

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Rostlinné silice jako potencionální aditiva pro konzervaci  
kančích inseminačních dávek**

**Diplomová práce**

**Adéla Koštířová**

**Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů**

**Ing. Pavel Nový, Ph.D.**

© 2024 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Rostlinné silice jako potencionální aditiva pro konzervaci kančích inseminačních dávek" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19.04.2024

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu práce Ing. Pavlu Novému Ph.D. za užitečné rady a čas strávený během průběžných kontrol při psaní této práce, a hlavně za ochotu a pomoc v laboratoři v průběhu laboratorního pokusu. Dále bych ráda poděkovala své rodině a příteli, kteří za mnou vždy stáli a věřili v úspěšný konec.

# Rostlinné silice jako potencionální aditiva pro konzervaci kančích inseminačních dávek

## Souhrn

Cílem práce bylo ověřit antimikrobiální účinky rostlinných silic proti vybraným bakteriím kontaminujícím kančí inseminační dávky. Vhodně zvolené kombinace silic by mohly být dostatečně účinné proti širokému spektru bakterií a mohly by tak v inseminačních dávkách posloužit jako náhrada za antibiotika, jejichž další používání mimo humánní medicínu bude z důvodu šířící se antibiotické rezistence zakázáno.

Teoretická část této diplomové práce byla zaměřena na shrnutí základních informací o reprodukci prasat a alternativních metodách konzervace kančích inseminačních dávek. Dále jsou charakterizovány rostlinné silice, mechanismus účinku a jejich vliv na bakterie či spermie, což bylo hlavním tématem této práce.

V experimentální části byl testován antibakteriální účinek vybraných rostlinných silic pomocí bujónové mikrodiluční metody *in vitro*. Celkem bylo otestováno 14 silic na 4 bakteriálních kmenech. Nejvýraznější antimikrobiální aktivitu vykazovala skořice proti všem testovaným bakteriím (MIC 512–2050 µg/ml). V kombinaci byla zjištěna synergie mezi tea tree a saturejkou proti *Enterococcus faecalis*, manukou a kajepuťem proti *Pseudomonas aeruginosa*, kadidlem s borovicí a tea tree s kadidlem, kajepuťem a borovicí proti *Staphylococcus aureus*, a nakonec u eukalyptu s kadidlem proti *Escherichia coli* (FICI 0,125 – 0,37). Naopak nejméně účinnými byly silice z šalvěže, badyánu, libavky, rosaliny, zázvoru a levandule.

Z dosažených výsledků není možné vyvozovat konečné závěry, pro potvrzení účinků *in vitro* by bylo nutné provést další testy na širší škále druhového spektra a také vliv těchto silic na kvalitativní parametry kančích spermií.

**Klíčová slova:** silice, synergie, antimikrobiální aktivita, inseminační dávka, kančí sperma

# Plant essential oils as potential additives for boar sperm preservation

## Summary

The aim of the study was to verify the antimicrobial effects of essential oils against selected bacteria contaminating boar insemination doses. Appropriately selected combinations of essential oils could be sufficiently effective against a wide range of bacteria and could thus serve in insemination doses as a substitute for antibiotics, the further use of which outside human medicine will be prohibited due to the spread of antibiotic resistance.

The theoretical part of this thesis was focused on summarizing basic information about pig reproduction and alternative methods of preservation of boar insemination doses. Furthermore, essential oils are characterized, the mechanism of action and their influence on bacteria or sperm, which was the main topic of this work.

In the experimental part, the antibacterial effect of selected essential oils was tested using the broth microdilution method *in vitro*. A total of 14 essential oils were tested on 4 bacterial strains. Cinnamon showed the most significant antimicrobial activity against all tested bacteria (MIC 512–2050 µg/ml). In combination, synergies were found between tea tree and savory against *Enterococcus faecalis*, manuka and tea tree against *Pseudomonas aeruginosa*, frankincense with pine and tea tree with frankincense, tea tree and pine against *Staphylococcus aureus*, and finally eucalyptus with frankincense against *Escherichia coli* (FICI 0.125 – 0.37). On the other hand, essential oils of sage, star anise, wintergreen, rosalina, ginger and lavender were the least effective. It is not possible to draw final conclusions from the achieved results, to confirm the effects *in vitro* it would be necessary to perform further tests on a wider range of species spectrum and also the effect of these essential oils on the qualitative parameters of boar sperm.

**Keywords:** essential oil, synergy, antimicrobial activity, insemination dose, boar semen



# Obsah

1. Úvod.....	1
2. Vědecká hypotéza a cíle práce .....	2
3. Literární rešerše.....	3
<b>3.1 Reprodukce prasat .....</b>	<b>3</b>
<b>3.2 Prostředky vhodné pro snížení bakteriální kontaminace kančích inseminačních dávek 5</b>	
3.2.1 Hygiena.....	5
3.2.2 Přírodní.....	6
3.2.3 Syntetické .....	8
3.2.4 Fyzikální .....	8
<b>3.3 Faktory ovlivňující antimikrobiální aktivitu silic .....</b>	<b>9</b>
3.3.1 Dispergační činidla a emulgátory.....	9
3.3.2 Podmínky kultivace a čas.....	9
3.3.3 Teplota.....	10
3.3.4 Obsah kyslíku .....	10
3.3.5 pH .....	10
<b>3.4 Silice.....</b>	<b>11</b>
3.4.1 Mechanismus účinku .....	11
3.4.1.1 Vliv na buněčné membrány .....	11
3.4.1.2 Účinky na dýchání a energetický metabolismus .....	12
3.4.1.3 Vliv na genetický materiál .....	12
3.4.2 Synergie, antagonismus.....	12
3.4.3 Vliv silic na spermie .....	13
4. Metodika.....	15
4.1 Chemikálie a kultivační média .....	15
4.2 Silice a mikroorganismy .....	15
4.3 Příprava inokula .....	15
4.4 Stanovení minimální inhibiční koncentrace .....	16
4.5 Vyhodnocování výsledků kombinací silic .....	17
4.6 Analýza chemického složení silic.....	17
5. Výsledky .....	18
6. Diskuze .....	27
7. Závěr .....	31
8. Literatura.....	32
9. Seznam použitých zkratk a symbolů.....	38





# 1. Úvod

Bakteriální rezistence na antibiotika a její rychlý nárůst se stává jednou z nejzávažnějších hrozeb pro lidské zdraví. Je to celosvětový problém, který si bohužel spousta lidí neuvědomuje. Mnoho bakterií si vyvinulo rezistenci vůči konvenčním antibiotikům v důsledku jejich nesprávného používání, jako je například nedostatečná dávka k jejich usmrcení či dlouhodobé používání. To znamená, že je třeba vyvíjet stále nová antibiotika s odlišným mechanismem působení. Mnoho odborníků se domnívá, že léčba infekčních chorob bude stále náročnější. Antibiotika jsou široce používána pro jiné účely než pro medicínu, což přispívá k nárůstu rezistence. Používání antibiotik v chovu zvířat je tomu dobrým příkladem (Attia a kol., 2022).

Prevence antibiotické rezistence zahrnuje racionální používání antibiotik, dodržování předepsaných léčebných postupů, podporu výzkumu nových antibiotik a rozvoj alternativních terapeutických přístupů k léčbě infekcí. Je rovněž důležité zlepšit hygienické praktiky a snížit používání antibiotik v zemědělství, kde může přispívat k vzniku rezistence u bakterií v potravním řetězci. Proto je také potřeba hledat alternativní zdroje látek s antimikrobiální aktivitou. Slibnou alternativou by mohly být rostlinné silice. Rostlinné silice mají široké spektrum využití v potravinářství, kosmetice, lékařství a zemědělství. V potravinářství se používají jako přírodní aromata, látky pro ochucování potravin a nápojů, ale zkoumá se i možnost jejich využití ke konzervaci potravin. V kosmetice jsou často součástí parfémů, olejů a krémů díky své vůni a přírodním vlastnostem. V lékařství se některé rostlinné silice využívají pro své léčebné účinky, například protizánětlivé, antimikrobiální nebo uklidňující účinky. V zemědělství k ochraně plodin před chorobami a škůdci, či v budoucnosti třeba jako konzervační činidla inseminačních dávek, nejen kanců.

## **2. Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem práce bylo vyhodnocení antimikrobiální aktivity rostlinných silic a jejich kombinací proti bakteriím kontaminujícím kančí sperma za účelem identifikace vhodných sloučenin, které by mohly nahradit antibiotika používaná pro přípravu a krátkodobé uchování inseminačních dávek kanců.

Hypotéza: Některá z vybraných kombinací silic bude mít zesilující antimikrobiální účinek *in-vitro*, případně bude inhibovat širší spektrum mikroorganismů než samostatné silice.

### 3. Literární rešerše

#### 3.1 Reprodukce prasat

Chov prasat je dnes založen na umělé inseminaci s chlazeným spermatem. To je skladováno při nižších teplotách s antibiotickou suplementací, aby se zabránilo bakteriospermii. Existuje mnoho negativních důsledků na kvalitu a funkčnost samčích ale i samičích pohlavních buněk v důsledku bakteriální kontaminace (Contreras a kol., 2022).

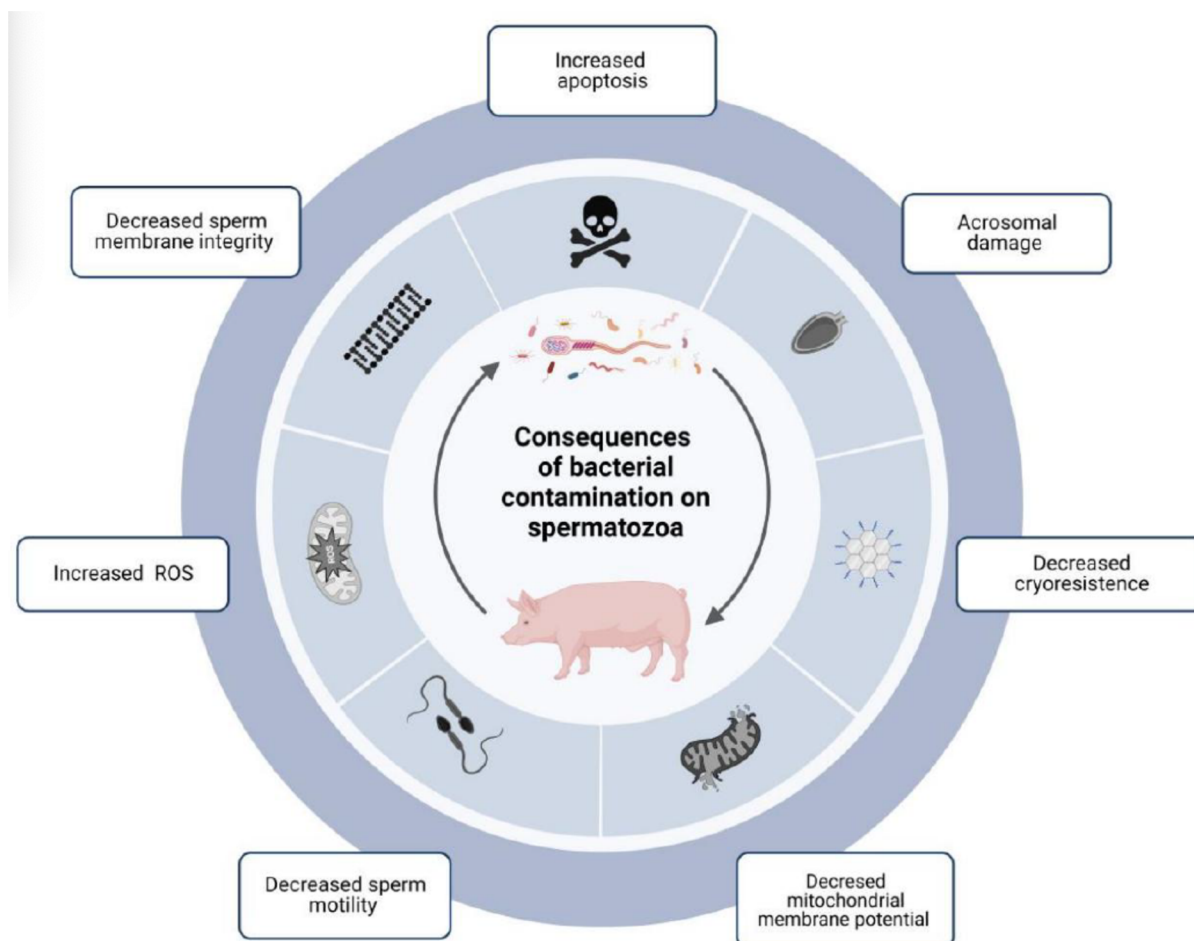
Umělá inseminace je široce používaná technika v produkci prasat. Pokroky v technice umožnily skladovat spermie při teplotách 15–20 °C po dobu až 10 dní. To souvisí s citlivostí kančích spermií bohatých na nenasycené mastné kyseliny na chlad a nízkou tolerancí k nejběžnějším kryokonzervačním přísadám (Johnson a kol., 2000). Bohužel je v současnosti spojena s bakteriální kontaminací při odběru spermatu či ředění (Schulze a kol. 2015). I když je teplota snížena, aby vyvolala nečinnost spermií během skladování, stále může docházet k růstu bakterií. Ten je spojován se škodlivými účinky na kvalitu a skladovatelnost, jako je aglutinace, snížená pohyblivost a životaschopnost (Althouse a kol., 2000). Bakteriální kontaminaci a jejím negativním účinkům na plodnost a velikost vrhu je třeba zabránit (Schulze a kol., 2015). Proto se ATB běžně přidávají do dávek spermatu. Ročně se celosvětově spotřebuje kolem 12,8 milionů litrů spermatu obsahujících antibiotika (Wiebke a kol., 2021)

Ejakulát se skládá z heterogenní populace normálních a abnormálních spermií v různých fázích zralosti. Předpokládá se, že ženský reprodukční trakt poskytuje řadu mechanismů selekce spermií, které zajistí, že pouze pohyblivé, morfologicky normální spermie jsou schopné podstoupit akrozomovou reakci a dosáhnou místa potenciálního oplodnění ve vejcovodech. (Bacilková a kol., 2011) Při umělé inseminaci se do ženského reprodukčního traktu vkládá menší počet spermií ve srovnání s přirozeným pářením. Dobrá kvalita má proto prvořadý význam. (Kudlová a kol., 2005)

Studie Schulz a kol. (2015) ukázala, že 90 z 334 vzorků spermatu ve 24 evropských zemích byly kontaminovány 21 různými druhy bakterií (většinou gramnegativních z čeledi *Enterobacteriaceae*). 18 z nich vykazovalo multirezistenci proti běžným antibiotikům. Chceme-li tento problém překonat, je důležité klást důraz na kontrolu hygienických opatření při získávání spermatu, stejně tak jako najít alternativy ke konvenčním ATB.

