



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Vliv obohacení medu vybranými bioaktivními
látkami na jeho antimikrobiální aktivitu vůči
*Escherichia coli***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

Autor: Lucie Šebestová

Vedoucí práce: Ing. Marian Hýbl, Ph.D.

České Budějovice 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou/diplomovou práci s názvem „Vliv obohacení medu vybranými bioaktivními látkami na jeho antimikrobiální aktivitu vůči *Escherichia coli*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 24. 4. 2024

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Mariánovi Hýblovi, PhD., za cenné rady, připomínky, trpělivost a věnovaný čas při práci v laboratoři. Dále děkuji vedení Zdravotně sociální fakulty Jihočeské fakulty za poskytnutí laboratorního zázemí. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu po celou dobu mého studia.

Vliv obohacení medu vybranými bioaktivními látkami na jeho antimikrobiální aktivitu vůči *Escherichia coli*

Abstrakt

Hlavním cílem této bakalářské práce je stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) a baktericidní koncentrace (MBC) jak u nativních medů a jejich ovlivnění růstu *Escherichia coli* u medů obohacených o vybrané esenciální oleje.

V teoretické části bakalářské práci je stručně charakterizována bakterie *Escherichia coli*, její patogenní kmeny a antibiotická rezistence. Dále je popsán med, jeho chemické složení a fyziologické účinky. V neposlední řadě jsou zde obecně popsány esenciální oleje, jejich antimikrobiální vlastnosti a také stručný popis ke každému vybranému oleji.

V metodické části bakalářské práce jsou popsány postupy přípravy média, agaru, inokula, používaných vzorků a stanovení jejich minimální inhibiční a baktericidní koncentrace. MIC bylo spektrofotometricky měřeno v 96 jamkových mikrotitračních destičkách. MBC bylo stanoveno očkováním z destičky na Mueller-Hinton agar a následnou 24hodinovou kultivací.

Celkem byly testovány 3 nativní medy, které byly poté obohaceny o 8 vybraných esenciálních olejů. Také byly testovány esenciální oleje s přídavkem dimethylsulfoxidu (DMSO).

Výsledky získaných dat jsou statisticky vyhodnoceny, graficky vyhotoveny a porovnány s odbornými zdroji.

Klíčová slova

med; esenciální oleje; *Escherichia coli*, antimikrobiální aktivita

Impact of honey enrichment on its antimicrobial activity by bioactive substances against *Escherichia coli*

Abstract

The main aim of this bachelor's thesis is to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of both native honeys and honeys enriched with selected essential oils on the growth of *Escherichia coli*.

In the theoretical part of the bachelor's thesis, bacteria *Escherichia coli* is briefly characterized, including its pathogenic strains and antibiotic resistance. Furthermore, honey is described, including its chemical composition and physiological effects. Additionally, essential oils are generally described, including their antimicrobial properties, along with a brief description of each selected oil.

In the methodological part of the bachelor's thesis, procedures for preparing mediums, agar, inoculum, and the determination of their minimum inhibitory and bactericidal concentrations are described. MIC was measured spectrophotometrically in 96 well microtiter plates. MBC was determined by inoculation from the plate onto Mueller-Hinton agar followed by a 24hour incubation.

A total of 3 native honeys were tested, which were then enriched with 8 selected essential oils. Essential oils with the addition of dimethyl sulfoxide (DMSO) were also tested. The results of the obtained data are statistically evaluated, graphically presented, and compared with scientific sources.

Key words

honey; essential oils; *Escherichia coli*; antimicrobial activity

Obsah

1	Úvod	8
2	<i>Escherichia coli</i>	9
2.1	Morfologie.....	9
2.2	Patogenita.....	9
2.3	Onemocnění.....	10
2.4	Klinicky významné kmeny <i>Escherichia coli</i>	10
2.4.1	Enterotoxigenní <i>E. coli</i> (ETEC).....	10
2.4.2	Enteropatogenní <i>E. coli</i> (EPEC).....	10
2.4.3	Enterohemoragické <i>E. coli</i> (EHEC).....	10
2.4.4	Enteroinvazivní <i>E. coli</i> (EIEC).....	11
2.4.5	Enteroagresivní <i>E. coli</i> (EAEC).....	11
2.4.6	Uropatogenní <i>E. coli</i> (UPEC).....	11
2.5	Antibiotická rezistence.....	11
3	Med	12
3.1	Vznik medu.....	12
3.2	Chemické složení medu.....	12
3.2.1	Cukry.....	12
3.2.2	Voda.....	13
3.2.3	Kyseliny.....	13
3.2.4	Bílkovinné látky.....	13
3.2.5	Tuky.....	14
3.2.6	Vitaminy.....	14
3.2.7	Minerální látky.....	14
3.2.8	Barviva.....	15
3.2.9	Aromatické látky.....	15
3.2.10	Toxické látky a kontaminanty.....	15
3.3	Antimikrobiální účinky medu.....	15
3.4	Antioxidační účinky.....	16
3.5	Med v medicíně.....	16
4	Esenciální oleje	17
4.1	Využití esenciálních olejů.....	17
4.2	Složení esenciálních olejů.....	18
4.2.1	Karvakrol a thymol.....	18
4.2.2	Eugenol.....	18

4.2.3	β -karyofylen	18
4.2.4	p-cymene.....	19
4.3	Vlastnosti esenciálních olejů	19
4.3.1	Antibakteriální vlastnosti esenciálních olejů.....	19
4.4	Skořicovník pravý (<i>Cinnamomum verum</i>).....	20
4.5	Tymián červený (<i>Thymus vulgaris</i>).....	20
4.6	Máta peprná (<i>Mentha piperita</i>).....	20
4.7	Hřebíčkovce kořený (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	20
4.8	Česnek setý (<i>Allium sativum</i>)	21
4.9	Vavřín kubébový (<i>Litsea cubeba</i>)	21
4.10	Dobromysl obecná (<i>Origanum vulgare</i>).....	21
4.11	Saturejka horská (<i>Satureja montana</i>)	21
5	Cíl práce a hypotéza	22
6	Metodika.....	23
6.1	Příprava MHB	24
6.2	Příprava MHA do Petriho misek.....	25
6.3	Příprava kultury <i>Escherichia coli</i>	25
6.4	Příprava vzorků	26
6.4.1	Nativní medy	26
6.4.2	Medy s esenciálními oleji	26
6.4.3	Esenciální oleje s DMSO	26
6.5	Příprava inokula	26
6.6	Stanovení MIC	26
6.7	Stanovení MBC.....	27
7	Výsledky	29
7.1	Nativní medy	29
7.2	Esenciální oleje s DMSO	29
7.3	Medy obohacené o esenciální oleje.....	29
8	Diskuse.....	33
9	Závěr	35
	Seznam použitých zdrojů	36
	Seznam obrázků	40

1 Úvod

Historie využití medu v lidské výživě a medicíně sahá již do starověku. Med je sladká látka produkována včelami z nektaru či medovice. Při jejich sběru je včely uchovávají v ústech, tam bakterie a enzymy začínají přeměňovat složité cukry na jednodušší. Med je poté uložen do pláství v úlu, kde dále zraje.

Med má mnoho prospěšných vlastností. Díky jeho antimikrobiálním účinkům je přirozeným konzervantem a lékem.

Escherichia coli je u lidí běžnou součástí střevní mikroflóry. Jako komenzál ve střevě pomáhá s trávením a syntézou některých vitamínů. Nicméně některé kmeny *E. coli* způsobují různá onemocnění od mírných zažívacích potíží až po vážné infekce, některé dokážou produkovat i toxiny.

Esenciální oleje jsou extrakty aromatických látek z různých částí rostlin. Lze je získat destilací, lisováním nebo extrakcí. Obsahují charakteristické aroma rostliny, ze které byly připraveny. Esenciální oleje se využívají pro různorodé účely, např: aromaterapie, jako součást kosmetiky či v potravinářství

2 *Escherichia coli*

Escherichia coli je klinicky velice významným bakteriálním druhem (Hurych et al., 2021). Je přítomna v gastrointestinálním traktu jako běžný komenzál, tak je i jedním z nejdůležitějších patogenů u lidí (Vila et al., 2016). Do tohoto druhu patří mnoho kmenů se známým patogenním působením, které vyplývá z přítomnosti určitých faktorů virulence. Tyto kmeny způsobují nejrůznější onemocnění, nejčastěji to jsou průjmy a močové infekce. Mohou způsobit i potenciálně fatální novorozeneckou meningitidu či hemolyticko-uremický syndrom (Vila et al., 2016; Hurych et al., 2021).

