

# Inhibiční účinky extrahovatelných látek z jedlých květů

Denisa Zemánková

---

Bakalářská práce  
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Denisa Zemánková**  
Osobní číslo: **T12984**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie a řízení v gastronomii**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Inhibiční účinky extrahovatelných látek z jedlých květů**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Jedlé květy rodů *Hemerocalis*, *Hosta*, *Matricaria*, *Monarda*, *Phlox* a *Salvia* – popis a využití v gastronomii
2. Extrakty z květů – způsoby extrakce, extrahovatelné látky
3. Inhibiční účinky – antibakteriální a antifungální vlastnosti extraktů z jedlých květů, přehled metod stanovení

### II. Praktická část

1. Příprava extraktů z vybraných květů s využitím Soxhletova extraktoru, příp. vařením daného vzorku pod zpětným chladičem
2. Testování antimikrobiálních účinků pomocí diskové difúzní metody vůči vybraným gramnegativním (*Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*) a grampozitivním (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Rothia sp.*) bakteriím, vůči kvasinkám (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida sp.*) a plísním (*Aspergillus sp.* a další)

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. JAMALIAN, A., M. SHAMS-GHAHFAROKHI, K. JAIMAND, N. PASHOOTAN, A. AMANI a M. RAZZAGHI-ABYANEH. Chemical composition and antifungal activity of *Matricaria recutita* flower Essentials oil against medically important dermatophytes and soil-borne pathogens. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*. 2012, vol. 22, issue 4, s. 308-315. DOI: 10.1016/j.mycmed.2012.09.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1156523312001473>
2. DAVIDSON, P, John Nikolaos SOFOS a Alfred Larry BRANEN. Antimicrobials in food. 3rd ed. Boca Raton: Taylor, 2005, 706 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 145. ISBN 978-082-4740-375.
3. MLCEK, Jiri a Otakar ROP. Fresh edible flowers of ornamental plants A new source of nutraceutical foods. *Trends in Food Science*. 2011, vol. 22, issue 10, s. 561-569. DOI: 10.1016/j.tifs.2011.04.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224411000847>
4. VOON, Han Ching, Rajeev BHAT a Gulam RUSUL. Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2012, vol. 11, issue 1, s. 34-55. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x>

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

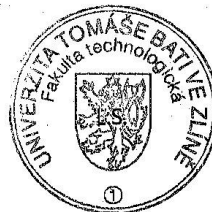
**20. ledna 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**7. května 2015**

Vě Zlíně dne 20. ledna 2015

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
děkan



  
Ing. Jiří Mlček, Ph.D.  
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ŽEMÁNKOVÁ DENISA

Obor: TECHNOLOGIE  
A ŘÍZENÍ V GASTRONOMII

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby<sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 1.5.2015

Žemánková

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydávalečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlázení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odporá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Jedlé květy mají řadu pozitivních vlastností, mezi které lze řadit například antimikrobiální, antioxidační či léčivé účinky. Tato bakalářská práce je věnována zjišťování antimikrobiálních účinků extraktů jedlých květů, které byly připraveny pomocí Soxhletova extraktoru a vařením vzorku pod zpětným chladičem za použití různých extrakčních činidel. Extrakty získané optimalizovanou metodou byly dále testovány na jejich antimikrobiální účinky. K testování antimikrobiálních účinků byla využita disková difúzní metoda na vybrané gram-pozitivní a gramnegativní bakterie, kvasinky a plísňe. Z výsledků je patrné, že extrakty z květů rostlin rodů *Matricaria*, *Salvia* a *Monarda* vykazují inhibiční účinky na gram-pozitivní bakterie a extrakty z květů rodu *Hosta* a *Monarda* působí inhibičně na některé z testovaných plísňí a kvasinek.

Klíčová slova: antimikrobiální účinky, bioaktivní látky, extrakty, jedlé květy

## **ABSTRACT**

Edible flowers have many positive qualities such as antimicrobial activity, antioxidant activity or medicinal effects. This bachelor thesis is focused on searching antimicrobial activity of extracts from edible flowers, which were prepared by using Soxhlet extractor and by boiling the sample under reflux using various extraction agents. Extracts prepared by optimized method were further tested for their antimicrobial effects. Antimicrobial activity was tested on selected Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts and moulds by disc diffusion method. The results show that extracts from flowers of plants of genera *Matricaria*, *Salvia* and *Monarda* have antimicrobial activity on Gram-positive bacteria and extracts from flowers of the genus *Hosta* and *Monarda* inhibit some of the tested fungi and yeasts.

Keywords: antimicrobial activity, bioactive compounds, extracts, edible flowers

Ráda bych poděkovala vedoucí této bakalářské práce Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení, ochotu a pomoc při realizaci této práce. Také bych chtěla poděkovat Ing. Romanu Kimmelovi, Ph.D. a Ing. Janě Hermanové za rady a pomoc při přípravě extraktů z jedlých květů. Dále bych chtěla poděkovat pracovnícím laboratoří Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB, paní Lence Machálkové a Bc. Veronice Kučbové, za ochotu a pomoc při vykonávání praktické části bakalářské práce a také paní Ing. Lence Fojtíkové. Děkuji rovněž rodině a mému příteli za velkou podporu během studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a elektronická verze nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 JEDLÉ KVĚTY</b> .....	<b>12</b>
1.1 NUTRIČNÍ A SENZORICKÁ JAKOST JEDLÝCH KVĚTŮ .....	12
1.2 VYUŽITÍ V GASTRONOMII .....	13
1.2.1 <i>Hemerocallis</i> .....	14
1.2.2 <i>Hosta</i> .....	15
1.2.3 <i>Matricaria</i> .....	15
1.2.4 <i>Monarda</i> .....	15
1.2.5 <i>Phlox</i> .....	16
1.2.6 <i>Salvia</i> .....	16
<b>2 BIOAKTIVNÍ LÁTKY</b> .....	<b>17</b>
2.1 ZPŮSOBY ZÍSKÁVÁNÍ BIOAKTIVNÍCH LÁTEK .....	17
2.1.1 Extrakce rozpouštědlem .....	18
2.1.2 Perkolace .....	18
2.1.3 Macerace .....	19
2.1.4 Hydrodestilace.....	19
2.1.5 Superkritická fluidní extrakce (SFE) .....	20
2.2 BIOAKTIVNÍ LÁTKY EXTRAHOVATELNÉ Z KVĚTŮ .....	20
2.2.1 Terpenoidy a terpeny.....	20
2.2.2 Flavonoidy.....	21
2.2.3 Karotenoidy .....	21
2.2.4 Chinony .....	21
2.2.5 Glykosidy .....	21
2.2.6 Fenolové sloučeniny.....	22
2.2.7 Taniny .....	22
2.2.8 Alkaloidy.....	22
<b>3 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY</b> .....	<b>24</b>
3.1 POPIS VYBRANÝCH METOD STANOVENÍ CITLIVOSTI MIKROORGANISMŮ .....	24
3.1.1 Agarová difúzní metoda .....	24
3.1.2 Diluční metody.....	25
3.1.3 Netradiční metody .....	27
3.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ VLASTNOSTI EXTRAKTŮ A SILIC PŘÍRODNÍCH LÁTEK .....	28
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>31</b>
<b>4 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>32</b>
<b>5 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>33</b>
5.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	33
5.2 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY .....	33
5.2.1 Masopeptonový agar (MPA).....	34
5.2.2 Potato dextrose Agar (PDA) .....	34
5.2.3 Czapek Dox Agar (CDA).....	34
5.2.4 Sabouraud chloramphenicol Agar (SAB) .....	34
5.2.5 Mueller Hinton Agar (MHA) .....	35
5.2.6 Příprava fyziologického roztoku .....	35



5.2.7	Příprava 0,1% fyziologického roztoku s Tweenem 80 .....	35
5.2.8	Příprava suplementu metylénové modři s přidavkem glukózy .....	35
5.3	VZORKY JEDLÝCH KVĚTŮ .....	35
5.4	POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KMENY .....	36
5.5	POUŽITÉ KMENY KVASINEK .....	36
5.6	POUŽITÉ KMENY MIKROMYCET .....	37
5.7	METODY .....	38
5.7.1	Příprava extraktů z <i>Matricaria recutita</i> .....	38
5.7.2	Příprava extraktů z rodů <i>Hemerocallis</i> , <i>Hosta</i> , <i>Monarda</i> , <i>Phlox</i> , <i>Salvia</i> .....	38
5.7.3	Disková difúzní metoda .....	38
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>40</b>
6.1	ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY EXTRAKTŮ Z <i>MATRICARIA RECUTITA</i> .....	40
6.1.1	Inhibiční účinky na bakterie .....	40
6.1.2	Inhibiční účinky na kvasinky .....	41
6.1.3	Inhibiční účinky na mikromycety .....	42
6.2	ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY EXTRAKTŮ Z RODŮ <i>HEMEROCALLIS</i> , <i>HOSTA</i> , <i>MONARDA</i> , <i>PHLOX</i> A <i>SALVIA</i> .....	44
6.2.1	Inhibiční účinky na bakterie .....	44
6.2.2	Inhibiční účinky na kvasinky .....	46
6.2.3	Inhibiční účinky na mikromycety .....	47
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>50</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>51</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>56</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>57</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>58</b>

## ÚVOD

Jedlé květy byly již v historii součástí lidské stravy. Někdy byly konzumovány, když byla nouze, jindy byly součástí slavnostních hostin. Dnes můžeme v časopisech s recepty vidět krásná aranžmá pokrmů s jedlými květy, kde právě jedlé květy dodávají pokrmům na estetičnosti, chuti a vůni.

V gastronomii je jejich použití všestranné. Mohou se využívat jedlé květy jak v čerstvém stavu, tak i sušené či mražené. Jejich výběr je rozsáhlý od zeleninových druhů, přes léčivé rostliny až k okrasným druhům rostlin.

Ke zvyšování zájmu v konzumaci jedlých květů dochází hlavně z důvodů zjišťování jejich nutriční hodnoty. Bylo zjištěno, že některé jedlé květy mohou mít antioxidační, antimikrobiální či dokonce léčivé účinky.

Z hlediska nárůstu antimikrobiální rezistence roste také zájem vědních oborů o bioaktivní látky, které lze získat právě z jedlých květů. Tyto látky lze získat pomocí různých separačních technik. Dále je nutné tyto látky otestovat ke zjištění antimikrobiálních účinků pomocí standardních mikrobiologických metod.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 JEDLÉ KVĚTY

Jedlé květy byly od nepaměti součástí lidské stravy, byly popisovány již v antické literatuře. Některé byly využívány v dobách nouze, jindy byly součástí slavnostních královských a šlechtických tabulí [1].

Dnes je jejich využití všestranné. V rámci světového stravování se navazuje na staré tradice, ale dochází i k využití současné orientální kuchyně. Rozšiřuje se sortiment potravin, které jsou chuťově i esteticky doplněné jedlými květy [1].

### 1.1 Nutriční a sensorická jakost jedlých květů

V dnešní době zájem o konzumaci jedlých květů roste a to z velké části díky novým poznatkům o nutriční jakosti květů [1]. Bylo zjištěno, že řada látek, obsažených v jedlých květech má ochranné (chemoprotektivní) nebo i léčivé účinky a snižuje riziko různých onemocnění [2]. Významné jsou například látky s antioxidačním účinkem, jako jsou například fenolové látky, karotenoidy apod. Ke zlepšení kondice spotřebitele může vést i malý přídavek vhodných jedlých květů [1].

Z nutričního hlediska lze květy rozdělit do tří hlavních skupin a to na pyl, nektar a okvětní lístky a další části květu. Ačkoliv je množství pylu velmi malé, lze jej považovat za bohatý zdroj proteinů, aminokyselin, sacharidů, nasycených a nenasycených lipidů, karotenoidů, flavonoidů atd. Jeho chuť však není příliš výrazná [3].

Nektar je obvykle sladká tekutina, která rovnoměrně obsahuje cukry (fruktózu, glukózu a sacharózu), aminokyseliny (hlavně prolin), proteiny, anorganické ionty, lipidy, organické kyseliny, fenolické látky, alkaloidy, terpenoidy atd. [3].

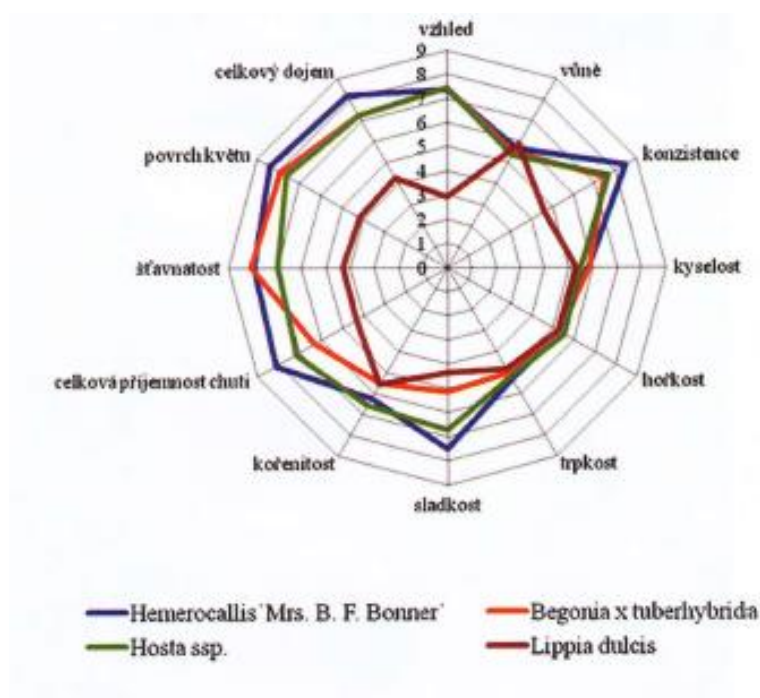
Okvětní lístky a další části květů mohou být nejen důležitým zdrojem výše uvedených složek, ale také vitaminů (např. žluté květy jsou obvykle velmi dobrým zdrojem vitamínu A), minerálních látek a antioxidantů [3].