V nedávných studiích byl jako nejběžnější vyhodnocen semenný mikrobiom skupiny *Proteobacteria* (39,1-57,3 %), *Firmicutes* (27,5-31,17 %) *Actinobacteria* (3,41-14,9 %), *Bacteroidetes* (4,24-5,7 %). Kromě toho byly druhy *Bacillus megaterium*, *Brachybacterium faecium* a *B. coagulans* rozpoznány jako postejakulační kontaminace z půdy, stolice a vodních zdrojů. Na druhé straně bylo zjištěno relativně malé množství *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *C. botulinum* a *Mycobacterium tuberculosis* (Godia a kol., 2020). *Lactobacillus* je velmi hojný ve vzorcích odebraných v zimě, naproti tomu *Pseudomonas* spíše v letním období, což je pozitivně spojeno s kvalitou spermií a reprodukční schopností (Zhang a kol. 2020).

Asi 60% variability profilu bakteriální kontaminace ve vzorcích spermatu lze vysvětlit hygienickými podmínkami různých kontrolních bodů při umělé inseminaci (Nitsche-Melkus a kol, 2020). Proces odběru vzorků byl krok za krokem analyzován za účelem stanovení kritických bodů pro bakteriální kontaminaci. Nejkritičtějšími body, kde může vzniknout kontaminace bylo stanovení odkapávání prepuciální tekutiny z ruky, doba sběru přes sedm minut a přítomnost dlouhého předkožkového ochlupení (Goldberg a kol. 2013).

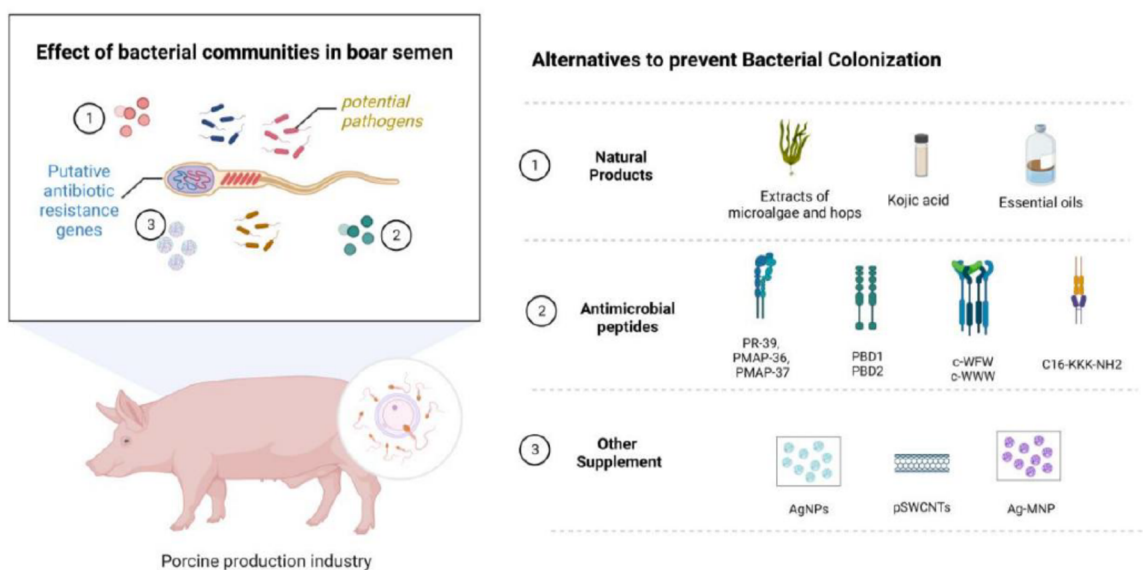


**Obr 1.:** Diagram znázorňující důsledky kontaminace bakteriálními komunitami u kančích spermii (Contreas a kol., 2022)

Ciornei a kol., (2021) doporučili změny pro odběr spermatu, provedení hygieny a biologickou bezpečnost odběru spermatu, která snižuje bakteriální kontaminaci v surovém spermatu o 49,85 %. Toto zahrnuje aplikaci lehce dekontaminačních látek (např. Misoseptol) 15 minut před odběrem, použití latexových rukavic, dezinfekce předkožky, vyprázdnění předkožkového divertiklu od sekretu a moči.

## 3.2 Prostředky vhodné pro snížení bakteriální kontaminace kančích inseminačních dávek

V posledních letech se zvyšuje úsilí o vývoj alternativních metod pro konzervaci kančích inseminačních dávek, aby se zabránilo používání konvenčních antibiotik. Potencionální přísada musí splňovat široké spektrum antimikrobiálního účinku, žádnou toxicitu vůči spermii, žádnou interferenci s plodností, vysokou stabilitu, nízký potenciál působit bakteriální rezistenci, snadnou aplikaci a ekonomickou proveditelnost (Schulze a kol., 2016).



**Obř 2.:** Různé druhy látek, které by mohly přispívat ke snížení bakteriální zátěže kančího spermatu a nahradit tím, alespoň z části antibiotika (Contreras a kol., 2022).

### 3.2.1 Hygiena

Přísná hygiena může snížit bakteriální kontaminaci během odběru spermatu (Althouse, 2008). Normální flóru kůže, vlasů a dýchacích cest nelze omezit, ikdyž zoohygienik může eliminovat svůj vlastní příspěvek prostřednictvím osobní hygieny a sterility odběrového zařízení. Je vhodné nosit pravidelně praný a dezinfikovaný chranný oděv a obuv. Lidé s respiračními infekcemi by se měli vyhýbat odběru, pokud to není možné, měli by užít roušku. Prostor pro odběr a zařízení by měly být důkladně vyčištěny a dezinfikovány. Nicméně dezinfekční prostředky jsou do určité míry spermicidní, proto je třeba se vyhnout reziduíům těchto látek na povrchu, který přijde do kontaktu se spermatem (Morrell a kol., 2014). Kromě kvalitních hygienických opatření, bezvadných podmínek ustájení včetně vhodných pojistek proti vstupu patogenů zvenčí, jsou důležitými pilíři systematické veterinární kontroly a péče, přizpůsobené vakcinační a odčervovací režimy a také kontrola ektoparazitů. Sperma by mělo být odebíráno pouze klinicky zdravým jedincům (Schulze a kol., 2016).

### 3.2.2 Přírodní

Rostliny produkují široké spektrum sekundárních metabolitů s antimikrobiální aktivitou. Tyto látky působí různými mechanismy inhibičně na růst a reprodukci mikroorganismů a jsou důležitým prvkem ochrany rostlin vůči infekcím. Existuje velké množství rostlinných látek s antimikrobiální aktivitou. Řada z nich byla testována také na účinnost při inhibici kontaminujících bakterií v kančích inseminačních dávkách, například některé antimikrobiální peptidy, bakteriociny, cannabinoidy, fenolické látky, chinony, flavonoidy, kumariny, taniny, glukosinoláty, alkaloidy, rostlinné silice (terpeny) a další.

Antimikrobiální peptidy mají tři mechanismy proti bakteriím. Pozitivně nabitě kationtové AMP interagují s negativním nábojem buněčné membrány a generují konformační změny. Po navázání AMP na buněčnou membránu se generují různé mechanismy účinku, které tvoří různé typy porů. AMP mohou interagovat přímo s DNA, RNA, ribozomy a narušenými chaperonovými proteiny, čímž naruší procesy, jako buněčné dělení, replikace a syntéza nukleových kyselin (Valdez-Miramontes a kol., 2021). AMP se stal jednou z nejslibnějších alternativ použití antibiotik k překonání rostoucí bakteriální rezistence, může však zhoršit kvalitu spermatu. Výsledky studie Bussalleu a kol., 2017 ukázaly, že všechny testované AMP snižují motilitu spermií. Účinně kontrolují bakteriální zátěž, i když méně než antibiotická kontrola, a udržují ji nízkou během deseti dnů skladování v chladu. Zachovávají životaschopnost a pohyblivost spermií ekvivalentní antibiotické kontrole při konzervaci 17 °C po dobu deseti dnů. Proto je jejich použití možné jako antibiotický doplněk (Puig-Timonet a kol., 2018). Kationtové AMP jsou novou třídou antimikrobiálních aditiv pro konzervaci kančího spermatu. Bylo zjištěno, že použití syntetických cyklických hexapeptidů částečně stimuluje progresivní lineární pohyb spermií. Kromě toho je kvalita v nízkých koncentracích srovnatelná s kvalitou standardního ředidla během skladování (Schulze a kol., 2014).

Bakteriociny se skládají z malých baktericidních nebo bakteriostatických peptidů syntetizovaných ribozomálně bakteriemi. Hrají regulační roli v bakteriálních ekosystémech. Mnohé z nich vykazují silnou antimikrobiální aktivitu proti specifickým, často blízcě příbuzným bakteriím. bakteriociny mají pro tuto antimikrobiální aktivitu různé způsoby působení. Zatímco některé bakteriociny působí permeabilizaci cytoplazmatických membrán, jiné inhibují stavbu peptidoglykanové buněčné stěny nebo dokonce napadají intracelulární struktury jako jsou endonukleázy (Karpinsky a Szkaradkiewicz 2013). Bakteriocin nisin je schválený FDA jako konzervant, který se používá v řadě potravinářských produktů (Chikindas a kol., 2018). Probíhají také první výzkumy ohledně použití bakteriocinů jako konzervačních činidel v kančích inseminačních dávkách. Pediocin PA-1, produkovaný *pediococcus acidilactici* měl pozitivní vliv na životaschopnost spermií se zvyšujícími se koncentracemi. Nepodařilo se mu však snížit růst bakterií během skladování do koncentrace 350 ng/ml (Bonet a kol., 2019).

Silice neboli také esenciální, éterické či aromatické oleje definujeme jako těkavé, intenzivně vonící směsi přírodních rostlinných látek olejovité konzistence, lipofilní, ve vodě těžko rozpustné. Zpravidla jsou bezbarvé, zvláště v čerstvém stavu, ale mohou být i různě zbarvené (např. žlutohnědá hřebíčková či skořicová). Delším uchováváním snadno oxidují, pryskyřnatí a tmavnou. Jsou známé svými inhibičními účinky proti široké škále různých organismů, zahrnující například viry, chlamydie, bakterie, houby, protozoa a škodlivý hmyz. Největší praktické využití nacházejí zejména v kosmetice a potravinářství. Silice se zpravidla skládají z velkého počtu chemických sloučenin. Dosud bylo identifikováno přes 500 různých látek, přičemž v jedné může být obsaženo až 50. Jsou zastoupeny látky různých biogenetických skupin, zejména látky s nižší molekulovou hmotností, menším počtem kyslíkatých funkcí a bez glykosidní vazby na cukry. Tyto vlastnosti mají hlavně monoterpeny, diterpeny a fenyylpropany. Dále jsou zastoupeny prakticky všechny typy organických sloučenin – uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony, kyseliny, estery, étery a jiné.

Esenciální oleje získáváme z rostlinných surovin několika technologickými postupy. Nejstarším způsobem je extrakce pomocí tuků. Průmysl parfémů používá většinou kontinuální extrakce lehce těkavými rozpouštědly, zpravidla petroléterem nebo benzenem. Pro farmaceutické účely se silice získávají většinou destilací. Silice, které nelze bez rozkladu destilovat se nejlépe získávají lisováním. Vylisovaná tekutina však není čistou silicí, neboť obsahuje také vodu a rozličné látky jako jsou např. pektiny (Bronislava Bacílková & Paulusová, 2011).

