a mnohé další. Stejně pestrý je výčet jejich biologických účinků a možností jejich vyhledávání. Takzvaný screening se rozděluje na chemický a biologický.

Chemický je založen na vyhledávání již známých chemických struktur se známou biologickou aktivitou. Biologický se rozlišuje na dva základní typy testů. První je metoda *in vivo*, která odráží celkovou bioaktivitu včetně biotransformací. Pozorovaný objekt se zkoumá přímo v přirozených podmínkách, tedy v orgánech, pletivech či buňkách. Druhá metoda je založena na interakci s tzv. rozpoznávacím elementem a nazývá se *in vitro*. Sem patří imunologické testy, kde protilátka produkovaná živočišnými buňkami slouží jako imunologická obrana organismu na danou látku. Dále to jsou receptorové testy, enzymatické a

buněčné testy pracující na celkové biologické odezvě buněk na určitou látku (Kopecký, 2006).

Antimikrobiální účinek par silic se obvykle posuzuje pomocí *in vitro* metod. Jedna z nich je difúzní disková metoda, kde jsou látky napuštěné do filtračního disku umístěného na Petriho misku a následně se porovnává vzniklá inhibiční zóna s referenčními hodnotami. Tato metoda patří k častým způsobům stanovení antibiotické citlivosti či vyšetřování většiny bakteriálních patogenů (Eucast, 2014).

Další způsob je diluční metoda, která se užívá ke stanovení minimální baktericidní koncentrace nebo minimální inhibiční koncentrace. Minimální inhibiční koncentrace je definována jako nejnižší antimikrobiální koncentrace, při které se inhibuje viditelný růst bakterií po inkubaci po stanovenou dobu. Minimální baktericidní koncentrací je koncentrace látky, která usmrcuje mikroorganismy. Jsou dvě možnosti provedení: buď makrodiluční metoda ve zkumavkách s testovaným větším objemem, nebo mikrodiluční pomocí mikrotitračních destiček. Testy mohou probíhat buď v bujónu, či v agaru. S kultivačním médiem a odstupňovanou koncentrací antimikrobiální látky se inokuluje testovaný mikroorganismus. Po proběhlé inkubaci se zjišťuje nejnižší koncentrace antibakteriální látky, která zabránila růstu testovaného mikroorganismu v kultivačním médiu. Tato bujónová diluční metoda se v praxi nejčastěji využívá v mikrodilučním provedení. Agarová diluční metoda se užívá jako referenční a slouží k hodnocení nových antimikrobiálních látek. Její výhodou je přesnost, která je však na úkor pracnosti a finanční náročnosti. Antibiotikum se v odstupňované koncentraci přidává do agarové půdy, která se následně nalije do Petriho misek. Inokula vyšetřovaných mikroorganismů jsou nanášena na povrch agarových médií s antibiotiky. Po proběhlé inkubaci sledujeme růst mikroorganismů na jednotlivých agarových médiích. Miska s nejnižší koncentrací antimikrobiální látky, která zabránila růstu, odpovídá minimální inhibiční koncentraci (Urbášková, 1998; Andrews, 2001; Nostro et al., 2004; Bednář, 2009).

2.4. MALDI-TOF

Principem hmotnostní spektrometrie je rozdělení nabitých částic podle poměru jejich molekulových hmotností s nábojem v elektrickém/magnetickém poli. K určení iontů vyšších molekulových hmotností se používá MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (TOF- time-of-flight). Hmotnostní spektroskopie v kombinaci s MALDI (dále jen MALDI) byla původně vyvinuta pro kvalitativní analýzu peptidů a bílkovin, nyní se využívá i pro analýzy nukleových kyselin nebo

nízkomolekulárních organických i anorganických látek. Metodu MALDI lze kombinovat jako hmotnostní detektor se separačními metodami, například s gelovou elektroforézou či kapalinovou chromatografií (Havliš, 1999).

Principem MALDI-TOF je, že krystaly matrice se vzorkem jsou vystaveny laserovému záření, které způsobí desorpci molekul matrice spolu s molekulami vzorku a zároveň dojde k ionizaci molekul vzorku předáním vodíkového protonu H^+ z molekul matrice. Poté je aplikováno extrakční napětí mezi MALDI destičku a vstupní štěrbinu průletového analyzátoru, čímž dojde k extrakci nabitých molekul podle zvolené polarity napětí a k jejich analýze v průletovém hmotnostním analyzátoru. TOF analyzátor pracuje na základě extrakce iontů a měření jejich doby letu. Ionty se pomocí vloženého napětí na extrakční mřížku urychlí elektrickým polem a získají rychlost v závislosti na molekulové hmotnosti a náboji částice (m/z). Získaná kinetická energie je přímo úměrná náboji iontů a nepřímo úměrná jejich hmotnosti. Výsledkem je rozdílná rychlost iontů s různým poměrem m/z . A proto takto urychlené ionty dopadnou na detektor v rozdílném čase, ačkoliv urazí stejnou vzdálenost. Detektor umožňuje změřit dobu průletu, ze které lze vypočítat hmotnost částice, resp. poměr m/z .

Velká část detektorů pracuje na základě převodu iontů na elektrický signál pomocí scintilační vrstvy, která při dopadu iontů vydává světelné záření. Tento typ záření je převeden na elektrický proud a dále zesílen. Detektory rozdělujeme na elektronový, fotonásobič a Faradayovu klec.

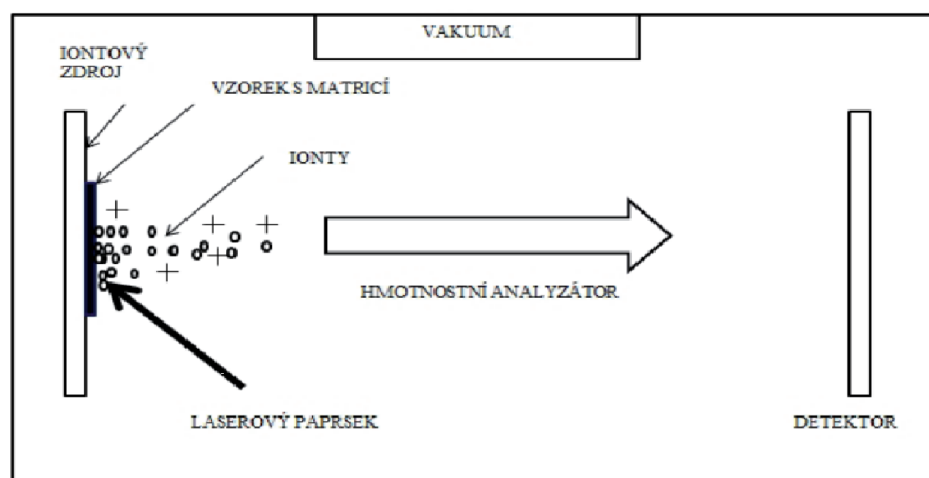
Vhodné matrice pro UV lasery jsou aromatické karboxylové kyseliny, většinou deriváty kyseliny benzoové rozpuštěné nejčastěji ve vodném roztoku acetonitrilu, ethanolu nebo methanolu. Roztok se navíc často okyseluje kyselinou trifluoroctovou. Nejpoužívanější matrice jsou kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA), 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (sinapová, SA), 4-hydroxy-3-methoxyskořicová (ferulová, FA) 2,5-dihydroxybenzoová (gentisová, DHB), ta se používá jako univerzální matrice, je vhodná pro stanovení vysokomolekulárních látek, dobře ionizuje peptidy, proteiny, lipidy, nukleové kyseliny a sacharidy. Protože každá matrice odlišně krystalizuje a ionizuje látky (Havliš, 1999; Huong et al., 2004).