Faktory virulence jsou endotoxin, exotoxiny (specifické pro jednotlivé kmeny), adhezivní faktory (Hurych et al., 2021). Kmeny způsobující močové infekce mají navíc systémy přijímání železa, polysacharidové obaly a invaziny, které nejsou přítomny v komenzálních a střevních patogenních kmenech (Vila et al., 2016).

E. coli je rozmanitý druh, na který lze z hlediska lidského zdraví pohlížet jako na tři hlavní podskupiny. Komenzální kmeny neškodně kolonizují tlusté střevo zdravých hostitelů, způsobující extraintestinální onemocnění pouze při velké infekční dávce (např. u penetrujícího abdominálního traumatu. Průjmové kmeny způsobují průjmové syndromy, které se liší klinickým obrazem a patogenezí podle charakteristických rysů virulence kmene. Tyto rozdíly slouží jako základ pro klasifikaci kmenů do subpatotypů, např. enterohemoragické *E. coli* (EHEC), enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), enteropatogenní *E. coli* (EPEC) a enteroagregativní *E. coli* (EAEC). Takové kmeny téměř nikdy nezpůsobují extraintestinální infekci a mimo rozvojový svět jen zřídka kolonizují zdravé hostitele (Vila et al., 2016).

2.1 *Morfologie*

E. coli je Gram negativní fakultativně anaerobní tyčinka s bičíky. Produkuje koliciny, které jsou toxické pro některé bakterie, podílí se na tvorbě vitamínu K (Hurych et al., 2021).

2.2 *Patogenita*

Mezi faktory virulence *E. coli* patří endotoxin (jako součást lipopolysachardů). Dále jsou pro ni typické adhezivní faktory (fimbrie), které pomáhají přichytit se a někdy i proniknout do intestinálního epitelu (Hurych et al., 2021).

2.3 Onemocnění

Kmeny *E. coli* mohou způsobit průjemová onemocnění, močové infekce, sepse, novorozeneckou meningitidu, hemolyticko-uremický syndrom či intraabdominální infekce (Hurych et al., 2021).

2.4 Klinicky významné kmeny *Escherichia coli*

2.4.1 Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC)

Tento kmen způsobuje serózní průjmy cestovatelů. Produkuje dva enterotoxiny: termolabilní a termostabilní. Termostabilní enterotoxin aktivuje adenylátcyklázu, čímž se zvýší hladina cAMP (cyklický adenosinmonofosfát) a dochází k hypersekreci vody a elektrolytů. Termostabilní enterotoxin má dvě formy, jedna zvyšuje hladinu cGMP (cyklický guanosinmonofosfát), u druhé mechanismus účinku neznáme (Hurych et al., 2021).

2.4.2 Enteropatogenní *E. coli* (EPEC)

Způsobuje serózní průjmy novorozenců a kojenců, při kterých dochází k dehydrataci, ve vážných případech může dojít až k úmrtí. Neprodukuje enterotoxiny, ale má adhezivní mechanismy, kterými se váže na enterocyty (Hurych et al., 2021).

2.4.3 Enterohemoragické *E. coli* (EHEC)

V literatuře se také může najít pod označením STEC (Shiga-like toxigenní) či VTEC (verotoxigenní). Tento kmen se dělí do několika sérotypů. Mezi nejvirulentnější patří O157:H7 (nejvíce rozšířená ve světě, O26 (nejvíce rozšířená v ČR), O104:H4, dále pak O111, O103 a O145. Jedná se většinou o pohyblivé bakterie s bičíky (Hurych et al., 2021).

Onemocnění začíná jako kolitida s hemoragií a může přejít v hemolyticko-uremický syndrom. EHEC produkuje Shiga-like toxin, který se váže na endotelie a vyvolává výše uvedené komplikace, které mohou vést až k smrti pacienta (Nguyen a Sperandio, 2012; Hurych et al., 2021). Člověk se může nakazit z hovězího masa, které bylo špatně tepelně upraveno, nepasterizovaného mléka apod. Infekční dávka je extrémně nízká (10 bakterií) (Hurych et al., 2021). Podání antibiotik může vést k uvolnění bakteriálních

toxinů a paradoxně zhoršit zdravotní stav pacienta (Nguyen a Sperandio, 2012; Huryh et al., 2021).

2.4.4 Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC)

Tento kmen díky svým faktorům invazivity proniká do epiteliálních buněk a množí se v nich, způsobuje průjemy s příměsí krve doprovázené i celkovými příznaky (Hurych et al., 2021).

2.4.5 Enteroagresivní *E. coli* (EAEC)

Způsobuje vodnaté průjemy cestovatelů (Hurych et al., 2021).

2.4.6 Uropatogenní *E. coli* (UPEC)

Vyvolává infekce močového systému. UPEC je nejčastější původce uroinfekcí v komunitě (80 %), v nemocnici jsou zastoupeny relativně méně, zde převládají spíše kmeny nozokomiální. Faktory virulence jsou specifické adheziny umožňující uchycení na sliznici močových cest (Hurych et al., 2021).

2.5 Antibiotická rezistence

Převažujícím rizikovým faktorem pro šíření rezistentních bakterií a genů je selektivní antibiotický tlak používáním velkého množství antibiotik nejen v lékařství, ale i v chování zvířat, výživě a zemědělství. Odhaduje se, že celková roční spotřeba antibiotik je mezi 100 000 a 200 000 tunami (von Baum et al, 2005).

Antimikrobiální rezistence u *E. coli* je trvale nejvyšší u antimikrobiálních látek, které se v humánní a veterinární medicíně používají nejdelší dobu, jako je ampicilin. V posledních dvou desetiletích však byl pozorován nárůst výskytu a šíření multirezistentních bakterií, včetně kmenů rezistentních vůči novějším antibiotikům, jako jsou fluorochinolony a cefalosporiny s rozšířeným spektrem účinku (Vila et al., 2016) a karbapenemy u rezistentních kmenů (Hurych et al., 2021)

Rezistence na beta-laktamová antibiotika u Gram negativních patogenů je zprostředkována beta-laktamázi. Ty hydrolýzou jejich beta-laktamové struktury inaktivují antimikrobiální látky (von Baum et al, 2005).

3 Med

Včelí med je nejznámější a nejdůležitější produkt včel (Veselý, 2003). Med je komplexní nutriční sladidlo složené převážně ze sacharidů (60–85 %) a vody (12–23 %). Obsahuje také v malých množstvích další sloučeniny, jako jsou organické kyseliny, minerály, vitamíny, enzymy, proteiny, aminokyseliny, těkavé sloučeniny a několik bioaktivních látek (např. fenoly a flavonoidy), stejně jako pylová zrna (Machado De-Melo et al., 2018).

3.1 Vznik medu

Med je definován jako sladká hmota vytvářená včelami z nektaru nebo z medovice, které sbírají (Veselý, 2003; Pita-Calvo a Vázquez, 2017), přetvářejí pomocí výměšků hltanových žláz (regurgitace) a odpařování (Khan et al., 2014). Účelem je přetvoření řídkých, mikrobiálně nestabilních přírodních látek na hutné a mikrobiálně stálé. Při tomto procesu se mění i chemické složení – sacharóza se štěpí na inertní cukr a současně z jednodušších cukrů vznikají cukry složitější (Veselý, 2003).

Včely med ukládají jako primární zdroj potravy ve voskových plástvích uvnitř úlu (Khan et al., 2014).

3.2 Chemické složení medu

Hlavními složkami medu jsou sacharidy, které tvoří asi 95 % sušiny medu. Kromě sacharidů obsahuje med vodu a další sloučeniny, jako jsou organické kyseliny, bílkoviny, aminokyseliny, minerály, polyfenoly, vitamíny a aromatické sloučeniny. Význam medu z hlediska výživy spočívá v jeho mnoha fyziologických účincích. Složení medu do značné míry závisí na botanickém původu (Bogdanov et al., 2008).

pH medu je běžně mezi 3,2 a 4,5. Tato relativně kyselá hladina pH zabraňuje růstu mnoha bakterií (Khan et al., 2014).

3.2.1 Cukry

Hlavními cukry (75 % obsahu) jsou monosacharidy fruktóza a glukóza (Bogdanov et al., 2008; Pita-Calvo a Vázquez, 2017), 10–15 % disacharidů a zbytek jsou ostatní cukry. Obsah cukru závisí na typu oplované rostliny, zpracování a skladování (da Silva et al., 2016).

Hlavními oligosacharidy v květovém medu jsou disacharidy sacharóza, maltóza, trehalóza a turanóza, stejně jako některé nutričně relevantní, jako je panóza, 1-kestóza, 6-kestóza a palatinóza. Ve srovnání s květovým medem obsahuje medovicový med vyšší množství oligosacharidů melezitózy a rafinózy. Při trávení medu jsou hlavní sacharidy fruktóza a glukóza rychle transportovány do krve a mohou být využity pro energetické potřeby lidského těla. Denní dávka 20 g medu pokryje asi 3 % potřebné denní energie (Bogdanov et al., 2008).