Bylo zjištěno, že esenciální oleje bohaté na monoterpeny, kam patří například *Cymbopogon citratus* a *Maculatum atropurpureum*, jsou nevhodné jako přísady do kančího spermatu ve všech testovaných koncentracích (například i při 0,001 %). Mají cytotoxické účinky, negativní vliv na motilitu a mitochondriální funkci (Cavalleri a kol., 2018). Během posledních let bylo k dispozici několik nových krátkodobých i dlouhodobých konzervantů kančího spermatu (Knox, 2016). Přesto stále existuje prostor pro zlepšení složení a hledání nových molekul, které by mohly zvýšit plodnost. Široké používání antimikrobiálních látek v potravinářské a živočišné výrobě je spojován s rozvojem antimikrobiální rezistence v bakteriálních populacích (Maron a kol., 2013).

### 3.2.3 Syntetické

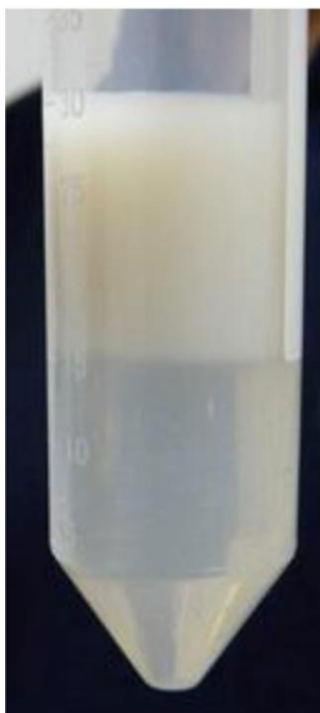
Skladování a uchovávání inseminačních dávek kanců má značný význam pro jejich kvalitu. Díky své citlivosti na nízké teploty je kančí sperma běžně skladováno v tekuté formě při teplotách 16-18 °C, aby se zabránilo poškození vysoce citlivých spermií studeným šokem. Tato relativně vysoká skladovací teplota v kombinaci s použitím ředících médií bohatých na živiny podporuje zvýšení mikrobiálního nárůstu. Aby se zabránilo tomuto růstu jsou do inseminačních dávek běžně přidávána antibiotika podle právních předpisů směrnice Rady, Evropské Unie, 90/429/EHS (Morrell, 2016).

Přidání antibiotik ve vhodné koncentraci zlepšuje přežití spermií a také plodnost. Dříve byla nejčastěji používána kombinace antibiotik penicilin a streptomycin v koncentraci 1 g/l. Dnes jsou úspěšně používány aminoglykosidy, včetně gentamycinu, v koncentraci asi 200mg/l (Gadea, 2003). Antibiotika mohou být však pro spermie toxická. Jejich používání v ředidlech kančího spermatu může mít nepříznivý vliv jak na kvalitu a životnost spermií, tak i na životní prostředí. To omezuje výběr antibiotik, která mohou být do ředidel použita. Ve snaze snížit toxicitu na ejakulát je používána směs ATB. To může vést k rozvoji ještě větší rezistence, která může být přenesena i na ostatní bakterie v těle hostitele. Dále je nezbytné, aby ředidla a sperma obsahující antibiotika byly likvidovány schváleným způsobem pro jejich inaktivaci před tím, než se dostanou do životního prostředí (Morell a Wallgren, 2014).

### 3.2.4 Fyzikální

Koloidní centrifugace spermatu je relativně jednoduchý způsob, který je dostupný ve většině laboratoří. Metoda jednovrstvé centrifugace je jednodušší, časově méně náročná a umožňuje snadné zpracování objemných ejakulátů (např. u kance či hřebce) než centrifugace v hustotním gradientu. Využívá pouze jednu vrstvu koloidu, čímž odpadá potřeba připravovat několik vrstev koloidu o různých hustotách. Připravený koloid je nalit do centrifugační zkumavky a ředěné sperma je pečlivě vrstveno na povrch (Obr 3.). pro optimální selekci semene by koncentrace spermií neměla přesáhnout cca 100 milionů/ml, aby nedošlo k přetížení koloidu. Zkumavka se odstředí při 300 x g 20 minut. Během centrifugace je semenná plazma umístěna v horní části, zatímco spermie jdou dolů skrze koloid. Peleta na dně zkumavky obsahuje pohyblivé a životaschopné spermie. Supernatant obsahující ředidlo, semennou plazmu a mrtvé sperma je společně s koloidem odsát. Peleta se spermatem je poté odebrána z pod zbytku koloidu sterilní pipetou a je přemístěna do čisté zkumavky s ředidlem spermatu. Koloidní centrifugace umožňuje odstranit významnou část kontaminujících bakterií. Mikroorganismy a jiné buňky se po centrifugaci nachází v semenné plazmě, která je umístěna v horní části zkumavky. Oproti tomu životaschopné spermie tvoří peletu na dně (Morrell a Wallgren, 2014).





**Obr 3.:** Jednovrstvá centrifugace ejakulátu s použitím Andocoll-E (Morrell a Wallgren 2014)

### **3.3 Faktory ovlivňující antimikrobiální aktivitu silic**

#### **3.3.1 Dispergační činidla a emulgátory**

Většina EO je nerozpustná ve vodě. Proto aby se rozpustnost zlepšila můžeme použít mnoho dispergačních činidel a povrchově aktivních činidel. Mezi nejpoužívanější patří bezvodný ethylalkohol, Tween, dimethylsulfoxid, agar a lecitin. Emulgátory mohou zpomalit separaci EO a vody a tím zvětšit kontaktní plochu mezi bakteriemi (Burt a Reinders, 2003). Například bylo zjištěno, že disperze citralu, geraniolu a linaloolu v Tween-20 může zlepšit jejich antimikrobiální aktivitu (Kim a kol., 1995). Ethanol a dimethylsulfoxid jsou polární rozpouštědla, která mohou zlepšit kontakt s jinými polárními materiály a zlepšit antibakteriální aktivitu (Chalova, Crandall a Ricke., 2010).

#### **3.3.2 Podmínky kultivace a čas**

Delší doba expozice obvykle vede k silnější antimikrobiální aktivitě. Může však existovat maximum, tedy bod, kdy se již antibakteriální aktivita nezvyšuje. EO lze rozdělit na dva typy v závislosti na délce doby, kterou produkují antibakteriální aktivitu. Pomalu nebo rychle působící. Některé látky, jako je cinnamaldehyd, karvanol a geraniol jsou považovány za rychle působící, protože mohou inaktivovat *E. coli* a *Salmonellu* již za 5 minut, zatímco pomalu působící sloučeniny obvykle musí působit 30-60 minut (Friedman a kol., 2004).

### **3.3.3 Teplota**

Vliv teploty na antimikrobiální aktivitu nelze ignorovat. Je tomu tak proto, že různé mikrobiální druhy mají různé optimální růstové teploty, nad nimiž nebo pod nimi je aktivita snížena. Mikroorganismy lze zařadit podle jejich preferovaného teplotního rozsahu do čtyř následujících skupin – psychrofilní, mezofilní, termofilní a hypertermofilní. Optimální podmínky psychrofilů se nachází při teplotě pod 15 °C, přežívají tedy i v chladírenských podmínkách, proto je důležité jejich sledování (Moleyar a Narashimham., 1992). Další důležitou skupinou bakterií, která může ohrožovat inseminační dávky jsou mezofilní bakterie, které mají ideální teplotu pro růst 20-40 stupňů.

### **3.3.4 Obsah kyslíku**

I kyslík má vliv na antimikrobiální aktivitu EO. Na jedné straně kyslík způsobuje řadu chemických reakcí s aktivními složkami v EO. Například za aerobních podmínek vykazuje thymol silnější účinky, účinek silice z tea tree se naopak zvyšuje za anaerobních podmínek (Kalemba a Kunicka., 2003). Na druhé straně mohou různé koncentrace kyslíku ovlivnit růst a metabolismus mikroorganismů. Ukázalo se, že EO v kombinaci s balením v modifikované atmosféře při vysokých koncentracích oxidu uhličitého (40 %) významně inhibují mikrobiální nárůst (Matan a kol., 2006).

### **3.3.5 pH**

Obecně se citlivost bakterií zvyšuje s klesajícím pH. pH a EO mohou mít synergický inhibiční účinek na bakterie. To může být způsobeno tím, že při nižších hodnotách pH s EO se nerozkládají a mají silnější hydrofobní účinky, což usnadňuje jejich spojení s bakteriálními buněčnými membránami (Rivas a kol., 2010).

## 3.4 Silice

### 3.4.1 Mechanismus účinku

Mechanismus účinku silic na mikroorganismy je komplexní a není ještě zcela objasněn. Terpenoidy jako látky lipofilního charakteru zřejmě působí na membránové enzymy a blokují respirační cyklus. Jiné součásti silic mohou působit na další biochemické buněčné děje. Inhibují syntézu DNA, RNA, proteinů a polysacharidů (Bronislava Bacílková & Paulusová, 2011). Obecně platí, že inhibiční účinky rostlinných extraktů více inhibují grampozitivní bakterie než gramnegativní (Klančnik a kol., 2011). To může být způsobeno tím, že vnější membrána gramnegativních bakterií obsahuje více lipopolysacharidů, které jsou pro lipofilní látky téměř nepropustné, což umožňuje bakteriím odolávat infiltraci aktivních složek EO (Kotzekidou, Giannakidis a Boulamatrix., 2008). Kromě toho hydrolázy v periplazmatickém prostoru gramnegativních bakterií pomáhají degradovat aktivní složky EO. Naproti tomu grampozitivní bakterie nemají tuto přirozenou bariéru, která umožňuje lipofilním aktivním molekulám v EO přijít do přímého kontaktu s fosfolipidovou dvojrstvou buněčné membrány, čímž se zvyšuje propustnost buněčné membrány (Gao a kol., 2011).

Ačkoli mají G-bakterie tento přirozený obal, EO je stále mohou inhibovat. To je způsobeno přítomností porinu ve vnější membráně, který poskytuje dostatečně široký kanál, aby umožnil průchod sloučenin s nízkou molekulovou hmotností (Kotzekidou, Giannakidis a Boulamatrix., 2008).

Thymol a carvacrol zvyšují permeabilitu bakteriální vnější membrány. Eugenol a citral inhibují beta-laktamázu a kyselina šalvějová inhibuje bakteriální efluxní pumpu (Ju, Xie, Yu, a kol., 2020).

#### 3.4.1.1 Vliv na buněčné membrány

Aktivní složky v EO narušují strukturu peptidoglykanu nebo inhibují jeho syntézu, což poškozuje buněčnou stěnu. Tato interakce může vést k narušení struktury a funkce membrány, což má za následek smrt bakterie nebo inhibici jejího růstu. EO mohou proniknout do bakteriálních membrán a narušit jejich integrity. To vede k úniku buněčného obsahu, narušení iontové rovnováhy, a nakonec k buněčné smrti. Interakce s buněčnými membránami může zvýšit jejich permeabilitu. Toto zvýšení umožňuje dalším antimikrobiálním látkám v silicích lépe proniknout do bakteriálních buněk a zesílit účinek.

Silice mohou také ovlivnit funkci membránových proteinů, včetně proteinů odpovědných za transport látek dovnitř a ven z bakteriální buňky. To může narušit klíčové metabolické procesy a inhibovat růst bakterií. Mohou měnit fluiditu bakteriálních membrán, což ovlivňuje jejich funkci a schopnost bakterií udržet si strukturu a provádět normální buněčné procesy.

Je důležité poznamenat, že specifický mechanismus a účinnost rostlinných silic se liší v závislosti na jejich chemickém složení, které je určeno druhem rostliny a částí rostliny, z které byl olej extrahován, a metodou extrakce. Některé EO jsou účinnější proti gram-pozitivním bakteriím, zatímco jiné mohou být účinnější proti gram-negativním bakteriím, což je dáno rozdíly v struktuře jejich buněčných membrán (Cezar, Maraschin a Di Piero, 2015).

### 3.4.1.2 Účinky na dýchání a energetický metabolismus

Respirační metabolismus je pro MO důležitý při tvorbě energie, což je v podstatě oxidační rozklad sacharidů. Antimikrobiální látky inhibují nebo dokonce zabraňují produkci energie v patogenních bakteriích, tím inhibují absorpci a transport živin, růst a reprodukci (Ulanowska a kol., 2006). Například tymián inhibuje syntézu ATP u *Salmonella typhimurium* (Pasqua a kol., 2010).

### 3.4.1.3 Vliv na genetický materiál

Genetický materiál (DNA nebo RNA) hraje hlavní roli v růstu, vývoji, reprodukci a mutaci. Přesnost a stabilita sebereplikace zajišťuje kontinuitu dědictví mezi rodiči. Genetický materiál navíc řídí syntézu a metabolismus proteinů. Proto destrukce tohoto materiálu ovlivní normální fungování buňky (Ya-Ru a kol., 2014).