Touto metodou lze tedy analyzovat vlastní proteiny mikroorganismů, především ribozomální proteiny a použít je pro taxonomickou identifikaci mikroorganismů. Identifikace se provádí pomocí spolehlivé teoretické korelace mezi získaným spektrem a referenčním spektrem ve formě biostatistických hladin spolehlivosti. Souhrn hmotností proteinů vytváří charakteristické rozložení hmotnosti a intenzity ribozomálních proteinů. Lze je interpretovat

jako molekulární otisk, a tedy použit k identifikaci mikrobiálních druhů. Pro dosažení výsledků se získaná hmotnostní spektra přenesou do seznamů píků, které se srovnávají s každým jednotlivým záznamem v referenční databázi

Konkrétně systém IVD MALDI Biotyper dokáže identifikovat 210 živočišných druhů či skupin, které zahrnují 280 klinicky významných bakterií a kvasinek, to představuje více než 98% bakteriální identifikace typické pro pracovní postupy v klinických laboratořích mikrobiologie (Anonym, 2013).

Obrázek 1. Schéma MALDI-TOF



3. Materiál a metody

3.1. Materiál

Mezi testovanými biologicky aktivními látkami byly silice ze saturejky, dobromyslu, tymiánu, skořice a hřebíčku.

Kmeny bakterií používané pro stanovení MIC byly poskytnuty Ing. Pánkovou ze „Sbírký fytopatogenních baktérií a referenčních protilátek z Výzkumného ústavu rostlinné výroby“ (www.vurv.cz/collections). Byly vybrány na základě toho, které jsou rizikové pro dané druhy zeleniny.

Vybranými druhy zeleniny byly mrkev obecná, petržel zahradní a celer miřík. Tato zelenina byla pěstována v ekologickém zemědělství, což by mělo garantovat pěstování bez syntetických látek na ochranu rostlin. Testovaná zelenina byla zakoupena v Bio obchodu „Rozmarýn“ v Praze.

3.2. Stanovení minimální inhibiční koncentrace

3.2.1. Chemikálie

Tryptónovo-sojový bujón (TSB) – (kasein, sojový protein; sůl, glukosa, hydrogenfosforečnan draselný); tween (Roth, GE); denaturovaný líh (70%, Penta CZ); destilovaná voda.

3.2.2. Testované mikroorganismy

Inhibiční aktivita byla testována proti následujícím bakteriím:

Pectobacterium carotovorum sub.*carotovorum* (CPPB 054), *Pseudomonas syringae* pv.*lachrymans* (CPPB 152), *Pseudomonas putida* (CPPB 074), *Pectobacterium carotovorum* subs. *carotovorum* (CPPB 143), *Pectobacterium carotovorum* subs. *carotovorum* (CCM 1008), *Pseudomonas fluorescens* (CPPB 195), *Pseudomonas fluorescens* (CPPB 089), *Pseudomonas syringae* (CCM 1718), *Pseudomonas putida* (CPPB 099), *Pectobacterium carotovorum* subs. *antroseptica* (CPPB 83), *Xanthomonas campestris* (CCM 022), *Pseudomonas fluorescens* (CPPB 171).

3.2.3. Mikrodiluční bujónová metoda

Pomocí mikrodiluční bujónové metody se zjišťovala minimální inhibiční koncentrace jednotlivých silic, které byly testované na vybrané druhy mikroorganismů. Všechny pomůcky byly před použitím sterilovány v autoklávu 15 min při teplotě 121 °C.

Nejdříve byl připraven tryptónovo-sojový bujón (Oxoid, Brno), který se skládá ze 17 g/l kaseinu, 3 g/l sojového protein, 5 g/l sůl, glukosa 2,5 g/l, 2,5 g/l hydrogenfosforečnanu draselného a 1 l destilované vody. Po promíchání byl bujón uložen do autoklávu. Byly připraveny zásobní roztoky silic, do kterých bylo přidáno 100 µl bujónu, 10,24 µl testované silice a 100 µl tweenu, vloženo do ultrazvuku a následně doplněno 3,8 ml bujónu.

Do sterilních mikrotitračních destiček bylo napipetováno do každé jamky 100 µl čistého média, kde se první řada v destičce ponechala pouze s médiem pro kontrolu čistoty bujónu (KČ). Pak se přidalo do následující řady 100 µl zásobního roztoku silice, ze kterého se po promíchání jinou pipetovací špičkou odebralo 100 µl do další řady pro snížení koncentrace, tímto způsobem ředění se pokračovalo až do koncentrace 2 µl. V poslední řadě byla kontrola nárůstu inokula (KNI).

Obrázek 2. Mikrotitrační destička

		koncentrace v $\mu\text{l/l}$										
bakterie	KČ	1024	512	256	128	62	32	16	8	4	2	KNI
B1												
B2												
B3												
B4												

Jeden den před samotným očkováním byly připraveny bakterie, které byly naočkovány do čistého media a ponechány kultivovat se na světle při pokojové teplotě. Bylo vytvořeno inokulum bakteriálních kmenů, které bylo upraveno na 0,5 McFarland. Bakterie byly dále připraveny za pomoci denzitometru. Primární koncentrace inokula byla 10^8 kolonií tvořících jednotku (KTJ) na ml. Bakteriální suspenze byla dále naředěna na 10^5 KTJ/ml, tento roztok byl přidáván injekční stříkačkou po kapce (10 μl) do každé jamky mikrotitrační destičky.

Vzorky byly umístěny do termostatu na 24 hodin při 37°C a druhý den byly vyhodnoceny. Biologická aktivita jednotlivých silic byla vyhodnocena na základě minimální inhibiční koncentrace u jednotlivých bakterií, kde kolonie při dané koncentraci silice narostly či nenarostly. MIC byla definována jako nejnižší koncentrace, při které mikroorganismy nevykazují žádný viditelný růst. Testování probíhalo ve dvojím provedení pro každou bakterii a opakovalo se třikrát. Stejným způsobem probíhalo testování minimální inhibiční koncentrace jednotlivých silic a identifikovaných bakterií pomocí MALDI.

3.3. Inokulace

Před inokulací bylo potřeba povrch zeleniny sterilovat, a to pomocí čisticí dezinfekce Savo. Následně se zkoušelo dvěma způsoby zaočkování testovanými kmeny: máčením a přímou inokulací.

