

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Vliv rostlinných olejů s obsahem mastných kyselin se
středním řetězcem na původce mastitid**

Bakalářská práce

Paula Slaničková

Zootechnika, obor Speciální chovy

Vedoucí práce doc. MVDr. Eva Skřivanová, Ph. D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že svoju bakalársku prácu "Vliv rostlinných olejů s obsahem mastných kyselin se středním řetězcem na původce mastitid " som vypracovala samostatne pod vedením vedúceho bakalárskej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce. Ako autorka uvedenej bakalárskej práce ďalej prehlasujem, že som v súvislosti s jej vytvorením neporušila autorské práva tretích osôb.

V Prahe dňa _____

Pod'akovanie

Rada by som pod'akovala mojej vedúcej práce, doc. MVDr. Eve Skřivanovej, PhD za pomoc a trpezlivosť a že si našla čas. A samozrejme skvelej Ing. Kláre Lalučkovej, ktorá mi vysvetlila ako mám správne pracovať v laboratórií a tiež za jej veľkú trpezlivosť a pomoc. Ďakujem aj svojej rodine za podporu a najmä priateľovi, ktorý mi bol veľkou oporou.

Vplyv rastlinných olejov s obsahom mastných kyselín so stredným reťazcom na pôvodcov mastitíd

Súhrn

Moja bakalárska práca sa zaoberá zisťovaním antibakteriálnych účinkov rastlinných olejov, ktoré obsahujú mastné kyseliny o strednej dĺžke reťazca (MCFA). Konkrétne sme testovali palmový (*Elaeis guineensis*), kokosový (*Cocos nucifera*) a tucuma (*Astrocaryum vulgare*) olej. Snažili sme sa zistiť antibakteriálnu aktivitu týchto olejov voči dvom baktériám a to *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus uberis*. MIC sme stanovili pomocou mikrodilučného testu v 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke. Kvôli tomu aby sme aktivovali antibakteriálne účinky olejov museli sme použiť štiepenie lipázou z *Mucor javanicus* na kmeňe spôsobujúce bovinú mastitídu (nami vybrané bakteriálne kmeňe *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus uberis*). Naše testované oleje vykazovali antibakteriálnu aktivitu voči uvedeným kmeňom v rozsahu 128 – 8129 $\mu\text{l/mL}$. Výsledky tejto štúdie dokazujú, že palmové oleje bohaté na MCFA môžu slúžiť ako prevencia voči vzniku bovinnej mastitidy u kráv, ale sú potrebné ďalšie štúdie, ktoré zistia všetky možné aplikácie týchto olejov v praxi.

Kľúčové slová: baktérie, mastné kyseliny, antibakteriálne oleje, štiepenie, inhibícia

The effect of plant oils rich in medium-chain fatty acids on mastitis-related pathogens

Summary

My bachelor thesis deals with the detection of antibacterial effects of vegetable oils containing medium chain fatty acids (MCFA). Specifically, we tested palm (*Elaeis guineensis*), coconut (*Cocos nucifera*) and tucuma (*Astrocaryum vulgare*) oil.

We tried to detect the antibacterial activity of these oils against two bacteria, namely *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis*. The MIC was determined by a microdilution assay in a 96-well microtiter plate. In order to activate the antibacterial effects of the oils, we had to use the cleavage of *Mucor javanicus* lipase on the bovine mastitis strain (the bacterial *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* strains selected by us). Our test oils showed antibacterial activity against these strains in the range of 128 - 8129 $\mu\text{l} / \text{mL}$. The results of this study show that MCFA-rich palm oils can serve to prevent bovine mastitis in cows, but further studies are needed to find all possible applications of these oils in practice.

Keywords: bacteria, fatty acids, antibacterial oils, cleavage, inhibition

Vliv rostlinných olejů s obsahem mastných kyselin se středním řetězcem na původce mastitid

Souhrn

Předložená bakalářská práce se zabývá stanovením antibakteriálních účinků rostlinných olejů, které obsahují mastné kyseliny o střední délce řetězce (MCFA). Konkrétně jsme testovali palmový (*Elaeis guineensis*), kokosový (*Cocos nucifera*) a Tucuma (*Astrocaryum vulgare*) olej. Snažili jsme se zjistit antibakteriální aktivitu těchto olejů vůči dvěma bakteriím a to *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus uberis*. MIC jsme stanovili pomocí mikrodilučních testů v 96-jamkové mikrotitrační destičce. Kvůli tomu abychom aktivovali antibakteriální účinky olejů museli jsme použít štěpení lipázou z *Mucor javanicus* na kmeny způsobující bovinní mastitidu (námi vybrané bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus uberis*). Naše testované oleje vykazovaly antibakteriální aktivitu vůči uvedeným kmenům v rozsahu 128 - 8129 $\mu\text{l}/\text{mL}$. Výsledky této studie dokazují, že palmové oleje bohaté na MCFA mohou sloužit jako prevence proti vzniku bovinní mastitidy u krav, ale jsou nutné další studie, které zjistí všechny možné aplikace těchto olejů v praxi.

Klíčová slova: bakterie, mastné kyseliny, antibakteriální oleje, štěpení, inhibice

Obsah

Úvod	9
Cieľ práce	11
Literárne rešerše	12
1.1 Bovinna mastitída.....	12
1.1.1 Pôvodcovia bovinnej mastitídy.....	12
1.1.2 Rezistencia baktérií na antibiotika.....	12
1.1.3 Alternatívne zdroje liečby.....	13
1.2 Charakteristika a vlastnosti mastných kyselín.....	13
1.2.1 Mastné kyseliny charakteristika.....	13
1.2.2 Štruktúra mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom	14
1.2.3 Antibakteriálne účinky mastných kyselín.....	15
1.3 Rastlinné oleje s obsahom mastných kyselín o strednej dĺžke reťazca.....	16
1.3.1 Kokosový olej	16
1.3.2 Palmový olej	17
1.3.3 Tucuma olej	18
1.4 Charakteristika gramnegatívnych baktérií	19
1.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
1.4.2 <i>Streptococcus uberis</i>	19
Metodika	20
1.5 Praktická časť	20
1.6 Spôsob zistenia antibakteriálneho potenciálu použitých olejov.....	20
1.6.1 Zloženie média v ktorom sa kultivovali baktérie (TSB).....	22
1.6.2 Uchovanie bakteriálnych kmeňov	23
Výsledky.....	24
1.7 MIC vybraných rastlinných olejov.....	24
Diskusia.....	25
Záver	27
Literatúra.....	28
Zoznam použitých skratiek a symbolov.....	37