## 3.4.2 Synergie, antagonismus

Synergismus či antagonismus kombinací EO závisí na typech EO a MO. Různé EO a MO mohou mít různé účinky. Thymol a carvol mají synergické inhibiční účinky na *E-Coli* O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Aspergillus niger* (Guarda a kol., 2011). V jiné studii kombinace EO skořice a hřebíčku antagonizovala růst *E-Coli* a vykazovala synergický účinek na *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* a *Yersinia enterocolitica* (Moleyar a Narasimham, 1992). Proto je obtížné přímo předpovědět antimikrobiální účinnost směsi EO.

Celý EO vykazuje silnější antimikrobiální aktivitu než hlavní složky. Například *Ocimum basilicum* má silnější inhibiční účinek na *Lactobacillus campylobacter* a *S. cerevisiae* než jeho hlavní složky linalool nebo methyl piperol (Lachowicz a kol., 1998). Studie Mourey a Canillac, (2002) toto potvrzuje u jehličnanů proti *L. monocytogenes*. Toto zjištění ukazuje, že i stopové složky v EO mohou být velmi důležité při působení proti bakteriím.

Je však důležité poznamenat, že EO jsou komplexní směsi složené z mnoha molekul, potenciálně se vzájemným synergickým i antagonistickým účinkem, takže jejich vlastnosti silně závisí na jejich kombinaci s jinými sloučeninami. Srovnávací studií mezi olejem z tea tree (*Melaleuca alternifolia*) a jeho hlavní složkou, terpinen-4olem, na morfofunkčních parametrech prasečích spermii. Výsledky ukázaly, že ačkoli terpinen-4-ol představoval > 40 % použitého *M. alternifolia* EO, vzorce toxicity byly velmi odlišné a bylo možné je připsat nějaké synergické interakci mezi jinými složkami. Vzhledem k výše uvedenému, protože se koncept synergie jeví jako extrémně relevantní, není možné převést výsledky získané použitím izolovaných složek na celou směs v rámci daného EO. Bohužel, přes všechny dobré potenciální schopnosti, tyto rozdíly a potřeba specifických studií a testů na každé jednotlivé šarži EO představují hlavní úskalí jejich aplikací (Bakkali a kol., 2023).

### 3.4.3 Vliv silic na spermie

EO získaný ze *Satureia montana* má prokázanou antibakteriální aktivitu v koncentraci nižší, než je koncentrace považovaná za toxickou pro kančí spermie (0,5mg/ml). Konkrétně, jak uvádí literatura, *S. montana* EO uvádí hodnotu MIC 0,39 mg/ml vůči *Staphylococcus aureus* (Vitanza a kol., 2019), MIC <0,5 mg/ml také proti *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Strepto-coccus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus* (Chouchan a kol., 2017). Z testovaných EO by tedy *S. montana* byla velmi dobrým kandidátem pro pokračování ve zkoumání jejího potenciálního použití pro dávky AI pro prasata, jelikož je aktivní proti většině nejběžnějších bakteriálních populací izolovaných z kančích ejakulátů.

*Levandula angustifolia* má silné antibakteriální a antimykotické účinky, zejména proti *Candida spp.* Analýza antimikrobiální aktivity proti orálním patogenním bakteriím ukázala, že levandulový olej má hodnoty MIC v rozmezí od 0,002 do 0,512 mg/ml (Pokajewicz a kol., 2023). Životaschopnost spermií byla ovlivněna pouze nejvyšší testovanou koncentrací (1 mg/ml) silice z *Levandula hybrida* a *Citrus limon...* Celkově jediný parametr, který byl ovlivněn již při střední koncentraci (0,5 mg/ml) byla motilita, i když až po 120 hodinách. Při porovnání těchto poznatků s dostupnou literaturou se ukazuje, že *L. hybrida* má antimykotický účinek ve velmi nízkých koncentracích a že *C. limon* může úspěšně inhibovat rozvoj *Listeria monocytogenes* v mletém hovězím mase již při 0,06–0,312 mg/g (Hsouna a kol., 2017).

*Mentha piperita* a *Melaleuca leucadendron* vykazují poškození při kontaktu s nejvyšší koncentrací 1 mg/ml. Zejména pro *M. piperita* se koncentrace 0,1 a 0,5 mg/ml zdají být velmi dobře tolerovány, přičemž doba skladování je relevantní pouze pro akrozomální reakce a celkovou motilitu. EO byl testován proti *S. aureus*, *S. pyogenes* a *S. mutans*, s výstupními MIC přibližně 0,6 mg/ml (Nikolic a kol., 2014). Tyto hodnoty jsou slibné, protože se blíží dobře tolerované koncentraci 0,5 mg/ml. Pro *M. leucadendron* není k dispozici mnoho literatury, takže pro lepší pochopení jejich potenciálu jsou zapotřebí další studie.

*Cymbopogon nardus* se zdá být velmi dobře tolerován ve všech testovaných koncentracích, navzdory mírnému snížení celkové motility, ale pouze po 120 hodinách inkubace. Hypotézou v tomto případě je, že takový účinek při 1 mg/ml může být zprostředkován mírnou interakcí s mitochondriální funkcí vedoucí k narušení buněčného energetického metabolismu, čímž se sníží produkce energie a buněčná dysfunkce. Co se týče *Eucalyptus globulus*, post-hoc testy neukázaly žádné rozdíly mezi ošetřenými vzorky a kontrolními vzorky. V tomto případě je nárůst akrozomálních reakcí a zjištěná ztráta motility zohledněn pouze dobou skladování. Stále je třeba uznat, že nedostatek statistické významnosti pro motilitu po 120 hodinách po ošetření 1 mg/ml, potenciálně kvůli použitému statistickému přístupu a velikosti vzorku, neznamená nedostatek biologické relevance, protože pohyblivost skutečně je téměř zcela potlačena. Literatura prokazuje antibakteriální aktivitu tohoto EO, a to jak samotného, tak v kombinaci s jinými látkami, a to i proti kmenům bakterií *Staphylococcus aureus* rezistentních na meticilin, s hodnotami MIC v rozmezí od 0,032 do 10 mg/ml (Elangovan a Mudgil, 2023).

Troisio a kol., (2024) osvětlil roli karvakrolu jako zmírňujícího činidla pro snížení kvality kančího spermatu během skladování za chladných podmínek: jeho schopnost snižovat produkci látek reaktivních s kyslíkem a regulovat mitochondriální aktivitu ve spermatu prasat z něj činí slibný antioxidant (Restrepo a kol., 2023). Carvacrol je terpen patřící do třídy monoterpenů, vznikl spojením dvou jednotek izoprenu (C10) a je složkou vyskytující se v různých rostlinách. Jako všechny terpeny i karvakrol vykazuje aktivitu závislou na koncentraci, přičemž vyšší koncentrace vedou ke škodlivým účinkům. Mezi EO použitými v práci Troisio a kol., (2024) vykazovala *S. montana* nejvyšší obsah karvakrolu (52,56 %) a byla skutečně jednou z testovaných sloučenin, která vyvolala nejsilnější změny morfofunkčních parametrů, což podpořilo převládající biologickou aktivitu karvakrolu.

## 4. Metodika

### 4.1 Chemikálie a kultivační média

Pro kultivaci bakterií byl použit Mueller-Hinton bujón CMO405 (MHB) od Oxoid (Basingstoke, UK) pufrovaný Tris-buffered saline Trisma base (TBS) od firmy Sigma-aldrich z USA. pH bylo upraveno na 7,2 pomocí kyseliny chlorovodíkové od firmy Lach-ner s.r.o. z Neratovic. Tween 80 od firmy Lach-ner s.r.o. z Neratovic a ethanol 96% naředěný na 70 % od firmy vwr chemicals z Bulharska a deionizovaná voda byly použity jako rozpouštědla pro rozpuštění testovaných silic a kontrolních antibiotik. Jako antibiotická kontrola byl použit Tetracyklin od firmy Sigma-aldrich z Číny a penicilin G sodium salt také od firmy Sigma-aldrich z Číny. Pro kontrolu bakteriálního nárůstu při vyhodnocení bylo použito barvivo MTT (Thiazole blue) od firmy Sigma-Aldrich.

### 4.2 Silice a mikroorganismy

Badyán (*Illicium verum*), Borovice (*Pinus sylvestris*), Eukalypt (*Eucalyptus globulus*), Kajeput (*Melaleuca leucadendron cajeputi*), Kadidlovník (*Boswellia carterii*), Levandule (*Lavandula angustifolia*), Libavka (*Gaultheria procumbens*), Manuka (*Leptospermum scoparium*), Rosalina (*Melaleuca ericaefolia*), Šalvěj (*Salvia officinalis*), Saturejka (*Satureia hortensis*), Skořice (*Cinnamomum cassia*), Tea tree (*Melaleuca alternifolia*), Zázvor (*Zingiber officinale*). Těchto 14 silic bylo testováno proti 4 druhům bakterií. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### 4.3 Příprava inokula

Ze zásobní zkumavky s čistým bakteriálním kmenem, bylo debráno sterilní stříkačkou a jehlou malé množství obsahu (2-3 kapky), které bylo následně přeneseno do sterilní popsané zkumavky s připraveným bujónem MHB. Takto připravené inokulum bylo kultivováno při teplotě 37 °C po dobu 12 hodin v termostatu.

## 4.4 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Minimální inhibiční koncentrace byla stanovena pomocí modifikované bujónové mikrodiluční metody podle doporučení CLSI (CLSI, 2009). Testované silice byly rozpuštěny ve směsi ethanolu a Tweenu v poměru 2:1 a naředěny 1:100 v kultivačním médiu na požadovanou počáteční koncentraci 8200 µg/ml.

Do mikrotitrační destičky bylo aplikováno mikropipetou 100µl média MHB+TBS. Poté bylo přidáno do prvních jamek 100µl daných druhů silic ve třech opakováních. Design pokusu byl pokaždé jiný v závislosti na zkoumaných silicích a bakterií. Následně se silice rozředila geometrickou řadou. Nejprve jsme silice otestovali samostatně pro zjištění minimální inhibiční koncentrace (MIC), dále byly zkoumány v kombinaci pro dokázání případné synergie či antagonismu pomocí šachovnicové metody. Destičky poté byly zaočkovány standardizovaným inokulem tak, aby koncentrace bakterií v zaočkovaných jamkách dosahovala přibližně  $5 \times 10^5$  KTJ/ml. Výsledky byly vyhodnoceny po 24 hodinách inkubace při 37°C. Pokaždé byla současně testovaná antibiotická kontrola.

Jako MIC byla vyhodnocena nejnižší koncentrace inhibující viditelný bakteriální nárůst. V případě vysokých koncentrací silic byl bakteriální nárůst pouhým okem obtížně vyhodnotitelný v důsledku tvorby přirozeného zákalu. V takovém případě byla přítomnost vitálních bakterií potvrzena/vyvrácena pomocí barviva MTT, které je bakteriemi metabolizováno za vzniku fialového pigmentu.

Šachovnicovou metodou byly testovány silice ve směsi o koncentraci v rozmezí od 4100µg/ml do 32 µg/ml opět pokaždé ve třech opakováních. Ředění probíhalo křížem, tak aby byla zředěná každá silice s každou. Souběžně byly na destičce testovány MIC jednotlivých silic. Kultivace probíhala stejně jako u předchozí metody.

Celý pokus byl prováděn ve sterilním prostředí v digestoři.



## 4.5 Vyhodnocování výsledků kombinací silic

Vyhodnocení účinku kombinace silic byl proveden podle následujícího součtu frakčních inhibičních koncentrací (FICI). FIC je matematickým vyjádřením účinku kombinace antibakteriálních látek.

$$FIC A = \frac{MIC \text{ silice } A \text{ v kombinaci}}{MIC \text{ samostatné silice } A}$$

$$FIC B = \frac{MIC \text{ silice } B \text{ v kombinaci}}{MIC \text{ samostatné silice } B}$$

$$FICI = FIC_A + FIC_B$$

Vyhodnocení interakcí dle FICI (Eucast, 2000):

$\geq 2$	antagonismus
1–2	indiference
0,5 – 1	aditivní účinek
$\leq 0,5$	synergie

Antagonismus je pozorován, pokud je účinek kombinace silic snížený ve srovnání s účinkem nejúčinnější samostatné látky. Indiferenci můžeme vysvětlit jako nezávislý účinek kombinace silic a inaktivovaných látek, který je stejný jako účinek nejúčinnější složky. Aditivní účinek kombinace silic je takový, u kterého je účinek kombinace roven součtu účinků jednotlivých složek nebo mírně zvýšený. Pokud účinek kombinace převyšuje aditivní účinky jednotlivých složek, můžeme tvrdit, že se jedná o synergii (Eucast, 2000).