Kromě nutriční hodnoty je také důležité posouzení sensorické jakosti. Řada sensoricky výrazných látek, obsažených v jedlých květech, zlepšuje psychofyzilogickou cestu trávení. Mezi kritéria, týkající se sensorické charakteristiky jedlých květů, která vnímáme našimi smysly, řadíme např. atraktivní vzhled, velikost, tvar, chuť, vůni a barvu [2].

Barva se řadí k důležitým organoleptickým vlastnostem a je dána obsahem chemických látek, ze kterých je nejdůležitější obsah karotenoidů a antokyaninů. Strávníky je v rámci barev

preferována žlutá a oranžová barva, zatímco modrá a kombinace jiných barev se řadí k méně oblíbeným [3].

V závislosti na našich receptorech může být chuť květů vnímána různě. Chuť a textura květů však také závisí i na jednotlivých druzích. Některé květy jsou velmi jemné, křehké či křupavé, některé mohou mít nahořklou chuť, jiné zase sladkou [2, 3]. Sladká chuť je způsobena obsahem sacharózy a její transport do otevírajících se květů je spojován s tvorbou silic, které jsou typické pro vůni jednotlivých druhů květů. V průběhu stárnutí květů může obsah sacharózy vzrůst, což je způsobeno hydrolýzou fruktanů. Tato reakce se projevuje právě jako otevírání květů [3]. Na obrázku (Obr. 1.) lze pozorovat sensorický profil čtyř rozdílných květů, z nichž jsou většinou nejlépe hodnoceny květy rodu *Hemerocallis*.



Obr. 1. Sensorický profil květů [4].

## 1.2 Využití v gastronomii

Využití jedlých květů v gastronomii je všestranné. Květy mohou být podávány v čerstvém stavu jako obloha různých pokrmů a studených mís, okvětními lístky se mohou zdobit saláty a nápoje. Některé květy se využívají i k ochucování pokrmů po tepelné úpravě nebo různém konzervování. Květy lze sušit či zamrazovat do ledových kostek nebo kuliček a pak je lze vložit do nápojů [2]. Dále se mohou jedlé květy péct, mohou se jimi ochucovat omáčky, želé, sirupy, ocet, med, oleje, čaje, likéry, mohou se jimi aromatizovat cukry, másla, mohou se kandovat nebo je lze využít i k barvení rýže, polévek atd. [3, 4].

Z velké části jsou jedlé květy využívány hlavně v orientální gastronomii, avšak i u nás mají svou tradici a momentálně se spíše na náš stůl vrací. V minulosti se například sedmikráskami sypala prosná kaše, ze smetánky se vyráběl med, salát i víno. Při zámeckých hostinách se cukrářské výrobky zdobily a ochucovaly květy černého bezu či růží [4].

Výběr jedlých květů je rozmanitý. Ze zeleninových druhů se sem řadí květenství kvěťáku, brokolice, artyčoků, čerstvé květy čekanky, tykve, pažitky nebo brutnáku. Z léčivých rostlin se v kuchyni můžou využít např. květy měsíčku zahradního, heřmánku, pivoňky nebo bezu černého, jehož květenství se smaží v těstíčku, tzv. kosmatice. Jako přísada do čajů se z léčivých květů využívá např. lípa, akát, jasmín, máta aj. I z některých okrasných rostlin lze využívat květy a to například z chryzantém, kopretin, růží, karafiátů, hvozdíků, topolovky, prvosenek, mečíků, kosatců, levandule či violek. Oblíbenými jsou květy denivky a lichořeřišnice. Také lze využít i květy volně rostoucích rostlin například pampelišek, sedmikrásek, jetele, chrpy, hluchavky, kostivalu, mateřídoušky atd. [5].

Ke zdobení a ochucování se hodí květy pažitky, hořčice, lichořeřišnice, chryzantém, hvozdíků. K barvení například rýže či polévek se využívají květy oranžového či žlutého zbarvení, jelikož obsahují karotenoidy (např. měsíček lékařský). K barvení nápojů se využívají květy topolovky. Na výrobu sirupů, limonád, vín a octů se využívají květy a květenství bezu černého, růže, violky, macešky, sedmikrásky, pampelišky nebo mařinky vonné. Aromatické květy violek a růží se využívají ke zlepšení aroma nápojů i pokrmů a květy brutnáku, akátu či růží se zase využívají k aromatizaci pečiva. Některá poupata, např. lichořeřišnice, lze využívat jako náhradu kaparů. Z květů sedmikrásek a pažitky lze připravit polévky či omáčky atd. [4].

### 1.2.1 *Hemerocallis*

Dlouhé listy těchto rostlin tvoří růžici. Květy bývají trojčetné a kvetou žlutě, oranžově až červeně a to od června do července. Květy kvetou jeden den – od toho název denivka. [6, 7].

V Asii je denivka pěstována kvůli květům již dvě tisíciletí. Květy jsou využívány při přípravě různých čínských jídel v čerstvém i sušeném stavu např. v Číně se poupata druhu *Hemerocallis fulva* suší a přidávají do polévek [8]. Z významných látek obsahují zejména karotenoidy [9].

Květy denivky jsou mírně sladké se zeleninovou příchutí, což by se dalo přirovnat ke sladkému salátu či melounu. Jejich chuť je jakoby kombinace chřestu a cukety. Aby mohly být

využity sladké okvětní lístky v dezertech, je dobré od nich první odřezat hořčejší bílý základ květu. Květy vypadají velmi pěkně jak v salátech, například velkými okvětními lístky lze posypat jarní salát, tak na povrchu chlazených dortů. Na jaře se můžou nasbírat výhonky dva až tři palce vysoké, které je možné použít jako náhradu za chřest. Denivky však mohou působit jako diuretikum a projímadlo, proto je nutné je jíst s mírou [10].

### 1.2.2 *Hosta*

Jde o okrasnou trvalku z čeledi liliovitých, která dosahuje výšky 30 – 40 cm. Listy jsou pestrobarevné, velké srdčité oválné až kopinaté, na delších řapících. Mezi listy vyrůstají stvolky s drobnými zvonkovitými květy, které se ohýbají k zemi a jsou nařezané nebo nařezané barvy [11, 12].

Mezi jedlé části se řadí mladé lístky a poupata. V tradiční medicíně v Číně a Japonsku se používají listy a oddenky. Jednotlivé druhy rodu *Hosta* se používají k léčbě různých stavů jako je například mastitida, zánět středního ucha, folikulitida, uretritida, kousnutí hada, bolest břicha apod. [12].

### 1.2.3 *Matricaria*

Heřmánek pravý patří do čeledi rostlin hvězdicovitých a je to jednoletá bylina se vzpřímeným větvením, na jejichž koncích jsou listy rozdělené. Dorůstá velikosti 50 – 90 cm. Květy heřmánku jsou podobné květům sedmikrásky. Mají duté kuželovité středy žluté barvy, které jsou obklopené stříbrně-bílými až krémově-bílými okvětními lístky [13]. Kvetou od května až do září a sklizeň může být provedena i několikrát do roka, jelikož rostliny rychle obrázejí a kvetou znovu [14].

Již v historii byl heřmánek používán v tradiční medicíně a je stále využíván jako léčivý čaj, jenž je významný svými uklidňujícími účinky [15]. Květy heřmánku voní příjemně a jejich chuť je nahořkle kořeněná [16]. Používají se k přípravě léčivých čajů či v čerstvém stavu jako obloha pokrmů [2].

### 1.2.4 *Monarda*

Rostliny tohoto rodu mají keříkovitý vzrůst a jejich trsy jsou vysoké podle druhu od 70 – 130 cm. Do tohoto rodu se řadí jak trvalé, tak i jednoleté druhy. K trvalkám se řadí například *Monarda didyma*. Ta může být vysoká až 90 cm a její květy jsou šarlatově červené. Z jejich

listů se připravuje čaj. Mezi jednoleté patří například *Monarda citriodora*, která je silně aromatická. Její odrůda 'Bergamo' tvoří poschodovitě uspořádané purpurové soukvětí [17].

Volně rostoucí zavínutka chutná jako oregano a máta. Chuť může připomínat citrusy a to jako jemně se prolínající chuť citronu a pomeranče. Červené květy mají mátovou příchut'. Kdekoliv kde se používá oregano lze použít květy zavínutky. Listy i okvětní lístky mohou být použity do ovocných salátů. Listy chutnají jako hlavní ingredience v čaji Earl Gray, bergamot, a mohou být použity i jako náhrada této ingredience [10].

### 1.2.5 *Phlox*

K jedlým květům se řadí *Phlox*, který roste jako trvalka a ne jako jednoletý *Phlox*. Trvalka je vyššího vzrůstu než jednoletá odrůda rostliny *Phlox*. Květy mohou mít barvu od červeno-fialové přes růžovou až k bílé. *Phlox* má jemnou kořeněnou chuť. Je výborný do ovocných salátů [10].

### 1.2.6 *Salvia*

Rostliny rodu *Salvia* se řadí do čeledi hluchavkovitých a jde o středně vysoké vytrvalé byliny, které rostou hlavně v teplejších oblastech ve světlých lesích, na výslunných stráních, suchých lukách apod. V závislosti na druhu se barva květů může lišit od růžovobílé (*Salvia verticillata*) přes růžovofialovou (*Salvia nemorosa*) až k fialovobílé (*Salvia pratensis*) či k fialové (*Salvia officinalis*). Podle druhu kvetou v měsících květen až září [18].

Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis* L.) vytváří polokeř, který dorůstá výšky 20 – 70 cm. Listy jsou šedozelené až stříbřité plstnaté zašpičatělé. Kvetou od června do srpna světle fialovými pyskatými květy a kvetou až dvouleté výhonky, které po odkvětu zasychávají [19, 20]. Květy jsou menší, trubkovité a jsou seskupeny v přeslenech podél vrcholů stonku [10].

Květy mají jemnější šalvějovou příchut' než listy a mohou být použity v salátech nebo jako obloha. Květy šalvěje se výborně hodí k mnoha pokrmům, a to včetně pokrmů fazolových či kukuřičných dále k dušeným nebo plněným houbám či k omáče pesto [10].



## 2 BIOAKTIVNÍ LÁTKY

Bioaktivní látky jsou metabolity syntetizované rostlinami pro jejich ochranu a kvůli dalším účelům. Tyto látky mohou mít různé potenciální využití lidmi. Esenciální i neesenciální biologicky aktivní látky jsou obsaženy v obrovském rozsahu potravin (např. ovoce, zelenina a obilí) a jsou součástí lidské výživy. Přibývá důkazů, že využití bioaktivních látek může zlepšovat zdraví a může redukovat riziko chronických onemocnění jako je rakovina, ischemická choroba srdeční, mrtvice a onemocnění Alzheimer [21].

V dnešní době rostoucí trendy na trhu vykazují rychlý nárůst produktů odvozených z rostlin. Tyto produkty mohou obsahovat nadzemní části, semena, ovoce, kořeny, oddenky a květy. Z těchto částí rostlin jsou velmi důležité květy a to pro jejich různé využití. Věří se, že extrakty a silice z květů jsou bohaté na fytochemikálie mající bohatou biologickou účinnost [22].

Například květy potočnice lékařské obsahují antibakteriálně působící glukosinoláty, v květech měsíčku zahradního byly zjištěny karotenoidy a silice s protizánětlivými účinky (azulogenní terpenalkoholy), v květech topolovky se vyskytují slizovité látky, pektiny, anthokyany, třísloviny, v květech růže můžeme nalézt třísloviny, bioflavonoidy a slizy, květy sedmikrásek obsahují silice, saponiny, třísloviny, flavonoidy, slizy, organické kyseliny, v květech pampelišek se vyskytují hořčiny, fytosteroly, třísloviny, silice, slizy aj. Dále v květech denivky byly zjištěny pigmenty, z nichž bylo identifikováno 14 karotenoidů, jako je například neoxanthin, violaxanthin, lutein, zeaxanthin atd. Podle literatury bylo z rostlin rodu *Hosta* izolováno 82 složek, včetně steroidních saponinů, saponinů, alkaloidů, flavonoidů atd. Dále bylo zjištěno, že v rostlinách rodu *Hosta* se vyskytují látky o různé biologické účinnosti, jako je například účinnost protinádorová, protizánětlivá, protivirová, protiplísňová apod.[1, 12].

### 2.1 Způsoby získávání bioaktivních látek

Extrakce je nejdůležitějším krokem v získání různých typů bioaktivních látek z rostlin. Ideálně by měly extrakční metody být kvantitativní a úsporné v čase [21]. Extrakty a silice lze z květů získat několika způsoby. Při výběru extrakční metody je však důležité zachovat stabilitu bioaktivních složek, je třeba brát v potaz, že některé látky (např. fenolické) se mohou oxidovat a degradovat při vyšších teplotách či při déle trvající extrakci. Dále je také důležité

určit množství použitého rozpouštědla tak, aby se zamezilo nasycení, plýtvání rozpouštědla a také by se měly brát v potaz vzniklé náklady [22].