Úvod

Bovinná mastitída ovplivňuje mliekarenský priemysel na celom svete (Erskine *et al.* 2004). Je nutné ako prevenciu používať antimikrobiálne látky, ktorých ročná spotreba sa odhaduje na 45 mg na 1 kg zvierat'a (Van Boeckel 2015). Ak sa už bovinná mastitída preukáže klasicky sa začne liečba antibiotikami, ale táto liečba má mnohé vedľajšie účinky ako napríklad nízka miera vyliečenia z dôsledku rezistencie baktérií a prítomnosť reziduí antibiotík v mlieku samozrejme sú stanovené prísne ochranné lehoty na to aby bolo mlieko bez reziduí. (Gomes a Henriques 2016). Intramamárna liečba antibiotikami je bežnou praxou pri liečbe alebo prevencii mastitídy, medzi používané liečivá patria betalaktámy, makrolidy a linkozamidy (Barkema *et al.* 2006). Antimikrobionálna rezistencia na antibiotiká sa objavuje v izolátoch z infikovaných kráv, iných zvierat rovnakého stáda a dokonca aj v potravinových produktoch, ktoré pochádzajú z infikovaných ale aj vyliečených zvierat (Silva *et al.* 2018). Medzi modernejšie spôsoby prevencie proti mastitíde patria nesteroidné protizápalové lieky (Breen 2017) a intramamárne liečivá na struky dojníc (Krömker *et al.* 2014). Avšak antibiotická rezistencia je stále vysoká a naďalej je potrebné hľadať alternatívne spôsoby liečby. Mastné kyseliny sa javia ako sľubná alternatíva voči antibiotikám vďaka ich antimikrobionálnej aktivite (Polycarpo *et al.* 2017). A okrem spomínaného sa nerozvetvené nasýtené mastné kyseliny so stredne dlhým reťazcom uhlíkov menovite kaproická (C6: 0), kaprylová (C8: 0), kaprínová (C10: 0) a kyselina laurová (C12: 0) sa prirodzene vyskytujú, ale len v minimálnych koncentráciach aj v kravskom mlieku (Legrand 2008). Menované mastné kyseliny vykazujú antimikrobionálne vlastnosti proti širokému spektru patogénov vrátane grampozitívnych baktérií (Hovorkova *et al.* 2018). Významným zdrojom mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom (MCFA) sú oleje, ktoré pochádzajú z paliem z tropických a subtropických oblastí, narozdiel od kravského mlieka, kde sú obsiahnuté len v malých koncentráciach, v olejoch sú (MCFA) zastúpené podstatne viac (Van der Vossen *et al.* 2001). Vo výskume (Hovorkova *et al.* 2018) zistili, že antibakteriálny účinok palmových olejov bohatých na MCFA ako je napríklad kokosový olej (*Cocos nucifera*), palmojadrový olej (*Elaeis guineensis*) a tucuma olej (*Astrocaryum vulgare*) sa vyvíjajú až po naštiepení, teda po ich uvoľnení z triglyceridov a najčastejším detegovaným MCFA je kyselina laurová, ako bolo zistené plynovou chromatografiou (Hovorkova *et al.* 2018). Antibakteriálne vlastnosti voľných MCFA a ich monoestery proti rôznym patogénom (Bunkova *et al.* 2011) vrátane stafylokokov (Batovska *et al.* 2009) a streptokokov (Schlievert a Peterson 2012) sú veľmi dobre známe. Doposiaľ nie sú žiadne štúdie o inhibičnej aktivite voči bovinnej mastitíde, kde

by aplikovali palmové oleje bohaté na MCFA. Tento výskum sa zameril na možnú aplikáciu palmových olejov bohatých na MCFA s cieľom znížiť bakteriálnu kolonizáciu, vyskytujúcu sa u dojníc mliečného aj masného typu kráv, ktorá postihuje vemená najmä pred, počas a po dojení.

Cieľ práce

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo stanoviť minimálnu inhibičnú koncentráciu olejov s obsahom mastných kyselín o strednej dĺžke reťazca pre vybrané baktérie. Túto aktivitu sme sa snažili stanoviť s alebo bez predchádzajúceho štiepenia triacylglycerolov pomocou *in vitro* inkubácie daného oleja s pankreatickou lipázou.

Literárne rešerše

1.1 Bovinna mastitida

Bovinná mastitida je zápal mliečnych žliaz u dojníc spôsobený inváziou a rozpadom tkanív produkujúcich mlieko patogénnymi mikroorganizmami (Schroeder 2012). Toto zápalové ochorenie spôsobuje finančné straty mliekarenskému odvetviu kvôli zníženiu produkcie mlieka, rovnako tak zníženej kvalite mlieka, zvýšené riziko utrácania zvierat a vysoké náklady na liečbu zvierat (Russell 2003). Ročné ekonomické straty spôsobené bovinou mastitídou sa na celom svete odhadujú na 1,1 miliardy dolárov (Mir *et al.* 2014). Mastitída sa pokladá za najčastejšiu príčinu úhynu dospelých dojníc (Esselmont a Kossaibati 1997).

1.1.1 Pôvodcovia bovinnej mastitídy

Je dokázané, že približne 137 druhov mikroorganizmov vrátane baktérií, kvasiniek a rias spôsobuje mastitídu (Watts a Bradley 2002). Najvýznamnejšie baktérie, ktoré sú zodpovedné za vznik mastitíd zahŕňajú grampozitívne aj gramnegatívne baktérie, ako sú stafylokoky, streptokoky, *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae* (Contreras a Rodríguez 2011). Koagulázovo negatívne stafylokoky (CNS) sú oportunistické patogény, ktoré sa tiež ukázali ako patogény pre mastitídu (Taponem *et al.* 2016). Patogény mastitídy môžu byť klasifikované ako nákazlivé alebo enviromentálne (Blowey a Edmondson 1995). Patogény sú schopné vytvoriť subklinické infekcie, ktoré sa zvyčajne prejavujú zvýšeným počtom somatických buniek (leukocyty a epiteliálne bunky) zvyčajne sa šíria z kravy na kravu a najčastejšie v čase alebo okolo dojenia (Radostits *et al.* 1994). A okrem iného sa ukázalo, že klinická aj subklinická mastitída môže nepriaznivo ovplyvniť aj plodnosť kráv (Schrick *et al.* 2001).

1.1.2 Rezistencia baktérií na antibiotiká

Bovinnú mastitídu sa snažia liečiť hlavne antibiotikami, avšak sú veľké problémy s rezistenciou baktérií voči antibiotikám. Prevalencia patogénov mastitídy a ich antimikrobiálnemu účinku boli preskúvané v mnohých štúdiách po celom svete. Napríklad štúdia z Etiópie a Estónska dokázali vysokú prevalenciu kmeňov *S. aureus* a CNS rezistentných na penicilín (Beyene *et al.* 2017; Kalmus *et al.* 2011). Rovnako aj v Západnom Bengálsku v Indii zistili, že gramnegatívne baktérie sú rezistentné voči antibiotikám ako sú

β -laktámy a tertacyklíny (Das *et al.* 2017). V strednom Mexiku zistili antimikrobiálnym výšetrením, že izolované patogény mastitídy boli rezistentné na penicilín, klindamycín a cefotaxim (León-Galván 2015). Antimikrobiálne štúdie z Kanady tiež ukázali, že subklinické izoláty dvoch hlavných patogénov mastitídy, *Streptococcus uberis* a *Streptococcus dysgalactiae* nesú v sebe gény, ktoré majú antimikrobiálnu rezistenciu (Vélez *et al.* 2017). Rezistencia na antibiotiká môže mať aj dopad na ľudské zdravie, kvôli riziku vzniku spomínaných baktérií odolných voči antibiotikám a tieto sa môžu dostať do potravinového reťazca (White a McDermott 2001).

1.1.3 Alternatívne zdroje liečby

V mnohých prípadoch alternatívu je potrebné hľadať v prírodných produktoch ako sú napr. rastliny, ktoré rastú v extrémnych podmienkach (púšte, dažďové pralesy, horúce pramene...) (Gohel *et al.* 2006). Prírodné produkty majú aj dnes významné miesto v medicíne a slúžia ako primárny zdroj v procesoch pri objavovaní liekov (Newman a Cragg 2012; Harvey 2008). Ukázalo sa, že prírodné produkty sú zdrojom antibakteriálneho účinku. Približne 66 % schválených liekov s obsahom antibakteriálnych látok sú prírodné produkty alebo deriváty prírodných produktov (Brown *et al.* 2014).