## 4.6 Analýza chemického složení silic

Analýza byla provedena na katedře kvality a bezpečnosti potravin FAPPZ na plynovém chromatografu Agilent 7890A GC, spojeným s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975C MSD, vybaveným nepolární kolonou HP – 5MS (30m x 0,250mm x 0,25 $\mu$ m). Vzorky silic byly před analýzou rozpuštěny v hexanu v poměru 1:1000. Jeden  $\mu$ l vzorku byl nastříknut do nástříkové jednotky vyhřáté na 250 °C ve splitovém poměru 12:1. Průtok nosného plynu (helila) byl nastaven na 1 ml/min. Teplotní program byl nastaven na počátečních 60 °C na 3 min., poté byla teplota zvyšována rychlostí 3 °C/min. až na konečných 231 °C, kde byla tato teplota byla udržována konstantní po dobu dalších 10 min. Ionizační energie detektoru byla nastavena na 70 eV a data byla zaznamenána v tzv. full scan režimu. Jednotlivé látky byly identifikovány pomocí porovnání hmotnostních spekter a retenčních indexů s National Institute of Standards and Technology Library (NIST, USA) a literaturou. U většiny hlavních složek byla identifikace potvrzena pomocí autentických chemických standardů. Procentické zastoupení jednotlivých složek v silicích bylo vyjádřeno na základě relativního procentického zastoupení ploch jednotlivých píků v poměru k součtu ploch všech píků.

## 5. Výsledky

Ze 14-ti testovaných silic byla u 8 potvrzena antimikrobiální aktivita alespoň proti jedné bakterii, 4 silice inhibovaly alespoň dva druhy bakterií, silice z tea tree inhibovala tři druhy bakterií. Proti všem čtyřem testovaným bakteriím byla účinná pouze skořice v koncentraci  $\leq 512$ – $2050 \mu\text{g/ml}$ . Nejideálnější kombinací se jevila skořice s borovicí či manukou, která znemožnila nárůst všem čtyřem testovaným druhům bakterií v koncentraci od  $\leq 256$  do  $1024 \mu\text{g/ml}$ . Nejvíce silice zabraňovaly růstu *E. coli*, a to v případě 5 silic v koncentracích od  $\leq 512$  do  $8200 \mu\text{g/ml}$ . Dále proti *P. aeruginosa* byly účinné 4 silice v koncentraci od  $2050$  do  $8200 \mu\text{g/ml}$ . *S. aureus* inhibovaly 3 silice od  $\leq 512$  do  $8200 \mu\text{g/ml}$  a *E. faecalis* pouze 2 o stejné koncentraci  $1025 \mu\text{g/ml}$  (tabulka 1).

Největší množství kombinací projevující synergický účinek se vyskytovalo proti *S. aureus* v koncentraci  $2048 \mu\text{g/ml}$ . Nejsilnější synergie byla zjištěna u kombinace tea tree se saturijkou proti *E. faecalis*, která snížila koncentraci silic potřebnou k inhibici 16krát, to je o 93,8 %. Dobře také fungovalo kadidlo s eukalyptem proti *E. coli*, která snižovala inhibující koncentraci z  $\geq 8200$  na  $2048$ , tedy minimálně o 81,52 %. Stejně na tom byla i borovice s kadidlem proti *S. aureus*. O trochu méně inhibovalo *S. aureus* tea tree s kadidlem, kajeputem a borovicí, kde se koncentrace potřebná k inaktivaci bakterií snížila o 75 %.

Nejčastější účinná koncentrace kombinací silic proti *E. faecalis* byla  $1024 \mu\text{g/ml}$  s indiferentním účinkem (tabulka 2). *E. coli* byla nejčastěji inhibována koncentrací  $2048 \mu\text{g/ml}$  s indiferentním či aditivním účinkem (tabulka 3). *S. aureus* byl inhibován převážně koncentracemi od  $256$  do  $512 \mu\text{g/ml}$ , a proto se řadí mezi nejúčinněji inhibovatelný organismus z testovaných bakterií (tabulka 4).

Nejvyšší koncentrace testovaných silic účinných pro inhibici bakterií byly zjištěny u *P. aeruginosa* (tabulka 3). Lze předpokládat, že pokud je kombinace silic schopna inhibovat *P. aeruginosa*, s velkou pravděpodobností inhibuje i ostatní testované bakterie ve stejné či nižší koncentraci. Proto bylo testování kombinací šachovnicovou metodou zaměřeno zejména na *P. aeruginosa* (tabulka 6,7,8,9,10).

**Tab 1.:** Minimální inhibiční koncentrace testovaných silic (µg/ml)

Silice	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Tea tree	8200	4100	2050	>8200
Libavka	>8200	>8200	>8200	>8200
Rosalina	>8200	>8200	>8200	>8200
Kadidlovník	>8200	8200	>8200	
Zázvor	>8200	>8200	>8200	>8200
Levandule	>8200	>8200	>8200	>8200
Borovice	>8200	>8200	2050	≤512
Skořice	≤512	2050	512	1025
Šalvěj	>8200	>8200	>8200	>8200
Manuka	≤512	>8200	8200	1025
Badyán	>8200	>8200		>8200
Kajeput	>8200	>8200	≤512	>8200
Eukalypt	>8200	8200	>8200	>8200
Saturejka	4100	>8200	2050	>8200

Nejúčinnější silicí proti všem testovaným bakteriím byla skořice s MIC ≤512–2050 µg/ml. Naopak mezi nejméně účinné silice patří libavka, rosalina, zázvor, levandule, šalvěj a badyán, u kterých přesná MIC zjištěna nebyla, jelikož maximální koncentrace se testovala 8200 µg/ml. U badyánu proti *E. coli* a kadidlovníku proti *E. faecalis* vyšly nejasné výsledky, proto není MIC vyplněna.

**Tab 2.:** Výsledky kombinací silic proti *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (µg/ml)

Silice	Badyán	Borovice	Eukalypt	Kajeput	Levandule	Libavka	Manuka	Rosalina	Šalvěj	Saturejka	Skořice	Tea Tree	Zázvor
<i>Badyán</i>	>8192												
<i>Borovice</i>		≤512		>4096 ANT			1024 IND				<256 ADD	2048 IND	
<i>Eukalypt</i>			>8192	>4096 n.a.			1024 IND			>4096 n.a.	1024 IND	>4096 n.a.	
<i>Kajeput</i>				>8192			1024 IND			>4096 n.a.	<b>512</b> ADD		
<i>Levandule</i>					>8192								
<i>Libavka</i>						>8192							
<i>Manuka</i>							1024			1024 IND	1024 IND	1024 IND	
<i>Rosalina</i>								>8192					
<i>Šalvěj</i>									>8192				
<i>Saturejka</i>										>8192	1024 IND	<b>1024</b> SYN	
<i>Skořice</i>											1024	1024 IND	
<i>Tea Tree</i>												>8192	
<i>Zázvor</i>													>8192

SYN= synergie, ANT= antagonismus, IND= bez interakce, ADD= aditivní účinek, n.a.= nepoužitelné výsledky, v šedém políčku jsou znázorněné koncentrace jednotlivých silic

Minimální inhibiční koncentrace samostatných silic vycházela nejlépe u Borovice

≤512 µg/ml a Skořice 1024 µg/ml. Jedinou synergickou interakci prokazovala Saturejka a Tea Tree o koncentraci každé silice 512 µg/ml. Aditivní účinek se ukázal u Skořice a Borovice, Skořice a Kajeputu. Bez interakce byla Manuka ve všech kombinacích, Skořice a Tea Tree, Skořice a Saturejka, Eukalypt a Skořice, Tea Tree a Borovice. Výsledek nelze hodnotit u Eukalyptu s Kajeputem, Saturejkou a Tea Tree a u Kajeputu se Saturejkou z důvodu vysokého nárůstu. Nevíme přesnou MIC jednotlivých EO. Antagonismus je patrný u Kajeputu a Borovice.

**Tab 3:** Výsledky kombinací silic proti *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ( $\mu\text{g/ml}$ )

Silice	Badyán	Borovice	Eukalypt	Kadidlo	Kajeput	Levandule	Libavka	Manuka	Rosalina	Šalvěj	Saturejka	Skořice	Tea Tree	Zázvor
<i>Badyán</i>	>8192													
<i>Borovice</i>		>8192	<b>4096 ADD</b>	>4096 IND	>4096 n.a.			<b>4096 ADD</b>			>4096 n.a.	<b>1024 ADD</b>	<b>2048 ADD</b>	
<i>Eukalypt</i>			8192	4096 IND	>4096 IND			<b>4096 ADD</b>			>4096 IND	<b>1024 ADD</b>	<b>2048 ADD</b>	
<i>Kadidlo</i>				8192	>4096 IND			>4096 IND			>4096 IND	<b>1024 ADD</b>	<b>2048 ADD</b>	
<i>Kajeput</i>					>8192			<b>2048 SYN</b>			>4096 n.a.	2048 IND	>4096 IND	
<i>Levandule</i>						>8192								
<i>Libavka</i>							>8192							
<i>Manuka</i>								>8192			>4096 n.a.	<b>1024 ADD</b>	<b>2048 ADD</b>	
<i>Rosalina</i>									>8192					
<i>Šalvěj</i>										>8192				
<i>Saturejka</i>											>8192	<b>1024 ADD</b>	<b>2048 ADD</b>	
<i>Skořice</i>												2048	<b>1024 ADD</b>	
<i>Tea Tree</i>													4096	
<i>Zázvor</i>														>8192

SYN= synergie, ANT= antagonismus, IND= bez interakce, ADD= aditivní účinek, n.a.= nepoužitelné výsledky, v šedém políčku jsou znázorněné koncentrace jednotlivých silic

Minimální inhibiční koncentrace samostatných silic vycházela nejlépe u Skořice 2048  $\mu\text{g/ml}$  a Tea Tree 4096  $\mu\text{g/ml}$ . Jedinou synergickou interakci prokazovala Manuka a Kajeput o koncentraci každé silice 1024  $\mu\text{g/ml}$ . Aditivní účinek se ukázal u většiny kombinací. Bez interakce bylo Kadidlo ve všech kombinacích, kromě se skořicí a tea tree a kajeput s kadidlem. Výsledek nelze hodnotit u Saturejky s Borovicí, Kajeputem a manukou a Kajeputem a borovicí z důvodu vysokého nárůstu. Nevíme přesnou MIC jednotlivých EO. Antagonismus není patrný u žádné kombinace.

**Tab 4.:** Výsledky kombinací silic proti *Escherichia coli* ATCC 25922 (µg/ml)

Silice	Borovice	Eukalypt	Kadidlo	Kajeput	Levandule	Libavka	Manuka	Rosalina	Šalvěj	Saturejka	Skořice	Tea Tree	Zázvor
<i>Borovice</i>	2048	2048 IND	<b>1024 ADD</b>	2048 IND			2048 IND			2048 IND	<b>&lt;256 ADD</b>	<b>2048 ADD</b>	
<i>Eukalypt</i>		>8192	<b>2048 SYN</b>	<b>4096 ANT</b>			<b>4096 ADD</b>		<b>4096 ADD</b>	4096 IND	512 IND	<b>2048 ADD</b>	
<i>Kadidlo</i>			>8192	2048 IND			<b>4096 ADD</b>			2048 IND	512 IND	<b>2048 ADD</b>	
<i>Kajeput</i>				<512			<b>4096 ANT</b>			<b>4096 ANT</b>	<256 IND	>4096 IND	
<i>Levandule</i>					>8192								
<i>Libavka</i>						>8192							
<i>Manuka</i>							8192			4096 IND	<b>&lt;256 ADD</b>	<b>2048 ADD</b>	
<i>Rosalina</i>								>8192					
<i>Šalvěj</i>									>8192				
<i>Saturejka</i>										2048	512 IND	<b>2048 ADD</b>	
<i>Skořice</i>											512	<b>1024 ADD</b>	
<i>Tea Tree</i>												2048	
<i>Zázvor</i>													>8192

SYN= synergie, ANT= antagonismus, IND= bez interakce, ADD= aditivní účinek, n.a.= nepoužitelné výsledky, v šedém políčku jsou znázorněné koncentrace jednotlivých silic

Minimální inhibiční koncentrace samostatných silic vycházela nejlépe u Kajeputu  $\leq 512$  µg/ml a Skořice 512 µg/ml. Jedinou synergickou interakci prokazoval Eukalypt s kadidlem o koncentraci každé silice 1024 µg/ml. Aditivní účinek se ukázal u všech kombinací tea tree kromě kombinace s kajeputem, kde byl účinek indiferentní. Dále skořice a manuka, skořice a borovice, šalvěj a eukalypt, Manuka s eukalyptem a kadidlem a kadidlo s borovicí. Bez interakce byly zbylé kombinace skořice, saturejky kromě jedné s kajeputem, kde se projevil antagonismus, borovice s eukalyptem a kajeputem a kajeput s kadidlem. Výsledek lze hodnotit u všech.