### 2.1.1 Extrakce rozpouštědlem

Extrakce rozpouštědlem je jedna z nejvíce používaných metod pro přípravu extraktů z květů, kdy se využívá separační techniky vyluhování, použitím vhodného rozpouštědla či směsi rozpouštědel. Tyto extrakce lze rozdělit do 2 metod na kontinuální, kdy rozpouštědlo protéká plynule přes vzorek a nasycené rozpouštědlo je konstantně mícháno s méně nasyceným rozpouštědlem (např. Soxhletova extrakce) a nekontinuální, kdy dochází k zastavení extrakce, když je dosaženo vhodné rovnováhy mezi koncentrací rozpuštěné látky (uvnitř květů a rozpouštědla). Proces extrakce může být ovlivněn různými faktory, jako je například rychlost transportu rozpouštědla do materiálu, rychlost rozpuštění rozpustných složek v rozpouštědle, rychlost přesunu extraktu vně z dané hmoty, dále také ovlivňují extrakci polarita rozpouštědla, tlak par či viskozita rozpouštědla [22].

Extraktů z květů mohou být připraveny jak z čerstvých, tak ze sušených vzorků. Před samotnou extrakcí by se však vzorky květů měly vysušit buď vzduchem, nebo mražením. Pak by se vzorky měli rozdrtit, rozemlít či jinak homogenizovat, aby došlo ke zmenšení částic vzorku, pro zvýšení efektivity výtěžku. Jako rozpouštědla se využívají například methanol, ethanol, hexan, aceton, ethylacetát a chloroform. Výběr rozpouštědla závisí na rozpustnosti bioaktivních látek. V některých případech je také doporučeno, kvůli zlepšení molekulární interakci, míchání během extrakce, například magnetické míchání nebo kontinuální rotační třepání. K zajištění maximální extrakce bioaktivních látek je obvyklé, že je proces extrakce zopakován dvakrát až třikrát a extrakty jsou následně slity dohromady. Poté následuje filtrace a odstředění extraktů kvůli odstranění plovoucích částic. Aby nedošlo k tvorbě nových látek či degradaci nebo polymeraci fenolických složek, měly by být extrakty lyofilizovány nebo zakoncentrovány při redukováném tlaku v rotační odparce. Tyto extrakty by měly být uchovány v chladu a temnu [22].

### 2.1.2 Perkolace

Tato metoda se může provádět v perkolátoru či v Soxhletově extraktoru. V perkolátoru se provlhčený vzorek zalije vyluhovadlem a nechá se určitou dobu macerovat za laboratorní teploty. Po dané době macerace se otevře výpustný kohout perkolátoru a výluh se nechá rovnoměrně vykapávat [23].

Soxhletova extrakce se používá pro extrakci tepelně stabilních látek. Soxhletův extraktor se skládá z destilační baňky, extraktoru a chladiče. V destilační baňce je zahříváno rozpouštědlo, dochází ke vzniku par, které kondenzují v chladiči a zkapávají na vzorek umístěný v extrakční patroně, která je umístěna v extraktoru. Jak dosáhne rozpouštědlo v extraktoru hranice na přetékání, tak je trubičkou nasáto a převedeno zpět do destilační baňky. Takto se i přenese rozpuštěná látka do celkového objemu rozpouštědla a celý proces se několikrát opakuje, případně se provádí, dokud není extrakce dokončena [22].

### 2.1.3 Macerace

V rámci této metody se vysušený vzorek vloží do vhodné nádoby, přilije se k němu dané množství rozpouštědla a nechá se, za občasného míchání, macerovat po určitou dobu. Po maceraci se extrakt zfiltruje na příslušném filtru [22].

Macerace může být jednostupňová či vícestupňová. U vícestupňové macerace se rozpouštědlo periodicky obměňuje, zatímco u jednostupňové ne. Tento způsob extrakce se může provádět jak za laboratorní teploty, tak i za zvýšené teploty, potom se tento proces nazývá digeste. Zvýšením teploty sice urychlíme průběh extrakce, na druhou stranu zase může dojít k rozkladu termolabilních látek [23].

Při infuzi se vzorek přelije studenou nebo vroucí vodou a nechá se po určitou dobu vyluhovat. Studená voda se využívá při extrakci látek, které jsou citlivé k vyšším teplotám. Touto metodou získáváme nálevy [23].

V rámci dekokce se vzorek vaří pod zpětným chladičem po určitou dobu v destilované vodě. Po varu, během chlazení, se extrakt nechá ještě 30 minut vyluhovat [24, 23].

### 2.1.4 Hydrodestilace

K získávání silic z rostlin se využívá metoda hydrodestilace. V praxi jde o hojně využívanou metodu, při které dochází k přímému kontaktu destilovaného materiálu s vodou. Vzorek se spolu s destilovanou vodou umístí do varné baňky, kde se zahřívá k varu. Případně může být přes vzorek proháněn proud vodní páry. To se pak jedná o destilaci s vodní parou, kterou lze získat málo těkavé látky, kdy není nutné je zahřívát na jejich bod varu. Tyto látky se s vodou nemísí, případně jsou v ní nepatrně rozpustné. Aparatura pro destilaci s vodní parou obsahuje destilační baňku, vyvíječ vodní páry, trubicí, kterou se vodní pára přivádí do destilační baňky, sestupný chladič, alonž a předlohu nebo-li jímadlo na destilát. [22, 25, 26].

Při získávání silic z květů se využívá Clevengerova aparatura. Kdy se usušený vzorek rozmělní, vloží do varné baňky a přidá se určitý objem destilované vody. Tato skleněná aparatura obsahuje nástavec na jímání silic. Součástí tohoto nástavce je chladič a kalibrovaná kapilára pro měření získaného objemu silic. Po přivedení obsahu baňky k varu, stoupá pára spolu s těkavými látkami do chladiče, kde dojde ke zkondenzování. Těkavé látky spolu s vodou zkapávají do kapiláry, kde se však silice drží na hladině vody a proto může být přebytečná voda odvedena postranním ramenem zpět do baňky [27].

### 2.1.5 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Tato metoda probíhá ve speciální aparatuře, kdy se jako rozpouštědlo využívá oxid uhličitý, CO<sub>2</sub>, v superkritickém stavu pod vysokým tlakem. Jedná se o zvláštní skupenský stav, při kterém se spojují vlastnosti kapaliny a plynu. Dochází k němu u kapalin či plynů při současném zvýšení teploty a tlaku na hodnoty vyšší než jsou její/jeho kritické hodnoty.

Pro CO<sub>2</sub> superkritický stav nastává při teplotě vyšší jak 31 °C a tlaku vyšším než 3,7 MPa. CO<sub>2</sub> v tomto stavu poskytuje podmínky pro rychlou extrakci a maximální výtěžnost. Potom, co jsou podmínky vráceny do hodnot, kdy CO<sub>2</sub> přechází do plynného stavu, dochází u něj ke ztrátě jeho rozpouštěcí schopnosti a látky, které byly extrahovány, se od něj oddělují a jímají se do sběrné nádoby. Extrakční podmínky je možné regulovat a tím pádem lze ovlivnit rozsah extrahovaných látek [26].

## 2.2 Bioaktivní látky extrahovatelné z květů

### 2.2.1 Terpenoidy a terpeny

Terpeny jsou přirozeně se vyskytující deriváty uhlovodíků z isoprenu. Jako terpenoidy, případně někdy také isoprenoidy, jsou uváděny terpeny, které byly chemicky upraveny například přeskupením uhlíkové kostry či oxidací. Do skupiny terpenů a terpenoidů se zahrnuje velká třída sekundárních metabolitů, které jsou primárně produkovány širokou škálou rostlin. Terpeny jsou hlavní složkou rostlinných silic, které se využívají jako přírodní přídatné aroma do potravin, vůní v parfumerii, a také v tradiční a alternativní medicíně jako aromaterapie. Také jsou zkoumány z hlediska antibakteriálních, antineoplastických a dalších farmaceutických účinků. I syntetické variace a deriváty přírodních terpenů a terpenoidů jsou využívány jako vůně v parfumerii a v potravinových aditivech [28].

### 2.2.2 Flavonoidy

Jsou to rostlinné fenoly, které obsahují v molekule dvě benzenová jádra. Tyto benzenová jádra jsou spojena tříuhlíkovým řetězcem. Flavonoidy se řadí do skupiny rostlinných barviv [29]. Flavonoidy zahrnují širokou skupinu více jak 4 000 sekundárních metabolitů vyšších rostlin [28]. Avšak pouze některé jsou významné jako přírodní rostlinná barviva, některé jsou zase důležité pro svoji chuť či mohou mít významné biologické účinky [29].

### 2.2.3 Karotenoidy

Jsou skupinou více jak 700 žlutých, oranžových a červených lipofilních pigmentů. Vyskytují se ve všech organismech schopných fotosyntézy, včetně zelených řas, vyšších rostlin a některých bakterií. Tvoří zbarvení mnoha květin, ovoce, zeleniny a obilovin. Karotenoidy mohou být rozděleny na karoteny a xantofyly [28].

### 2.2.4 Chinony

Tato skupina obsahuje asi 400 žlutých, červených, hnědých a černých pigmentů, obsažených v různých částech mikroorganismů, řas, lišejníků, hub, vyšších rostlin a i v některých druzích hmyzu [28]. V dnešní době se tyto barviva využívají spíše pro kosmetické a farmaceutické účely případně jako potravinářská barviva [29]. Přírodní chinoidní barviva vyskytující se v potravinách jsou většinou odvozeny od 1,2-benzochinonu, 1,4-benzochinonu, 1,4-nafthochinonu a 9,10-anthrachinonu [28].

### 2.2.5 Glykosidy

Jedná se o deriváty sacharidů, které vznikají náhradou hydroxylové skupiny zbytkem necukerné molekuly tzv. aglykonem či geninem. Cukerná složka (glykon) může být zastoupena obvyklými i méně obvyklými monosacharidy, které se nacházejí v přírodě a může se jednat jak o pentosu, tak i o hexosu [30].

Glykosidy se vyskytují v celé rostlinné říši. Pro některé čeledi rostlin mohou být některé druhy glykosidů charakteristické, ale většinou se vyskytuje více typů glykosidů. Glykosidy mají pro rostlinu význam detoxikačního mechanismu, kdy dochází k transformaci toxických a lipofilních látek na látky ve vodě rozpustné, které následně mohou být tělem rostliny transportovány [30].

### 2.2.6 Fenolové sloučeniny

Fenoly jsou charakteristické tím, že mají nejméně jeden aromatický kruh s jednou či více připojenými hydroxylovými skupinami. V této skupině látek se vyskytují jak jednoduché látky o nízké molekulové hmotnosti, tak složité komplexní molekuly. Některé jsou meziprodukty při biosyntéze živočišných pigmentů (např. melaniny), jiné se zase vyskytují v řadě rostlinných pigmentů (např. anthokyaniny) nebo se také mohou vyskytovat ve struktuře rostlinné buňky (např. lignin, suberin). Některé fenoly, které jsou redukovány na alkoholy, aldehydy, alkany a alkeny nebo tvoří ethery či estery, jsou společnými složkami květinových vůní a přispívají také do chuti a vůně ovoce a zeleniny. Fenoly a jejich deriváty jsou složkou hormonů, mohou mít antimikrobiální, antioxidační, antikarcinogenní a další farmaceuticky významné účinky [28].

### 2.2.7 Taniny

Je to skupina přírodních polyfenolů s různorodým složením. Mohou být rozděleny do dvou skupin na:

- gallotaniny a ellagotaniny (hydrolyzovatelné třísloviny) – základem je kyselina gallová či kyselina ellagová a esterově navázaná glukosa;
- katechinové třísloviny (kondenzované) – vznikají kondenzací pentahydroxyflavanu.

Třísloviny se vyskytují v potravinářských surovinách (např. v semenech luštěnin). U těchto látek byly zjištěny antimikrobiální a antiinvazní účinky avšak byly prokázány i určité anti-nutriční účinky [31].

### 2.2.8 Alkaloidy

Jsou to dusíkaté bazické sloučeniny, které tvoří soli s kyselinami. Vznikají jako sekundární metabolity a mohou mít různé biologické účinky. Alkaloidy se vyskytují v částech vyšších rostlin, v určitých druzích mechů, hub a bakterií. Většinou se v rostlině vyskytuje jeden hlavní alkaloid a další vedlejší alkaloidy. V závislosti na vnějších vlivech, které na rostlinu působí, se mění i obsah alkaloidů a při začátku kvetení se jejich tvorba snižuje, až zastavuje [29, 30].

Tato heterogenní skupina zahrnuje více jak 5 000 sloučenin. Některé z nich se řadí k rostlinným antibiotikům, jako součást obranného mechanismu rostlin, některé se zase řadí mezi přírodní toxické aminokyseliny, biogenní aminy či přírodní barviva [29].

Alkaloidy lze členit do 3 hlavních skupin na [29]:

- pravé alkaloidy – jedná se o heterocyklické dusíkaté báze odvozené od aminokyselin. Často jsou velmi toxické pro člověka i jiné živočichy (např. nikotin v tabáku);
- pseudoalkaloidy – jsou to také heterocyklické dusíkaté báze, avšak prekurzory nejsou aminokyseliny a obvykle jsou méně toxické oproti pravým alkaloidům (např. kofein v kávě);
- protoalkaloidy – zde se jedná o bazické aminy, které jsou sice odvozené od aminokyselin, ale dusík není obsažen v heterocyklickém systému (např. kapsaicin v pálivé paprice).

### 3 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY

Existují látky, které svým chemickým složením mohou mít nepříznivé účinky na mikroorganismy. Tyto látky se nazývají antimikrobiální a lze je rozlišit podle toho, zda zastavují rozmnožování mikroorganismů, pak se jedná o látky tzv. mikrobistatické, nebo zda mikroorganismy usmrcují, pak jde o látky mikrobicidní. Pokud dané látky působí pouze na bakterie, lze je nazvat bakteriostatické či baktericidní, jedná-li se o látky působící na kvasinky a plísně, nazýváme je fungistatické případně fungicidní [32].