Narostlá kultura bakterií se rozmíchala v 300 ml destilované vody a na povrchu se zelenina poškodila pomocí korkovrtu, skalpelem a následně se zelenina máčela v inokulu 20 minut. Potom se kultivovala zabalena do potravinářské folie bez přístupu světla při pokojové teplotě. Po několika dnech se několikrát vyhodnocoval stav komodit.

Druhý způsob inokulace byla příprava inokula z narostlé kultury o koncentraci 10^3 ; 10^6 ; 10^8 , která byla aplikovaná jednorázově jedním vpichem cca 15 μl bakteriální suspenze inzulinovou jehlou či se do rány vložila namočená buničina v suspenzi.

Tento návod byl převzat z certifikované metodiky pro praxi „Metodika inokulace jírovce maďalu (*Aesculus hippocastanum*) původcem choroby bleeding canker, bakterií *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*, v polních podmínkách.“ (Pánková a kol., 2013).

3.4. Identifikace pomocí MALDI – přímý přenos bakterií

Nejdříve před mikrobiální identifikací bylo nutné nový nosič MALDI očistit a zkontrolovat, aby nebyl poškrábaný. Bylo potřeba dbát také na to, aby nedošlo ke smíchání různých vzorků roztékáním kapek matrice a nesprávnou polohou vzorků rozetřených na nosiči MALDI, jinak by hrozila neúplnost výsledků identifikace. Vzorek hniloby byl použit z těch částí zeleniny, kde se vytvořila hniloba na místech bez předešlé inokulace. Tato situace nastala u petržele a celeru. Vzorek hniloby byl poté kultivován v médiu. Kolonie bakterií byla rozetřena na ocelovou MALDI destičku pomocí párátka. Na každý vzorek byla použita nová špička pipety či párátka, aby nedošlo ke zkřížené kontaminaci. Následně bylo aplikováno 1 μl roztoku HCCA matrice. Vzorek se nechal zaschnout a byl vložen do přístroje.

4. Výsledky

4.1. Minimální inhibiční koncentrace

Z jednotlivých výsledků testování MIC byla vypočítána statistická hodnota medián, která je znázorněna v Tabulce 1.

Tabulka 1. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) testovaných silic (mg/ml)

bakterie	saturejka	dobromysl	tymián	skořice	hřebíček
CPPB 054	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
CPPB 152	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
CPPB 074	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
CPPB 143	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
CCM 1008	> 1,024	> 1,024	> 1,024	0,512	> 1,024
CPPB 195	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
CPPB 089	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
CCM 1718	> 1,024	> 1,024	> 1,024	0,128	> 1,024
CPPB 099	> 1,024	> 1,024	> 1,024	0,128	> 1,024
CPPB 83	> 1,024	0,256	0,128	0,128	0,512
CCM 022	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
CPPB 171	> 1,024	0,512	0,256	0,128	> 1,024

4.2. Inokulace

Nárůst patogenů na testované zelenině se za podmínek uvedených výše nepodařilo iniciovat. Hniloba se rozvinula pouze na místech, které nebyly ošetřované inokulem, a to u petržele a celeru. Proto byl odebrán vzorek, který byl následně testován pomocí Maldi testu pro identifikaci bakterií.

4.3. Maldi BIOTYPER 2.3 Bruker Daltonik GmbH

Analýza vzorků byla provedena na přístroji MALDI BIOTYPER 2.3 Bruker Daltonik GmbH. Identifikace izolovaných kmenů bakterií z petržele a celeru proběhla pomocí metody MALDI – TOF. Celkově se podařilo identifikovat 7 bakterií. Z analytů petržele byla s jistotou určena gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie *Serratia liquefaciens*. S velkou pravděpodobností byly určeny grampozitivní aerobní bakterie *Bacillus subtilis*, *Serratia grimesii* a *Serratia plymuthica*. Tyto bakterie jsou typické pro půdní prostředí. Z analytů

celeru byla identifikována stejně jako u petržele pravděpodobně *Serratia liquefaciens*, dále *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas graminis* a *Pseudomonas rhodesiae*.

Výsledky s identifikovanými mikroorganismy z izolátu petržele a celeru jsou v Tabulce 2 a v Tabulce 3a-c.

Hodnota výsledků u jednotlivých mikroorganismů byla hodnocena následovně:

2,300 – 3,000 vysoká pravděpodobnost identifikace

2,000 – 2,299 bezpečná pravděpodobnost identifikace

1,700 – 1,999 pravděpodobná identifikace

0,000 – 1,699 nespolehlivá identifikace

Tabulka 2. Identifikované mikroorganismy v petrželi

Petržel								
analyt 1			analyt 2			analyt 3		
Organismus	hodn.	NCBI	Organismus	hodn.	NCBI	Organismus	hodn.	NCBI
Bacillus subtilis ssp subtilis DSM 10T DSM	1,672	135461	Serratia liquefaciens DSM 30125 DSM	2,337	614	Bacillus subtilis DSM 5552 DSM	1,857	1423
Bacillus atrophaeus DSM 5551 DSM	1,493	1452	Serratia liquefaciens DSM 4487T DSM	2,317	614	Bacillus subtilis ssp subtilis DSM 5660 DSM	1,852	135461
Clostridium bifermentans 2274_CCUG 35556 A BOG	1,423	1490	Serratia liquefaciens DSM 30065 DSM	2,312	614	Bacillus subtilis DSM 5611 DSM	1,783	1423
Bacillus subtilis ssp spizizenii DSM 618 DSM	1,413	96241	Serratia liquefaciens DSM 30068 DSM	2,295	614	Bacillus subtilis ssp subtilis DSM 10T DSM	1,683	135461
Agromyces neolithicus HKI 321 HKJ	1,397	269420	Serratia liquefaciens DSM 30066 DSM	2,293	614	Bacillus mojavensis DSM 9205T DSM	1,669	72360
Lactobacillus paracasei ssp paracasei DSM 20207 DSM	1,383	47714	Serratia liquefaciens DSM 30064 DSM	2,237	614	Bacillus subtilis ssp spizizenii DSM 15029T DSM	1,592	96241
Streptococcus acidominimus DSM 20622T DSM	1,366	1326	Serratia liquefaciens CCM 2716 CCM	2,049	614	Bacillus subtilis ssp spizizenii DSM 618 DSM	1,483	96241
Streptomyces avidinii B190 UFL	1,354	1895	Serratia liquefaciens DSM 30067 DSM	1,964	614	Bacillus atrophaeus DSM 5551 DSM	1,441	1452
Arthrobacter stackebrandtii DSM 16005T DSM	1,344	272161	Serratia grimesii DSM 30063T DSM	1,902	82995	Bacillus vallismortis DSM 11031T DSM	1,411	72361
Arthrobacter psychrolactophilus DSM 15612T DSM	1,32	92442	Serratia plymuthica DSM 22907 DSM	1,814	82996	Lactobacillus paracasei ssp paracasei DSM 8741 DSM	1,402	47714