**Tab 5.:** Výsledky kombinací silic proti *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (µg/ml)

Silice	Badyán	Borovice	Eukalypt	Kadidlo	Kajeput	Levandule	Libavka	Manuka	Rosalina	Šalvěj	Saturejka	Skořice	Tea Tree	Zázvor
<i>Badyán</i>	>8192													
<i>Borovice</i>		>8192	4096 IND	2048 SYN	4096 ADD			<256 ADD			4096 IND	<256 ADD	2048 SYN	
<i>Eukalypt</i>			>8192	4096 ADD	>4096 n.a.			512 IND			>4096 IND	512 IND	1024 ADD	
<i>Kadidlo</i>				>8192	4096 ADD			512 IND			2048 ADD	512 IND	2048 SYN	
<i>Kajeput</i>					>8192			<256 ADD			4096 IND	1024 IND	2048 SYN	
<i>Levandule</i>						>8192								
<i>Libavka</i>							>8192							
<i>Manuka</i>								≤512			<256 ADD	512 IND	<256 ADD	
<i>Rosalina</i>									>8192					
<i>Šalvěj</i>										>8192				
<i>Saturejka</i>											4100	512 IND	2048 ADD	
<i>Skořice</i>												≤512	512 IND	
<i>Tea Tree</i>													8192	
<i>Zázvor</i>														>8192

SYN= synergie, ANT= antagonismus, IND= bez interakce, ADD= aditivní účinek, n.a.= nepoužitelné výsledky, v šedém políčku jsou znázorněné koncentrace jednotlivých silic

Tato bakterie je nejméně odolná vůči testovaným silicím, a proto výsledky proti ní vychází nejlépe. Minimální inhibiční koncentrace samostatných silic vycházela nejlépe u manuky ≤512 µg/ml a Skořice 512 µg/ml. Synergickou interakci prokázaly 4 kombinace o koncentraci každé silice 1024 µg/ml, Borovice a tea tree, Borovice a Kadidlo, Tea tree a kadidlo a tea tree kajeput. Aditivní účinek se ukázal u kadila s eukalyptem, kajeputu s borovicí a kadidlem, manuky s borovicí a kajeputem, saturejky s kadidlem a manukou, skořice a borovice, tea tree s eukalyptem, manukou a saturejkou. Bez interakce byla skořice ve všech kombinacích kromě borovice, saturejka s borovicí, eukalyptem a kajeputem, manuka s kadidlem a eukalyptem a eukalypt s borovicí. Výsledek nelze hodnotit jen u Eukalyptu s Kajeputem, stejně jako tomu bylo u *Enterococcus faecalis* z důvodu vysokého nárůstu MIC. Nevíme přesnou koncentraci jednotlivých EO. Antagonismus se proti této bakterii nevyskytoval.

**Tab 6.:** Kombinace skořice a borovice proti všem testovaným bakteriálním kmenům prováděná křížovou metodou

	Samostatná		Koncentrace borovice (µg/ml)													
	MIC		2050		1025		513		256		128		64		32	
	Skořice	Borovice	MIC skoř	FICI	MIC skoř	FICI	MIC skoř	FICI	MIC skoř	FICI	MIC skoř	FICI	MIC skoř	FICI	MIC skoř	FICI
<i>E. coli</i> ATCC 25922	512,5	1025	32	2,063	64	1,125	256	1,000	256	0,750	256	0,625	256	0,563	256	0,531
			≤32	n.a.		IND		AD		AD		AD		AD		AD
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2048	8192	513	0,501	513	0,376	513	0,313	513	0,282	513	0,266	513	0,258	513	0,254
				AD		SYN		SYN		SYN		SYN		SYN		SYN
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	512,5	2048	128	1,251	256	1	256	0,750	256	0,625	256	0,562	256	0,531	128	0,265
				IND		IND		AD		AD		AD		AD		SYN
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1025	256	32	8,039	32	4,035	32	2,033	513	1,501	513	1,001	513	0,751	513	0,626
			≤32	n.a.		n.a.		ANT		IND		IND		AD		AD

SYN= synergie, ANT= antagonismus, IND= bez interakce, ADD= aditivní účinek, n.a.= nepoužitelné výsledky, MIC= minimální inhibiční koncentrace, FICI= frakční inhibiční koncentrace

**Tab 7.:** Kombinace manuky a borovice proti *P. aeruginosa* křížovou metodou

	Samostatná		Koncentrace borovice (µg/ml)													
	MIC		2050		1025		513		256		128		64		32	
	Manuka	Borovice	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>8200	>8200	>4100		>4100		>4100		>4100		>4100		>4100		>4100	
				n.a.		n.a.		n.a.		n.a.		n.a.		n.a.		n.a.

SYN= synergie, ANT= antagonismus, IND= bez interakce, ADD= aditivní účinek, n.a.= nepoužitelné výsledky, MIC= minimální inhibiční koncentrace, FICI= frakční inhibiční koncentrace

**Tab 8.:** Kombinace manuky a kajeputu proti *P. aeruginosa* křížovou metodou

	Samostatná		Koncentrace kajeputu (µg/ml)													
	MIC		2050		1025		513		256		128		64		32	
	Manuka	Kajeput	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>8200	>8200	>4100		>4100		>4100		>4100		>4100		>4100		>4100	
				n.a.		n.a.		n.a.		n.a.		n.a.		n.a.		n.a.

SYN= synergie, ANT= antagonismus, IND= bez interakce, ADD= aditivní účinek, n.a.= nepoužitelné výsledky, MIC= minimální inhibiční koncentrace, FICI= frakční inhibiční koncentrace



**Tab 9.:** Kombinace Manuky a Tea tree proti *P. aeruginosa* křížovou

	Samostatná		Koncentrace teatrea (µg/ml)													
	MIC		4100		2050		1025		513		256		128		64	
	Manuka	Tea Trea	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI
<i>P.aeruginosa</i>	>8200	4100	32	1,002	4100	0,750	4100	0,500	4100	0,375	4100	0,312	4100	0,281	4100	0,266
<i>ATCC 27853</i>				IND		AD		AD		SYN		SYN		SYN		SYN

SYN= synergie, ANT= antagonismus, IND= bez interakce, ADD= aditivní účinek, n.a.= nepoužitelné výsledky, MIC= minimální inhibiční koncentrace, FICI= frakční inhibiční koncentrace

**Tab 10.:** Kombinace Manuky a Skořice proti *P. aeruginosa* křížovou

	Samostatná		Koncentrace skořice (µg/ml)													
	MIC		2050		1025		513		256		128		64		32	
	Manuka	Skořice	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI	MIC man	FICI
<i>P.aeruginosa</i>	>8200	2050	32	1,002	2050	0,625	4100	0,500	4100	0,375	4100	0,313	4100	0,281	4100	0,266
<i>ATCC 27853</i>				IND		AD		AD		SYN		SYN		SYN		SYN

SYN= synergie, ANT= antagonismus, IND= bez interakce, ADD= aditivní účinek, n.a.= nepoužitelné výsledky, MIC= minimální inhibiční koncentrace, FICI= frakční inhibiční koncentrace

**Tabulka 11.:** Chemické složení testovaných silic

Složka	RI	RI <sub>Lit</sub>	Kajeput	Tea tree	Borovice	Skořice	Saturejka	Eukalyptus	Manuka	Kadidlovník
<i>α</i> -Thujene	932	931	0,14	0,78			0,77			2,08
<i>α</i> -Pinene <sup>a</sup>	941	939	1,60	2,66	44,74		1,34	3,28	1,33	43,17
Camphene <sup>a</sup>	957	953			1,44					0,90
Sabinene	979	976								4,72
<i>β</i> -Pinene <sup>a</sup>	984	980	1,07	0,57	20,54		0,65	0,17		1,40
<i>β</i> -Myrcene <sup>a</sup>	993	991	0,91	0,31	1,72		1,11			3,16
<i>α</i> -Phellandrene <sup>a</sup>	1009	1005	0,13				0,16			
3-Carene <sup>a</sup>	1016	1011			10,63					1,26
<i>α</i> -Terpinene <sup>a</sup>	1022	1018	0,23	0,28			2,15			
<i>p</i> -Cymene <sup>a</sup>	1031	1026	1,00	25,88	2,04		16,03	4,72		4,84
Limonene <sup>a</sup>	1035	1031			9,82					19,74
Eucalyptol <sup>a</sup>	1038	1033	67,94	5,48				91,69	0,18	
<i>γ</i> -Terpinene <sup>a</sup>	1065	1062	0,97	3,25			31,82			
Terpinolene <sup>a</sup>	1093	1088	0,75	0,67						
Linalool <sup>a</sup>	1102	1098	2,37							
Borneol <sup>a</sup>	1175	1165					0,33			
Terpinen-4-ol <sup>a</sup>	1185	1177	0,76	44,92			0,36			
<i>α</i> -Terpineol <sup>a</sup>	1197	1189	12,61	3,17	0,57					0,23
<i>E</i> -Cinnamaldehyde <sup>a</sup>	1280	1266				91,70				
Bornyl acetate	1292	1285			2,43					
Thymol <sup>a</sup>	1296	1298					0,56			
Carvacrol <sup>a</sup>	1306	1285					42,63			
<i>α</i> -Cubebene	1359	1351							3,45	
Copaene	1387	1376				0,42			6,16	
<i>α</i> -Gurjunene	1422	1409							0,83	
Caryophyllene <sup>a</sup>	1433	1418	1,55	0,23	0,56		1,10		1,86	1,89
Aromandendrene	1453	1439		2,05					2,20	
Cadina-3,5-diene	1464	1454							0,64	
Humulene <sup>a</sup>	1468	1454	1,00							
Alloaromadendrene	1475	1461		0,64					0,65	
<i>δ</i> -Cadinene	1535	1524				0,22				
<i>Z</i> -Calamenene	1535	1521							30,22	
Flavesone	1553	1538							4,29	
Spathulenol	1592	1576		0,41					0,60	
Caryophyllene oxide <sup>a</sup>	1598	1581			1,06		0,30		1,22	2,36
Isoleptospermone	1629	1615							4,71	
Leptospermone	1637	1620							19,13	
<b>Celkem identifikováno</b>			<b>93,02</b>	<b>91,30</b>	<b>95,56</b>	<b>92,35</b>	<b>99,32</b>	<b>99,86</b>	<b>77,46</b>	<b>85,74</b>

 RI: retenční index, <sup>a</sup>: identifikace potvrzena autentickým standardem

## 6. Diskuze

Pro diskusi o celkových výsledcích této práce je důležité uvést, že přesné složení různých EO se mění nejen mezi rostlinami, ale také v rámci stejné rostliny během různých fází jejího růstového cyklu. To je důvod, proč je při vyšetřování a vykazování údajů pro EO rozhodující posouzení a zohlednění jejich přesného složení (Troisio a kol., 2024)

Studie Sethuga a kol., 2023 prokázala že silice získaná z *Cinnamomum zeylanicum* je vysoce aktivní proti všem testovaným mikroorganismům, včetně *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* a *Aspergillus niger*. V kombinaci se zázvorovým olejem vykazovala synergickou aktivitu proti *Bacillus subtilis*. S hřebíčkovým olejem projevila synergii proti *Aspergillus niger*. Dále v kombinaci s antibiotiky (chloramfenikol, ampicilin) proti *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*. Studie Mele, (2020) odhalila, že tato silice má nepříznivé účinky na bakteriální buňky jako je zvýšení permeability cytoplazmatické membrány u *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*, poškození morfologie a uvolnění proteinů, DNA a RNA. Dávka 1-6 mg/ml je vhodná pro inhibici všech testovaných mikrobů. V této práci nebyla zjištěna žádná synergie skořice s další silicí, ale vykazovala aditivní účinek s borovicí a manukou proti *E. coli*, s borovicí proti *S. aureus*, s borovicí, kajepudem, kadidlem, manukou a saturejkou proti *P. aeruginosa* a s borovicí a kajepudem proti *E. faecalis* v koncentraci (tabulka 2,3,4,5). Tento rozdíl mezi výsledky může být způsoben složením silic, jelikož ve studii Sethuga a kol., (2023) obsahovala skořice 57,5% trans-cinnamaldehyde, 6,5 %  $\beta$ -Caryophyllene, 5,9% eugenol a další látky. V této studii se zjistilo složení z 91,7 % Cinnamaldehyde(E)1268-1272, 7,3 % Methoxycinnamaldehyde 1566 a dalších minoritních složek.

Současné výsledky Nikolic a kol., (2017) podporují aplikaci EO *Melaleuca alternifolia*, *Citrus limon* a *Piper nigrum* proti bakteriálním a plísňovým infekcím. Nejsilnější aktivity proti bakteriím dosáhl EO *M. alternifolia* o koncentraci MIC 310–630  $\mu\text{g/ml}$ . V této studii byla zjištěna o dost vyšší MIC *M. alternifolia* proti zkoumaným druhům bakterií (tabulka 11). Proti *E. faecalis*  $\geq 8200 \mu\text{g/ml}$ , *S. aureus* 8200  $\mu\text{g/ml}$ , *P. aeruginosa* 4100  $\mu\text{g/ml}$ . Nejnížší inhibující koncentrace se vyskytovala u *E. coli* 2050  $\mu\text{g/ml}$ . Tato bakterie nebyla ve studii Nikolic a kol., (2017) testována, proto nemůžeme porovnat výsledek. Vyskytovalo se také rozdílné složení této silice v obou studiích. Zde bylo složení nejvíce zastoupených látek 44,9 % Terpinen-4ol, 25,9 % p-Cymene, 5,5 % Eucalyptol a další složky. Oproti studii Nikolic a kol., (2017), která zjistila ve složení opět nejvíce Terpinen-4olu (38,6 %), ale další složky již shodné nebyly.  $\gamma$ -Terpinene 21,7 %,  $\alpha$ -Terpinen 9,1 %, p-Cymene pouze 3,5 % a eucalyptol nebyl obsažen vůbec. Bohužel neexistují studie, které uvádějí použitelné výsledky synergických interakcí s *M. alternifolia*, se kterými by se dala získaná data porovnat, proto zde nejsou uvedena.