3.2.2 Voda

Aktivita vody v medu je nízká. Většina molekul vody je spojena s cukry a jen málo z nich zůstává dostupných pro mikroorganismy, takže je pro jejich růst nevhodným prostředím. Pokud je med smíchán s vodou, ztrácí svou nízkou aktivitu vody, a již nemá tuto antimikrobiální vlastnost (Khan et al., 2014).

Obsah vody v medu souvisí s různými faktory, jako je botanický a geografický původ nektaru, půdní a klimatické podmínky, období sklizně, intenzita toku nektaru, stupeň zrání, manipulace včelaři během období sklizně, podmínky zpracování a skladování. Medy různého botanického původu mohou mít různý obsah vlhkosti (Machado De-Melo et al., 2018).

Vlhkost je kvalitativní parametr související s trvanlivostí medu. Normálně se vlhkost medu pohybuje mezi 13 a 25 %, optimální je asi 17 %. Medy, jejichž vlhkost je vyšší než 18 %, jsou náchylné ke kvašení, protože osmotický tlak cukru není dostatečně silný, aby zabránil množení osmofilních (cukr tolerantních) kvasinek (Machado De-Melo et al., 2018).

3.2.3 Kyseliny

Med je slabě kyselý díky 0,57% obsahu organických kyselin. Tyto kyseliny derivovány z cukrů enzymy sekterovanými včelami při přeměně nektaru na med. Nejvíce zastoupenou kyselinou je kyselina glukonová (da Silva et al, 2016), ta vzniká v medu, když včely vylučují enzym glukózooxidázu, který katalyzuje oxidaci glukózy na kyselinu glukonovou (Khan et al., 2014). Dále v medu jsou kyselina citronová, kyselina levulová a kyselina mravenčí (da Silva et al, 2016).

3.2.4 Bílkovinné látky

Med obsahuje 0,1–0,5 % bílkovin (Machado De-Melo et al., 2018), především enzymů a volných aminokyselin (Bogdanov et al., 2008). Obsah proteinů se liší druhem včel – med *Apis mellifera* obsahuje 0,2–1,6 % proteinů, zatímco med *Apis cerana* obsahuje 0,1–3,3 % (da Silva et al, 2016). Bílkoviny v medu pocházejí jak od včel (slinné žlázy), tak od rostlin (nektar, medovice a hlavně pyl) (da Silva et al, 2016; Machado De-Melo et al., 2018).

Nejvíce zastoupenou aminokyselinou 0v medu je prolin. Do medu se dostává ze slinných sekretů včel při přeměně nektaru nebo medovice na med. Používá se jako ukazatel zralosti medu (da Silva et al, 2016; Machado De-Melo et al., 2018).

Tři hlavní enzymy medu jsou diastáza (amyláza), rozkládající škrob nebo glykogen na menší cukerné jednotky, invertáza (sacharóza, α -glukosidáza), rozkládající sacharózu na fruktózu a glukózu a také glukosidáza, která štěpí glukózu na peroxid vodíku a kyselinu glukonovou (Bogdanov et al., 2008).

3.2.5 Tuky

V medu byla nalezena malá množství lipidových sloučenin (asi 0,04 %), mezi nimi glyceridy, steroly, fosfolipidy a různé kyseliny, jako je palmitová, olejová, laurová, miristová, stearová a linolová. Vznikají z rostlin, a hlavně ze zbytků vosku (Machado De-Melo et al., 2018).

3.2.6 Vitaminy

Med obsahuje vitamíny, které pocházejí především z pylu květů navštěvovaných včelami, dále z nektaru nebo medovice (Machado De-Melo et al., 2018). Hlavně to jsou vitamíny B1, B2, C, B6, B5 a B3 (Khan et al., 2014) a dále také vitamin C. (da Silva et al, 2016). Med obsahuje 0,3–25 mg/kg cholinu a 0,06–5 mg/kg acetylcholinu. Cholin je nezbytný pro kardiovaskulární a mozkovou funkci, stejně jako pro složení a opravu buněčných membrán, zatímco acetylcholin působí jako neurotransmitter (Bogdanov et al., 2008).

3.2.7 Minerální látky

Obsah minerálních látek v medu je obecně nízký, v květovém medu se pohybuje mezi 0,02 a 0,3 %, zatímco v medovicovém může dosáhnout 1 % z celkového množství

(Machado De-Melo et al., 2018). Z nutričního hlediska je důležitý chrom, mangan a selen, zejména pro děti od 1 do 15 let (Bogdanov et al., 2008).

3.2.8 Barviva

Za barvu medu jsou zodpovědné pigmenty. Nejdůležitější jsou polyfenoly, karotenoidy, xanthopyly a antokyany, které lze seskupit do pigmentů rozpustných ve vodě a rozpustných v tucích. Dalšími sloučeninami, které mohou přispět k barvě medu, jsou cukry, minerály a aminokyseliny (Machado De-Melo et al., 2018).

3.2.9 Aromatické látky

Polyfenoly jsou důležitou skupinou sloučenin s ohledem na vzhled a funkční vlastnosti medu. Polyfenoly v medu jsou především flavonoidy, fenolové kyseliny a deriváty fenolových kyselin. Jsou to sloučeniny, o kterých je známo, že mají antioxidační vlastnosti. (Bogdanov et al., 2008).

3.2.10 Toxické látky a kontaminanty

Stejně jako každá jiná přírodní potravina může být i med kontaminován prostředím, např. těžkými kovy, pesticidy, antibiotiky atd. (Bogdanov et al., 2008). Přírodní toxické sloučeniny jsou většinou syntetizovány rostlinami, jako chemický obranný mechanismus proti býložravcům. Hlavní toxické sloučeniny některých medů jsou pyrrolizidinové alkaloidy (PA) a polyhydroxylované cyklické uhlovodíky (diterpenoidy) Když včely sbírají nektar a pyl z rostlin syntetizujících toxiny, toxické sloučeniny mohou být přeneseny do včelích produktů (Machado De-Melo et al., 2018).

3.3 Antimikrobiální účinky medu

Antibakteriální aktivita medu je závislá na jeho fyzikálněchemickém složení. Faktory přispívající antibakteriální aktivitě medu jsou: vysoký obsah sacharidů, peroxid vodíku, methylglyoxal, protein defensin-1 a nízké pH (Kwakman et al, 2012; Libonatti et al, 2014).

Hlavním antibakteriálním faktorem je peroxid vodíku, který vzniká činností glukosidázy. Glukosidáza v medu štěpí glukózu na glukonovou kyselinu a peroxid vodíku (Kwakman et al, 2012; Khan et al., 2014), ale kapacita produkce peroxidu závisí také na aktivitě medové katalázy (Bogdanov et al., 2008). Množství hydrogen peroxidu

je ovlivněno světlem, teplotou a vzduchem, které se mohou lišit dle výrobních a skladovacích podmínek (Libonatti et al, 2014).

Antibakteriální aktivita závisí i na jiných složkách, jako jsou aromatické kyseliny, osmolarita, flavonoidy, fenoly a lysozym. Výhodou těchto složek na rozdíl od peroxidu je to, že se vlivem teploty a světla nemění a jsou neměnné i při dlouhodobém skladování medu (Bogdanov et al., 2008; Libonatti et al, 2014). Za antibakteriální aktivitu může také nízké pH medu. Tyto různé faktory mají větší vliv na antibakteriální aktivitu květového medu než na med medovicový. Pro optimální antibakteriální aktivitu by tedy měl být med skladován na chladném a tmavém místě a konzumován čerstvý (Bogdanov et al., 2008).

3.4 *Antioxidační účinky*

Bylo zjištěno, že med obsahuje významnou antioxidační aktivitu včetně glukosidázy, katalázy, kyseliny askorbové, flavonoidů, fenolových kyselin, derivátů karotenoidů, organických kyselin, aminokyselin a proteinů. Antioxidační aktivita závisí na botanickém původu medu a u medů z různých botanických zdrojů se značně liší (Bogdanov et al., 2008; Machado De-Melo et al., 2018).

3.5 *Med v medicíně*

Bylo zjištěno, že med má silné antibakteriální účinky na nejméně šedesát druhů bakterií a na rozdíl od antibiotik, která jsou proti některým druhům bakterií často nepoužitelná, je med netoxický (Khan et al., 2014). V dnešní době bylo schváleno několik medů pro medicínské účely – příkladem je Manukový med. Aby se med mohl v medicíně použít, musí být sterilizován, obvykle gama zářením (Machado De-Melo et al., 2018), aby se zničily potenciálně přítomné bakteriální spory (Kwakman et al, 2012).