1.2 Charakteristika a vlastnosti mastných kyselín

1.2.1 Mastné kyseliny charakteristika

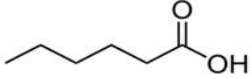
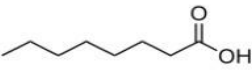
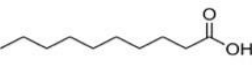

Mastné kyseliny (FA) sú všadeprítomné molekuly, ktoré sú viazané na iné zlúčeniny, ako sú glycerol, cukry alebo hlavné skupiny fosfátov, čím vytvárajú lipidy. Lipidy sú súčasťou bunkových štruktúr, napr. membrány, ktoré sú tvorené fosfolipidmi a zásoby energie, ktoré sú zložené najmä z triglyceridov (Desbois a Smith 2010). K vstrebávaniu lipidov dochádza v tenkom čreve pankreatickou a črevnou lipázou. Lipidy teda tuky sú štiepené na monoacylglyceroly a neesterifikované mastné kyseliny. V dutine čriev sa vytvoria z tuku útvary, ktoré sa nazývajú micely zložené z žlčových kyselín, 2-monoacylglycerolov, fosfolipidov, cholesterolu a mastných kyselín. Micely sú tvorené hydrofóbnym centrom a hydrofilnou perifériou. Tieto micely sa dostávajú medzi riasinkové lemy čreva a lipidické látky sa z nich uvoľňujú. Látky rozpustné v tukoch sa ľahko dostávajú cez membránu črevných buniek. Mastné kyseliny s dlhším reťazcom sú viazané na špecifický proteín a transportované do enterocytov (Reece 1998). Mastné kyseliny sa uvoľňujú z lipidov,

pomocou enzýmu, aby sa stali voľnými mastnými kyselinami (FFA)-ktoré majú rôznorodú a účinnú biologickú aktivitu (Desbois a Smith 2010).

1.2.2 Štruktúra mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom

Mastné kyseliny (MK) sú zložené z reťazca z 4 až 28 uhlíkov, sú monokarboxylové, väčšinou nerozvetvené a v párnom počte (McNaught 1997). Podľa dĺžky reťazca rozdelíme mastné kyseliny na MK s krátkou dĺžkou reťazca do 6 uhlíkov, MK so strednou dĺžkou reťazca s počtom 6 až 12 uhlíkov, MK s dlhým reťazcom s počtom uhlíkov od 13 do 21 a MK s veľmi dlhým reťazcom, kde sa nachádza viac ako 22 uhlíkov (Olson *et al.* 2014). V našej práci sa zamierame na MK so stredne dlhým reťazcom. Mastné kyseliny so stredne dlhým reťazcom sú radené medzi nasýtené mastné kyseliny. Medzi tieto kyseliny patria (viď tabuľka č. 1) kyselina kapronová (C6:0), kyselina kaprylová (C8:0), kyselina kaprinová (C10:0) a často radená aj kyselina laurová (C12:0) (Marten *et al.* 2006).

Tabuľka č. 1: mastné kyseliny o strednej dĺžke reťazca (MCFA)

systematický názov (MCFA)	triviálny názov (MCFA)	sumárny vzorec	štruktúrny vzorec
kyselina hexánová	kyselina kapronová	C₆H₁₂O₂	
kyselina oktánová	kyselina kaprylová	C₈H₁₆O₂	
kyselina dekanová	kyselina kaprinová	C₁₀H₂₀O₂	
kyselina dodekánová	kyselina laurová	C₁₂H₂₄O₂	

1.2.3 Antibakteriálne účinky mastných kyselín

Antibakteriálne účinky FFA majú široké spektrum účinnosti porovnateľné s prirodzenými antimikrobiálnymi peptidmi (AMP) *in vitro* (Georgel *et al.* 2005). Okrem bakteriostatických a bakteriocídnych účinkov FFA tiež vytvárajú nepriaznivé podmienky pre rast určitých baktérií na povrchu kože udržiavaním kyslého pH (Fluhr *et al.* 2001; Takigawa *et al.* 2005). FFA môžu ďalej ovplyvniť bakteriálnu virulenciu, ktorá je nevyhnutná pri vzniku infekcie, pravdepodobne narušením signalizácie od bunky k bunke. Takto nasýtené alebo nenasýtené FFA môžu zabrániť počiatkovej adhézií baktérií a následnej tvorbe biofilmu (Kurihara *et al.* 1999; Osawa *et al.* 2001; Kankaanpää *et al.* 2004; Won *et al.* 2007; Stenz *et al.* 2008; Davies a Marques 2009). Medzi procesy, ktoré môžu vyvolať inhibíciu alebo smrť baktérií je lýza buniek, inhibícia enzýmovej aktivity, zhoršenie príjmu živín s tvorbou toxickej peroxidácie a autooxidácie. FFA môžu zabiť baktériu úplne (baktericídny účinok) alebo inhibovať jej rast (bakteriostatický účinok) čo je reverzibilné a znamená to, že baktéria zostáva životaschopná, ale nemôže sa ďalej deliť, ak sú prítomné FFA (Kodicek a Worden 1945). Najefektívnejšie nasýtené, mononenasýtené a polynenasýtené mastné kyseliny sú tie, ktoré majú dĺžku reťazca C12, C16:1 a C18:2 (Kabara 1980). Vo všeobecnosti sa inhibičné vlastnosti mastných kyselín vyskytujú výraznejšie u dlhších a nenasýtených formách (Nieman 1954).

1.3 Rastlinné oleje s obsahom mastných kyselín o strednej dĺžke reťazca

1.3.1 Kokosový olej

Kokosový olej sa získava z kokosového orecha (*Cocos nucifera*) (Manisha DebMandal a Shyamapada Mandal 2011). Je to tropický olej a presnejšie sa extrahuje z kopy (sušených vnútorných častí orecha). Tento olej pochádza z palmy z rodu arekotvárnej (*Areaceae*) (Eyres *et al.* 2016). Olej sa využíva k tepelnej úprave hlavne v krajinách Indie a Asie (Srivastava *et al.* 2010). Výroba kokosového oleja každým rokom stúpa. Hlavným producentom sú Filipíny potom Indonésia a nakoniec India (Eyres *et al.* 2016). Kokosový olej obsahuje prevažne TAG a MCFA s celkovým zastúpením 86,5% tvorí SFA, 5,8 % MUFA a 1,8% PUFA (Eyres *et al.* 2016). Najvyššie zastúpená mastná kyselina v kokosovom oleji je kyselina laurová (C12:0) tvorí až 50% obsahu MK, je dokázané, že deriváty (napríklad MG) priaznivo pôsobia na elimináciu rôznych baktérií ako sú napríklad *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* (Daftary *et al.* 2008). Kokosový olej má veľkú výhodu a tou je jeho odolnosť voči oxidácií a polymerácií vďaka čomu je stabilný pre tepelnú prípravu (Eyres *et al.* 2016).



Obrázok č. 1: Palma kokosová (*cocos nucifera*) a jej plod- kokosový orech

Zdroj: <https://en.wikipedia.org/wiki/Coconut>

1.3.2 Palmový olej

Olej z palmových jadier (PKO) sa získava spracovaním jadra z palmy rodu *Elaeis guineensis*. Palmový olej je kvapalina, ktorá nie je rozpustná vo vode, ale je rozpustná v tukoch. Čistý palmový olej má oranžovo-červenú farbu, ktorá závisí od množstva karotenoidov (Obahiagbon 2012). Ovocie tejto palmy je kôstkovica s tučným, mäsitým mezokarpom obklopujúci tvrdý endokarp, ktorý obsahuje veľké semeno tvorené endospermom a malým embryom (Dussert *et al.* 2013). Hlavnou zložkou tohoto oleja sú triglyceridy, tvoria až 90% oleja. Mastné kyseliny tvoria až 95% triglyceridov. Najviac zastúpenými mastnými kyselinami sú kyselina palmitová (32-47%), kyselina olejová (40-52%), kyselina linoleová (5-7%) a kyselina myristová (1-6%). Ďalej palmový olej obsahuje vitamíny a ďalšie látky avšak presné zloženie závisí od toho na akej pôde sa palma pestuje a rovnako aj na spôsobe spracovania (Obahiagbon 2012).