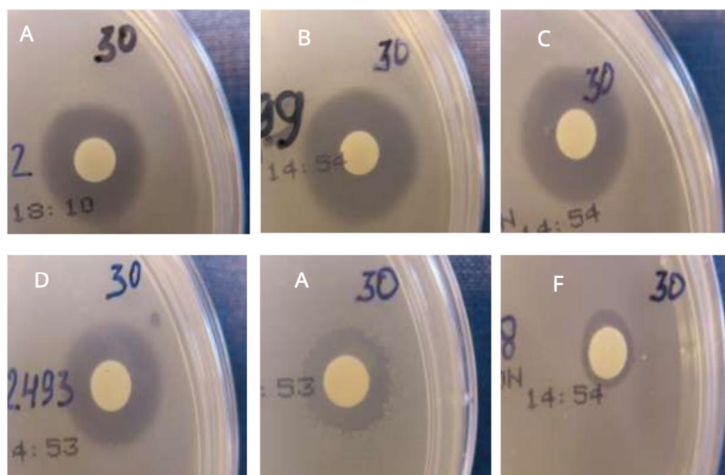
**Tab 11.:** Porovnání výsledků MIC *M. alternifolia* proti *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* u studie Nikolic a kol., 2017 s touto studií (µg/ml).

	Studie Nikolic a kol., (2017)	DP Košťřová, (2024)
<i>Staphylococcus aureus</i>	310	8200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	630	4100
<i>Enterococcus faecalis</i>	630	>8200

Frantini a kol., (2020) zjistili, že samostatné silice z manuky a saturejky prokázaly mírnou antibakteriální účinnost ve vysokých koncentracích 15 625 µg/ml a 31 250 µg/ml proti *E. coli* izolované z onemocnění prasat (např. novorozeneckého průjmu). Zatímco ve směsi působily synergicky. Zejména směs 70:30, která se projevila jako potenciální nástroj prevence a terapie inhibovala *E. coli* v koncentraci 1 953 µg/ml. V poměru 50:50 byly silice účinné v koncentraci 3 906 µg/ml a v poměru 30:70 byla MIC 7 812. V porovnání s touto studií neprokazovala saturejka s manukou žádnou synergickou interakci. Manuka projevila synergii s kajepuťem proti *P. aeruginosa* s MIC 2048 µg/ml a saturejka s tea tree proti *E. faecalis* s MIC 1024 µg/ml. Složení silic bylo v obou studiích podobné, lišilo se akorát procentuální zastoupení, ale i to může způsobit rozdílnost výsledků. U manuky bylo zjištěno ve studii Frantini a kol., (2020) 21,4 % cis-calamenene, 18,3 % leptospermone, 6,9 % flavesone a další složky. U saturejky majoritně 45,4 % carvacrol, 10,3 % p-cymene a 7 % thymol. V této studii obsahovala manuka 30,2 % cis-calamenene, 19,1 % leptospermone, 4,3 % flavesone a další složky. Saturejka se skládala převážně z 42,6 % carvacrolu, 31,8 % γ-Terpinene, 16 % p-Cymene.

Bylo zjištěno, že MIC borovice proti *P. aeruginosa* je >8200 µg/ml a proti *E. coli* 2050 µg/ml. Ve studii Njoku a kol., 2022 zjistili pomocí mikrodiluční bujónové metody nejvyšší citlivost silice z *Pinus silvestris* na *Klebsiella pneumoniae* s hodnotami MIC 65,5 µg/ml, *P. aeruginosa* MIC 78,3 µg/ml a *E. coli* 105,2 µg/ml. Tedy o dost nižší koncentrace, což může být způsobeno různými vlivy, například rozdílným složením silice, které v tomto případě bylo markantní. Njoku a kol., (2022) určili složení borovice z humulene 13,2 %, α-Guaiene 11,6 %, 9,4 % allo-ocimene, 8,9 % terpinolene a spoustu dalších. Tato studie prokázala složení borovice 44,7 % α-pinene, 20,5 % β-pinene, 10,6 % 3-carene a 9,8% D-limonene.

Výzkum Stefanowski a kol., (2022) prokázal, že kajeputový esenciální olej vykazuje antibakteriální vlastnosti. Nejcitlivější na tento olej byly grampozitivní bakterie, což může naznačovat, že účinné látky v kajeputové silice (včetně fenolových kyselin, tříslovin atd.) mohou být potenciálními prostředky proti bakteriálním infekcím. Z gramnegativní bakterií, byla inaktivována *Pseudomonas aeruginosa*. Statisticky významné změny v průměrech inhibice růstu po aplikaci silice cajeput jsme nezaznamenali oproti kontrolním vzorkům (96% etanol). Tato studie může naznačovat, že použití kajeputového esenciálního oleje může být užitečné pro širokou škálu bakteriálních infekcí ve veterinární či humánní medicíně, akvakultuře a dalších oborech.



**Obr 4.:** Inhibiční růstové zóny vyvolané kajeputovým esenciálním olejem proti (A) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, (B) *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, (C) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, (D) *Staphylococcus aureus* ATCC 12493, (E) *Escherichia coli* ATCC 25922, (F) *Escherichia coli* ATCC 35218 (Stefanowski a kol., 2022).

Podobné výsledky prokázali i ve studii Valdése a kol., (2008) proti *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*.

Výsledky Al-Abd a kol., (2015) odhalily, že extrakty z květů i listů nezpůsobily u testovaných gramnegativních bakterií žádné inhibiční zóny. Extrakty však prokázaly aktivitu proti *B. cereus*, *S. aureus* a *S. epidermidis*.

U žádného z výše uvedených výzkumů na antimikrobiální aktivitu kajeputu nebylo zjišťováno složení silice. V této studii bylo diagnostikováno složení 67,9 % eucalyptol, 12,6 %  $\alpha$ -Terpineol, 2,4 % linalool a další minoritní složky. Samostatná MIC vycházela nejlépe proti *E. coli* o koncentraci  $\leq 512$   $\mu\text{g/ml}$ . Proti ostatním bakteriím převyšovala MIC 8200  $\mu\text{g/ml}$ . Byl prokázán aditivní účinek se skořicí proti *E. faecalis*, synergický účinek s manukou proti *P. aeruginosa*, aditivní účinek s manukou a synergický účinek s tea tree proti *S. aureus* a antagonistický účinek s manukou, saturejkou a eukalyptem. Potvrdila se tedy antimikrobiální aktivita samostatného kajeputu proti *E. coli*. V kombinaci však proti této bakterii většinou nefunguje.

Antibakteriální aktivity esenciálního oleje *Eucalyptus globulus* (EOEG) byly stanoveny proti 7 patogenním bakteriím pro ryby (*Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, *S. parauberis*, *Lactococcus garviae*, *Vibrio harveyi*, *V. ichthyenteri* a *Photobacterium damseflowe olive*). Inhibiční aktivita byla hodnocena třemi metodami: diskovou difúzní metodou, minimální inhibiční koncentrací (MIC) a minimální baktericidní koncentrací (MBC). Podle diskového difúzního testu, jak koncentrace EOEG (5-40 µg) stoupá, inhibiční zóna se zvětšuje. Ve srovnání s amoxicilinem, tetracyklinem a chloramfenikolem vykazoval EOEG podobnou antibakteriální aktivitu. MIC EOEG se pohybovala od 7,8 do 125 mg/ml a hodnoty MBC se pohybovaly od 62 do 250 mg/ml. Tyto výsledky ukazují, že EOEG má antimikrobiální aktivitu proti všem sedmi bakteriím, ale mezi jednotlivými rody nebyl žádný výrazný rozdíl. Z těchto výsledků vyplývá, že EOEG lze použít jako antimikrobiální činidlo proti bakteriálním onemocněním ryb v rybím průmyslu (Park a kol., 2016). Hodnoty jsou však příliš vysoké na to, aby se eukalyptus dal použít jako konzervační činidlo kančích inseminačních dávek. V této studii se zjistily podobně vysoké výsledky, ikdyž na jiné bakteriální druhy. Samostatně silice inhibovala pouze *P. aeruginosa* v koncentraci 8200 µg/ml, u ostatních bakterií koncentrace převyšovala 8200 µg/ml, přesná MIC tedy zjištěna nebyla. Složení eukalyptu zde bylo velice jednoduché, jelikož obsahoval pouze 91,7 % eukalyptolu, 4,7 % p-Cymene, 3,3 %  $\alpha$ -Pinene a 0,3 %  $\beta$ -Pinenu.

## 7. Závěr

V hypotéze jsme se domnívali, že Tato. Jako výsledek testování antimikrobiálního účinku kombinací vybraných silic bylo zjištěno celkem 7 synergických účinků. Byla tak potvrzena hypotéza, že některé z vybraných kombinací silic budou mít zesilující antimikrobiální účinek *in-vitro*, případně že budou inhibovat širší spektrum mikroorganismů než samostatné silice.

Nejvíce synergicky působících kombinací, celkem 4, bylo zjištěno proti bakteri *S. aureus*. Konkrétně se jednalo o kombinace mezi kadidlem a borovicí; a tea tree s borovicí, kadidlem a kajepudem. Proti *E. coli* byla zjištěna synergie u kadidla a eukalyptu, proti *E. faecalis* prokázala nejsilnější účinek kombinace tea tree se saturejkou. *P. aeruginosa* pak byla nejúčinněji inhibována kombinací manuky s kajepudem.

Neexistuje mnoho studií, které se zabývají kombinacemi silic a jejich společným účinkem na mikroorganismy, ať už aditivním či synergickým. Proto je potřeba provést další výzkumy proti širšímu spektru bakterií, dalším druhům silic, popřípadě kombinací více než dvou druhů silic, aby bylo zajištěno širokospektrální působení směsi při dostatečně nízkých koncentracích, které nebudou toxické pro necílové buňky. Důležité je také provést další studie na vliv těchto antimikrobiálních látek na kančí inseminační dávky, aby se mohlo těchto znalostí co nejdříve využít v praxi.

## 8. Literatura

- 1) Al-Abd, N. M., Mohamed Nor, Z., Mansor, M., Azhar, F., Hasan, M. S., & Kassim, M. (2015). Antioxidant, antibacterial activity, and phytochemical characterization of Melaleuca cajuputi extract. BMC Complementary and Alternative Medicine, 15, 385. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0914-y>.
- 2) Althouse, G.C., Kuster, C.E., Clark, S.G., Weisiger, R.M., 2000. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. Theriogenology. 53, 1167-1176.
- 3) Althouse, GC., 2008. Sanitary producers for the production of extended semen. Reprod. Domest. Anim. 43, 374-378
- 4) Attia, A.A., Elmetwalli, A., Eldiasty, J.G., 2022, Impact of antibiotic interactions with essential oils on bacterial growth. Journal of Complementary medicine research vol. 13. doi: 10.5455/jcmr.2022.13.03.25
- 5) Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. Biological effects of essential oils – A review. Food Chem. Toxicol. 46, 446–475 (2008).
- 6) Ben Hsouna, A., Ben Halima, N., Smaoui, S. & Hamdi, N. Citrus lemon essential oil: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against Listeria monocytogenes inoculated in minced beef meat. Lipids Health Dis. 16, 146 (2017).
- 7) Bonet S, Briz M, Casas I, Bussalleu E. Is bacteriocin PA-1 effective in controlling the bacterial load and in keeping the sperm viability of porcine seminal doses? Reprod Domest Anim 2019;54:107.
- 8) Bronislava Bacílková, M., & Paulusová, I. H. (2011). Vliv silic a jejich hlavních účinných látek na mikroorganismy a na archivní materiál. Univerzita Karlova v Praze.
- 9) Buchta V., Jílek P., Kubanová P., Förstl, M.: Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví, Praha, Karolinum, 2002
- 10) Burt, S.A., and Reinders, R.D., 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. Letters in applied microbiology 36 (3):162-7. doi:10.1046/j.1472-765x.2003.01285.x.
- 11) Bussalleu, E., Sancho, S., Briz, M.D., Yeste, M., Bonet, S., 2017. Do antimicrobial peptides PR-39, PMAP-36 and PMAP-37 have any effect on bacterial growth and quality of liquid-stored boar semen? Theriogenology, 89, 235-243.
- 12) Cavalleri R., Becker S.J., Pavan M.A., Bianchetti P., Goettert I.M., Ether M.E., Bustamante-Filho C.I (2018) Essential oils rich in monoterpenes are unsuitable as additives to boar semen extender. Andrologia 50: e13074
- 13) Cezar, DRNA, M.Maraschin a R.M.Di Piero., 2015. Antifungal activity of salicylic acid against penicillium expansum and its possible mechanism of action. International journal of food microbiology 215:64-70. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.018.
- 14) Ciornei, S., Drugociu, D., Ciornei, L.M., Mares, M., Rosca, P., 2021. Total asepticization of boar semen to increase the biosecurity of reproduction in Swine., Molecules., 26,6183.