Nízká vodní aktivita medu brání růstu většiny bakterií, mnoha kvasinek a plísní. Při místní aplikaci na rány osmóza bude čerpat vodu z rány do medu, což pomůže vysušit infikovanou tkáň a snížit růst bakterií (Khan et al., 2014).

4 Esenciální oleje

Esenciální oleje (EO) jsou těkavé, přírodní, složité sloučeniny, které jsou charakteristické silnou vůní či zápachem. Jsou syntetizovány jako sekundární metabolity aromatických rostlin. Chemické složení esenciálních olejů zahrnuje složité směsi organických látek, které mají různé funkční skupiny, především to jsou však terpenoidy (Anžlovar, 2014), terpeny, aromatické a alifatické složky. Hlavní složky tvoří 20–70 % celkové koncentrace, zbytek tvoří minoritní složky. Relativní koncentrace těchto hlavních sloučenin určuje biologické vlastnosti esenciálních olejů. Složení esenciálních olejů se může měnit rok od roku důsledkem mnoha faktorů, jako je geografická oblast pěstování, agronomické techniky a datum sklizně (Haro-González at al., 2021).

Esenciální oleje jsou získávány z různých částí rostlin, jako jsou listy, kůra, stonky, kořeny, květy a plody (Burt, 2004; Calo et al, 2015). Získávají se fermentací, extrakcí či parní destilací. Existuje více než 3000 esenciálních olejů, ze kterých je komerčně důležitých 300 (Burt, 2004; Haro-González at al., 2021).

Kromě antibakteriálních vlastností mají esenciální oleje či jejich složky antivirové, antimykotické, antitoxigenní, antiparazitární a insekticidní vlastnosti. Tyto vlastnosti jsou nejspíše spojeny s funkcí těchto sloučenin v rostlinách (Burt, 2004; Haro-González at al., 2021).

4.1 Využití esenciálních olejů

Většina přírodních antimikrobiálních látek (získaných z rostlin) může účinně snížit patogenní bakterie z potravin a zároveň prodloužit životnost. Kromě toho, jak je tomu ve většině situací, rostliny nebo jejich extrakty jsou považovány za obecně neškodné pro lidi. Mnoho esenciálních olejů z různých rostlin, jako jsou jedlé a léčivé byliny, koření a rostliny, jsou bezpečné a mají silné antibakteriální účinky a našly využití v lékařství a potravinářském průmyslu (Kumar Pandey et al., 2002; Vasconcelos et al., 2018).

Esenciální oleje jsou považovány za vhodné látky pro náhradu chemických přísad pro konzervaci potravin. Používají se jako antimikrobiální, analgetická, sedativní a protizánětlivá léčiva a lokální anestetika. Dále se esenciální oleje a jejich složky

používají k výrobě parfémů, make-upu, zdravotních, dentálních a zemědělských produktů a alternativních terapií (Burt, 2004; Haro-González et al., 2021).

4.2 Složení esenciálních olejů

Složení olejů se může lišit podle vybrané metody způsobu jejich získání. Nejběžněji používanou metodou pro výrobu esenciálních olejů je parní destilace. Extrakce pomocí kapalného oxidu uhličitého za nízké teploty a vysokého tlaku produkuje přirozenější organoleptický profil. Rozdílné složení ovlivňuje i antimikrobiální aktivitu (Burt, 2004).

Esenciální oleje jsou těkavé, a proto se musí skladovat v temnu, ve vzduchotěsných nádobách, aby se zamezilo změnám jejich složení (Burt, 2004).

Vybrané složky v následujících podkapitolách byly vybrány, jelikož se vyskytují u více než jednoho vybraného esenciálního oleje používaného v mém pokusu.

4.2.1 Karvakrol a thymol

Karvakrol je jedna z hlavních složek oreganových a tymiánových olejů. Thymol je strukturně podobný karvakrolu, má hydroxylovou skupinu na jiném místě na fenolovém kruhu. Obě látky činí buněčnou membránu permeabilní (Burt, 2004).

4.2.2 Eugenol

Eugenol je těkavá sloučenina, má nízkou rozpustnost ve vodě, silný zápach a intenzivní chuť. Mezi biologické aktivity eugenolu patří insekticidní, antimikrobiální, protizánětlivé, antioxidační, protirakovinné a antivirotické aktivity, dále je dobrý na hojení ran (Haro-González et al., 2021; Kumar Pandey et al., 2022). Esenciální oleje s eugenolem inhibují produkci amylázy a proteáz bakterií. Také mají schopnost poškodit buněčnou stěnu a vyvolat buněčnou lýzu (Burt, 2004).

Mezi rostliny, které obsahují eugenol patří poupata hřebíčku, listy a kůra skořice, pepř, kurkuma, oregano, tymián a zázvor (Kumar Pandey et al., 2022).

4.2.3 β -karyofylen

β -karyofylen je nerozpustný ve vodě, ale rozpustný v ethanolu. Byly prokázány jeho antimikrobiální, antikarcinogenní, protizánětlivé a antioxidační vlastnosti. Také má efekt lokální anestezie (Haro-González et al., 2021; Kumar Pandey et al., 2022).

Vyskytuje se například v EO z oregana, meduňky, hřebíčku, zázvoru nebo šalvěže lékařské (Nguyen, 2017).

4.2.4 *p-cymene*

p-Cymene je biologický prekurzor karvakrolu a thymolu (Burt, 2004; Balahbib et al., 2021), je hydrofobní a způsobuje bobtnání cytoplazmatické membrány ve větší míře než karvakrol. Samostatně není antibakteriálně účinný, při kombinaci s karvakrolem dochází k synergismu (Burt, 2004).

Vyskytuje se jako hlavní složka EO z různých aromatických rostlin, včetně pelyňku, oregana, bazalky, mateřídoušky či eukalyptu (Balahbib et al., 2021).

4.3 *Vlastnosti esenciálních olejů*

Esenciální oleje jsou složeny z terpenům alkoholů, kyselin, esterů, aldehydů, ketonů, aminů a sulfidů. Poměr těchto složek závisí na tom, ze které části rostliny je esenciální olej vyroben (Calo et al, 2015).

4.3.1 *Antibakteriální vlastnosti esenciálních olejů*

Důležitou vlastností esenciálních olejů a jejich složek je jejich hydrofobie, která jim umožňuje se rozpouštět se v lipidech bakteriální buněčné membráně a mitochondrií, čímž narušují jejich struktury a činí je propustnějšími (Burt 2004; Calo et al, 2015). Takto dochází ke ztrátě iontů a dalšího buněčného obsahu, větší ztráty znamenají pro buňku smrt (Burt 2004).

Antibakteriální aktivita esenciálních olejů je také spojena s jejich schopností penetrovat membránou bakteriální buňky dovnitř buňky, kde inhibují její funkční a lipofilní vlastnosti (Calo et al, 2015).

Obecně platí, že esenciální oleje, které mají nejsilnější antibakteriální vlastnosti proti patogenům přenášenými potravinami, obsahují vysoké procento fenolických sloučenin, jako je například karvakrol, eugenol a thymol (Burt, 2004). Fenoly esenciálních olejů narušují buněčnou membránu mikroorganismů a tím inhibují funkční vlastnosti buňky. Mohou narušit buněčnou permeabilitu, což bude mít za následek smrt buňky (Calo et al, 2015).

Chemické složení jednotlivých složek esenciálních olejů ovlivňuje jejich přesný způsob antibakteriální aktivity. Relativní poloha hydroxylové skupiny na fenolovém kruhu v zásadě neovlivňuje stupeň antibakteriální aktivity (Burt, 2004).

4.4 *Skořicovník pravý (Cinnamomum verum)*

Kůra a listy se běžně používají k léčbě různých poruch a je o nich známo, že mají antibakteriální, protiplísňové, antioxidační, antidiabetické, protizánětlivé, nematocidní, insekticidní a protirakovinné účinky. Skořice, stejně jako jiné rostliny, má širokou škálu sekundárních metabolitů, které vykazují antibakteriální vlastnosti. Sekundární metabolity zahrnují cinnamaldehyd, cinnamát, kyselinu skořicovou a širokou škálu esenciálních olejů, jako je trans-cinnamaldehyd, cinnamylacetát, eugenol, L-borneol, kafr, karyofylenoxid, β -karyofylen, aj. (Vasconcelos et al., 2018).

4.5 *Tymián červený (Thymus vulgaris)*

Esenciální oleje tymiánu mají antiseptický, antivirový a antimikrobiální účinek. Hlavními složkami jsou thymol a p-cymen, dále se vykytují karvakrol, α -terpinyl acetát a *cis*-myrtanol (Anžlovar, 2014).