NCBI – identifikační číslo organismů v mezinárodní databázi

Tabulka 3a. Identifikované mikroorganismy v celeru

Celer								
analyt 1			analyt 2			analyt 3		
Organismus	hodn.	NCBI	Organismus	hodn.	NCBI	Organismus	hodn.	NCBI
<i>Pseudomonas cichorii</i> DSM 50259T HAM	1,803	36746	<i>Pseudomonas cichorii</i> DSM 50259T HAM	1,768	36746	<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363T HAM	1,72	158627
<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363T HAM	1,694	158627	<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363T HAM	1,744	158627	<i>Pseudomonas caricapapayae</i> LMG 2152T HAM	1,688	46678
<i>Pseudomonas oleovorans</i> 062_Galv10 NFI	1,669	301	<i>Pseudomonas sp</i> 057_Galv13 NFI	1,687	286	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ssp <i>aurantiaca</i> CIP 106718T HAM	1,671	333
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> DSM 14020T HAM	1,657	76760	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ssp <i>aurantiaca</i> CIP 106718T HAM	1,657	333	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> DSM 14020T HAM	1,66	76760
<i>Pseudomonas veronii</i> B561 UFL	1,643	76761	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ssp <i>pseudoalcaligenes</i> DSM 50188T HAM	1,639	330	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ssp <i>pseudoalcaligenes</i> DSM 50188T HAM	1,635	330
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ssp <i>pseudoalcaligenes</i> DSM 50188T HAM	1,595	330	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> DSM 14020T HAM	1,621	76760	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ssp <i>chlororaphis</i> DSM 50083T HAM	1,593	333
<i>Pseudomonas caricapapayae</i> LMG 2152T HAM	1,583	46678	<i>Pseudomonas caricapapayae</i> LMG 2152T HAM	1,597	46678	<i>Pseudomonas veronii</i> B561 UFL	1,561	76761
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ssp <i>aurantiaca</i> CIP 106718T HAM	1,543	333	<i>Pseudomonas oleovorans</i> DSM 1045T HAM	1,571	301	<i>Pseudomonas antarctica</i> DSM 15318T HAM	1,525	219572
<i>Pseudomonas oleovorans</i> DSM 1045T HAM	1,53	301	<i>Pseudomonas tolaasii</i> LMG 2342T HAM	1,56	29442	<i>Pseudomonas sp</i> 057_Galv13 NFI	1,522	286
<i>Pseudomonas agarici</i> DSM 11810T HAM	1,526	46677	<i>Pseudomonas veronii</i> B561 UFL	1,501	76761	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,511	76759

Tabulka 3b. Identifikované mikroorganismy v celeru

Celer						
analyt 4			analyt 5			
Organismus	hodn.	NCBI	Organismus	hodn.	NCBI	
<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363T HAM	1,84	158627	<i>Serratia liquefaciens</i> DSM 30064 DSM	2,241	614	
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> DSM 14020T HAM	1,702	76760	<i>Serratia liquefaciens</i> DSM 30125 DSM	2,21	614	
<i>Pseudomonas abietaniphila</i> CIP 106708T HAM	1,684	89065	<i>Serratia liquefaciens</i> DSM 30068 DSM	2,197	614	
<i>Pseudomonas cichorii</i> DSM 50259T HAM	1,663	36746	<i>Serratia liquefaciens</i> DSM 30065 DSM	2,178	614	
<i>Pseudomonas caricapapayae</i> LMG 2152T HAM	1,6	46678	<i>Serratia liquefaciens</i> DSM 4487T DSM	2,161	614	
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ssp <i>pseudoalcaligenes</i> DSM 50188T HAM	1,595	330	<i>Serratia liquefaciens</i> DSM 30066 DSM	2,077	614	
<i>Pseudomonas</i> sp 107_Neb26 NFI	1,567	286	<i>Serratia entomophila</i> DSM 12358T DSM	1,939	42906	
<i>Pseudomonas viridiflava</i> DSM 11124T HAM	1,534	33069	<i>Serratia liquefaciens</i> DSM 30067 DSM	1,833	614	
<i>Pseudomonas lutea</i> LMG 21974T HAM	1,527	243924	<i>Ewingella americana</i> DSM 4580T HAM	1,689	41202	
<i>Pseudomonas savastanoi</i> ssp <i>savastanoi</i> LMG 2209T HAM	1,495	29438	<i>Serratia plymuthica</i> DSM 22907 DSM	1,658	82996	

Tabulka 3c. Identifikované mikroorganismy v celeru

Celer					
analyt 6			analyt 7		
Organismus	hodn.	NCBI	Organismus	hodn.	NCBI
Serratia liquefaciens DSM 30064 DSM	2,15	614	Pseudomonas rhodesiae DSM 14020T HAM	1,723	76760
Serratia liquefaciens DSM 30068 DSM	2,134	614	Pseudomonas graminis DSM 11363T HAM	1,586	158627
Serratia liquefaciens DSM 4487T DSM	2,132	614	Pseudomonas pseudoalcaligenes ssp pseudoalcaligenes DSM	1,541	330
Serratia liquefaciens DSM 30125 DSM	2,108	614	Pseudomonas cichorii DSM 50259T HAM	1,541	36746
Serratia liquefaciens DSM 30065 DSM	2,096	614	Pseudomonas abietaniphila CIP 106708T HAM	1,521	89065
Serratia liquefaciens DSM 30066 DSM	1,95	614	Pseudomonas trivialis DSM 14937T HAM	1,493	200450
Serratia entomophila DSM 12358T DSM	1,746	42906	Pseudomonas tolaasii LMG 2342T HAM	1,486	29442
Serratia liquefaciens DSM 30067 DSM	1,745	614	Pseudomonas antarctica DSM 15318T HAM	1,481	219572
Serratia ficaria DSM 4569T DSM	1,676	61651	Pseudomonas sp 107_Neb26 NFI	1,47	286
Serratia fonticola DSM 4576T DSM	1,676	47917	Pseudomonas oleovorans DSM 1045T HAM	1,456	301

4.3.1. MIC z Maldi testu

Výsledky minimální inhibiční koncentrace jednotlivých silic a identifikovaných bakterií pomocí MALDI jsou uvedeny v Tabulce 4. Z těchto výsledků byla vypočítána statistická hodnota medián.

Tabulka 4. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) silic (mg/ml)

bakterie	saturejka	dobromysl	tymián	skořice	hřebíček
<i>Pseudomonas cichorii</i>	0,512	0,128	0,128	0,032	< 1,024
<i>Pseudomonas graminis</i>	< 1,024	< 1,024	< 1,024	0,032	< 1,024
<i>Bacillus subtilis</i>	< 1,024	< 1,024	< 1,024	< 1,024	< 1,024
<i>Serratia liquefaciens</i>	0,512	< 1,024	< 1,024	0,032	< 1,024
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	< 1,024	< 1,024	< 1,024	< 1,024	> 1,024

5. Diskuze

V rámci testování minimální inhibiční koncentrace vyšla s nejlepšími výsledky skořicová silice, která působila na nejvíce mikroorganismů v několika poměrně nízkých koncentracích. Nejvíce na rod *Pseudomonas*, konkrétně na *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringea*, dále na *Pectobacterium carotovorum* subs. *antroseptica* a *Pectobacterium carotovorum* subs. *carotovorum*. Skořicová silice dosáhla minimální inhibiční koncentrace 0,512 mg/ml proti gramnegativní bakterii *Pectobacterium carotovorum* subs. *carotovorum* a proti *Pectobacterium carotovorum* subs. *antroseptica*. Oproti ostatním zmíněným zástupců rodu *Pseudomonas* byla MIC 0,128 mg/ml. Úspěšnost skořicové silice v koncentraci 0,128 mg/ml byla tedy 33 %. V druhém testování minimální inhibiční koncentrace s identifikovanými mikroorganismy pomocí MALDI se nejlépe prokázala aktivita vůči rodu *Pseudomonas*, konkrétně *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas graminis* a *Serratia liquefaciens*, a to v MIC 0,032 mg/ml.