Obrázok č. 2: Palma olejná (*Elaeis guineensis*) a jej plod

Zdroj: https://cs.wikipedia.org/wiki/Palma_olejn%C3%A1

1.3.3 Tucuma olej

Palmy z ktorých tucuma olej pochádza nájdeme v tropických oblastiach Južnej a Strednej Ameriky, kde sú plody obľúbenou pochúťkou (Shanley 2011). Tucuma olej pochádza z plodov a to z palmy *Astrocaryum vulgare* a *Astrocaryum aculeatum* (čel'ad' *Arecaceae*) (Pesce 1985). Ovocie z ktorého sa olej vyrába je veľmi obľúbené a konzumované amazonskou populáciou a pripravujú z tohto ovocia v prírodnej forme sendviče, dezerty a zmrzlinu. Indovia dokonca extrahovaný olej z dužiny plodu alebo z drene ovocia alebo semien používajú na telo a vlasy (Maia *et al.* 2014). Tucuma má hladkú kôru je oválneho alebo guľovitého tvaru, jeho sfarbenie môže byť žlté až tmavo oranžové a červené alebo belavé. Konzistencia plodu je slizovitá a masná, s charakteristickou sladkou chuťou (Maia *et al.* 2014). Najviac zastúpená kyselina obsiahnutá v oleji z tucama plodu je kyselina laurová (Mambrim a Barrera-Arellano 1997). Čo sa týka nutričného zloženia, tucuma olej vyniká vysokým obsahom vlákniny (Ferreira *et al.* 2008).



Obrázok č. 3: Palma Tucuma (*Astrocaryum aculeatum*) a jej plod

Zdroj: <https://www.freepng.es/png-j6f6c3/>

1.4 Charakteristika gramnegatívnych baktérií

1.4.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je známy svojou schopnosťou stať sa rezistentný voči antibiotikám (Chambers a DeLeo 2009). Primárny spôsob prenosu baktérie je prostredníctvom priameho kontaktu s pokožkou nakazeného jedinca alebo s kontaminovaným predmetom či povrchom (Lowy 1998). Je fakultatívne anaeróbný. Tvorí nemotilné kokové škvrny, ktoré sú pozitívne na gramovo sfarbenie, tvoria páry a klastre. Jeho rast podporuje médium obsahujúce 10% NaCl, už menej pri 15% NaCl (Bergey 2009). Jeho priemer je od 0,5-1,0 mm. Môžu tvoriť kolónie o veľkosti až 5mm. Kolónie sú hladké, lesklé a priesvitné. Môžu produkovať kapsuly. Enkapsulové kmene zvyčajne produkujú menšie a konvexnejšie kolónie. Ukázalo sa, že tieto enkapsulárne kmene obsahujú kyselinu N-acetyl-d-amino-galakturónovú, N-acetyl-d-fukozamín a taurín. Ich membrány obsahujú glykolipidy, mono- a diglukosyldiglycerid a fosfolipidy, lyzylfosfatidylglycerol a kardiolipín. Niektoré kmene produkujú epidermolytický toxín a enterotoxíny. Môžu spôsobiť napríklad toxický šok a infekcie (Bergey 2009). *Staphylococcus aureus* je zrejme najnebezpečnejší z baktérií, čo sa týka baktérií, ktoré vyvolávajú mastitídu. Vyvolaná mastitída touto baktériou bola lokalizovaná v najhlbších častiach tkaniva mliečnej žľazy. Samozrejme sa takáto infekcia len veľmi ťažko lieči (Kováč *et al.* 2001).

1.4.2 *Streptococcus uberis*

Bunky tejto baktérie tvoria kokoidné útvary, vyskytujú sa ako páry v dlhých reťazoch. K rastu dochádza v 4% roztoku NaCl. Avšak 6,5% roztoku NaCl rast nepodporuje a rovnako ani pH 9,6. Rast baktérie je medzi teplotou 10°C až 45°C. Baktéria neprežije zahrievanie na 65°C po dobu viac ako 30 minút (Bergey 2009). *Streptococcus uberis* sa považuje za enviromentálny patogén (Radostis *et al.* 1994).

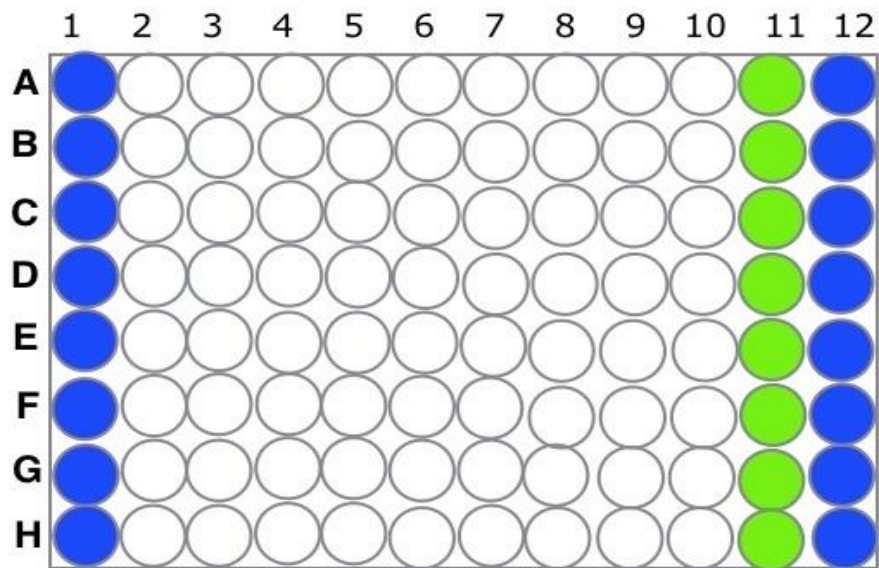
Metodika

1.5 Praktická časť

Pri výskume bol použitý kokosový olej (*C. nucifera*), palmojadrový olej (*E. guineensis*), ktoré boli zakúpené od spoločnosti (Sigma- Aldrich Praha,CZ) a olej z tucumy (*A. vulgare*), ktorý bol získaný z Natural Sweet Botanicals (Panama City, Fl. USA). Oleje sme rozpustili v dimetysulfoxide (DMSO) a emulgovali Tween 80 (Sigma-Aldrich, Praha CZ), aby bola zabezpečená dostatočná disperzia do emulzie s konečnou koncentráciou 819200 µg/ml. Konečná koncentrácia rozpúšťadiel v kg testovanej vzorky neprekročili 1%, preto nemohli ovplyvniť životaschopnosť baktérií. Aby sme dosiahli požadovaný objem, nakoľko emulzia má 100x vyššiu koncentráciu, tak sme ju zriedili v tryptickom sójovom bujóne (TSB, Oxoid, Brno, CZ) alebo s TSB obohatenú o kvasnicový extrakt (Oxoid, Brno, CZ), aby sa dosiahla konečná koncentrácia 8192 µg/ml. Táto emulzia bola ďalej doplnená lipázou z *Mucor javanicus* (Sigma-Aldrich, Praha, CZ) vo výške 2,73 mg/mL kultivačného média. Táto emulzia, ktorá vznikla z testovaného oleja, vhodného kultivačného média, ktoré bolo vybrané podľa testovaného kmeňa a z lipázy z *M. javanicus* sa pretrepávala vo vodnom kúpeli, zahrieva sa na 37°C celú hodinu, aby sme dosiahli uvoľnenie MCFA z triacylglycerolov a uľahčil sa ich antibakteriálny účinok. Penicilín G (Sigma-Aldrich, Praha, CZ) bol použitý ako kontrola kvôli čistote a rastu baktérií.