4.6 *Máta peprná (Mentha piperita)*

Máta peprná se běžně používá v léčivech na chřipku, bolest hlavy a bolest v krku (Zhao, 2022). Obsahuje silice a neesenciální složky jako např. steroidy, flavonoidy, triterpenoidy a fenolové kyseliny. Silice máty peprné: menthol, menthone, neomenthol a iso-menthone, jsou směsí biologicky aktivních sekundárních metabolitů s antibakteriálními, protizánětlivými, antivirovými, protinádorovými a antioxidačními účinky (Mughal, 2022; Zhao, 2022).

4.7 *Hřebíčkovec kořený (Syzygium aromaticum)*

Hřebíček obsahuje velké množství bioaktivních sloučenin, včetně antioxidantů a antimikrobiálních látek. Hřebíčkový esenciální olej je z velké části složen z fenylypropanoidů, zejména z eugenolu a jeho derivátů. Díky biologickým vlastnostem hřebíčkového esenciálního oleje, které zahrnují antioxidační, antibakteriální, antiseptickou, analgetickou a proti karcinogenní aktivitu, je využit v potravinářství, biomedicíně, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu (Haro-González et al., 2021; Pandey, 2022; Vinay Kumar et al., 2022).

4.8 Česnek setý (*Allium sativum*)

Česnek se běžně používá jak v potravinářství, tak i v lékařství. Používá se při léčbě a prevenci bolestí hlavy, nádorů, průjmů a dalších onemocnění. Česnekový esenciální olej obsahuje více než 95 % sulfidů. Česneková silice má antimikrobiální, antioxidační, insekticidní, protinádorovou a protizánětlivou aktivitu (Huang, 2023).

4.9 Vavřík kubébový (*Litsea cubeba*)

Plody *Litsea cubeba* se používají ve farmacii, parfumerii a potravinářství. Sušené plody se využívají v tradiční čínské medicíně, jelikož jsou považovány za diuretikum, antiastmatikum, sedativum a antiseptikum. Esenciální olej z *Litsea cubeba* má antimikrobiální, antibakteriální, antioxidační a antiparazitickou aktivitu. Dále má také potenciál na prevenci rakoviny (Yang, 2014).

4.10 Dobromysl obecná (*Origanum vulgare*)

Dva primární fenoly, které tvoří téměř 78–85 % oregánového esenciálního oleje zodpovědné za antimikrobiální vlastnosti rostliny jsou karvakrol a thymol. Thymol se váže na membránové proteiny a zvyšuje permeabilitu bakteriální buněčné membrány. Stejně tak karvakrol působí na bakteriální buňky a způsobuje strukturální a funkční poškození, což zvyšuje permeabilitu bakteriální buněčné membrány (Lombrea et al., 2020).

4.11 Saturejka horská (*Satureja montana*)

Byly prokázány léčivé vlastnosti rostlin saturejky, jako jsou protizánětlivé, analgetické, antidiabetické účinky. Esenciální oleje ze saturejky mají pozoruhodnou variabilitu chemického složení, která může být způsobena několika faktory, jako je vývojová fáze rostlin, ekologicky odlišné lokality a genetické vlastnosti. Například karvakrol se pohybuje od 84 % do pouhých 0,4 % a thymol sleduje stejný trend, od 46,0 % do stopových množství, p-cymen může být v rozmezí stop až 41,4 %) (Santos et al., 2019).

5 Cíl práce a hypotéza

1. Stanovení Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) u nativních i obohacených medů o vybrané bioaktivní látky.
2. Porovnání vlivu přidání jednotlivých bioaktivních látek na med.

Hypotéza:

1. Přidání vybraných bioaktivních látek v různých koncentracích ovlivňuje antimikrobiální aktivitu medu vůči bakterii *Escherichia coli*.

6 Metodika

Seznam vybraných esenciálních olejů:

- Skořicovník pravý (*Cinnamomum verum*)
- Tymián červený (*Thymus vulgaris*)
- Máta peprná (*Mentha piperita*)
- Hřebíčkovce kořený (*Syzygium aromaticum*)
- Česnek setý (*Allium sativum*)
- Vavřín kubébový (*Litsea cubeba*)
- Dobromysl obecná (*Origanum vulgare*)
- Saturejka horská (*Satureja montana*)

Pomůcky:

- petriho misky
- sterilní bakteriologické kličky
- odměrné válce
- kádinky
- miktrotitrační destičky s víkem
- skleněné zkumavky s víkem
- mikrozukavky Eppendorf 2ml
- automatické pipety
- multikanálové pipety
- špičky na pipety
- uzavíratelné plastové sáčky

Přístroje:

- analytické váhy
- vortex
- denzitometr
- termostat
- spektrofotometr
- flowbox
- magnetické míchadlo

Použité medy, látky a bakterie

- květový med
- květový med 2
- medovicový med
- esenciální oleje
- dimethylsulfoxid (DMSO)
- Mueller-Hinton agar (MHA)
- Mueller-Hinton bujon (MHB)
- destilovaná voda
- *Escherichia coli* CCM 4517

6.1 Příprava MHB

Pro přípravu 1 l Miller-Hinton bujónu je třeba 21 g prášku MHB. Já jsem ovšem měla k dispozici 200ml sklenice se šroubovacím víkem, a tudíž jsem pro toto množství destilované vody navážila 4,2 g. Pro vážení jsem použila analytické váhy a pro odměření vody odměrný válec. Po navážení jsem sklenici postavila na magnetické

míchadlo a nechala řádně promíchat. Poté jsem zašroubovanou láhev postavila do tlakového hrnce a vařila 30 minut.

Takto připravený Miller-Hilton bujon jsem mohla použít v laboratoři.

6.2 Příprava MHA do Petriho misek

Na přípravu 1 l Miller-Hinton agaru je třeba navázat 38 g prášku MHA. Opět jsem přepočítala množství na 200 ml destilované vody. Tudíž jsem na analytické váze navázila 7,6 g MHA a nechala promíchat na magnetickém míchadle. Postavila jsem zašroubovanou láhev do tlakového hrnce a vařila 30 minut. Před úplným vychladnutím jsem médium rozlila do připravených Petriho misek ve flowboxu. Takto připravené misky s agarem jsem mohla použít na kultivaci bakteriální kultury a ke stanovení hodnoty MBC.



Obrázek 1: Použitý bujón a agar

6.3 Příprava kultury *Escherichia coli*

Ve všech pokusech byl použit kmen *Escherichia coli* CCM 4517, který byl získán z České sbírky mikroorganismů v Brně. Kultura byla rozpuštěna v kapce vody na MHA

na Petriho misce. Poté byla miska vložena do uzavíratelného plastového sáčku a vložily se na inkubování do termostatu, na 24 hodin při 37 °C.

Poté jsem před každým pokusem ze staré kultury pomocí bakteriologické kličky přenesla kolonii bakterií na novou Petriho misku s MHA. Misku jsem vložila do uzavíratelného sáčku a nechala v termostatu 24 hodin při 37 °C inkubovat.

6.4 Příprava vzorků

6.4.1 Nativní medy

Připravovala jsem 50% koncentrace medů. Na váze jsem do 2ml mikrozkušavky navážila 1 g medu a ve flowboxu jsem po rýsku napipetovala MHB médium. Poté jsem obsah mikrozkušavky pomocí vortexu zhomogenizovala.

6.4.2 Medy s esenciálními oleji

Do 2ml mikrozkušavky jsem navážila 1 g medu. Ve flowboxu jsem přidala 8 µl esenciálního oleje a po rýsku napipetovala MHB médium. Poté jsem obsah mikrozkušavky důkladně zhomogenizovala na vortexu.

6.4.3 Esenciální oleje s DMSO

Napipetovala jsem 20 µl DMSO do 2ml mikrozkušavky, přidala 8 µl esenciálního oleje a po rýsku napipetovala MBH médium. Obsah jsem zhomogenizovala na vortexu.

6.5 Příprava inokula

Sterilní bakteriologickou kličkou jsem nabrala kolonii *Escherichia coli* a otáčivým pohybem jsem jí přenesla do sterilní destilované vody ve zkumavce. Obsah zkumavky jsem pomocí vortexu zhomogenizovala a na denzitometru změřila zákal. Požadovaná hodnota inokula byla 0,5 McFarland.