Navzdory rozvoji antibiotik, jsou však stále bakteriální a plísňové nákazy hlavním problémem v medicíně a to z důvodu rostoucí rezistence na léky. Avšak v posledních letech vzrůstá zájem o přírodní látky a to hlavně kvůli jejich antimikrobiální a antioxidační účinnosti, ale také z důvodů jejich dostupnosti, menších vedlejších účinků nebo toxicity, stejně jako jejich lepší biologické odbouratelnosti oproti současným antibiotikům a konzervantům [33].

Sekundární metabolity rostlin mají rozsáhlé využití v tradiční medicíně i v ochucování a konzervaci potravin. K omezení mikrobiálního růstu v potravinách se v dnešní době používají hlavně chemické konzervanty potravin. Nicméně vzrůstá potenciál přírodních konzervantů v potravinářském průmyslu [15, 33].

#### 3.1 Popis vybraných metod stanovení citlivosti mikroorganismů

Pro zjištění citlivosti mikroorganismů vůči daným látkám existují různé metody. Výběr metody závisí na různých faktorech, jako je například praktičnost, flexibilita, přizpůsobivost k automatickým či poloautomatickým systémům, finanční náročnost, reprodukovatelnost, spolehlivost, přesnost a individuální preference [34].

Metody stanovení citlivosti testovaných mikroorganismů rozlišujeme na semikvantitativní a kvantitativní [35].

##### 3.1.1 Agarová difúzní metoda

Agarová difúzní metoda je nejvíce rozšířenou metodou testování antimikrobiální účinnosti. Tato metoda je přesná i přesto, že poskytuje semi-quantitativní výsledky a podle některých autorů pouze kvantitativní výsledky a nemusí být možné ji vždy zopakovat [33].

Metoda je založena na difúzi antimikrobiální látky o specifické koncentraci z jamky, disku nebo proužků do pevného média, na které bylo nanášeno inokulum testovaného mikroorganismu. U diskové difúzní metody je testovaná látka nanášena na papírový disk, který je



umístěn na agarovou plotnu. U jamkové difúzní metody je testovaná látka dána do jamky v agaru. V závislosti na výši koncentrace testované látky se po kultivaci měří průměry inhibičních zón kolem disků nebo jamek. V těchto inhibičních zónách není pozorován žádný nárůst testovaného mikroorganismu [36]. Účinnost také závisí na koncentraci antimikrobiální látky na disku a její schopnosti difundovat. Hlavními výhodami této metody je nízká cena, jednoduchost v provedení, může být použita jako prověřovací test proti velkému počtu izolátů. Menší nevýhodou je, že ruční měření zón zabere více času a že automatické čtení zón nemusí zaznamenat danou zónu, pokud nemá průměr o určité velikosti [34].

K provedení tohoto testu je potřeba připravit neselektivní médium, které je rozlito do Petriho misek v hloubce cca 4 mm. Po ztuhnutí média je možno na jeho povrch nanést inokulum suspenze daného mikroorganismu. Tato suspenze by měla přibližně obsahovat log 6,0 CFU/ml testovaného mikroorganismu. Na disk z filtračního papíru, standardně o průměru 6 mm, je nanesena určitá koncentrace testované látky. Po vysušení jsou tyto disky s antimikrobiální látkou nanášeny na Petriho misky, které již obsahují dané médium a inokulum. Podobně se postupuje u jamkové difúzní metody, kdy jsou místo disků použity jamky vyřezané do média. Do těchto jamek je pipetováno určité množství antimikrobiální látky o dané koncentraci. Misky jsou potom inkubovány podle optimálních podmínek pro testovaný mikroorganismus. Po inkubaci se měří inhibiční zóny, které vznikly kolem disku či jamky. Inhibiční zóny jsou měřeny včetně disku či jamky a jsou udávány v milimetrech. Měl by být rovněž proveden kontrolní test citlivosti daného mikroorganismu a to použitím určitého antibiotika, případně antimykotika o známé koncentraci [36].

Výsledky agarové difúzní metody jsou semikvantitativní. Citlivost daného mikroorganismu souvisí s velikostí inhibičních zón. Pro antibiotika platí, že mikroorganismy se považují za citlivé, pokud je zóna v průměru větší od 30-ti do 35-ti milimetrů, středně citlivé pokud je inhibiční zóna od 20-ti do 30-ti mm, nebo jsou považovány za resistantní a to v případě kdy je zóna menší než 15 až 20 mm. Touto metodou lze stanovit i MIC (minimální inhibiční koncentraci), ale pokud chceme stanovovat MIC je lepší použití jiné metody [36].

### 3.1.2 Diluční metody

Hlavním cílem těchto metod je stanovení MIC, nebo-li minimální inhibiční koncentrace, což je koncentrace, která viditelně inhibuje růst testované bakterie, ať už pomocí bujónového ředění nebo ředění v agaru. MIC je definováno jako nejnižší koncentrace antimikrobiální

látky, která brání růstu mikroorganismů po specifické době inkubace. Testování antimikrobiální citlivosti pomocí ředících metod se jeví jako více reproduktivní a kvantitativní než disková difúzní metoda [33, 34, 36].

V případě agarové ředící metody jsou nádoby naplněné „roztaveným“ neselektivním agarem a do jednotlivých nádob je přidána antimikrobiální látka o dané koncentraci. V každé nádobě je jiná koncentrace. V klinické mikrobiologii se používá dvojkové ředění, nicméně může být použito jakékoliv ředění, které jsme v rámci metody MIC schopni připravit. Potom, co je do ještě tekutého agaru přidána antimikrobiální látka, je agar rozlit do Petriho misek. Testovaný mikroorganismus se zředí na hodnotu  $7,0 \log \text{CFU/ml}$  a nakape na misky v objemu 1 - 2  $\mu\text{l}$  ( $4,0 \log \text{CFU}$  na kapku) [36]. Na jedné misce lze testovat víc než jeden druh či kmen. Kvůli kontrole růstu testovaného mikroorganismu by měla být připravena i jedna miska bez přidané antimikrobiální látky a také by mělo testování obsahovat i mikroorganismus, u kterého je známá citlivost na danou antimikrobiální látku. Misky by měly být inkubovány při běžné teplotě, při které se dané mikroorganismy kultivují, po dobu od 16 – 24 hodin. Doba inkubace může být prodloužena dle testovaného mikroorganismu. Agarová diluční metoda má několik výhod, jako je možnost testovat velké množství kmenů v jednom, můžeme snadno rozpoznat kontaminaci a médium může obsahovat neprůhledný materiál [36].

U bujónového ředícího testování je antimikrobiální látka sériově zředěna a jednotlivé koncentrace jsou přidány do kultivujících zkumavek, které obsahují neselektivní bujónové médium. Koncentrace antimikrobiální látky se vybírá podle stejných způsobů jako při testování pomocí agarové diluční metody. Zkumavky (obvykle o celkovém objemu 1 – 10 ml) jsou inokulovány tak, aby obsahovaly přibližně hodnotu  $5,7 \log \text{CFU/ml}$  testovaného mikroorganismu. Stejně jako u agarového ředícího testování, tak i zde by testování mělo obsahovat zkumavku bez antimikrobiální látky a zkumavku s kmenem o známé citlivosti na antimikrobiální látku. Zkumavky inkubujeme 16 – 24 hodin při optimální teplotě testovaného mikroorganismu, doba inkubace může být opět prodloužena v závislosti na běžných podmínkách růstu daného mikroorganismu [36].

Bujónová ředící metoda se může provést ve zkumavkách obsahujících minimální objem 2 ml (makrodiluční metoda) nebo v mikrotitrační destičce s použitím velmi malých objemů (mikrodiluční metoda). Mikrodiluční testování se provádí v mikrotitrační destičce, kde v každé jamce je obsaženo 50 – 100  $\mu\text{l}$  bujónu plus jednotná koncentrace antimikrobiální látky. Do každé jamky je přidáno inokulum o přibližné hodnotě  $4,7 \log \text{CFU}$  na jamku. Zbytek testování probíhá stejným způsobem jako standardní bujónové diluční testování [36].

Ke stanovení letální dávky, jak u standardního, tak u mikrodilučního bujnového testování, musí být proveden následující postup. Z posledních zkumavek případně z jamek mikrotitrační destičky, kde nebyl zaznamenán žádný růst (žádný zákal) se odebere 10 – 100  $\mu\text{l}$  média, které je umístěno na neselektivní agar pomocí „rozetření“ sterilní hokejkou. Zkratkou MBC (minimální baktericidní koncentrace) či MLC (minimální letální koncentrace) se označuje nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která usmrtí  $\geq 99,9\%$  testovaných mikroorganismů. Výsledky těchto typů metod jsou kvantitativní [33, 36].

### 3.1.3 Netradiční metody

#### *Metoda mikroatmosféry*

Jedná se v podstatě o modifikovanou diskovou difúzní metodu, která se hodí pro vyhodnocení silic v plynné fázi. Tato metoda se používá ke zjištění účinnosti silic, které by mohly být využity jako konzervační látky v ochranné atmosféře. Na disk je nanášena testovaná látka a je připevněna na víko Petriho misky, která je otočena dnem vzhůru a inkubována. Výsledky jsou prezentovány jako průměr inhibiční zóny nebo jako minimální inhibiční množství testované silice, které inhibuje celkový růst mikroorganismů [33].

#### *Turbidimetrie*

Tato metoda se po mnoho let využívá k testování antimikrobiálních účinků silic. S vývojem počítačů je umožněno skanovat malé množství růstového média a přečíst tak optickou hustotu. Tekuté kultury obsahující určitou koncentraci silice jsou umístěny do 96 – 100 jamkové polystyrenové mikrotitrační testovací destičky s plochým dnem (typu ELISA, Petra-Plastic, apod.). Po inkubaci je destička umístěna na vibrační plošinu, kde je protřepána a posléze je okamžitě skenována multiskanovým fotometrem. Výsledky se uloží do počítače a analyzují se. Zákal z emulzí olej – voda mohou narušovat konečný bod čtení a proto se někdy mohou využívat indikátory [33].

#### *Metoda bioautografie*

Je to metoda používaná k vyšetření rostlinných extraktů. Extrakty obsahují různé druhy složek, které mohou být odděleny pomocí papírové nebo tenkovrstevné chromatografie. Po tom, co se odpaří rozpouštědlo, je na chromatografický papír či desku nanášen bujón s daným mikroorganismem. Po inkubaci se kontroluje růst. Žádný růst je pozorován na bodech, kde se vyskytují aktivní složky. Zároveň jsou složky z extraktu eluovány (vymývány) a identifikovány. Tato metoda se kvůli vysoké těkavosti moc nepoužívá na testování silic [33].

### 3.2 Antimikrobiální vlastnosti extraktů a silic přírodních látek

Rostlinné silice a jejich složky byly široce používány jako ochucující látky v pokrmech již od dávné historie. Také bylo zjištěno, že rostlinné silice mají široké antimikrobiální využití, kdy antimikrobiální složky lze v rostlinných materiálech nalézt ve frakcích silic z listů (rozmarýn, šalvěj, bazalka,...), cibulí (česnek, cibule), semen (fenykl, kmín, muškátový oříšek,...), kořenů, plodů nebo jiných částí rostlin [37].

Antimikrobiální účinnost silic závisí na mnoha faktorech, jako je například koncentrace, chemická struktura jejich složek, interakce s potravinovou maticí, inaktivace dalšími přídatnými látkami, malá rozpustnost a nerovnoměrné rozšíření v potravinové matici, některé látky mohou být ovlivněny změnou pH či metodou aplikace dané látky. Dále také může záviset na času sklizně, metody extrakce atd. Literatura uvádí, že silice, získané ze saturejky během doby kvetení byly nejsilnější, co se týče jejich významných baktericidních vlastností [37].

Látky obsažené v rostlinných silicích mohou být pro mikrobiální buňky letální, případně mohou inhibovat produkci sekundárních metabolitů, jako jsou např. mykotoxiny. Více antimikrobiálních složek se může v rostlinách vyskytovat před nebo po infekci, v závislosti na mechanismu poškození infekčními nebo parazitickými látkami. V důsledku toho může být rostlina zdrojem vysoce antimikrobiálních látek, které inhibují růst potravinových patogenů. Antimikrobiální složky jsou dále produkovány i v závislosti na stresu z neaktivních prekurzorů. Například v hořčici a křenu je prekurzor glukosinolátů přeměněn pomocí enzymu myrosinázy na různé isothiokyanáty včetně allylové formy, která je silně antimikrobiální látkou [37].

Rostlinné silice většinou působí více proti grampozitivním bakteriím než gramnegativním, ale některé nefenolické látky ze silic (např. allylisothiokyanát) jsou více účinné proti gramnegativním bakteriím. Hlavní složky silic s antimikrobiálním účinkem byly nalezeny v kytkách, bylinách a kořenech a jednalo se o fenolické látky, terpeny, alifatické alkoholy, aldehydy, ketony, kyseliny a isoflavonoidy. Jednoduché a komplexní deriváty fenolu jsou hlavními antimikrobiálními složkami v silicích z koření [37].

Literatura uvádí, že efektivní antimikrobiální účinnost vodných extraktů z různých částí rostlin mají různé druhy rostlin rodu *Allium*. Antimikrobiální účinnost byla pozorována proti patogenním bakteriím, jako jsou *Shigella flexinix*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*,

*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Extrakty z některých květů rostlin tohoto rodu mají mnohem vyšší antibakteriální účinnost než extrakty z cibulí [22].