Ve studiích Prabuseenivasana a kol. (2006) vyšla skořicová silice pomocí diskové difúzní metody také s velice slibnou inhibiční aktivitou při nízkých koncentracích. Dané studie uváděly, že může být tato silice dobrým zdrojem antibakteriálních látek, protože vykazovala maximální aktivitu s hodnotami MIC v rozsahu od 0,8 do 3,2 mg/ml. Uvádí, že *Bacillus subtilis* byl nejvíce citlivý organismus. Při našem testování se však skořicová silice proti *Bacillus subtilis* neprokázala. Výsledky v této práci vyšly velice pozitivně oproti zmiňované studii, pravděpodobně je to kvůli jiným testovaným kmenům. Ve studii byly použity kmeny *Escherichia coli* (ATCC25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 15380), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (MTCC 1771), *Bacillus subtilis* (MTCC441) a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Pro případné potvrzení výsledků by bylo potřeba zjistit přesné složení námi použité silice, což nebylo součástí naší práce. Skořicová silice u nás nejčastěji působila na rod *Pseudomonas*, který patří mezi gramnegativní bakterie.

Naopak Zhang a kol. (2016) testovali skořicovou silici na gramnegativní *Escherichia coli* a grampozitivní *Staphylococcus aureus*. MIC byla proti obou bakteriím stejná, 1,0 mg/ml, ale hodnota minimální baktericidní koncentrace byla u *E. coli* 4,0 mg/ml a u *S. aureus* 2,0 mg/ml. Tedy *S. aureus* byl mírně citlivější ke skořicové silici, ale celkově lze říci, že výsledky ukázaly velmi pozitivní efekt a potenciál skořicové silice pro použití v potravinářských produktech. Pro možné další testování by se mohl využít poznatek Hiliho a kol., kteří uvádí,

že pro zvýšení antimikrobiální aktivity lze přidat dimethylsulfoxid a účinky skořicové silici se až zněkolikanásobí.

Další silicí, která bakterie nejčastěji inhibovala, byla tymiánová. Ta inhibovala bakterii *Pseudomonas fluorescens* při koncentraci 0,256 mg/ml a *Pectobacterium carotovorum* subs. *antroseptica* při koncentraci 0,128 mg/ml. Silice inhibovala z identifikovaných mikroorganismů pomocí MALDI nejvíce *Pseudomonas cichorii*, kde byla minimální inhibiční koncentrace 0,128 mg/ml. Proti ostatním bakteriím neukázala silice žádnou aktivitu.

Studie Rota a kol. (2006) testovala silice tří druhů tymiánu (*Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* a *Thymus hyemalis*), u kterých stanovila MIC menší než 0,2 µl/ml. Mezi jednotlivými druhy nebyly zjištěny žádné rozdíly, protože všechny vykazovaly silnou aktivitu proti devíti z deseti testovaných bakterií. Studie se zaměřila i na jednotlivé obsahové složky, kde byl nejvíce zastoupen tymol (57,7%), p-cymen (18,7%) a karvakrol (2,8%). Uvádí, že většina antimikrobiální aktivity tymiánové silice se zdá být spojena s fenolickými látkami tymolem a karvakrolem. Pro některé testované mikroorganismy však vysoká koncentrace těchto složek není nezbytná, aby se dosáhlo optimálních bakteriostatických a baktericidních účinků.

Silici tymiánu se věnovala i studie Dormana a Deanse (2000), kteří testovali silice pomocí diskové difúzní metody. Silice tymiánu obecného měla inhibiční zónu $23,4 \pm 1,2$ mm proti *Bacillus subtilis*, vůči *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica*) měla $35,8 \pm 4,4$ mm. A se zástupcem z rodu *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa* se projevila inhibiční zónou růstu $33,5 \pm 2,0$ mm. I studie Cosentina a kol. (1999), která byla zaměřena na *Thymus sardinian*, ukazuje, že *Pseudomonas aeruginosa* byla nejméně citlivá bakterie s minimální baktericidní koncentrací větší než 0,9 mg/ml. Tato bakterie se ukázala být odolná vůči mnoha antimikrobiálním látkám, včetně karvakrolu a tymolu, které se často řadí mezi nejúčinnější antimikrobiální látky obsažené v tymiánové silici. V naší studii byla častou inhibovanou bakterií *Pseudomonas cichorii*. Preedy (2015) ve své knize uvádí, že silice kmínu kořenného *Carum carvi*, která v sobě obsahuje 23,3 % karvonu, 18,2 % limonenu, 16,2 % germagrenu D a 14 % trans-dihydrocarvonu. V rozmezích 170,2–7280 µl silice inhibovala právě tuto bakterii.

Další testovanou silicí byla silice z dobromyslu obecného (*Origanum vulgare*), která při testování působila inhibičně na *Pseudomonas cichorii*, *fluorescens* a *Pectobacterium carotovorum* subs. *antroseptica*. Minimální inhibiční koncentrace byly 0,128 mg/ml, 0,512 mg/ml a 0,256 mg/ml, uvedeno v pořadí.

Sarikurkcu a kol. (2015) zkoumali antimikrobiální citlivost této silice pomocí mikrodiluční metody a při pokusech bylo zjištěno, že hodnoty MIC pro *Origanum vulgare*

subsp. *vulgare* a *Origanum. vulgare* subsp. *hirtum* se pohybovaly v rozmezí od 0,0853 do 0,4267 mg/ml a od 0,0853 do 0,512 mg/ml. Respektive *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* ukázalo velmi silnou aktivitu proti *Sarcina lutea* s MIC 0,0853 mg/ml. Mnoho předchozích výsledků z výzkumů na antimikrobiální aktivitu druhu *Origanum* se však od sebe odlišovalo. Například dřívější výsledky ukazovaly antimikrobiální aktivitu v inhibici růstu *Bacillus cereus* s MIC a 0,032 mg/ml, což se při našem testování proti *Bacillus subtilis* neprojevilo. Rozdílné výsledky lze přičíst rozdílům v metodách a složení silic či proměnné citlivosti různých mikroorganismů.