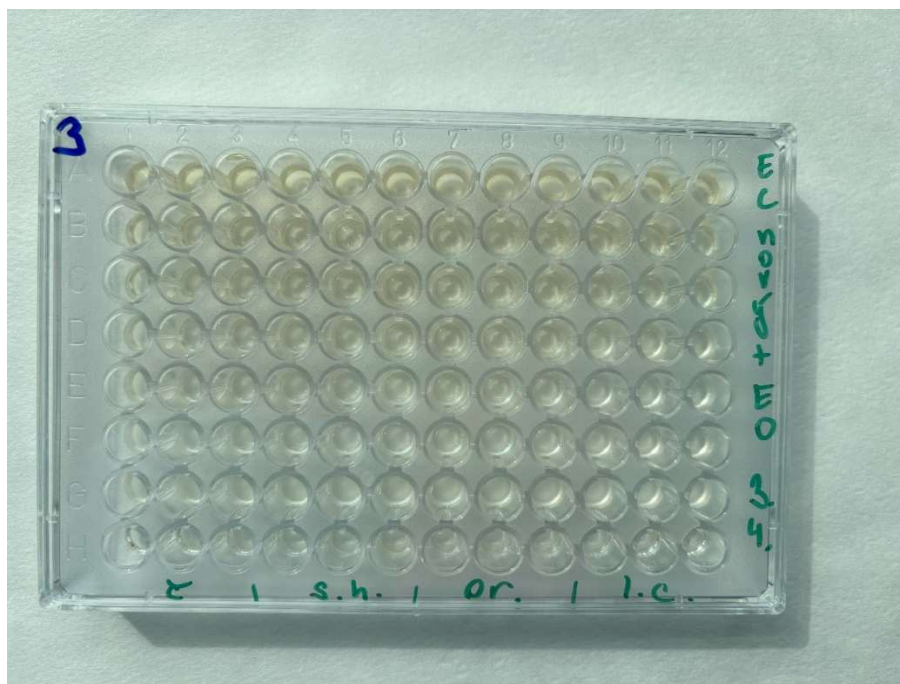
6.6 Stanovení MIC

Do 96 jamkové mikrotitrační destičky jsem do řady A automatickou pipetou napipetovala 200 µl z připravených 50% medů v mikrozkušavce. Stejný med/stejný esenciální olej byl v tripletech vedle sebe. Do jamek v řadách B až H jsem napipetovala 100 µl média.

Multikanálovou pipetou jsem z řady A napipetovala 100 μ l a přenesla obsah do řady B. Několikanásobně jsem pipetou promísila obsah a přenesla 100 μ l obsahu z řady B do řady C. Takto jsem pokračovala až do řady F, kde jsem nabrala 100 μ l a špičky i s nabraým obsahem vyhodila. Tímto způsobem jsem dostala sestupnou koncentrační řadu: 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,13 %, 1,56 %).

Do jamek v řadách A až G jsem automatickou pipetou přidala 10 μ l inokula *E. coli*. Řada G byla pozitivní kontrola, tudíž obsahovala jen bakterie a médium. Řada H byla negativní kontrola, tudíž obsahovala jen samotné médium.

Ihned po inokulaci jsem destičku s víčkem vložila do spektrofotometru, kde byla změřena při vlnové délce 620 nm. Poté jsem destičku vložila do sáčku a do termostatu, kde se 24 hodin při 37 °C inkubovala. Druhý den jsem destičku opět změřila a z hodnot ze dne založení a po 24hodinové inkubaci jsem vypočítala MIC.



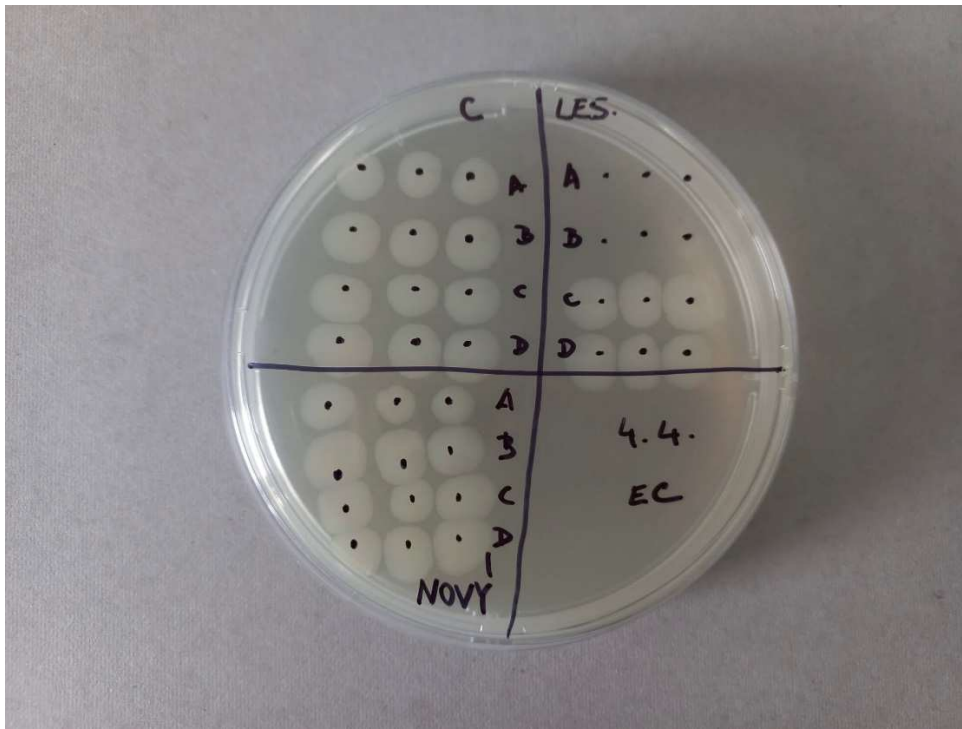
Obrázek 2: Připravená destička pro MIC

6.7 Stanovení MBC

Na připravené Petriho misky s agarem jsem lihovým fixem ze spodní strany nakreslila dvě na sebe kolmé čáry. Tím jsem plochu rozdělila čtyři části, které odpovídaly čtyřem vzorkům. Dále jsem do každé čtvrtiny nakreslila tři tečky ve čtyřech řadách.

Po změření mikrotitrační destičky jsem určila, které jamky nevykazovaly velký bakteriální růst a z těch jsem inokulační kličkou odebrala vzorek a aplikovala jej na předpřipravenou misku. Takto naočkovanou Petriho misku jsem uzavřela do plastového sáčku a uložila na 24 hodin do termostatu při 37 °C.

Po inkubaci jsem odečetla MBC hodnoty, což jsou zóny koncentrací bez růstu bakterie.



Obrázek 3: Narostlá miska pro odečtení MBC po 24h inkubaci

7 Výsledky

Antimikrobiální aktivita nativních medů vůči *Escherichia coli* byla zjištěna pomocí ukazatelů MIC a MBC. Celkem každý med má 9 různých výsledků (nativní a obohacený o 8 vybraných esenciálních olejů). Výsledky v tab. 1 a tab. 2 jsou pro stejnou sadu esenciálních olejů. Tab. 1 ukazuje procentuální obsah medu ve vzorku, zatímco tab. 2 ukazuje obsah esenciálních olejů v ppm. To samé platí pro druhou sadu esenciálních olejů v tab. 3 a tab. 4.

V tabulkách jsou zaznamenány poslední hodnoty s inhibicí, která byla 75-100 %.

7.1 Nativní medy

Med květový vykazoval MIC 50 % a MBC vyšší než 50 %. Med smíšený měl MIC i MBC 50 %. Med medovicový vykazoval 12,50 % MIC a MBC vyšší než 50 %.

7.2 Esenciální oleje s DMSO

EO z *Litsea cubeba* měl MIC 1000 ppm a MBC 4000 ppm. Esenciální olej z česneku měl hodnotu MIC 2000 ppm a MBC 4000 ppm. MIC samotného oreganového EO byla 500 ppm a jeho MBC 1000 ppm. EO saturejky horské vykazoval MIC 1000 ppm a MBC 2000 ppm.

MIC bylo 1000 ppm, u MBC byl obsah 2000 ppm. MIC a MBC samostatného EO z tymiánu červeného byly 2000 ppm. Esenciální olej z máty peprné měl hodnoty MIC a MBC větší než 4000 ppm. Hřebíčkovému EO vyšly MIC a MBC 2000 ppm.

7.3 Medy obohacené o esenciální oleje

Z tabulky 1 je patrné, že přidání EO skořicové kůry ke všem medům zlepšilo jejich MIC i MBC. U medu květového vyšla po přidání EO ze skořice MIC 12,50 % a MBC 25 %. U medu smíšeného byl zaznamenán velký vliv, a to zlepšení MIC na 6,25 % a MBC na 12,50 %. Medovicový med se skořicovým EO měl MIC i MBC 6,25 %.