Dále také vodné a ethanolové extrakty z květů rostliny *Hibiscus sabdariffa* Linn. (roselle) mají vysokou inhibiční účinnost proti bakterii druhu *Bacillus cereus*. Kdy pozorované inhibiční zóny byly pro vodné extrakty 2; 6 a 16 mm a pro ethanolové extrakty 4; 9 a 12 mm při koncentracích 1; 2 a 4 mg/ml. Autor také zaznamenal, že vzrůstající obsah vodných a ethanolových extraktů byl v souladu se vzrůstající inhibicí růstu bakterie *B. cereus* a dokonce došlo ke kompletní inhibici a to při dosažení koncentrace u vodných extraktů 3,45 mg/ml a ethanolových extraktů 4,12 mg/ml [22].

V jiném výzkumu bylo zase zjištěno, že extrakty z okvětních lístků *Rosa canina* L. zvyšují účinky několika antibiotik proti methicillin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus*. Tyto extrakty rovněž mají silnou inhibiční účinnost proti kvasinkám druhu *Candida albicans* [22].

V literatuře bylo rovněž uvedeno, že k určení antimikrobiální účinnosti alkoholových, petroletherových a vodných extraktů z okvětních lístků růží proti různým patogenním bakteriím byla použita diskovou difúzní metoda. Byly provedeny tři typy ředění (1:1, 1:2, 1:3) a u všech byla prokázána inhibice proti všem testovaným bakteriím. Průměry inhibičních zón dosahovaly od 12 do 30 mm, přičemž nejcitlivější bakterií na petroletherový extrakt z okvětních lístků růže byla bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Výsledky dále ukázaly silnou antimikrobiální účinnost alkoholových extraktů proti bakteriím *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas aeruginosa* [22].

Vodné extrakty zase prokázaly antimikrobiální účinnost proti bakteriím *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* a *Bacillus subtilis*. V rámci srovnání bylo zjištěno, že alkoholové extrakty mají průměrně vyšší antimikrobiální účinnost oproti vodným a petrolétherovým extraktům [22].

Silná baktericidní účinnost byla pozorována u silice z heřmánku, kde nejlepší koncentrací pro stanovení antimikrobiální účinnosti byla koncentrace 20 µg/disk. Dále také vyšší efekty byly pozorovány u methanolových extraktů [15]. V jiném výzkumu bylo navíc zjištěno, že seskviterpenoidní látky obsažené v heřmánku mají schopnost zvyšovat účinnost antibiotik, v závislosti na použité koncentraci seskviterpenoidních látek. Tyto seskviterpenoidní látky zvyšují totiž propustnost antibiotik přes buněčnou membránu [38].

V dnešní době se provádí mnoho výzkumů na zjištění antimikrobiální účinnosti z rostlinných extraktů případně silic, používaných v tradiční medicíně nebo izolovaných složek jako jsou například alkaloidy, flavonoidy, seskviterpenové laktony, diterpeny, triterpeny nebo naphochinony a mnoho dalších. To, že rostlinné extrakty mají určitou účinnost, by měl být pouze předběžný údaj a měla by následovat identifikace účinných látek prostřednictvím detailnějšího testu. Výzkum by měl také odhalit údaje ohledně toxicity látek proti zvířecím a lidským buňkám, mechanismy účinku daných látek, účinky *in vivo*, pozitivní a negativní interakce s antibiotiky a řadu dalších [39].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce byla:

- příprava různých extraktů z jedlých květů druhu *Matricaria recutita* s využitím Soxhletova extraktoru, případně vařením daného vzorku pod zpětným chladičem a optimalizovat metodu pro získání extraktů s nejvýraznějším antimikrobiálním účinkem;
- příprava extraktů z jedlých květů rodů *Hemerocallis*, *Hosta*, *Monarda*, *Phlox* a *Salvia* optimalizovanou metodou;
- testování antimikrobiálních účinků připravených extraktů z jedlých květů.



## 5 MATERIÁL A METODY

### 5.1 Přístroje a pomůcky

- Topné hnízdo (Brněnská drutěva, Česká republika)
- Rotační vakuová odparka Heidolph Laborota 4010 digital (Heidolph, Německo)
- Analytická váha Kern ALJ 220-4 (max. 220 g, d= 0,1 mg, Kern&Sohn GmbH, Německo)
- Váha Kern 440-43N (max. 400 g, d= 0,1 g, Kern&Sohn GmbH, Německo)
- Mikrobiologický inkubátor (MEMMERT, Německo)
- BIOHAZARD box EUROFLOW (Clean Air, Holandsko)
- pH metr HANNA pH 211 (Fischer Scientific, spol. s r. o., Česká republika)
- DENZI-LA-METER (Erba Lachema, Česká republika)
- Laboratorní třepačka Vortex (Heidolph, Německo)
- parní sterilizátor VARIOKLAV 75S, 135S (Labortechnik AG, Německo)
- Spektrofotometr (PerkinElmer, Velká Británie)
- Mikropipety (Hirschmann Laborgerate, Německo)
- Parafilm (Vitrum VWR, Česká republika)
- Papírové disky 6 mm (Advantec, Japonsko)
- Soxhletův extraktor
- běžné laboratorní sklo, pomůcky a spotřební materiál

### 5.2 Chemikálie a roztoky

- Methanol (Ing. Petr Lukeš, Česká republika)
- Ethanol (Ing. Petr Lukeš, Česká republika)
- Hexan (Ing. Petr Lukeš, Česká republika)
- Dichlormethan (Ing. Petr Lukeš, Česká republika)
- Aceton (Ing. Petr Lukeš, Česká republika)
- Chloroform (Ing. Petr Lukeš, Česká republika)
- Potato dextrose agar (Himedia, Indie)
- Czapek Dox agar (Himedia, Indie)
- Sabouraud chloramphenicol agar (Himedia, Indie)
- Mueller Hinton agar (Himedia, Indie)

- Masový výtažek (Himedia, Indie)
- Pepton (Himedia, Indie)
- Chlorid sodný (Penta, Česká republika)
- Agar
- D-Glukosa monohydrát (Lachema, a. s., Česká republika)
- Tween 80 (Lach-ner, Česká republika)
- Fyziologický roztok
- Methylenová modř
- Chloramphenicol (Oxoid, Velká Británie)
- Mycomax – fluconazol (Léčiva, a.s., Česká republika)
- Amfotericin (Himedia, Indie)
- Vorikonazol (Himedia, Indie)

#### **5.2.1 Masopeptonový agar (MPA)**

Masopeptonový agar byl připraven smícháním 3 g masového výtažku, 5 g peptonu, 5 g NaCl, 15 g agaru s 1 000 ml destilované vody. Po provedení kontroly pH média (pH 7,3 ± 0,2) následovala sterilizace parním autoklávem (121 °C/20 minut). Po zchlazení bylo médium rozlito do Petriho misek.

#### **5.2.2 Potato dextrose Agar (PDA)**

Potato dextrose agar byl připraven smícháním 39 g instantní půdy a 1 000 ml destilované vody. Posléze byla provedena sterilizace v parním autoklávu (121 °C/20 minut). Po zchlazení bylo médium rozlito do Petriho misek.

#### **5.2.3 Czapek Dox Agar (CDA)**

Czapek Dox agar byl připraven smícháním 49 g instantní půdy a 1 000 ml destilované vody. Následně bylo médium sterilizováno v parním autoklávu (121 °C/20 minut). Po zchlazení bylo médium rozlito do Petriho misek.

#### **5.2.4 Sabouraud chloramphenicol Agar (SAB)**

Sabouraud chloramphenicol agar byl připraven smícháním 65 g instantní půdy s 1 000 ml destilované vody. Následovala sterilizace v parním autoklávu (121°C/20 minut). Po ochlazení bylo médium rozlito do Petriho misek.

### 5.2.5 Mueller Hinton Agar (MHA)

Mueller Hinton agar byl připraven smícháním 39 g instantní pŕůdy s 1 000 ml destilované vody. Následně byla provedena kontrola pH média (pH 7,4 ± 0,2) a sterilizace v parním autoklávu (121°C/20 minut). Nakonec, po zchlazení, bylo médium rozlito do Petriho misek.

### 5.2.6 Příprava fyziologického roztoku

Fyziologický roztok byl připraven smícháním 8,5 g NaCl a 1 000 ml destilované vody. Následně byl fyziologický roztok sterilizován v autoklávu (121°C/20 minut).

### 5.2.7 Příprava 0,1% fyziologického roztoku s Tweenem 80

Tento roztok byl připraven smícháním 400 ml fyziologického roztoku s 400 µl roztoku Tween 80. Posléze byl tento roztok sterilizován v parním autoklávu (121°C/20 minut).

### 5.2.8 Příprava suplementu metylenové modři s přídavkem glukózy

Roztok 1 byl připraven smícháním 0,05 g metylenové modři s 10 ml destilované vody. Roztok 2 byl připraven smícháním 20 g glukózy s 50 ml destilované vody. Následně byly tyto dva roztoky smíchány a sterilizovány v parním autoklávu (121°C/20 minut).

## 5.3 Vzorky jedlých květů

Vzorky květů poskytla Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně. Květy byly sbírány v obci Lednice (173 m. n. m.) v období měsíců květen – červenec v roce 2012. Seznam a množství použitých květů je uveden v tabulce (Tab. 1).

Tab. 1. Seznam a množství použitých vzorků.

Označení vzorku	Název vzorku	Použité hmotnosti [g]
6	<i>Salvia officinalis</i>	10
11	<i>Salvia nemorosa</i> Violet „Queen“	3,6
13	<i>Salvia glutinosa</i>	3,5
14	<i>Salvia nemorosa</i>	3,6
15	<i>Hosta</i> "Golden Tiara"	7,1
16	<i>Hosta sieboldiana</i>	10
19	<i>Hemerocallis fulva</i> " Buzz Bomb"	10
21	<i>Phlox paniculata</i> (růžový)	10
23	<i>Monarda didyma</i> "Scorpion"	7,1
27	<i>Salvia nemorosa</i> "Rose Queen"	10

29	<i>Salvia verticillata</i>	10
32	<i>Salvia transsylvanica</i>	10
35	<i>Hosta</i> "Ginko Craig"	10
38	<i>Hosta</i> "Blue Cadet"	10
-	<i>Matricaria recutita</i>	10

#### 5.4 Použité bakteriální kmeny

K testování antibakteriálních účinků byly použity druhy uvedené v tabulce (Tab. 2).

Tab. 2. Testované bakterie.

	Bakterie
G+	<i>Bacillus cereus</i> CCM 2010
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953
	<i>Rothia</i> sp. (izolát z masa WT, ÚIOŽP, FT UTB)
G-	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. <i>Enteritidis</i> CCM 4420
	<i>Pseudomonas fulva</i> (izolát z jedlého hmyzu, ÚIOŽP, FT UTB)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955
	<i>Ewingella</i> sp. (izolát z masa WT, ÚIOŽP, FT UTB)

Bakterie byly přeočkovávány sterilní bakteriologickou kličkou a to nabráním jedné kolonie, která byla přenesena na sterilní Petriho misku s masopeptonovým agarem a následně bylo provedeno vyočkování pomocí křížového roztěru. *Pseudomonas fulva*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rothia* sp. a *Ewingella* sp. byly kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin, ostatní druhy bakterií byly kultivovány při 37 °C 24 hodin.

Po kultivaci byla další den zhotovena inokula. Inokula byla připravována do sterilních plastových zkumavek tak, že do nich byl napipetován sterilní fyziologický roztok a postupně byly kličkou odebírány jednotlivé kolonie a přidávány do zkumavek s fyziologickým roztokem až do získání hodnoty zákalu 0,5 McF [15, 36].

#### 5.5 Použité kmeny kvasinek

K testování antimykotických účinků na kvasinky byly použity druhy uvedené v tabulce (Tab. 3).

Tab. 3. Testované kvasinky.

Kvasinky
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCM 8191

<i>Candida albicans</i> CCM 8275
<i>Candida parapsilosis</i> CCM 8260

Kvasinky byly přeočkovány pomocí sterilní bakteriologické kličky, kterou byla nabrána jedna kolonie a ta byla naočkována křížovým roztěrem na sterilní Petriho misku s Sabouraud agarem. Následně byla provedena kultivace při 28 °C po dobu 48 hodin.

Po kultivaci byla připravena inokula do sterilních plastových zkumavek. Do nich byl prvně napipetován sterilní fyziologický roztok, do kterého byly bakteriologickou kličkou přidávány jednotlivé kolonie, dokud nebylo získáno inokulum s hodnotou zákalu 0,5 McF [40].

## 5.6 Použité kmeny mikromycet

K testování antimykotických účinků na mikromycety byly použity druhy uvedené v tabulce (Tab. 4).

Tab. 4. Testované plísně.

Plísně
<i>Aspergillus niger</i> (izolát z potravin WT, ÚIOŽP, FT UTB)
<i>Trichoderma</i> (izolát z potravin WT, ÚIOŽP, FT UTB)
<i>Phoma</i> (izolát z potravin WT, ÚIOŽP, FT UTB)
<i>Rhizopus</i> (izolát z potravin WT, ÚIOŽP, FT UTB)
<i>Penicillium vulpinum</i> (izolát z potravin WT, ÚIOŽP, FT UTB)
11 (izolát z jedlého hmyzu, ÚIOŽP, FT UTB)
12 (izolát z jedlého hmyzu, ÚIOŽP, FT UTB)
21 (izolát z jedlého hmyzu, ÚIOŽP, FT UTB)
22 (izolát z jedlého hmyzu, ÚIOŽP, FT UTB)

Jednotlivé plísně byly vyočkovány pomocí sterilní jehly a to tak, že na jehlu byly nanесeny spory dané plísně a ty byly vpichem naočkovány do sterilních Petriho misek s Potato dextrose agarem nebo Czapek Dox agarem případně se Sabouraud agarem. Následně byly naočkované Petriho misky ponechány ke kultivaci při teplotě 28 °C během 1 týdne.