Silice ze saturejky inhibovala pouze růst *Pseudomonas cichorii* a *Serratia liquefaciens* s MIC 0,512 mg/ml. Výsledky Mihajilov-Krsteva a kol. (2010) ukazují, že silice *Satureja hortensis* L. byla aktivní vůči všem testovaným gramnegativním bakteriím v rozsahu MIC 0,025–0,78 µg/ml a proti grampozitivním bakteriím silice účinkovala v rozmezí MIC 0,05–0,39 µg/ml. Azaz a kol.(2002) porovnávali silice z různých druhů saturejky. *Pseudomonas aeruginosa* byla nejlépe inhibována silicí *Satureja icarica*, kde hodnota MIC byla 62,5 µg/ml, tento druh obsahoval nejvíce karvakrolu, 59,2 %. Dále byla *Pseudomonas aeruginosa* inhibována silicí *Satureja boissieri* při MIC 125 µg/ml, tento druh obsahuje karvakrolu 44,8 %. *Satureja pilosa* s 42,2 % karvakrolu inhibovala *P. aeruginosa* při MIC 125 µg/ml. Výsledky z našeho testování se neshodují se studii, odlišují se v úspěšnosti inhibiční aktivity proti testovaným bakteriím a v hodnotě minimální inhibiční koncentrace.

Hřebíčková silice se projevila s minimální inhibiční koncentrací 0,512 mg/ml pouze proti *Pectobacterium carotovorum* subs. *antroseptica*. Naopak v rámci studie Fu a kol. (2007) vykazovala hřebíčková silice slibnější výsledky. Autoři studie silici z hřebíčku testovali vůči *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichiacoli* a *Proteus vulgaris* pomocí diskové difúzní metody, kde se průměr inhibice projevil větší než 10 mm a jen v případě *Pseudomonas aeruginosa* byl menší než 10 mm. Hřebíčková silice vykazovala rovněž dobrou antifugální citlivost, zejména proti *Candida albicans*, 32,0 mm, a *Aspergillus niger*, 40,0 mm. MIC silice hřebíčku byla v rozmezí od 0,062 % (v/v) do 0,500 % (v/v) pro všechny testované mikroorganismy.

K porovnání výsledků mezi silicemi z hřebíčku a oregana může sloužit studie Moreira a kol. (2007), kteří zkoumali parametry antimikrobiální aktivity proti kmenu *E. coli* pomocí silic z různých druhů rostlin, např. eukalyptu (*Eucalyptus globulus*), tea tree (*Melaleuca alternifolia*), rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*), máty (*Mentha piperita*), růže mošusové (*Rosa moschata*), hřebíčku (*Syzygium aromaticum*), citronu (*Citrus limonum*), oregana (*Origanum vulgare*), borovice (*Pinus silvestrys*) a bazalky (*Ocimum basilicum*). Silice

z oregana, bazalky, máty, citronu, borovice a růže mošusové měly MIC vyšší než 17 $\mu\text{l/ml}$. Konkrétně silice z oregana měla minimální inhibiční koncentraci 18 $\mu\text{l/ml}$, silice z eukalyptu 4 $\mu\text{l/ml}$, tea tree 5 $\mu\text{l/ml}$, silice rozmarýnu 6 $\mu\text{l/ml}$, máty 20 $\mu\text{l/ml}$, bazalky 19,5 $\mu\text{l/ml}$, citronu 25 $\mu\text{l/ml}$. Silice borovice a růže mošusové měly MIC větší než 30 $\mu\text{l/ml}$. Silice hřebíčku vykazovala vyšší aktivitu než ostatní extrakty, MIC byla 2,5 $\mu\text{l/ml}$. A v rámci dané studie vycházela tedy nejlépe.

Tyto výsledky nebyly ve shodě s našimi výsledky, kde oreganová i hřebíčková silice inhibovala ve vyšších koncentracích, než uvádějí popsané studie. Rozdíly lze přičíst testovaným mikroorganismům a inherentním faktorům silic (odrůda, podmínky okolí, ekologické faktory, sklizeň).

6. Závěr

Všech pět testovaných silic prokázalo určitou inhibiční aktivitu proti alespoň jedné bakterii v *in vitro* podmínkách.

Prokazatelným pozitivním výsledkem při testování antimikrobiální aktivity bylo nalezení nejčastější minimální inhibiční koncentrace 0,128 mg/ml u skořicové silice proti osmi ze sedmnácti testovaných mikroorganismů.

Závěrem lze říci, že z *in vitro* studií nelze přímo potvrdit antimikrobiální aktivitu silic, která by šla aplikovat pro původně zamýšlený cíl využití biologicky aktivních látek v silicích na ochranu kořenové zeleniny. Proto je třeba dalších výzkumů, které se budou zabývat testováním látek *in vivo* a do budoucna se zaměří i na způsoby inokulace, které se v tomto pokusu nezdařily.

7. Použitá literatura

- Adigüzel, A., Güllüce, M., ŞENGÜL, M., Ögütçü, H., ŞAHİN, F., Karaman, I. (2005). Antimicrobial effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) extract. *Turkish Journal of Biology*, 29(3), 155-160.
- Adiguzel, A., Ozer, H., KiliC, H., & CetiN, B. (2007). Screening of antimicrobial activity of essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis* on foodborne bacteria and fungi. *Czech journal of food sciences*, 25(2), 81.
- Al-Daraji, H. J., Al-Mashadani, H. A., Mirza, H. A., Al-Hassani, A. S., Al-Hayani, W. K. (2012). The effect of utilization of parsley (*Petroselinum crispum*) in local Iraqi geese diets on blood biochemistry. *Journal of American Science*. 8, 427-432.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(1), 5-16.
- Anonym. (2013). IVD MALDI Biotyper 2.3 Návod k použití. Copyright 2013 © Bruker Daltonik GmbH.
- Anonym. Moderní metody skladování ovoce – Metodické listy OPVK. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o [online]. 2015. [cit. 2017-04-04]. Dostupné z <http://www.vsuo.cz/common/cms_files_pr/files_to_download/A12_Moderni_meto_dy_skladovani_ovoce.pdf>.
- Anonym. Uchovávání ovoce, zeleniny a brambor. In: Informační centrum bezpečnosti potravin. Praha. [online]. 2012. [cit. 2016-01-31]. Dostupné z <<http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76483.aspx>>.
- Anonym. Preventivní opatření proti „cavity spot“. In: Informační centrum bezpečnosti potravin [online]. 2008 [cit. 2016-01-15]. Dostupné z <<http://www.bezpecnostpotravin.cz/preventivni-opatreni-proti-cavity-spot.aspx>>.
- Antunes, M. D. C., Cavaco, A. M. (2010). The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and fragrance journal*, 25(5), 351-366.
- Arndt, T. Skořicovník čínský. In: Celostní medicína, informační server o zdraví [online]. 2005 [cit. 2016-01-31]. Dostupné z <<http://www.celostnimedicina.cz/skoricovnik-cinsky.htm#ixzz3ydyJrC5p>>.