1.6 Spôsob zistenia antibakteriálneho potenciálu použitých olejov

Prvý a posledný stĺpec jamiek na mikrotitračnej doštičke bol naplnený len TSB (ako kontrola čistoty) a jeden celý stĺpec jamiek bol naplnený s baktériou v TSB bez oleja (ako kontrola rastu baktérie). Ostatné jamky boli naplnené s baktériou v TSB a s prisluchajúcim olejom (viď obrázok č. 4), aby sme mohli vyhodnotiť antibakteriálny potenciál vyššie uvedených palmových olejov bohatých na MCFA, ktoré majú pôsobiť na baktérie mastitíd hovädzieho dobytká, 5 kmeňov baktérií (viď tabuľka č. 2), ktoré boli preukázané, že spôsobujú zápal mastitíd.

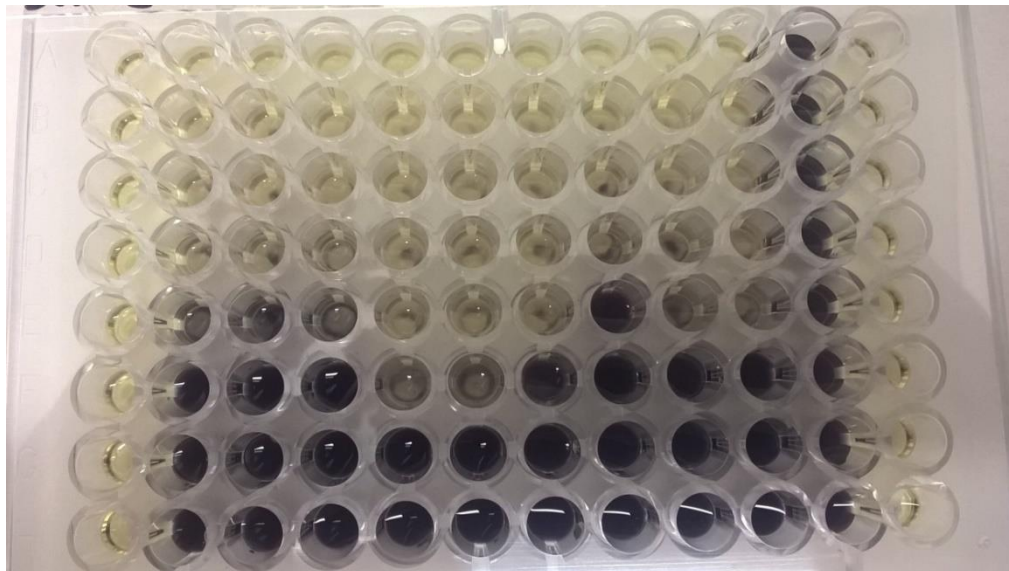


Obrázok č. 4: Dizajn mikrotitračnej doštičky použitej v experimente

Modrá: kontrola čistoty- jamky sú naplnené len TSB

Zelená: kontrola rastu baktérie- jamky sú naplnené baktériou v TSB bez oleja

Biela: jamky sú naplnené TSB s olejom a naočkované baktériou



Obrázok č. 5: Mikrotitračná doštička po experimente

Tabuľka č. 2: Bakteriálne kmene a ich špecifikácia

Baktérie	Kmeň	Špecifikácia	Iné označenie
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach 1884 ^{AL}	CCM 4442	Izolát bovinnej mastitídy (CZ); produkcia β-hemolyzínu; atypický kmeň: dochádza k fosfatáze	P. Benda M 27/92
	CCM 6188	Izolát z mliečnej žľazy postihnutej bovinnou mastitídou; strata produkcie hemolyzínov	B. Skalka K 126
	DSM 6732	Izolát hovädzieho vemena; mureínu: A11.3; žiadne gény toxínov (PCR)	ATCC 25178
<i>Streptococcus uberis</i> Diernhofer 1932 ^{AL}	CCM 4617	Izolát bovinnej mastitídy (CZ); kontrolný kmeň pre STREPTOtest a HIPPURATEtest	P. Benda 1268
	DSM 20569	Typ kmeňa	ATCC 19436 CCUG 17930 JCM 5709 NCDO 2038 NCTC 3858

1.6.1 Zloženie média v ktorom sa kultivovali baktérie (TSB)

TSB- tryptose soya broth (tryptose sojový bujón) je médium zakúpené z firmy Oxoid (Brno, Cz). Toto médium podporuje rast širokej škály baktérií, kvasiniek a plesní pri inkubácií a za vhodných podmienok (dodržaná správna teplota atď). Jeho konečné pH dosahuje hodnoty 7,3 ±0,2 pri 25°C.

Tabuľka č. 3: zloženie TSB

zloženie TSB	gm/litre
pancreatic digest of casein (pankreatické štiepenie kazeínu)	17,0
papaic digest of soybean meal (papainové štiepenie sójového šrotu)	3,0
sodium chloride (chlorid sodný)	5,0
di-potassium hydrogen phosphate (dihydrogenfosforečnan draselný)	2,5
glucose (glukóza)	2,5

1.6.2 Uchovanie bakteriálnych kmeňov

Kmene použité v priebehu experimentu sú uvedené v tabuľke č. 2. Tieto kmene boli zakúpené z Českej kolekcie mikroorganizmov (CCM; Czech Collection of Microorganisms) a z Nemeckej zierky mikroorganizmov a bunčných kultúr (DSMZ; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Alikvoty bakteriálnych kultúr boli do doby testovania skladované v TSB alebo v TSB s kvasnicovým extraktom a 20% glycerole pri 80°C. Pracovné kultúry mikroorganizmov sa následne kultivovali v príslušnom živnom médiu pri teplote 37°C počas 24 hodín pred testovaním.

4.2 Stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie

Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) sa stanovila s použitím pokynov Clinical and Laboratory Standards Institute (2013), aby sa vyhodnotil antibakteriálny účinok kokosového oleja, palmojadrového oleja a oleja z tukumy proti grampozitívnej bovinnej mastitíde, ktorú spôsobujú bakteriálne kmene. Na testovanie antimikrobiálnej citlivosti palmových olejov bohatých na MCFA sa použila mikrodilučná metóda *in vitro* na mikrotitračných platniach s 96 jamkami. Počiatočná koncentrácia na testovanie citlivosti palmových olejov bola uvedená vyššie ako 8129 µg/mL. Doštičky boli naočkované bakteriálnou suspenziou s konečnou hustotou $5 \cdot 10^5$ CFU/ml, ktorá bola kontrolovaná pomocou MCFarland Densitometer Biosan DEN-1 (BioTech, Praha, CZ) a celá doštička bola inkubovaná pri 37°C počas 24 hodín. Bakteriálny rast pred a po inkubácií bol vyhodnotený pomocou čítačky mikrotitračných doštičiek Tecan Infinite® 200 PRO (Tecan Group Ltd., Männedorf, Švajčiarsko) pri vlnovej dĺžke 405 nm. Hodnoty MIC boli vyjadrené ako najnižšie koncentrácie palmových olejov, ktoré viedli k 80% zníženiu rastu v porovnaní s kontrolou rastu bez obsahu oleja. Navyše citlivosť testovaných kmeňov na penicilín G sa uskutočňovala aj stanovením MIC ako v prípade palmových olejov. Všetky kombinácie olejov alebo penicilína boli testované v troch individuálnych experimentoch, každý z nich sme urobili trojmo. Konečná MIC bola určená ako mód všetkých hodnôt. V súlade s hodnotami zákalu meranými v jamkách mikrotitračných doštičiek pred a po inkubácií zásobného roztoku troch testovaných olejov a piatich bakteriálnych kmeňov boli vypočítané hodnoty MIC pre vybrané oleje a baktérie. Meraním MIC bola tiež stanovená citlivosť všetkých baktérií na penicilín G. Žiadna antimikrobiálna aktivita palmových olejov nebola pozorovaná bez predchádzajúceho štiepenia lipázou, preto výsledky uvedené nižšie platia len pre oleje po štiepení lipázou z *Mucor javanicus*.