Přidání tymiánu červeného také zlepšilo MIC a MBC u všech tří medů. Med květový měl po přidání tymiánového EO MIC 12,50 % a MBC 25 %. Med smíšený opět vyšel s největším zlepšením – MIC a MBC 12,50 %. Spojení medovicového medu s EO z tymiánu dosáhlo zlepšení MIC na 6,25 % a MBC na 12,50 %.

Esenciální olej z máty peprné MIC zlepšil u květového a smíšeného medu a to na 25 %.

U medu medovicového tento EO MIC nijak neovlivnil. MBC byla zlepšena u všech tří medů – květový na 6,25 %, smíšený na 25 % a medovicový na 12,50 %.

Tabulka 1: Výsledná MIC a MBC u první sady esenciálních olejů [% medu ve vzorku]

	nativní med		skořice kůra		tymián červený		máta peprná		hřebíček	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
květový med	50,00	>50,00	12,50	25,00	12,50	25,00	25,00	6,25	6,25	12,50
smíšený med	50,00	50,00	6,25	12,50	12,50	12,50	25,00	25,00	6,25	12,50
medovicový med	12,50	>50,00	6,25	6,25	6,25	12,50	12,50	12,50	6,25	12,50

V tabulce 2 můžeme vidět, že obsah EO ze skořice u květového medu, který vykazoval MIC bylo 1000 ppm, u MBC byl obsah 2000 ppm. U smíšeného medu a medovicového medu byl obsah skořicového esenciálního oleje pro MIC 500 ppm. Pro MBC u smíšeného medu byl obsah 1000 ppm a u medu medovicového 2000 ppm.

Obsah esenciálního oleje z tymiánu červeného pro MIC květového a smíšeného medu bylo 1000 ppm. Pro MIC medovicového medu to bylo 500 ppm. Pro hodnotu MBC květového medu byl obsah tymiánového EO 2000 ppm. Pro MBC smíšeného a medovicového medu bylo 1000 ppm tymiánového EO.

MIC pro květový a smíšený med s obsahem EO máty peprné byly 2000 ppm. Obsah esenciálního oleje z máty v květovém medu bylo 500 ppm a v medu smíšeném 2000 ppm pro MBC. Pro kombinaci medovicového medu s EO z máty peprné byl obsah oleje pro MIC 500 ppm a 1000 ppm pro MBC.

Přidání hřebíčkového esenciálního oleje mělo stejný účinek na všechny tři medy, a to s obsahem EO 500 ppm pro MIC a 1000 ppm pro MBC.

Tabulka 2: Výsledná MIC a MBC u první sady esenciálních olejů [ppm esenciálních olejů ve vzorku]

	skořice kůra		tymián červený		máta peprná		hřebíček	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
květový med	1000	2000	1000	2000	2000	500	500	1000
smíšený med	500	1000	1000	1000	2000	2000	500	1000
medovicový med	500	500	500	1000	1000	1000	500	1000
EO + DMSO	1000	2000	2000	2000	>4000	>4000	2000	2000

V tabulce 3 lze vidět, že esenciální olej z *Litsea cubeba* i medu květového MIC ani MBC nijak neovlivnil. U medu smíšeného se spojení s EO *Litsea cubeba* podařilo MIC

snížit na 12,50 % a MBC na 25 %. U medovicového medu měl také dobrý účinek na snížení jak MIC (6,25 %), tak MBC (12,50 %).

Přidání EO z česneku ke květovému medu mělo pozitivní účinky na MIC, ta se zlepšila na 25 %, zatímco MBC zůstalo stejné. Obohacením smíšeného medu o česnekový esenciální olej vyšlo MIC 25 % a MBC 12,50 %. MIC a MBC medovicového medu byly česnekovým EO také zlepšeny a to na 6,25 % a 12,50 % v tomto pořadí.

Esenciální olej z oregana byl schopen vylepšit MIC a MBC u všech tří medů. Všechny tři medy po obohacení tímto EO měly MIC 6,25 %, květový med měl MBC 6,25 % a MBC u smíšeného a medovicového byla 12,50 %.

Přidání EO ze saturejky horské ke květovému medu zlepšilo jeho MIC i MBC na 25 %. U smíšeného medu se zlepšily MIC i MBC na 12,50 %. Obohacení saturejkovým esenciálním oleje medovicového medu také vedlo ke zlepšení jeho MIC a MBC na 6,25 %.

Tabulka 3: Výsledná MIC a MBC u druhé sady esenciálních olejů [% medu ve vzorku]

	nativní med		<i>litsea cubeba</i>		česnek		oregano		saturejka horská	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
květový med	50,00	>50,00	50,00	50,00	25,00	50,00	6,25	6,25	25,00	25,00
smíšený med	50,00	50,00	12,50	25,00	25,00	12,50	6,25	12,50	12,50	12,50
medovicový med	12,50	>50,00	6,25	12,50	6,25	12,50	6,25	12,50	6,25	6,25

Z tabulky 4 je patrné, že MIC a MBC byla u květového medu s přidavkem 4000 ppm esenciálního oleje z *Litsea cubeba*. Obohacený smíšený med o EO z vavřínu vykazoval MIC při 1000 ppm oleje a MBC při 2000 ppm. Pro MIC u medovicového medu stačil přídavek 500 ppm esenciálního oleje a pro MBC 1000 ppm.

MIC u květového a smíšeného medu vykazoval přídavek 2000 ppm česnekového EO. Přidání 4000 ppm oleje ke květovému medu vedlo k MBC. MBC u smíšeného a medovicového medu se projevila při 1000 ppm esenciálního oleje z česneku. MIC se projevila obohacením medovicového medu 500 ppm oleje.

MIC se u všech třech medů projevila při přidání 500 ppm esenciálního oleje z oregana. Obsah oleje pro MBC květového medu bylo 500 ppm. Pro kombinaci smíšeného a medovicového medu s EO z oregana byl obsah oleje pro MBC 1000.

MIC a MBC u květového medu byly při přidavku 2000 ppm EO ze satirejky horské. U spojení smíšeného medu se satirejkovým esenciálním vyšla MIC a MBC při obsahu 1000 ppm. Pro MIC i MBC u smíšeného medu byl obsah EO 500 ppm.

Tabulka 4: Výsledná MIC a MBC u druhé sady esenciálních olejů [ppm esenciálních olejů ve vzorku]

	<i>litsea cubeba</i>		česnek		oregano		satirejka horská	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
květový med	4000	4000	2000	4000	500	500	2000	2000
smíšený med	1000	2000	2000	1000	500	1000	1000	1000
medovicový med	500	1000	500	1000	500	1000	500	500
EO + DMSO	1000	4000	2000	4000	500	1000	1000	2000

8 Diskuse

Gramnegativní bakterie jsou obvykle vůči rostlinným extraktům, olejům a jejich složkám více odolné než bakterie Gram pozitivní, protože buněčná stěna gramnegativních bakterií je složitější. Buněčná stěna grampozitivních bakterií umožňuje hydrofobním molekulám snadno pronikat a působit na buněčnou stěnu i v cytoplazmě (Vasconcelos et al., 2018).

Nejsilnější antibakteriální účinky vůči *E. coli* ze zvolených medů vykazoval med medovicový s MIC 12,50 % a MBC >50 %. Klimešová et al. (2019) zkoumaly antibakteriální efekt medů z České republiky a manukového medu na původce mastitidy skotu. Jedním z vybraných patogenů byla i *E. coli*. Výzkum prováděly na krevním agaru. Z jejich pokusu je patrné, že manukový med má nejsilnější inhibiční efekt při 20–30% koncentraci. Také ale zmiňují, že mezi medovicovým medem a medem manukovým nejsou přílišné rozdíly. Jelikož z mých výsledků vychází MIC pro menší koncentraci medu, usuzuji, že jejich kmen *E. coli* mohl být méně citlivý, či složení našich medovicových medů se mohlo mírně lišit.

Nejlepší kombinace EO s květovým medem pro jeho antimikrobiální aktivitu byla s oreganem následována kombinací s hřebíčkovým olejem. Stejně esenciální oleje měly nepříznivější účinky na med smíšený. Z mého pokusu vyšla MIC s hodnotou 500 ppm oreganového EO jak pro oba zmíněné medy, tak i pro samotný EO s DMSO. Siroli et al. (2014) uvádějí MIC pro *E. coli* 250–350 ppm oreganového esenciálního oleje.