Po kultivaci byla provedena příprava inokula. Inokulum bylo připravováno tak, že jednotlivé plísně byly zality určitým množstvím fyziologického roztoku s Tweenem 80. Následně byl tento roztok, který již obsahoval i spory, napipetován z misky pomocí automatické pipety a napipetované množství bylo smícháno ve sterilní skleněné zkumavce s 0,1% roztokem fyziologického roztoku s Tweenem 80. Takto připravená inokula byla následně ponechána cca 3- 5 minut sedimentovat a následně byla změřena jejich hustota pomocí spektrofotometru.

Pokud denzita suspenze nebyla v rozmezí 0,09 – 0,30 při 530 nm bylo inokulum upraveno buď přidáním suspenze spor nebo roztoku fyziologického roztoku s Tweenem 80 [40].

## 5.7 Metody

### 5.7.1 Příprava extraktů z *Matricaria recutita*

Extrakty byly připraveny během měsíců duben – červen 2014. Extrakty z květů rostliny *Matricaria recutita* byly připraveny, jak pomocí Soxhletova extraktoru, tak vařením vzorku pod zpětným chladičem

Na přípravu extraktů z květů rostliny *Matricaria recutita* bylo použito 6 různých druhů rozpouštědel (methanol, ethanol, aceton, chloroform, dichlormethan, hexan)

Příprava extraktů vařením daného vzorku pod zpětným chladičem byla provedena tak, že do varné baňky bylo naváženo 10 g vzorku a k tomu bylo přidáno 150 ml daného rozpouštědla. Vzorek byl vařen pod zpětným chladičem po dobu pěti hodin a po zchlazení byl extrakt podtlakově přefiltrován. Přebytek rozpouštědla byl odpařen na membránové vakuové odparce. Následně byly extrakty uzavřeny v baňkách a ponechány v chladu do použití.

Při přípravě extraktů pomocí Soxhletova extraktoru bylo do extrakční patrony naváženo 10 g vzorku a do varné baňky bylo odměřeno 150 ml daného rozpouštědla. Extrakce probíhala 5 hodin a po zchlazení byl extrakt odpařen na membránové vakuové odparce. Odpařený vzorek byl ponechán v chladu a temnu v uzavřené baňce do použití.

### 5.7.2 Příprava extraktů z rodů *Hemerocallis*, *Hosta*, *Monarda*, *Phlox*, *Salvia*

Extrakty z daných rodů byly připravovány pomocí Soxhletova extraktoru, kdy bylo do extrakční patrony naváženo 10 g vzorku, případně méně (Tab. 1) a do varné baňky bylo odměřeno 150 ml daného rozpouštědla. Extrakce probíhala 5 hodin a po zchlazení byl extrakt odpařen na membránové vakuové odparce. Odpařený vzorek byl ponechán v chladu a temnu v uzavřené baňce do použití.

### 5.7.3 Disková difúzní metoda

Nejprve byly extrakty rozpuštěny ve vypočteném množství rozpouštědla, pomocí kterého se původně připravovaly. Po rozpuštění byly dané extrakty nanесeny na disky. Nejprve byly použity disky o průměru 5,5 mm z filtračního papíru, na které byly nanесeny 3  $\mu$ l daného

extraktu, následně bylo testování zopakováno s disky o průměru 6 mm, na které bylo naneseno 10  $\mu$ l daného extraktu. Opakované testování bylo provedeno jen u takových extraktů, u kterých se během předchozího testování jevíly výsledky nejasně nebo u kterých byly výsledky pozitivní.

Následovala příprava inokula. Po přípravě inokula byl pomocí automatické pipety napipetován 1 ml daného inokula na Petriho misku s Mueller Hinton agarem. Následovalo přelévání krouživým pohybem, aby bylo inokulum rovnoměrně rozlito po celé ploše Petriho misky. Přebytké inokulum bylo odsáto automatickou pipetou.

Po zaschnutí na Petriho miskách byly pomocí jehly nanášeny disky napuštěné jednotlivými extrakty. Po nanesení všech testovaných disků byly Petriho misky kultivovány v termostatu při takových podmínkách, které vyhovovaly danému mikroorganismu. Tedy všechny bakterie byly kultivovány při 37 °C/24 hod., kromě bakterií *Pseudomonas fulva*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ewingella* sp. a *Rothia* sp., které byly kultivovány při 30 °C/24h. Kvasinky byly kultivovány při 28 °C/48h a plísně byly kultivovány při teplotě 28 °C po dobu 5 – 7 dnů. Po dané době byly provedeny odečty inhibičních zón měřením průměru včetně disku [15, 22].

Jako kontrola antimikrobiálního účinku sloužily disky napuštěné danými antibiotiky. Pro bakterie byly použity disky s antibiotikem chloramphenicol o koncentraci 30  $\mu$ g/disk, pro kvasinky byly využity disky flukonazol o koncentraci 25  $\mu$ g/disk a citlivost plísní byla testována antimykotiky amfotericin B o koncentraci 100 jednotek/disk a vorikonazol o koncentraci 1  $\mu$ g/disk [40].

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Testování inhibičních účinků extraktů z jedlých květů bylo provedeno pomocí diskové difúzní metody. Antimikrobiální účinnost extraktů byla stanovována proti osmi druhům bakterií, třem druhům kvasinek a devíti druhům plísní.

### 6.1 Antimikrobiální účinky extraktů z *Matricaria recutita*

#### 6.1.1 Inhibiční účinky na bakterie

Pro testování inhibičních účinků extraktů byly použity tři druhy grampozitivních bakterií *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Rothia* sp. a pět druhů gramnegativních bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fulva*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* a *Ewingella* sp.

Nejdříve byly připravovány extrakty z heřmánku s použitím různých rozpouštědel ke zjištění nejvyšší účinnosti daných rozpouštědel. Dále byly také extrakty připravovány pomocí dvou technik Soxhletova extraktoru a vařením vzorku pod zpětným chladičem pro optimalizaci metody.

Testované extrakty z *Matricaria recutita* byly účinné jen na grampozitivní bakterie. Proto v tabulce (Tab. 5) nebyly uvedeny výsledky na testované gramnegativní bakterie.

Tab. 5. Testování antibakteriálních účinků – extrakty z heřmánku pravého – průměr inhibičních zón (mm).

Způsob extrakce	Druh extraktu	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Rothia</i> sp.
Soxhlet	CH <sub>3</sub> OH	6,5	6	5,8
Reflux		6	0	0
Soxhlet	hexan	0	6	0
Reflux		0	0	0
Soxhlet	CHCl <sub>3</sub>	0	0	0
Reflux		0	0	0
Soxhlet	ETOH	6	0	0
Reflux		6	0	0
Soxhlet	CHCl <sub>2</sub>	0	0	0
Reflux		0	0	0
Soxhlet	aceton	7	0	0
Reflux		5,8	0	0



V tabulce (Tab. 5) lze pozorovat, že z hlediska použitých rozpouštědel byl nejvíce účinný methanol a to zároveň s použitím přípravy extraktu pomocí Soxhletova extraktoru, kdy se prokázala antimikrobiální účinnost na všechny tři testované grampozitivní bakterie. Jako nejcitlivější mikroorganismus se jevil *Bacillus cereus*, u kterého byla pozorována inhibice u tří ze šesti testovaných rozpouštědel.

Z literatury bylo při testování silic a extraktů z rostliny *Matricaria recutita* zjištěno, že silice jsou silně baktericidní a že nejvhodnější koncentrace s antimikrobiální účinností byla 20 µg/disk. Vysokou účinnost měly i methanолоvé extrakty ve srovnání s extrakty připravenými z jiných rozpouštědel, což lze pozorovat v tomto výzkumu kde právě antimikrobiální účinnost methanолоvých extraktů byla vyšší než u extraktů, připravených pomocí jiných rozpouštědel. Dále bylo také v literatuře uvedeno, že testované extrakty vykazovaly antimikrobiální účinnost i na gramnegativní bakterie, což mohlo být způsobeno tím, že byly použity vyšší koncentrace extraktů na disku, příp. i jinou extrakční technikou [15].

### 6.1.2 Inhibiční účinky na kvasinky

K testování antimikrobiálních účinků na kvasinky byly použity kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*. V následující tabulce (Tab. 6) lze pozorovat výsledky testování antimikrobiálních účinků extraktů z *Matricaria recutita* na kvasinky.

Tab. 6. Testování antimykotických účinků extraktů z *Matricaria recutita* na kvasinky – průměr inhibičních zón (mm).

Způsob extrakce	Druh extraktu	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Soxhlet	CH <sub>3</sub> OH	0	0	0
Reflux		0	0	0
Soxhlet	Hexan	0 *	0	0 *
Reflux		0 *	0	0 *
Soxhlet	CHCl <sub>3</sub>	0	0	0 *
Reflux		0 *	0	0 *
Soxhlet	ETOH	0 *	0	0
Reflux		0 *	0	0
Soxhlet	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0	0	0 *
Reflux		0	0	0 *
Soxhlet	Aceton	0	0	0
Reflux		0	0	0

\*... slabá inhibice

V příložené tabulce (Tab. 6) lze pozorovat, že na kvasinku *Candida albicans* neměly dané extrakty žádnou účinnost. Oproti tomu u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida parapsilosis* byla pozorována mírná inhibice, která ovšem nebyla měřitelná. Tyto extrakty jsou v tabulce (Tab. 6) označeny hvězdičkou. Inhibice byly pozorovatelné u extraktů z heřmánku připravených pomocí rozpouštědla hexan u obou kvasinek, dále u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byly pozorovatelné inhibice u extraktů připravených pomocí chloroformu a vaření vzorku pod zpětným chladičem a u obou extrakčních metod s využitím rozpouštědla ethanol. Oproti tomu byly mírné inhibice pozorovány u kvasinky *Candida parapsilosis* u extraktů připravených pomocí chloroformu a to oběma metodami a stejně tak i u rozpouštědla dichlormethanu.

Ve výzkumu týkajícího se antimikrobiálních účinků extraktů a silic z rostliny *Matricaria recutita*, byla zjištěna antimikrobiální účinnost methanolvých, ethanolových, diethyletherových a hexanových extraktů na kvasinku *Candida albicans* [15]. Rozdíly ve výsledcích jejich a tohoto výzkumu mohly být způsobeny použitím jiné extrakční techniky a jinými koncentracemi použitými k testování daných extraktů.

### 6.1.3 Inhibiční účinky na mikromycety

K testování inhibičních účinků extraktů na plísně byly využity plísně *Trichoderma*, *Aspergillus niger*, *Phoma* a *Rhizopus*. Všechny extrakty z jedlých květů, kromě extraktů z rostliny *Matricaria recutita*, byly dále také testovány proti čtyřem izolátům plísní z jedlého hmyzu. Tyto plísně nebyly blíže určeny.

V další příložené tabulce (Tab. 7) lze pozorovat účinky extraktů z heřmánku na testované plísně.

Tab. 7. Testování antimykotických účinků na extrakty z *Matricaria recutita* na mikromycety – průměr inhibičních zón (mm).

Způsob extrakce	Druh extraktu	<i>Trichoderma</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Phoma</i>	<i>Rhizopus</i>
Soxhlet	CH <sub>3</sub> OH	0	0	0 *	0
Reflux		0	0	0	0
Soxhlet	Hexan	0	0 *	0 *	0 *
Reflux		0	0	0 *	0 *
Soxhlet	CHCl <sub>3</sub>	0 *	0 *	0 *	0 *
Reflux		0	0	0 *	0 *

Soxhlet	ETOH	0	0	0	0
Reflux		0	0	0	0
Soxhlet	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0	0	0 *	0
Reflux		0	0	0 *	0
Soxhlet	Aceton	0	0	0 *	0
Reflux		0	0	0	0

\*...slabá inhibice

V tabulce (Tab. 7) u extraktů z heřmánku byly pozorovány pouze slabé známky inhibice, která nebyla měřitelná. U všech testovaných plísni byla pozorována mírná inhibiční zóna na extrakt připravený pomocí Soxhletova extraktoru s rozpouštědlem chloroform. Dále byla mírná inhibice pozorována u extraktu připraveného Soxhletovým extraktorem s využitím rozpouštědla hexan na plísně *Aspergillus niger*, *Phoma* a *Rhizopus*. U plísně *Rhizopus* byly mírné inhibiční zóny pozorovány i extraktů připravených vařením pod zpětným chladičem s využitím rozpouštědel hexan a chloroform. U plísně *Phoma* bylo těchto nezměřitelných inhibičních zón pozorováno nejvíce (Tab. 7).

Z literatury bylo při testování extraktů *Matricaria recutita* zjištěno, že všechny extrakty (methanolové, ethanolové, diethyletherové a hexanové) vykazují antimikrobiální účinnost vůči testované plísni *Aspergillus flavus* [15]. V rámci tohoto testování však nebyla pozorována žádná, případně jen mírná antimikrobiální účinnost, což mohlo být způsobeno jinou přípravou extraktů případně jinými testovanými koncentracemi daného extraktu na disku.

Při testování silic z rostliny *Matricaria recutita* na plísně bylo zjištěno, že v závislosti na koncentraci dané dávky došlo k inhibici všech testovaných dermatofytů (*Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes* a *Trichophyton rubrum*). Dermatofyty byly inhibovány nejvyšší testovanou koncentrací 80 µg/ml, avšak také nejnižší testovanou koncentrací 2,5 µg/ml. Růst dermatofytů byl inhibován již od 3,2 % do 100 %. Efektivní koncentrace (EC<sub>50</sub>) v µg/ml byla nejnižší u plísně druhu *Trichophyton tonsurans* a to pouhé 3,0 µg/ml a nejvyšší byla u plísně druhu *Microsporum gypseum*, kde hodnota koncentrace silice z heřmánku činila 61,0 µg/ml. Z čehož vyplývá, že plíseň *Trichophyton tonsurans* je mnohem citlivější k této silici než *Microsporum gypseum* [13].