Výsledky

Podľa experimentu, ktorý je vyššie popísaný sme získali údaje o zložení a koncentrácií MCFA našich vybraných olejov a rovnako MIC jednotlivých olejov na nami vybrané kmene baktérií, pomocou mikrodilučnej metódy v tekutom médiu.

1.7 MIC vybraných rastlinných olejov

Tabuľka č. 4: Minimálna inhibičná koncentrácia vybraných rastlinných olejov ($\mu\text{g/mL}$)¹

kmeň		modus MIC [$\mu\text{g/mL}$]				priemerná MIC z olejov	priemerná MIC z penicillin G
		Kokosový olej	Palmový olej	Tucuma olej	penicillin G		
<i>S. aureus</i>	CCM 4442	2048	2048	2048	0.001953	4324	0.00138
	CCM 6188	8192	4096	4096	0.001953		
	DSM 6732	8192	4096	4096	0.000244		
<i>Str. uberis</i>	CCM 4617	2048	1024	2048	0.000488	1045	0.00061
	DSM 20569	512	128	512	0.000977		
Celkový priemer MIC		4173	2278	2560	0.0001123		

Z uvedenej tabuľky č. 4 merania MIC vyplíva: *S. aureus* sme namerali hodnotu MIC od 2048-4096 $\mu\text{g/mL}$, u *Str. uberis* bol citlivejší a hodnoty ktoré nám vyšli sú od 128-2048 $\mu\text{g/mL}$.

Diskusia

Mastné kyseliny o strednej dĺžke reťazca, niekoľkokrát spomínané v tejto práci (kyselina kaprylová, kyselina kaprinová a laurová kyselina) majú uznaný tzv. GRAS status ako viacúčelové potravinárske aditívum v ľudskej potrave, uznal ich americký úrad na kontrolu potravín a liečiv (FDA 2015).

Zvyšovanie rezistencie u mnohých baktérií dospelo do zákazu používania látok, ktoré podporovali používanie antibiotík v chove hospodárskych zvierat medzi štátmi EÚ (nariadenie Európskeho parlamentu a rady Es č. 1831/2003 z 22. septembra 2003 o doplnkových látkach určených na používanie vo výžive zvierat). Je zrejmé, že šírenie génov rezistencie na antibiotiká je aj medzi bakteriálnymi kmeňmi, ktoré spôsobujú mastitídy u hovädzieho dobytku, preto je potrebné hľadať skôr prírodné antimikrobionálne zlúčeniny, ktoré pôsobia priamo na pôvodcov spôsobujúcich mastitídy.

Kyselina laurová je jednou z najčastejšie označovanou kyselinou MCFA, ktorá vykazuje veľmi silné antibakteriálne účinky (Galbraith *et al.* 1971; Sun *et al.* 2003). Naše testované oleje kokosový, palmojadrový a tucuma olej obsahujú viac ako 50% kyseliny larovej, takže vďaka tomu dokážu tieto oleje inhibovať baktérie *Staphylococcus aureus*. MIC spomínaných rastlinných olejov voči tejto baktérii sa pohybuje v rozmedzí 2048-4096 µg/mL výsledok, ktorý nám vyšiel v meraní.

Palmové oleje, ktoré sú rastlinného pôvodu obsahujúce lipidy so stredne dlhým reťazcom, možno nájsť aj v prírodných produktoch ako je napríklad mlieko, tieto lipidy sú netoxické a šetrné k sliznici aj keď dokážu inhibovať širokú škálu ľudských a živočíšnych patogénov (Churchward *et al.* 2018). Dokonca všetky MCFA sú uznané ako bezpečné na používanie vo výžive ľudí (FDA 2019). A je dobre známe, že MCFA vykazujú antibakteriálne vlastnosti voči rôznym patogénom, ale podľa našich zistení neexistuje žiadna štúdia o antibakteriálnych vlastnostiach palmových olejov bohatých na MCFA proti bovinnej mastitíde, ktorú spôsobujú najmä stafylokoky a streptokoky. Batovska (2009) sa zaoberá antibakteriálnou aktivitou voči *S. aureus* 209, *S. aureus* 146 MR a *S. aureus* ATCC 33862 USA pomocou agarovej jamkovej difúznej metódy a zistili, že kyselina kaprinová inhibuje všetky tri bakteriálne kmene pri koncentráciách 250-500 µg/ml a že kyselina laurová inhibuje *S. aureus* 209 pri koncentráciách 125 µg/ml. Tieto koncentrácie inhibujúce stafylokokový rast sú asi 10x nižšie ako v prípade

testovaných palmových olejov v tejto štúdií (2048-8129 ug / ml). Okrem iného (Schlievert a Peterson 2012) hodnotia inhibičnú aktivitu kyseliny larovej vo forme glycerolmonolaurátu proti 54 rôznym kmeňom *S. aureus* a stanovujú ich MIC pri 300 ug/ml. Nakoľko palmové oleje sú rôznou kombináciou mastných kyselín, nielen MCFA, ale tiež napríklad tokoferolov, polyfenolov, fytosterolov a fenolových kyselín (Srivastava *et al.* 2016), môžeme predpokladať, že tieto zlúčeniny interagujú v dôsledku svojich mechanizmov pôsobenia a tým znižujú antibakteriálnu aktivitu samotných olejov. Predpoklad vysokého stupňa rezistencie bakteriálneho kmeňa *S. aureus* je spôsobený jeho kapsulou tvorenou exopolysacharidmi a produkciou slizu, ktorá sa preukázala aj pri kmeňoch, ktoré spôsobujú mastitídy (Baselga *et al.* 1994).

Nakoľko je dokázané, že mastitída je z veľkej miery zapríčinená nedostatočnou hygienou (Schreiner a Ruegg 2003), zaužívalo sa do praxe ako prevencia, používanie rôznych dezinfekčných postupov pred a po dojení. Najčastejšie dezinfekčné postupy hlavne po dojení sú dezinfekcie v podobe jódu (jódofory) a chlórhexidín, avšak na oba druhy dezinfekcie existujú baktérie, ktoré sú rezistentné (Behiry *et al.* 2012).

Antibakteriálne vlastnosti rastlinných olejov bohatých na MCFA proti patogénom spôsobujúcim mastitídy sú veľmi potrebné. Medzi ďalšie výhody rastlinných olejov bohatých na MCFA je aj ich pozitívny vplyv na pokožku (Oyedeji a Okeke 2010). Pre tieto výhody olejov, ktoré obsahujú MCFA by mohli byť užitočné v prevencii a mohli by ich začať používať v praxi a to aplikáciou na struky kravám pred a po dojení.