- Azaz, D., Demirci, F., Satıl, F., Kürkçüoğlu, M., Hüsnü, K., Başer, C. (2002). Antimicrobial activity of some Satureja essential oils. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(9-10), 817-821.
- Bacílková, B., Paulusová, H. (2012). Vliv silic a jejich hlavních účinných látek na mikroorganismy a na archivní materiál. Praha: Národní archiv, 28.
- Bednář, M. 2009. Diluční metoda. Fondu rozvoje vysokých škol FRVŠ 1359/2009 “Příručka lékařské mikrobiologie pro bakalářské studijní programy”. [online]. 2009. [cit. 2016-01-10]. Dostupné z <<http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/mic/mic.htm>>.
- Benada, J. Špaček, J. 1961. Zemědělská fytopatologie díl. 3 Choroby zeleniny. Vydala Československá akademie zemědělských věd ve spolupráci se Státní zemědělským nakladatelstvím Praha.
- Božik, M., Císarová, M., Tančinová, D., Kouřimská, L., Hleba, L., Klouček, P. (2017). Selected essential oil vapours inhibit growth of *Aspergillus* spp. in oats with improved consumer acceptability. *Industrial Crops and Products*, 98, 146-152.
- Buchtová, I. Situační výhledová zpráva zelenina. EAGRI. Praha: Ministerstvo zemědělství. [online]. 2014. [cit. 2015-11-29]. ISBN 978-80-7434-187-8. Dostupné z <http://eagri.cz/public/web/file/357515/SVZ_Zelenina_2014.pdf>.
- Bulánková, I. (2005). Léčivé rostliny na naší zahradě (Vol. 66). Grada Publishing as. ISBN 80-247-1274-1.
- Bull, C. T., Clarke, C. R., Cai, R., Vinatzer, B. A., Jardini, T. M., Koike, S. T. (2011). Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae* sensu lato confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. *Phytopathology*, 101(7), 847-858.
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M. L., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in applied microbiology*, 29(2), 130-135.
- Cwiková, O., Gregor, T., Šottníková, V., Mašková, H. Antimikrobiální aktivita koření. Antimicrobial activity of spices. *Potravinářstvo: Scientific Journal for Food Industry*. 2010, 4, 381-386.
- Dalton, I. P., Epton, H. A. S., Bradshaw, N. J. (1981). The susceptibility of modern carrot cultivars to violet root rot caused by *Helicobasidium purpureum*. *Journal of Horticultural Science*, 56(1), 95-96.

- Dorman, H. J. D., Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- Gaugovish, O., Smith, R., Cahn, M., Koike, S., Smith, H., Aguiar, J. (2008). Celery production in California, Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 7220. ISBN-13:978-1-60107-618-2.
- Engelhard, A. W., McGuire, R. G., Jones, J. B. (1986). *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, a pathogen of *Kalanchoë blossfeldiana*. *Plant disease*, 70(6), 575-577.
- Eucast European committee susceptibility testing. Eucast disková difúzní metoda. European Society of Clinical Microbiology nad Infectious Diseases. [online]. 2014. [cit. 2015-20-06]. Dostupné z <http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Diskova_metoda/EUCAST_Disk_Manual_v.4.0_2014.pdf>.
- Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., & Efferth, T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*, 21(10), 989-994.
- Harding, J. (2009). *Byliny: Obrazový průvodce bylinami a rostlinnými léčivy*. 1. české vydání. Praha: Svojtka. ISBN 978-80-256-0050-4.
- Havliš, J. Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. In: *Vesmír: Fyzika* [online]. 1999 [cit. 2016-01-10]. Dostupné z <<http://casopis.vesmir.cz/clanek/hmotnostni-spektrometrie-maldi-tof>>.
- Hili, P., Evans, C. S., Veness, R. G. (1997). Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in applied microbiology*, 24(4), 269-275.
- Horáková, I. Definitivní údaje o sklizni zemědělských plodin-2016. Český statistický úřad. [online]. 2017 [cit. 2017-02-14]. Dostupné z <https://www.czso.cz/web/czso/404-?p_p_id=3&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&_3_struts_action=%2Fsearch%2Fsearch&_3_redirect=%2Fweb%2Fczso%2F404-&_3_keywords=sklizen+zeleniny&_3_groupId=0>.
- Huong, T. T., Komínková, M., Guráň, R., Ruttkay-Nedecký, B., Kopel, P., Trnková, L., Zírka, O., Adam, V., Kizek, R. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* 2014, 1, 64—66. Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita. Brno. [online]. 2014. [cit. 2016-1-24]. Dostupné

z<http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0214/pdf/dmicrobial_identification_by_maldi-tof_ms.pdf>.

- Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food chemistry*, 108(3), 986-995.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzgium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy research*, 21(6), 501-506.
- Charai, M., Mosaddak, M., Faid, M. (1996). Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. *Journal of Essential Oil Research*, 8(6), 657-664.
- Chorin, M. Palti, J. Moeller, S. Leaf, stem and fruit diseases of vegetables of the Cucurbitaceae, Cruciferae, Umbelliferae and Liliaceae in Israel. Cab direct. 1954.
- Chupp, C. Manual of Vegetable Plant Diseases. New Delhi: Discovery Publishing House, 2011. ISBN 8171412513.
- Hartz, T. K., Johnstone, P. R., Nunez, J. J. (2005). Production environment and nitrogen fertility affect carrot cracking. *HortScience*, 40(3), 611-615.
- Jirásek, R. Fytoterapie respiračních onemocnění: Ministerstvo zemědělství ČR – Vědecký výbor pro výživu zvířat, Výzkumný ústav pro výživu zvířat Praha-Uhřetěves. Farmi news. 2012, 3.
- Jirásek, R. (2010). Léčivé rostliny a choroby pohybového ústrojí. Edukafarm. Praha. [cit. 2016-1-24]. Dostupné z<<http://www.edukafarm.cz/data/soubory/casopisy/Farmi%202-2010/08%20lecivky.pdf>>.
- Kaur, G. J., Arora, D. S. (2009). Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. *BMC complementary and alternative medicine*, 9(1), 30.
- Kazda, J. Jindra, Z. Kabíček, J. Prokinová, E. Ryšánek, P. Stejskal, (2003). V. Choroby a škůdci polních plodin, ovoce a zeleniny. Vydavatelství odborných časopisů. Praha. ISBN 80-86726-03-7
- Kennouche, A., Benkaci-Ali, F., Scholl, G., Eppe, G. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* cloves extracted by conventional and microwave techniques. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 5(1), 1-11.