Dále bylo z literatury zjištěno, že při testování silic z *Matricaria recutita* na saprofyty (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum* a *Fusarium oxysporum*) silice inhibovali růst všech testovaných saprofytů v rozmezí koncentrací 15,62 µg/ml až 1000 µg/ml [13]. Z procentuálního hlediska byl růst saprofytů inhibován

od 3,5 % do 93,6 %, tedy oproti dermatofytům nedošlo k úplné inhibici. Nejnižší hodnota poloviny maximální efektivní koncentrace v  $\mu\text{g/ml}$  byla u plísni druhu *Fusarium oxysporum*, kde koncentrace silic heřmánku byla 53,7  $\mu\text{g/ml}$  a nejvyšší hodnota  $\text{EC}_{50}$  byla u plísni druhu *Trichoderma harzianum*, u níž byla koncentrace silic kalkulována na 638,8  $\mu\text{g/ml}$  [13]. Z tohoto hlediska lze tedy usoudit, že silice z rostliny *Matricaria recutita* vykazují vyšší antimikrobiální účinnost než extrakty připravované pomocí jiných rozpouštědel.

## 6.2 Antimikrobiální účinky extraktů z rodů *Hemerocallis*, *Hosta*, *Morinda*, *Phlox* a *Salvia*

### 6.2.1 Inhibiční účinky na bakterie

V následující tabulce lze pozorovat výsledky testování antibakteriálních účinků na extrakty z jedlých květů.

Tab. 8. Testování antibakteriálních účinků na další extrakty z jedlých květů – průměr inhibičních zón (mm).

Označení vzorku	G+			G-				
	1	2	3	4	5	6	7	8
6	14	14,5	15	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0 *	0 *
13	0	0	0	0	0 *	0 *	0 *	0 *
14	8,5	0 *	0	0	0 *	0 *	0 *	0 *
15	0	0	0	0	0 *	0	0 *	0
16	0	0	0	0	0 *	0 *	0 *	0 *
19	0	0	0	0	0 *	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0
23	12	26	20	0	0 *	0	0	0 *
27	7,5	0 *	0	0	0 *	0	0 *	0
29	6,5	0	0	0	0	0	0	0
32	8,5	7,25	0	0 *	0 *	0	0 *	0 *
35	0	0	0	0	0 *	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0
C30	40	31	36	31	34	22	13	8
CH <sub>3</sub> OH	0	0	0	0	0	0	0	0

\*... slabá inhibice; C30...chloramphenicol 30  $\mu\text{g/disk}$ ; CH<sub>3</sub>OH...methanol; 1...*Bacillus cereus*; 5...*Salmonella enteritidis*; 2...*Staphylococcus aureus*; 6...*Ewingella* sp.; 3...*Rothia* sp.; 7...*Pseudomonas fulva*; 4...*Escherichia coli*; 8...*Pseudomonas aeruginosa*

V tabulce (Tab. 8) lze pozorovat, že u testování inhibičních účinků dalších rodů jedlých květů, byla pozorována, jako nejcitlivější, opět bakterie *Bacillus cereus*. Tato bakterie byla citlivá na 6 druhů extraktů, z nichž 5 se řadilo k rodu *Salvia* a jeden k rodu *Monarda*. Největší inhibiční zónu tvořil extrakt z květů *Salvia officinalis*. U bakterií *Staphylococcus aureus* a *Rothia* sp. největší inhibiční zónu tvořil extrakt z květů rostliny *Monarda didyma*. V rámci testování gramnegativních bakterií nebyly pozorovány tak jasné zóny jako u testování gram-pozitivních bakterií, ale byly zde u některých testovaných extraktů zaznamenatelné rozdíly oproti extraktům, které nevykazovaly žádnou inhibici. Tyto extrakty byly v tabulce (Tab. 8) označeny hvězdičkou.

V literatuře byly zjištěny obdobné výsledky testování antimikrobiálních účinků na bakterie *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Pozitivní výsledky byly pozorovány u bakterie *Staphylococcus aureus* u extraktů z květů rostliny *Geranium maculatum* a *Monarda fistula*, kdy inhibiční zóna byla o velikosti v průměru 7 mm nebo i například u květů rostliny *Spiraea tomentosa*, kde pozorovaná inhibiční zóna byla 13 mm. Na bakterie *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* tyto extrakty neměly žádnou účinnost [41].

Ve výzkumu, zabývajícím se antimikrobiálními účinky silic rostliny *Salvia officinalis*, bylo uvedeno, že byly pozorovány inhibiční zóny na bakterie *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Micrococcus flavus*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Bacillus subtilis*. Testované silice byly před testováním zředěny v n-hexanu na 20% a 50% roztoky. Přičemž u 20% roztoků zředěných n-hexanem byla u bakterie *Micrococcus flavus* pozorována největší inhibiční zóna a to  $(56,00 \pm 0,71)$  mm. U bakterie *Staphylococcus aureus* byla pozorována inhibiční zóna o velikosti  $(24,00 \pm 1,00)$  mm. V rámci testovaných gramnegativních bakterií byla nejvyšší inhibice pozorována u bakterie *Salmonella typhi*, kde naměřená inhibiční zóna měla průměr  $(40,20 \pm 0,45)$  mm. Byly testovány tři kmeny bakterie *Escherichia coli*, kde všechny, i jeden multirezistentní kmen, byly citlivé vůči testovaným silicím. Silice z rostliny *Salvia officinalis* vykazovaly antimikrobiální účinnost i na bakterii *Shigella sonnei*, kde pozorovaná inhibiční zóna byla o velikosti  $(21,20 \pm 0,83)$  mm. U bakterie *Salmonella enteritidis* byla velikost inhibiční zóny  $(16,60 \pm 2,07)$  mm. Na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* nebyla, jako na jedinou bakterii tohoto testování, prokázána účinnost testovaných silic [42].

### 6.2.2 Inhibiční účinky na kvasinky

V další přiložené tabulce (Tab. 9) jsou zaznamenány výsledky testování extraktů z dalších rodů jedlých květů na dané kvasinky.

Tab. 9. Testování antimykotických účinků extraktů z dalších jedlých květů na kvasinky – průměr inhibičních zón (mm).

Označení vzorku	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
6	0	0	0
11	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	20,5	15	13
16	20	13	13
19	0	0	0
21	0	0	0
23	8	0	0
27	0	0	0
29	0	0	0
32	0	0	0
35	20	15	14,5
38	17	9	10,5
Flukonazol 25 µg	34	18	23
CH <sub>3</sub> OH	0	0	0

Ohledně testování dalších jedlých květů bylo pozorováno, že na kvasinky mají nejvyšší účinnost extrakty z květů rostlin rodu *Hosta*. Ze tří testovaných druhů kvasinek se jako nejcitlivější jevila kvasinka rodu *Saccharomyces cerevisiae*, u které byly naměřené v průměru větší zóny než u ostatních testovaných kvasinek. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byl mimo jiné pozorován i inhibiční účinek extraktu z květů rostliny *Monarda didyma*, který u dalších dvou testovaných kvasinek pozorován nebyl (Tab. 9). Bylo zjištěno, že látka Funkiosid C, která je obsažena v rostlinách rodu *Hosta*, má antifungální účinnost a byla prokázána její antimikrobiální účinnost na kvasinku *Candida albicans*, s minimální inhibiční koncentrací 0,310 g/l [12].

Obdobné výsledky byly uvedeny v literatuře a to u kvasinky *Candida albicans* u extraktů z květů rostliny *Epilobium angustifolium*, u které byla naměřena inhibiční zóna 17 mm a u rostliny *Euphorbia esula*, u níž byla pozorována inhibiční zóna ve velikost 9 mm [41].

### 6.2.3 Inhibiční účinky na mikromycety

V tabulce (Tab. 10) jsou uvedeny výsledky prvního testování plísní. Bohužel i přes dodržení skladovacích podmínek pro připravená inokula, došlo u dvou rodů (*Phoma*, *Rhizopus*) k jejich oslabení a daná inokula již netvořila na Petriho misce s MHA souvislý nárůst, avšak inhibiční zóny u nich byly pozorovatelné a proto byly změřeny ze dvou míst, která se vyskytovala nejbližší testovanému disku s extraktem, a následně byl vypočten průměr dané inhibiční zóny. Tyto naměřené hodnoty jsou v tabulce (Tab. 10) označeny dvěma hvězdičkami.

Tab. 10. První testování antimykotických účinků extraktů z dalších jedlých květů na mikromycety – průměr inhibičních zón (mm).

Označení vzorku	<i>Trichoderma</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Phoma</i>	<i>Rhizopus</i>
6	0	0	0	0
11	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	18,5	7,25*	14,25**	0
16	20,5	6,25*	9**	0
19	0	0	0	0
21	0	0	0	0
23	0	0	0	13,75**
27	0	0	0	0
29	0	0	0	0
32	0	0	0	0
35	21	7,5*	21,75**	0
38	20,75	6,5*	16,5**	0

\*... slabá inhibice, \*\*... nesouvislý nárůst plísní

V tabulce (Tab. 10) lze pozorovat, že velmi účinné byly extrakty z květů rodu *Hosta*, které působily inhibičně na tři ze čtyř testovaných plísní a to na plíseň *Trichoderma*, *Aspergillus niger* a *Phoma*. Dále byl účinný i extrakt z květů druhu *Monarda didyma*, který byl inhiboval plíseň rodu *Rhizopus*, na kterou nepůsobily extrakty z květů rodu *Hosta*. Avšak jak již bylo zmíněno, u dvou rodů plísní byla testovaná inokula nedostatečná a z tohoto důvodu bylo rozhodnuto, že bude provedeno nové testování. Druhé testování bylo provedeno na stejné rody plísní a navíc byly k tomuto testování přidány ještě čtyři další plísně, které byly získány izolací z jedlého hmyzu a plíseň *Penicillium vulpinum*. Toto testování se uskutečnilo po čtyřech měsících skladování, kdy byly extrakty skladovány při 4 °C na temném místě.

Tab. 11. Druhé testování antimykotických účinků extraktů z dalších jedlých květů na mikromycety – průměr inhibičních zón (mm).

Označení vzorku	<i>Trichoderma</i>	<i>A. niger</i>	<i>Phoma</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>P. vulpinum</i>	11'	12**	21	22
6	0	0*	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	10,5	0*	0*	7,5 – 8*	15	0	0	0*	0
16	10	0*	0*	9*	15	0	0	0*	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	6,5*	0	0	0	0*	0*
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	11	0*	0*	6,5*	15	0	0	0*	0
38	10,5	0*	0*	0*	16,5	0	0	0*	0
AMF	10,5	18	20,5	9	21	14,5	13	15	10
VOR	26	29	43,5	30	34	47	0	0	32

\*... slabá inhibice, \*\*...slabé inokulum, '...kontaminace inokula

Jak již bylo zmíněno, testování plísní probíhalo dvakrát a to s čerstvými extrakty a s extrakty po skladování. V tabulkách (Tab. 10, 11) lze pozorovat rozdíly, které vznikly vlivem času. Lze pozorovat, že u plísně *Trichoderma*, došlo ke zmenšení průměru inhibičních zón. Je zde tedy možnost, že extrakty s delší dobou skladování postupně slábnou (Tab. 11). Je také zajímavé, že na plíseň rodu *Rhizopus* byly extrakty rodu *Hosta* účinné až při testování na podzim. K tomuto jevu mohlo pravděpodobně dojít tím, že v létě bylo testované inokulum slabé. U plísně rodu *Rhizopus* jako jediné z testovaných plísní, byl pozorován inhibiční efekt extraktu z květů rostliny *Monarda didyma*, avšak toto tvrzení by mělo být ověřeno. Vzhledem k tomu, že účinnost těchto extraktů pravděpodobně klesá po určité době a v rámci prvního měření bylo inokulum této plísně slabé. V rámci plísně *Penicillium vulpinum* byla pozorována citlivost opět k extraktům z rodu *Hosta*. Bylo zjištěno, že antifungální účinek rostlin tohoto rodu způsobuje látka Funkiosid C, která inhibovala plíseň *Fusarium oxysporum*, a zjištěná minimální inhibiční koncentrace byla 0,217 g/l [12].

Dále byly testovány i plísně, které byly izolovány z jedlého hmyzu. Žádný z testovaných extraktů neměl antimykotické účinky na tyto izoláty, které nebyly identifikovány.



Z literatury bylo zjištěno, že silice z rostliny *Myrtus communis* mají velmi silný účinek proti plísním *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. a *Alternaria alternata*, kde například u plísně *Aspergillus niger* byla pozorována inhibiční zóna ( $30 \pm 1,2$ ) mm. Obdobné výsledky byly pozorovány i u dalších druhů testovaných plísní, kdy byly pozorovány průměry inhibičních zón v rozmezí 20 – 30 mm [43].

## ZÁVĚR

Jedlé květy jsou velmi perspektivní komoditou, ať již v lidské stravě či ve farmaceutickém průmyslu. Z hlediska lidské výživy mohou přispět svým nutričním složením, sensorickými vlastnostmi, a to buď vzhledem, kdy dodávají pokrmu na estetičnosti nebo chuťovými či aromatickými složkami. Farmaceutický průmysl má o jedlé květy zájem hlavně z důvodů jejich ochranných, antioxidačních, antimikrobiálních a léčivých účinků. Tyto účinky souvisí hlavně s obsahem bioaktivních látek, které jsou v květech obsažené. Vzhledem k růstu antimikrobiální rezistence je nutné hledat nové zdroje možných léčiv. Proto roste o jedlé květy zájem, ať už z hlediska vědeckých výzkumů či v rámci veřejnosti.