Záver

Nakoľko hrozí potencionálne riziko prenosu živočíšnych patogénnych kmeňov do mlieka a mliečnych výrobkov, je stále väčšia potreba zisťovať ako sa voči tomu brániť. A jedna z alternatívnych metód je demonštrovaná v tejto bakalárskej práci. Pozorovali sme, že sledované oleje menovite kokosový olej, palmojadrový olej a tucuma olej, ktoré sú bohaté na MCFA, majú antibakteriálny účinok po štiepení lipázy z *Mucor javanicus* proti piatim patogénom spôsobujúcim bovinnú mastitídu *in vitro*. Jednou z možností aplikácie olejov by mohla byť aplikácia priamo na struky hovädziemu dobytku. Oleje bohaté na MCFA ponúkajú alternatívnu prevenciu proti bovinnej mastitíde. Ich ďalšou výhodou je, že nedráždia pokožku a sliznice ako rôzne preparáty na dezinfekciu používané niekoľkokrát denne pred, počas a po dojení kráv.

Literatúra

- Barkema H.W., Schukken Y.H., Zadoks R.N. 2006. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, **89**, 1887-1895.
- Baselga R., Albizu I., Amorena B. 1994. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Veterinary Microbiology*, **39**, 195-204.
- Batovska D.I., Todorova T., Tsvetkova V., Naidenski H.M. 2009. Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: individual effects and synergistics relationships. *Polish Journal of Microbiology*, **58**, 43-47.
- Behiry A.E., Schlenker G., Szabo I., Roesler U. 2012. *In vitro* susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with subclinical mastitis to different antimicrobial agents. *Journal of Veterinary Science*, **13**, 153-161.
- Bergey D.H. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology III*, Second Edition. Springer. New York, USA. p. **1422**. 403-709.
- Beyene T. *et al.* 2017. Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus* in dairy farms, abattoir and humans in Addis Ababa, Ethiopia, *BMC Res. Notes* **10**, 1-9.
- Blowey R. W. a Edmondson P. W. 1995. Mastitis control in dairy herds. pp. **29**. Ipswich, farming Press.
- Bradley A. J. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease, *Vet. J.* **164**, 116-128.
- Breen J. 2017. The importance of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in mastitis therapeutics. *Livestock*, **4**, 182-185.
- Brown D. G., Lister T., May-Dracka T. L. 2014. New natural products as new leads for antibacterial drug, discovery, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **24**, 413-418.

- Bunkova L., Bunka F., Janis R., Krejci J., Dolezalkova I. et al. 2011. Comparison of antibacterial effect of seven 1-monoglycerides on foodborne pathogens or spoilage bacteria. *Acta Veterinaria Brno*, **80**, 29-39.
- Contreras G. A., Rodríguez J. M. 2011. Mastitis: comparative etiology and epidemiology, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **16**, 339-356.
- Daftary GV, Pai SA, Shanbhag GN. 2008. Stable emulsion compositions for intravenous administration having preservative efficacy. United States Patent Application.
- Das A. *et al.* 2017. Detection of emerging antibiotic resistance in bacteria isolated from subclinical mastitis in cattle in West Bengal, *Vet World* **10**, 517-520.
- Davies DG, Marques CNH. 2009. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol* **191**, 1393-1403.
- Desbois A. P. a Smith V. J. 2010. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 1629-1642.
- Dussert S., Guerin Ch., Andersson M., Joët T., Tranbarger T.J., Pizot M., Sarah G., Omoro A., Durand-Gasselín T., Morcillo F. 2013. Comparative Transcriptome Analysis of Three Oil Palm Fruit and Seed Tissues That Differ in Oil Content and Fatty acid Composition. *Plant Physiology*. **162** (3). 1337-1358.
- Erskine R., Cullor J., Schaelibaum M., Yancey B., Zecconi A. 2004. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. In: National Mastitis Council (NMC) Annual Meeting Proceedings, Verona, Italy, 400-414.
- Esselmont R.J. a Kossaibati M. A. 1997. Culling in 50 dairy herds in England. *Veterinary record* **140**, 36-9
- Eyres L., Eyres F.M., Chisholm A., Brown C.R. 2016. Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. *Nutrition reviews*. **74** (4). 267-280.

- FDA. 2015. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption, subpart I: Multipurpose additives. *U.S. Food and Drug Administration*. College Park. Dostupné na: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=172.860> (cit. 8.4.2019)
- FDA. 2019. Electronic Code of Federal Regulations. U.S. Food & Drug Administration, College Park. Dostupné na : https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=3ee286332416f26a91d9e6d786a604ab&mc=true&tpl=/ecfrbrowse/Title21/21tab_02.tpl (cit. 10.03.2019).
- Ferreira E.S., Lucien V.G., Amaral A.S., Silveria C.S. 2008. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart). *Alimentose Nutrição Araraquara*. **19** (4). 427–433.
- Fluhr JW, Kao J., Jain M., Ahn SK, Feingold KR, Elias PM. 2001. Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *J Invest Dermatol*: **117**, 44-51.
- Georgel P., Crozat K., Lauth X., Makrantonaki E., Seltmann H., Sovath S., Hoebe K., Du X., Rutschmann S., Jiang Z., Bigby T., Nizet V., Zouboulis CC, Beutler B. 2005. A toll- like receptor 2-responsive lipid effector pathway protects mammals against skin infections with Gram-positive bacteria. *Infect Immun* **73**, 4512-4521.
- Gohel V. *et al.* 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms, *Afr. J. Biotechnol.* **5**, 54-72.
- Gomes F., Henriques M. 2016. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Current Microbiology*, **72**, 377-382.
- Harvey A. I. 2008. Natural products in drug discovery, *Drug Discov. Today* **13**, 894-901.
- Henry F. Chambers a Frank R. DeLeo. 2009. *Nat Rev Microbiol.***7**, 629-641.

- Hovorkova P., Laloučková K., Skřivanová E. 2018. Determination of *in vitro* antibacterial activity of plant oils containing medium- chain fatty acids against Grampositive pathogenic and gut commensal bacteria. Czech Journal of Animal Science, **63**, 119-125.
- Churchward C.P., Alany R.G., Synder L.A. 2018. Alternative antimicrobials: the properties of fatty acids and monoglycerides. Critical reviews in mikrobiology, **44**, 561-570.
- Kabara JJ. 1980. Lipids as host-resistance factors of human milk. Nutrition Reviews **38**, 65-73.
- Kalmus P. *et al.* 2011. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia, Acta Vet. Scand. **53**, 4.
- Kankaanpää P., Yang B., Kalio H., Isolauri E., Salminen S. 2004. Effects of polyunsaturated fatty acids in growth medium on lipid composition and on physicochemical surface properties of lactobacili. Appl Environ Microbiol **70**, 129-136.
- Kodicek E., Worden AN. 1945. The effect of unsaturated fatty acids on *Lactobacillus helveticus* and other Gram-positive microorganism. Biochem J. **39**, 78-85.
- Kováč G., *et al.* 2001. *Choroby hovädzieho dobytku*. 1. vyd. Prešov: M&M vydavateľstvo Prešov, 673-676.
- Krömker V., Grabowski N.T., Friedrich J. 2014. New infection rate of bovine mammary glands after application of an internal teat seal at dry-off. Journal of Dairy Research, **81**, 54-58.
- Kurihara H., Goto Y., Aida M., Hosokawa M., Takahashi K. 1999. Antibacterial activity against cariogenic bacteria and the inhibition of insoluble glucan production by free fatty acids obtained from dried *Gloiopeltis furcata*. Fish Sci **65**, 129-132.