- Koike, S. T., Gladders, P., Paulus, A. (2006). *Vegetable diseases: A colour handbook*. CRC Press. ISBN-10:0-12-373675-7.
- Kopec, K. (2010). *Zelenina ve výživě člověka*. Grada Publishing as. Praha. 168. ISBN 978-80-247-2845-2.
- Kopecký, J. *Metody vyhledávání biologicky aktivních látek.. Mikrobiologický ústav AVČR. Třeboň. Ústav fyzikální biologie Jihočeské univerzity[online]. 2006. [cit. 2015-20-06]. Dostupné z <<http://archiv.otevrenaveda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Chemie/30kopecky.pdf>>.*
- Laird, K., Phillips, C. (2012). Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials, *Letters in applied microbiology*, 54(3), 169-174.
- Lazar, E. E., Jobling, J. J., Benkeblia, N. (2010). Postharvest disease management of horticultural produce using essential oils: Today's prospects. *Stewart Postharvest Review*, 6(3), 1-9.
- Lis-Balchin, M. (2002). *Geranium and Pelargonium: the genera Geranium and Pelargonium*. Taylor & Francis. Medicinal and Artomatic Plants – Industrial Profiles. vol. 27.
- Lis-Balchin, M., Hart, S. L., Deans, S. G. 2000. Pharmacological and antimicrobial studies on different Tea-tree oils (*Melaleuca alternifolia*, *Leptospermum scoparium* or Manuka and *Kunzea ericoides* or Kanuka), originating in Australie and New Zealand. *Phytotherapy Research*. 14(8), 623-629.
- Mahmout, B. S. M. Application of some spices in flavoring and preservation of cookies. I. Antioxidant properties of cardamom, cinnamon and clove. *Research gate*. 2002, 98(5), 176-183.
- Mihajilov-Krstev, T., Radnović, D., Kitić, D., Stojanović-Radić, Z., Zlatković, B. (2010). Antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against pathogenic microbial strains. *Archives of Biological Sciences*, 62(1), 159-166.
- Minchinton, E., Auer, D., Martin, H., Tesoriero, L. (2006). *Guide to Common Diseases and Disorders of Parsley*. State of Victoria: Department of Primary Industries, *National Library of Australia*, 1-46. ISBN 1-74146-784-5.
- Mishra, S. R. (2005). *Plant Protection and Pest Management*. Discovery Publishing House. ISBN 81-8356-042-3.
- Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., Roura, S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Science and Technology*, 38(5), 565-570.

- Nostro, A., Blanco, A. R., Cannatelli, M. A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., ... & Alonzo, V. (2004). Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters*, 230(2), 191-195.
- Opletal, L., Šimerda, B. Antiinvazní látky přírodního původu jako aditiva do krmiv. Ministerstvo zemědělství ČR – Vědecký výbor pro výživu zvířat, Výzkumný ústav pro výživu zvířat Praha-Uhřetěves. Hradec Králové, Šumperk. [online]. 2005 [cit. 2016-01-31]. Dostupné z <<http://www.vuzv.cz/sites/File/vybor/Opletal%20Antiinvazni%20latky.pdf>>.
- Opletal, L., Skřivanová, V. Přírodní látky a jejich biologická aktivita, Svazek 2, Využití látek pro ovlivnění biologických procesů hospodářských zvířat. Nakladatelství Karolinum. Univerzita Karlova. 2010. ISBN 978-80-246-1801-2.
- Pánková, I. „Sbírký fytopatogenních bakterií a referenčních protilátek z Výzkumného ústavu rostlinné výroby“. [online]. Dostupné z <<http://www.vurv.cz/collections/vurv.exe/search?lang=cz&org=BA>>.
- Pánková, I., Krejzar, V., Mertelík, J., Kloudová, K. (2013). Metodika inokulace jírovce maďalu (*Aesculus hippocastanum*) původcem choroby bleeding canker, bakterií *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*, v polních podmínkách. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. ISBN 978-80-7427-142-7.
- Phillips, P. A. (2005). Late blight of celery (*Septoria Apiicola*): Timing fungicides based on its biology as predicted by in-field weather stations. University of California Cooperative Extension Santa Barbara County. [online]. Dostupné z <<http://cesantabarbara.ucdavis.edu/files/75295.pdf>>.
- Pekárková, E. (2004). Pěstujeme mrkev, ředkvičky, celer a další kořenové zeleniny. Grada. ISBN 80-247-0744-6.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC complementary and alternative medicine*, 6(1), 39.
- Preedy, V. R. (2015). Essential oils in food preservation, flavor and safety. Department of Nutrition and Dietetics, King's College London, *Academic Press*, ISBN 978-0-12-416641-7.
- Raid, R. N., (2004). Celery diseases and their management. In *Diseases of Fruits and Vegetables Volume I*. (pp. 441-453). Springer Netherlands. ISSN 978-1-4020-2606-5.
- Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food control*, 19(7), 681-687.

- Ruberto, G., Baratta, M. T., Deans, S. G., Dorman, H. D. (2000). Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta medica*, 66(08), 687-693.
- Řepková, J., Odolnost rostlin k patogenům. Přírodovědecká fakulta Masarykovy University. [online]. 2013 [cit. 2016-01-31]. Dostupné z <
<http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js13/genetika/web/pages/07-rezistence-k-patogenum.html>>.
- Şahin, F., Karaman, I., Güllüce, M., Ögütçü, H., Şengül, M., Adıgüzel, A., ... Kotan, R. (2003). Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. *Journal of ethnopharmacology*, 87(1), 61-65.
- Sarikurkcü, C., Zengin, G., Oskay, M., Uysal, S., Ceylan, R., Aktumsek, A. (2015). Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Industrial Crops and Products*, 70, 178-184.
- Schlett, S. (2008). 100 potravin pro zdraví. 1. vyd. Praha. 248 s. ISBN 978-80-249-0991-2.
- Snowden, A. L. (2010). Post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables: volume 2: vegetables (Vol. 2). University of Cambridge. ISBN 978-1-84076-598-4.
- Suchý, V. 1988. Farmakognosie, část obecná. Vysokoškolská skripta, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislavě. p. 216.
- Trepková, E. Vonášek, F. Vůně a parfémy: Tajemství přitažlivosti. Praha: Maxdorf, 1997. p. 173. ISBN 80-85800-48-9
- Tůmová, L. a R. Jirásek. Česnek – efektivní imunomodulační rostlina. *FarmiNews*. 2011, 8(1), 44. ISSN 1214-5017.
- Tůmová, L., Holcová, L. (2014). Přehled účinků a bezpečnosti užívání přírodních léčiv v průběhu těhotenství a laktace. *Praktické Lékárenství - Časopis Postgraduálního Vzdělávání. Farm*, 10(1), 30-3.
- Urbášková, P. Rezistence bakterií k antibiotikům. Vybrané metody. Praha, Trios. 1998. ISBN 80-238-3106-2.
- Uddin, Z., Shad, A. A., Bakht, J., Ullah, I., Jan, S. (2015). In vitro antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical screening of *Apium graveolens*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(5), 1699-1704.
- Václavík, T. Jak úspěšně vytvořit a provozovat systém „biobedýnek. Ministerstvo zemědělství. České republiky. [online]. 2008. [cit. 2015-08-09]. Dostupné

z <http://www.tso-tso.cz/upload/soubory/jak_vytvorit_a_uspesne_provozovat_system_biobedynek.pdf>.

- Vermeiren, L., Devlieghere, F., van Beest, M., de Kruijf, N., Debevere, J. 1999. Developments in the active packaging of foods. *Trends In Food Science, Technology*. 10, 77-86.
- Velký slovník naučný. Vyd. 1. Praha: Diderot, 1999, p. 843-1679. Encyklopedie Diderot. ISBN 80-902723-1-2.
- Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., Quek, S. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 59, 282-289.