Cílem této práce bylo zjišťování antimikrobiální účinnosti extraktů z jedlých květů diskovou difúzní metodou. Bylo zjištěno, že na bakterie, jakožto prokaryotické mikroorganismy, působí hlavně extrakty připravované z rostlin rodu *Salvia*, případně z květů rostliny *Monarda didyma* a také z květů *Matricaria recutita*. Přičemž citlivější byly bakterie grampozitivní.

Antifungální účinky byly prokázány u extraktů z květů rostlin rodu *Hosta*, které působily na všechny testované kvasinky a většinu testovaných sbírkových plísní a také druhu *Monarda didyma* (inhiboval jednu kvasinku a jednu plíseň).

Nejzajímavější extrakt byl získán z květů druhu *Monarda didyma*, jelikož bylo prokázáno široké spektrum jeho inhibičních účinků – vůči bakteriím, kvasinkám i plísním. Bylo by velmi zajímavé pokračovat ve výzkumu extraktů z těchto květů a zjistit, jaké látky jsou zodpovědné za tento účinek.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] KOPEC, Karel a Josef BALÍK. *Kvalitologie zahradnických produktů: nauka o hodnocení a řízení jakosti produktů a produkčních procesů*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2008, 171 s. ISBN 978-80-7375-198-2
- [2] KOPEC, K. Jedlé květy pro zpestření jídelníčku. *Výživa a potraviny*. 2004, vol. 59, s. 151-152
- [3] MLCEK, Jiri a Otakar ROP. Fresh edible flowers of ornamental plants – A new source of nutraceutical foods. *Trends in Food Science*. 2011, vol. 22, issue 10, s. 561-569. DOI: 10.1016/j.tifs.2011.04.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224411000847>
- [4] MLČEK, J., K. KOPEC, O. ROP, J. NEUGEBAUEROVÁ, A. NĚMCOVÁ a J. VÁBKOVÁ. Nutriční a senzorická jakost jedlých květů. *Výživa a potraviny*. 2012, č. 2, s. 49-51.
- [5] KOPEC, Karel. *Zelenina ve výživě člověka*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2010, 159 s. ISBN 978-80-247-2845-2
- [6] KONČINSKÁ, Markéta. Botanická zahrada a genofondové sbírky Chotobuz: Sběrka denivek. In: *Botanický ústav AV ČR, v. v. i.* [online]. 2015 [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: [http://www.ibot.cas.cz/sites/File/menu/vedecka\\_cinnost/sbirky\\_a\\_databaze/sbirky\\_botanicke\\_zahrady\\_chotobuz/hemerocallis/denivky.pdf](http://www.ibot.cas.cz/sites/File/menu/vedecka_cinnost/sbirky_a_databaze/sbirky_botanicke_zahrady_chotobuz/hemerocallis/denivky.pdf)
- [7] Hemerocallis-denivka. *Botanický ústav AV ČR, v. v. i.* [online]. 2015 [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <http://www.ibot.cas.cz/hemerocallis>
- [8] MORSE, Kitty. *Jedlé květy: kuchyňský průvodce s recepty*. Vyd. 1. Praha: Volvox Globator, 1999, 87 s. Kuchařky na okraji. ISBN 80-720-7254-4.
- [9] NEUGEBAUEROVÁ, J. a J. VÁBKOVÁ. Jedlé květy součástí food stylingu. *Zahradnictví*. 2009, vol. 83, s. 22-24.
- [10] Edible flowers chart. *What's cooking America* [online]. 2004 [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <http://whatscookingamerica.net/EdibleFlowers/EdibleFlowersMain.htm>
- [11] JIRÁSEK, František. *Květiny našich domovů*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1973. ISBN 07-001-73-04/45.

- [12] RUI LI. Chemical constituents and biological activities of genus *Hosta* (Liliaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012-04-16, vol. 6, issue 14. DOI: 10.5897/JMPR11.1123. Dostupné z: [http://www.academicjournals.org/jmpr/abstracts/abstracts/abstracts2012/16April/Li et al.htm](http://www.academicjournals.org/jmpr/abstracts/abstracts/abstracts2012/16April/Li%20et%20al.htm)
- [13] JAMALIAN, A., M. SHAMS-GHAHFAROKHI, K. JAIMAND, N. PASHOOTAN, A. AMANI a M. RAZZAGHI-ABYANEH. Chemical composition and antifungal activity of *Matricaria recutita* flower essential oil against medically important dermatophytes and soil-borne pathogens. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*. 2012, vol. 22, issue 4, s. 308-315. DOI: 10.1016/j.mycmed.2012.09.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1156523312001473>
- [14] RICHTER, Miloš a František SEVERA. *Léčivé rostliny*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1971. ISBN 07-031-71-04/38.
- [15] ROBY, Mohamed Hussein Hamdy, Mohamed Atef SARHAN, Khaled Abdel-Hamed SELIM a Khalel Ibrahim KHALEL. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*. 2013, vol. 44, 1, s. 437-445. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.10.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092666901200564X>
- [16] JIRÁSEK, Václav a František STARÝ. *Atlas léčivých rostlin*. 2. vyd. Praha: SPN, 1989. ISBN 14-031-89.
- [17] Rostliny: Monarda - zavinutka. *Garten* [online]. 2013 [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <http://www.garten.cz/a/cz/7976-monarda-zavinutka-1/>
- [18] DEYL, Miloš a Květoslav HÍSEK. *Naše květiny*. 3rd rev. ed. Praha: Academia, 2001, 690 p. ISBN 80-200-0940-X.
- [19] PŘÍHODA, Antonín. *Léčivé rostliny*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1973. ISBN 07-016-73-04/38.
- [20] GROSSER, Wolfgang. *Bylinky na zahradě*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004. ISBN 80-247-0593-1.
- [21] PURI, Munish, Deepika SHARMA a Colin J. BARROW. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*. 2012, vol. 30, issue 1,

- s. 37-44. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.06.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779911001181>
- [22] VOON, Han Ching, Rajeev BHAT a Gulam RUSUL. Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2012, vol. 11, issue 1, s. 34-55. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x>
- [23] ČERNÁ, Ladislava a Zdeňka ŠKUBALOVÁ. Extrakce. *Laboratorní technika: Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola Hradec Králové* [online]. 2015 [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: <http://lat.zshk.cz/vyuka/extrakce.aspx>
- [24] ANDRADE, Eriel Forville de, Roberta de Souza LEONE, Luciana N. ELLENDERSEN a Maria Lucia MASSON. Phenolic profile and antioxidant activity of extracts of leaves and flowers of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Industrial Crops and Products*. 2014, vol. 62, 12, s. 499-506. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.09.025.
- [25] CÍDLOVÁ, Hana, Miroslav FIALA a Irena PLUCKOVÁ. Destilace. *Laboratorní technika* [online] 2006 [cit. 2015-04-06] Dostupné z: [http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech-old/soubory/operace/separacni\\_metody/destilace.pdf](http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech-old/soubory/operace/separacni_metody/destilace.pdf)
- [26] PAVELA, Roman a Martin BĀRNET. *Alternativní plodina ruta vonná (Ruta graveolens L.): pěstování, význam, využití v ochraně rostlin : uplatněná certifikovaná metodika*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2011, 24 s. ISBN 978-80-87011-71-3.
- [27] TOPIAŘ, M., M. SAJFRTOVÁ, H. SOVOVÁ a J. KARBAN. Optimalizace a matematický popis Hydrodestilace eukalyptu a lipie. In: *Digitální repozitář* [online]. 2015 [cit. 2015-04-06] Dostupné z: [<http://invenio.nusl.cz/record/161347/files/content.csg.pdf>]
- [28] VELÍŠEK, Jan a Karel CEJPEK. *Biosynthesis of food components*. 1st ed. Tábor: OSSIS, 2008, xii, 497 s. ISBN 978-80-86659-12-1.
- [29] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. Vyd. 2. uprav. Tábor: OSSIS, 2002, 343 s. ISBN 808665902x.

- [30] MORAVCOVÁ, Jitka. *Biologicky aktivní přírodní látky*, Praha: VŠCHT Praha, 2006, 108 s.
- [31] OPLETAL, Lubomír a Věra SKŘIVANOVÁ. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2010, 653 s. ISBN 978-80-246-1801-2.
- [32] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 361 s. ISBN 80-856-0571-6.
- [33] KALEMBA, D. a A. KUNICKA. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*. 2003-05-01, vol. 10, issue 10, s. 813-829. DOI: 10.2174/0929867033457719. Dostupné z: <http://www.eurkaselect.com/openurl/content.php?genre=article>
- [34] OIE], [edited by the OIE Biological Standards Commission and adopted by the World Assembly of Delegates of. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: (mammals, birds and bees)*. 7th ed. Paris: Office international des épizooties, 2012. ISBN 978-929-0448-785.
- [35] BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renáta KARPÍŠKOVÁ a Petra MYŠKOVÁ. *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-676-6. Dostupné z: <http://www.vfu.cz/inovace-bc-a-navmgr/realizovane-klicove-aktivita/skripta/ls-2013-2014/mikrobiologicke-laboratorni-metody.pdf>
- [36] DAVIDSON, P, John Nikolaos SOFOS a Alfred Larry BRANEN. *Antimicrobials in food*. 3rd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005, 706 s. ISBN 0-8247-4037-8.
- [37] RAI, Mahendra a Michael CHIKINDAS. *Natural antimicrobials in food safety and quality*. Wallingford: CABI, c2011, xiii, 368 s. ISBN 978-1-84593-0.
- [38] PETRONILHO, Sílvia, Marcelo MARASCHIN, Manuel A. COIMBRA a Sílvia M. ROCHA. In vitro and in vivo studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Industrial Crops and Products*. 2012, vol. 40, 11, s. 1-12. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.02.041. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669012001343>
- [39] RÍOS, J.L. a M.C. RECIO. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005, vol. 100, 1-2, s. 80-84. DOI: 10.1016/j.jep.2005.04.025. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874105003247>

- [40] MALLÁTOVÁ, N., P. HAMAL, I. KOČMANOVÁ, V. BUČHTA a K. MENCL. Testování citlivosti mikromycety k antimykotikům in vitro u imunosuprimovaných pacientů – doporučení odborníků s podporou CELL a SLM ČLS JEP. In: *Zdraví E15: Postgraduální medicína* [online]. 26. 10. 2011 [cit. 2015-04-06] Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/testovani-citlivosti-mikromycet-k-antimykotikum-in-vitro-u-imunosuprimovanych-pacientu-doporuceni-odborniku-s-podporou-cell-a-slm-cls-jep-462246>
- [41] BORCHARDT, Joy R., Donald L. WYSE, Crag C. SHEAFFER, Kendra L. KAUPPI, R. Gary FULCHER, Nancy J. EHLKE, David D. BIESBOER a Russell F. BEY. Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. *JOURNAL OF MEDICINAL PLANTS RESEARCH*. 2008, roč. 2, č. 5, s. 98-110. Dostupné z: [http://www.academicjournals.org/article/article1380378099\\_Borchardt%20et%20al%20%281%29.pdf](http://www.academicjournals.org/article/article1380378099_Borchardt%20et%20al%20%281%29.pdf)
- [42] BOZIN, Biljana, Neda MIMICA-DUKIC, Isidora SAMOJLIK a Emilija JOVIN. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, vol. 55, issue 19, s. 7879-7885. DOI: 10.1021/jf0715323. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0715323>
- [43] HSOUNA, Anis Ben, Naceur HAMDİ, Ramzi MILADI a Slim ABDELKAFI. Myrtus communis Essential Oil: Chemical Composition and Antimicrobial Activities against Food Spoilage Pathogens. *Chemistry*. 2014, vol. 11, issue 4, s. 571-580. DOI: 10.1002/cbdv.201300153.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

MPA	Masopectonový agar.
PDA	Bramborovo – dextrózový agar
CDA	Czapek dox agar
SAB	Sabouraud chloramphenicol agar
MHA	Mueller – Hinton agar
McF	McFarlandův stupeň.
CFU	Colony forming unit (kolonie tvořící jednotka)
MIC	Minimální inhibiční koncentrace.
C30	Antibiotikum chloramphenicol o koncentraci 30 µg/disk
AMF	Antimykotikum Amphotericin o koncentraci 100 jednotek/disk
VOR	Antimykotikum Vorikonazol o koncentraci 1 µg/disk



## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Sensorický profil květů .....</i>	<i>13</i>
--	-----------

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1. Seznam a množství použitých vzorků. ....</i>	<i>35</i>
<i>Tab. 2. Testované bakterie. ....</i>	<i>36</i>
<i>Tab. 3. Testované kvasinky. ....</i>	<i>36</i>
<i>Tab. 4. Testované plísně. ....</i>	<i>37</i>
<i>Tab. 5. Testování antibakteriálních účinků – extrakty z heřmánku pravého – průměr inhibičních zón (mm). ....</i>	<i>40</i>
<i>Tab. 6. Testování antimykotických účinků extraktů z Matricaria recutita na kvasinky – průměr inhibičních zón (mm). ....</i>	<i>41</i>
<i>Tab. 7. Testování antimykotických účinků na extrakty z Matricaria recutita na mikromycety – průměr inhibičních zón (mm). ....</i>	<i>42</i>
<i>Tab. 8. Testování antibakteriálních účinků na další extrakty z jedlých květů – průměr inhibičních zón (mm). ....</i>	<i>44</i>
<i>Tab. 9. Testování antimykotických účinků extraktů z dalších jedlých květů na kvasinky – průměr inhibičních zón (mm). ....</i>	<i>46</i>
<i>Tab. 10. První testování antimykotických účinků extraktů z dalších jedlých květů na mikromycety – průměr inhibičních zón (mm). ....</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 11. Druhé testování antimykotických účinků extraktů z dalších jedlých květů na mikromycety – průměr inhibičních zón (mm). ....</i>	<i>48</i>