Pro medovicový med byl nejúčinnější esenciální olej ze saturejky horské, s MIC 500 ppm. Santos et al. (2019) ve svém výzkumu uvádí, že EO ze saturejky horské vykazoval MIC při 225 ppm. Z mého pokusu samotný saturejkový olej vykazoval hodnotu MIC při 1000 ppm. Jejich vzorek byl připraven rozpuštěním 500 ppm saturejkového esenciálního oleje v MHB a 1 % DMSO. Postup pokusu mají shodný s mojí metodikou. Takto velký rozdíl ve výsledcích připisuji jinému složení použitých esenciálních olejů, pravděpodobně že hrál roli i jiný použitý kmen *E. coli*.

Bai et al. (2023) ve svém pokusu zmiňují, že MIC u hřebíčkového EO jim vyšla 640 ppm. V mém pokusu mi vyšla MIC samostatného esenciálního oleje z hřebíčku 2000 ppm a při jeho přidání k medům 500 ppm.

Sherlock et al. (2010) uvádějí, že MIC a MBC nativního ulmového medu vůči *E. coli* jsou 12,50 %. Také uvádějí stejnou hodnotu (12,50 %) pro MIC a MBC nativního manukového medu. Z mých výsledků lze usoudit, že přidání esenciálních olejů k medům lze docílit stejných, či lepších hodnot pro MIC a MBC, než je u těchto silně antibakteriálních nativních medů. Z mých vybraných EO těchto hodnot dosáhly medy obohaceny o tyto esenciální oleje: skořice, tymián, hřebíček, oregano. Obecně se dá říct, že nejuniverzálnějším esenciálním olejem je hřebíčkový.

9 Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) u nativních i obohacených medů o vybrané bioaktivní látky. Cílem bylo také porovnání vlivu přidání jednotlivých bioaktivních látek na med.

S přibývajícím rezistencí patogenů na antibiotika, roste snaha na boj proti nim najít alternativní léčebné prostředky. Takovou alternativu by mohly nabídnout právě medy obohacené o esenciální oleje. Nativní medy mají vysokou antimikrobiální aktivitu a esenciální oleje mají mnoho léčebných vlastností. Případné možnosti využití by mohly zahrnovat např. léčbu kožních problémů nebo podporu trávicího a imunitního systému.

Jako univerzální EO z mnou použitých olejů vyšel hřebíčkový EO s jeho MIC 500 ppm a MBC 1000 ppm ve všech třech zkoumaných medech. Také jsem touto prací dokázala, že přídavek esenciálních olejů k medům má smysl pro zlepšení jejich antimikrobiální aktivity vůči Gram negativním bakteriím.

Pro další výzkum by bylo vhodné pokračovat s dalšími esenciálními oleji a jinými bakteriemi.

Seznam použitých zdrojů

- ABDUL HAMMID, S., AHMAD, F., 2015. Chemotype of *Litsea cubeba* Essential Oil and Its Bioactivity. *Natural product communications*. 10(7), 1301–1304. ISSN 1555-9475.
- ANŽLOVAR, S., et al., 2014. Essential Oil of Common Thymes as a Natural Antimicrobial Food Additive. *Food Technology and Biotechnology*. 52(2), 263-268. ISSN 1330-9862.
- BAI, J., et al., 2023. Antibacterial activity and mechanism of clove essential oil against foodborne pathogens. *LWT*. 173, 114249. doi: 10.1016/j.lwt.2022.114249.
- BOGDANOV, S., et al., 2008. Honey for Nutrition and Health: a Review. *Journal of the American College of Nutrition*. 27(6), 677–689. doi: 10.1080/07315724.2008.10719745.
- BURT, S., Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223–253. doi: 0.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- CALO, J. R., et al., 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*. 54, 111–119, doi: 10.1016/j.foodcont.2014.12.040.
- da SILVA, P. M., et al., 2016. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food chemistry*. 196, 309–323, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.09.051.
- HARO-GONZÁLEZ, J. N., et al., 2021. Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. *Molecules*. 26(21), 6387. doi: 10.3390/molecules26216387.
- HUANG, L., et al., 2023. Bioactivity and health effects of garlic essential oil: A review. *Food science & nutrition*, 11(6), 2450–2470. doi: 10.1002/fsn3.3253.
- HURYCH, J., ŠTÍCHA, R., et al., 2021. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium* (3. vydání). Praha: Triton. ISBN 978-80-7553-976-2.

- KHAN, I., DUBEY, W., GUPTA, V., 2014. Medicinal properties of honey: A review. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*. 2(5), 149-156. ISSN: 2320-7051.
- KLIMEŠOVÁ, M., et al., 2019. Antibacterial effect of Czech and Mānuka honey on selected mastitis pathogens. *Acta Veterinaria Brno*, 87(4), 387-393. doi: 10.2754/avb201887040387.
- KUMAR PANDEY, V., et al., 2022. A comprehensive review on clove (*Caryophyllus aromaticus L.*) essential oil and its significance in the formulation of edible coatings for potential food applications. *Frontiers in Nutrition*. 9, 987674. doi: 10.3389/fnut.2022.987674.
- KWAKMAN, P. H. S., ZAAT, S. A. J., 2012. Antibacterial Components of Honey. *IUBMB Life*. 64(1), 48–55, doi: 10.1002/iub.578.
- LIBONATTI, C., SOLEDAD, V., BASUALDO, M., 2014. Antibacterial activity of honey: A review of honey around the world. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. 6(3), 51–56, doi: 10.5897/jma2014,0308.
- LOMBREA, A., et al., 2020. A Recent Insight Regarding the Phytochemistry and Bioactivity of *Origanum vulgare L.* Essential Oil. *International journal of molecular sciences*. 21(24), 9653. doi: 10.3390/ijms21249653.
- MACHADO DE-MELO, A. A., et al., 2018. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of apicultural research*. 57(1), 5-37. doi: 10.1080/00218839.2017.1338444.
- MUGHAL, S. S., 2020. Peppermint oil, its useful, and adverse effects on human health: a review. *Innovare Journal of Ayurvedic Sciences*. 8(6), 1-4. doi: 10.22159/ijas.2020.v8i6.39189.
- NGUYEN, Y., SPERANDIO, V., 2012. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. doi: 10.3389/fcimb.2012.00090.
- PANDEY, V. K., 2022. A comprehensive review on clove (*Caryophyllus aromaticus L.*) essential oil and its significance in the formulation of edible coatings for potential food applications. *Frontiers in Nutrition*. 9. doi: 10.3389/fnut.2022.987674.

PAVEL, C. I., et al., 2011. Biological Activities of Royal Jelly – Review. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*. 44(2), 108-118. ISSN 1841-9364.

PITA-CALVO, C., VÁZQUEZ, M., 2017. Differences between honeydew and blossom honeys: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 59, 79-87. doi: 10.1016/j.tifs.2016.11.015.

SANTOS, J. D.C, et al., 2019. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja Montana* byproducts essential oils. *Industrial Crops & Products*. 137, 541–548. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.05.058.

SHERLOCK, O., et al., 2010. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC complementary and alternative medicine*. 10, 47. doi: 10.1186/1472-6882-10-47.

SIROLI, L., et al., 2014. Characterization of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and definition of its antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* in vitro system and on foodstuff surfaces. *African Journal of Microbiology Research*. 8(29), 2746-2753. doi: 10.5897/ajmr2014.6677.

SOARES, S., et al., 2017. A comprehensive review on the main honey authentication issues: Production and origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 16(5), 1072-1100. doi: doi.org/10.1111/1541-4337.12278.

THIELMANN, J., MURANAYI, P., 2019. Review on the chemical composition of *Litsea cubeba* essential oils and the bioactivity of its major constituents citral and limonene. *Journal of Essential Oil Research*. 31(5), 361–378. doi: 10.1080/10412905.2019.1611671.

VASCONCELOS, N. G., CRODA, J., SIMIONATTO, S., 2018. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microbial Pathogenesis*. 120, 198–203. doi: 10.1016/j.micpath.2018.04.036.

VESELÝ, V. et al., 2003. Včelařství. Vydání 2. Praha: Nakladatelství Brázda, s.r.o. ISBN 80-209-0320-8.

VILA, J., et al., 2016. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS microbiology reviews*, 40(4), 437–463. doi: 10.1093/femsre/fuw005.

von BAUM, H., MARRE, R., 2005. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *IJMM*. 295, 503–511. doi: 10.1016/j.ijmm.2005.07.002.

YANG, K., et al., 2014. Bioactivity of essential oil of *Litsea cubeba* from China and its main compounds against two stored product insects. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 17(3), 459-466. ISSN 1226-8615.

ZHAO, H., et al., 2022. *Peppermint* essential oil: its phytochemistry, biological activity, pharmacological effect and application. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 154. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113559.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Použitý bujón a agar	25
Obrázek 2: Připravená destička pro MIC	27
Obrázek 3: Narostlá miska pro odečtení MBC po 24h inkubaci	28