- Legrand P. 2008. Nutritional interest of different fatty acids from milk fat. *Sciences des Aliments*, **28**, 34-43.
- León-Galván M. F. *et al.* 2015. Molecular detection and sensitivity to antibiotics and bacteriocins of pathogens isolated from bovine mastitis in family dairy herds of central Mexico, *Biomed. Res. Int.*, 1-9.
- Lowy FD. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, **339**, 520-32.
- Maia G.C.H.M., Campos M.S., Barros-Monteiro J., Castillo J.E.L., Faleiros M.S., Sales R.S.A., Galeno D.M.L., Lira E., Souza F.Ch.A., Ortiz C., Morales L., Carvalho R.P. 2014. Effects of *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Tucuma) on Diet- Induced Dislipidemic rats. *Journal of Nutrition and Metabolism*. Article ID 202367. 9.
- Mambrim, M. C. T., Barrera-Arellano D. 1997. Characterization of palm tree fruits oils from Brazilian Amazon region. *Grasas Y Aceites*. **48** (3), 154-158.
- Mandal Deb Manisha a Mandal Shyamapada 2011. *Asian APcific Journal of Tropical Medicine*, 241-247.
- Marten B., Pfeuffer M., Schrezenmeir J. 2006. Medium-chain triglycerides. *International Dairy Journal*. **16**. 1374-1382.
- McNaught, A. D. 1997. *Compendium of chemical terminology*. Blackwell Science. Oxford. p. 450. ISBN: 9780865426849.
- Mir A. Q. *et al.* 2014. Subclinical mastitis in machine milked dairy farms in Punjab: prevalence, distribution of bacteria and current antibiogram, *Vet. World* **7**, 291-294.
- Newman D. J. a Cragg G. M. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981-2010, *J. Nat. Prod.* **75**, 311-335.

- Nair M.K.M., Joy J., Vasudevan P., Hinckley L., Hogland T.A. *et al.* 2005. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, **88**, 3488-3495.
- Nieman C. 1954. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriological Reviews* **49**, 1-32.
- Obahiagbon F. I. 2012. A Review: Aspects of the African Oil Palm (*elaeis guineensis jacq.*) and the Implication of its Bioactives in Human Health. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*.
- Olson D., Froehlich F., Christiano R., Hannibal-Bac H., Ejsing C., Wather T. 2014. Phosphorylation Control Coordinates Very Long Chain Fatty Acid Synthesis. In: Alberts B. (eds). *Molecular biology of the cell*. Garland Science. Bethesda. p. **1392**.
- Osawa K., Miyazaki K., Shimura S., Okuda J., Matsumoto M., Ooshima T. 2001. Identification of cariostatic substances in the cacao bean husk: their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. *J Dent Res* **80**, 2000-2004.
- Oyedeji F.O., Okeke I.E. 2010. Comparative analysis of moisturizing creams from vegetable oils and paraffin oil. *Research Journal of Applied Sciences*, **5**, 157-160.
- Pesce C. 1985. Oil palms and other oilseeds of the Amazon. *Brittonia*. **38** (2). 138.
- Polycarpo G.V., Andretta I., Kipper M., Cruz-Polycarpo V.C., Dadalt J.C. *et al.* 2017. Meta-analytic study of organic acids as an alternative performance- enhancing feed additive to antibiotics for broiler chickens. *Poultry Science*, **96**, 3645-3653.
- Radostits O. M., Leslie K. E., Fetrow J. 1994. Herd health: Food Animal Production Medicine. Philadelphia, PA, Saunders. p. 233.
- Reece William O. 1998. Fyziologie domácích zvířat, vydavatel'stvo GRADA, p. **14365**, 72.

- Russell A. 2003. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations, *Lancet Infect. Dis.* **3**, 794-803.
- Shanley P. 2011. Fruit trees and useful plants in Amazonian life (online). Food and Agricultural Organisation. Rome. Dostupné na <http://www.fao.org/docrep/015/i2360e/i2360e.pdf> . (cit 15.3.2019)
- Schlievert P.M., Peterson M.L. 2012. Glycerol monolaurate antibacterial activity in broth and biofilm cultures. *PloS one*, **7**, e40350.
- Schreiner D.A., Ruegg P.L. 2003. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, **86**, 3460-3465.
- Schrack F. N., Hockett M. E., Saxton A. M., Lewis M. J., Dowlen H. H., Oliver S. P. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *Journal of Dairy Science*. **84**, 1407-12.
- Schroeder J. W. 2012. Bovine mastitis and milking management, NDSU Extension Serv. **1129**, 1-16.
- Silva J.G., Alcântara A.M., Mota R.A. 2018. Bovine mastitis caused by *Staphylococcus spp.* Methicillin-resistant: literature review. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **38**, 223-228.
- Srivastava Y., Semwal A.D., Majumdar A. 2016. Quantitative and qualitative analysis of bioactive components present in virgin coconut oil. *Cogent Food Agriculture*, **2**, 1164929.
- Srivastava S., Singh M., George J., Bhui K., Murari S.A., Shukla Y. 2010. Genotoxic and carcinogenic risks associated with the dietary consumption of repeatedly heated coconut oil. *British Journal of Nutrition*. **104** (9). 1343-1352.
- Stenz L., Francois P., Fischer A., Huyghe A., Tangomo M., Hernandez D., Cassat J., Linder P., Schrenzel J. 2008. Impact of oleic acid (cis-9-octadecenoic acid) on bacterial viability and biofilm production in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **287**, 149-155.

- Sun C.Q., O'Connor C.J., Robertson A.M. 2003. Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *Fems Immunology and Medical Microbiologi*. **36** (1-2). 9-17.
- Takigawa H., Nakagawa H., Kuzukawa M., Mori H., Imokawa G. 2005. Deficinet production of hexadecenoic acid in the skin is associated in part with the vulnerability of atopic dermatitis patients to colonisation by *Staphylococcus aureus*. *Dermatology* **21**, 240-248.
- Taponem S., Nykäsenoja S., Pohjanvirta T., Pytkälä A., Pyörälä S. 2016. Species distribution and *in vitro* antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *staphylococci* isolated from bovine mastitic milk, *Acta Vet. Scand.* **58**, 1-13.
- Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A. *et al.* 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 5649-5654.
- Van der Vossen H.A.M., Umali B.E., Oyen L.P.A., Jansen P.C.M. 2001. Vegetable oils and fats. In: Jansen P.C.M., Westphal E., Wulijarni- Soetjipto N. (eds.): *Plant Resources of South- East Asia*, Volume 14. Backhuys Publishers, Leiden, NL, 13-170.
- Vélez J. R. *et al.* 2011. Whole-genome sequence analysis of antimicrobial resistance genes in *Streptococcus uberis* and *Streptococcus disgalactiae* isolates from Canadian dairy herds, *Front. Vet. Sci.* **4**, 1-11.
- Watts J.L. 1998. Etiological agents of bovine mastitis, *Vet. Microbiol.* **16**, 41-66.
- White D.G. a McDermott P. F. 2001. Emergence and transfer of antibiotic resistance. *Journal of Dairy Science* **84** (E. Suppl.), 151-5.
- Wille JJ., Kydonieus A. 2003. Palmitoleic acid isomer (C16:1 6) in human skin sebum is effective against Gram-positive bacteria. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **16**, 176-187.

Won S-R, Hong M-J, Kim Y-M, Li CY, Kim J-W, Rhee H-I. 2007. Oleic acid: an efficient inhibitor of glucosyltransferase. *FEBS Lett* **58**, 4999-5002.

Zoznam použitých skratiek a symbolov

CCM- česká zbierka organizmov

CNF- koagulázovo negatívne stafylokoky

DMSO- dimetysulfoxid

FA- mastné kyseliny

FFA-voľné mastné kyseliny

MCFA- stredná dĺžka reťazca

MIC- minimálna inhibičná koncentrácia

MUFA- mononenasýtené mastné kyseliny

NaCl- chlorid sodný (kuchynská soľ)

pH- kyslosť alebo acidita

PKO- olej z palmových jadier

PUFA- polynenasýtené mastné kyseliny

SFA- nasýtené mastné kyseliny

TAG- triacylglyceroly

TSB- médium v ktorom sa kultivovali baktérie (tryptose soya brot)