- 15) CLSI. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-Eighth edition: Approved Standard M07-A8. , Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 16) Contreras MJ., Nunez-Montero K., Bruna P., Garcia M., Leal K., Barrientos L., Weber H. (2022) Bacteria and Boar Semen Storage: Progress and Challenges. *Antibiotics* 11: 1796
- 17) Elangovan, S. & Mudgil, P. Antibacterial properties of Eucalyptus globulus essential oil against MRSA: A systematic review. *Antibiotics* 12, 474 (2023).
- 18) European committee for antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) of the European society of clinical microbiology and infectious disease (ESCMID)., May 2000, Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents, eucast definitive document e.def 1.2
- 19) Fratini, F., Forzan, M., Turchi, B., Mancini, S., Alcamo, G., Pedonese, F., Pistelli, L., Najar, B., Mazzei, M., 2020. *In vitro* antibacterial activity of manuka (*Leptospermum scoparium* J.R. et G.Forst) and winter savory (*Satureja Montana* L.) essential oils and their blends against pathogenic *E. coli* isolates from pigs. *Animals*, Vol:10, Iss:12. doi:103390/ani10122202.
- 20) Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E., Mandrell, R.E., 2004. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *Journal of agricultural and food chemistry* 52 (19):6042-8. doi:10.1021/jft0495340.
- 21) Gadea J. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2003, 1(2), s. 17-27.
- 22) Gao, C., Tian, C., Lu, Y., Xu, J., Luo, J, and Guo, X., 2011. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Sphallerocarpus gracilis* seeds against selected food-related bacteria. *Food control* 22 (3-4): 517-22. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.09.038
- 23) Godia, M., Ramayo-Caldas, Y., Zingaretti, L.M., Darwich, L., Lopez, S., Rodríguez-Gil, J.E., Yeste, M., Sánchez, A., Clop, A.A., 2020., Pilot RNA-seq study in 40 pietrain ejaculates to characterize the porcine sperm microbiome. *Theriogenology*. 157, 525-533.
- 24) Goldberg, A.M.G., Argenti, L.E., Faccin, J.E., Linc, L., Santi, M., Bernardi, M.L., Cardoso, M.R.I., Wentz, I., Bortolozzo, F.P., 2013. Risk Factors for bacterial contamination during boar semen collection. *Res. Vet. Sci*, 95, 362-367.
- 25) Guarda, A., Rubilar, J.F., Miltz, J., Galotto, M.J., 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International journal of food microbiology* 146(2):144-50. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011.
- 26) Chalova, V.I., Crandall, P.G., Ricke, S.C., 2010. Microbial inhibitory and radical scavenging activities of cold-pressed terpeneless Valencia orange (*Citrus sinensis*) oil in different dispersing agents. *Journal of the science of food and agriculture* 90 (5):870-6. doi: 10.1002/jsfa.3897.
- 27) Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LM. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol* 2018;49:23e8.
- 28) Chouhan, S., Sharma, K. & Guleria, S. Antimicrobial activity of some essential oils— Present status and future perspectives. *Medicines* 4, 58 (2017).

- 29) Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P. & Maxwell, W. M. C. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 143–172 (2000).
- 30) Ju, J., Xie, Y., Yu, H., Guo, Y., Cheng, Y., Oian, H., Yao, W., 2022. Synergistic interactions of plant essential oils with antimicrobial agents: a new antimicrobial therapy. *Critical reviews in food science and nutrition* 62: 1740-1751.
- 31) Ju, J., Xie, Y., Yu, H., Guo, Y., Cheng, Y., Zhang, R., Yao, W., 2020. Major components in Lilac and Litsea cubea essential oils kill *penicillium roqueforti* through mitochondrial apoptosis pathway. *Industrial crops and products* 149:112349.
- 32) Ju, J., Xu, X., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., and Yao, W., 2018. Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth on baked foods. *Food chemistry* 240:850-5. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.07.120.
- 33) Kalembe, D., and Kunicka, A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry* 10 (10):813-29. doi: 10.2174/0929867033457719.
- 34) Karpinski TM, Szkaradkiewicz AK. Characteristic of bacteriocins and their application. *Pol J Microbiol* 2013;62:223e35
- 35) Kim, J.M., Marshall, M.R., Cornell, J.A., Preston III, J.F., Wei, C.I., 1995. Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of food science* 60 (6):1364-8. doi: 10.1111/j.1365-2621.1995.tb04592.x.
- 36) Klančnik, A., Piskernik, S., Možina, S., Gašperlin, L., and Jeršek, B., 2011. Investigation of some factors affecting the antibacterial activity of rosemary extracts in food models by a food microdilution method. *International journal of food science and technology* 46 (2): 413-20.
- 37) Kotzekidou, P., Ginnakidis, P., and Boulamatsis, A., 2008. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT – food science and technology* 41 (1): 119-27. doi: 10.1016/j.lwt.2007.01.016
- 38) Kudlová, E., Mydlilová, A. *Výživové poradenství u dětí do dvou let*. Praha: Grada Publishing a.s., 2005. ISBN 80-247-1039-0
- 39) Lachowicz, K.J., Jones, G.P., Briggs, D.R., Brienvu, F.E., Coventry, M.J., 1998. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. *Letters in applied microbiology* 26(3):209-14.
- 40) Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A.J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, and Parker, M., 2006. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International journal of food microbiology* 107 (2):180-5. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.007.
- 41) Mele, E., 2020. Electrospinning of essential oils. *Polymers* 12 (4). doi.org/10.3390/POLYM12040908
- 42) Meng, D., Garba, M., Ren, Y., Yao, M., Xia, X., 2020. Antifungal activity of chitosan against *Aspergillus ochraceus* and its possible mechanism of action. *International journal of biological macromolecules* 158:1063-70.
- 43) Moleyar, V. and Narasimham, P., 1992. Antimicrobial activity of essential components. *International journal of food microbiology* 16(4):337-42. doi:10.1016/0168-1605(92)90035-2

- 44) Moleyar, V., and Narasimham. 1992. Antibacterial activity of essential oil components. *International journal of food mikrobiology* 16 (4):337-42. doi: 10.1016/0168-1605(92)90035-2.
- 45) Morell, J.M., Klein, C., Lundeheim, N., Erol, E., Troedsson, M.H.T., 2014. Removal of bacteria from stallion semen by clloid centrifugation. *Anim. Reprod. Sci.* 145, 47-53.
- 46) Morrell J.M., Wallgren M. (2014) Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders: A Review. *Pathogens* 3: 934-946
- 47) Morrell, J., 2016. Antimicrobials in boar semen extenders—A risk/benefit analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2, 107
- 48) Mourey, A. and Canillac, N., 2002. Anti-listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers. *Food control* 13(4-5):289-92 doi: 10.1016/S0956-7135(02)00026-9.
- 49) Nikolić, M. et al. Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. *Ind. Crops Prod.* 61, 225–232 (2014).
- 50) Nikolic, M.M., Jovanovic, K.K., Markovic, T.L., Markovic, D.L., Gligorijevic, N.N., Radulovic, S.S., Kostic, M., Glamoclija, J.M., Sokovic, M.D., 2017, Antimicrobial synergism and cytotoxic properties of citrus limon L., piper nigrum L. and melaleuca alternifolia cheel essential oils, *Journal of pharmacy and pharmacology* Vol:69, Iss:11, Page: 1606-1614. doi: 10.1111/jphp.12792.
- 51) Nitsche-Melkul, E., Bortfeldt, r., Jung, M., Schulze, M., Impact of hygiene on bacterial contamination in extended boar semen an eight-year retrospective study of 28 european AI centres. *Theriogenology*, 146, 133-139.
- 52) Njoku, I.S., Rahman, N.U., Khan, A.M., Otunomo, I., Asekun, O.T., Familoni, O.B., Ngozi, C., May 2022. Chemicals composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil from the leaves of pinus sylvestris. *The pacific journal of science and technology*. Vol:23, Num.1
- 53) Park, Joo-Woo, Wendt, Mitchell, Heo, Gang-Joon, 2016. Antimicrobial activity of eukalyptus globulus essential oil against fish pathogenic bacteria. *Lab.Anim.Res.* 32. doi: org./10.5625/lar.2016.32.2.87.
- 54) Pasqua, R., Mamone, G., Ferranti, P., Ercolini, D., Mauriello, G., 2010. Changes in the proteome of salmonella enterica serovar Thompson as stress adaption to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics* 10(5):1040-9. doi: 10.1002/pmic.200900568.
- 55) Pokajewicz, K., Czarniecka-Wiera, M., Krajewska, A., Maciejczyk, E. & Wieczorek, P. P. *Lavandula × intermedia*—A bastard lavender or a plant of many values? Part II. Biological activities and applications of lavandin. *Molecules* 28, 2986 (2023).
- 56) Puig-Timonet, A., Castillo-Martín, M., Pereira, B.A., Pinart, E., Bonet, S., Yeste, M., 2018. Evaluation of porcine beta defensins-1 and -2 as antimicrobial peptides for liquid-stored boar semen: effects on bacterial growth and sperm quality. *Theriogenology*, 111, 9-18.
- 57) Restrepo, G., Zapata, K., Colorado, P. & Rojano, B. Cooling of porcine semen in an extender supplemented with carvacrol. *Reprod. Domest. Anim.* 58, 860–866 (2023).

- 58) Rivas, L., McDonnell, M.J., Bruggess, C.M., O'Brien, M., Navarro-Villa, A., Fanning, S., Duffy, G., 2010. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *International journal of food microbiology* 139 (1-2):70-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.029.
- 59) Santagati M, Scillato M, Patan e F, Aiello C, Stefani S. Bacteriocin-producing oral streptococci and inhibition of respiratory pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;65:23e31.
- 60) Sethuga, M., Ranasinghe, M.M.K.D., Ranaweera, K.K.D.S., Munaweera, I., Gunathilake, K.D.P.P., 2023. Synergistic antimicrobial activity of essential oils and oleoresins of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), clove bud (*syzygium aromaticum*) and ginger (*Zingiber officinale*). *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, Vol 51. doi: 10.1016/j.bcab.2023.102800
- 61) Schulze, M., Ammon, C., Nürnberg, G., Rüdiger, K., Jung, M., & Demeler, J. (2016). Field study analysis of the influences of deworming regimens and housing conditions on parasites and sperm output in 21 European boar studs. *The Veterinary Journal*, 209, 186–189.
- 62) Schulze, M., Ammon, C., Rudiger, K., Jung, M., Grobbel, M., 2015. Analysis of hygienic critical control point in boar semen production. *Theriogenology*, 83, 430-437. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.004
- 63) Schulze, M., Dathe, M., Waberski, D., Muller, K., 2016. Liquid storage of boar semen current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*, 85, 39-46.
- 64) Schulze, M., Junkes, C., Mueller, P., Speck, S., Ruediger, K., Dathe, M., Muller, K., 2014. Effects of cationic antimicrobial peptides assessment of their antimicrobial potency in liquid preserved boar semen. *Plos ONE*, 9, e105949.
- 65) Stefanowski, N., Tkachenko, H., Kurhaluk, N., Opryshko, M., Gyrenko, O., Maryniuk, M., Buyun, L., 2022. Antibacterial properties of commercially available cayeput essential oil against different gram-positive and gram-negative bacteria. Doi: 10.32900/2312-8402-2022-128-36-45.
- 66) Troisio, I., Bertocchi, M., Ventrella, D., Scozzoli, M., Vito Di M., Truzzi, E., Benvenuti, S., Mattarelli, P., Bacci, m.L., Elmi, A., 2024. Short- and long-term effects of essential oils on swine spermatozoa during liquid phase refrigeration. *Scientific reports* 14. Article num.:285.
- 67) Ulanowska, K., Tkaczyk, A., Konopa, G., Wegrzyn, G., 2006. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Archives of microbiology* 184(5):271-8. doi: 10.1007/s00203-005-0063-7.
- 68) Valdés, A. F., Martínez, J. M., Lizama, R. S., Vermeersch, M., Cos, P., & Maes, L. (2008). *In vitro* anti-microbial activity of the Cuban medicinal plants *Sima-rouba glauca* DC, *Melaleuca leucadendron* L and *Artemisia absinthium* L. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(6), 615–618. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762008000600019>.
- 69) Valdez-Miramontes, C.E., de Haro-Acosta, J., Aréchiga-Flores, C.F., Verdiquel-Fernández, L., Rivas-Santiago, B., 2021. Antimicrobial peptides in domestic animals and their applications in veterinary medicine. *Peptides*. 141, 170576

- 70) Vitanza, L. et al. *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. *Microb. Pathog.* 126, 323–331 (2019).
- 71) Wiebke, M., Hensel, B., Nitsche-Melkus, E., Jung, M., Schulze, M., 2021. Cooled storage of semen from livestock animals (part I): Boar bull and stallion. *Anim.Reprod. Sci.* 246, 106822.
- 72) Ya-Ru, L.I., Zhou, L.Y., Shu-Rong, L.I., Cao, Z.Z., Zhang, L., Wei, M., Peng, C.H., 2014. Antimicrobial activity and mechanism of action of plant essential oils and their main components from fruits and vegetables. A review. *Journal of food science* 35(11):325-9.
- 73) Zhang, J., Liu, H., Yang, Q., Li, P., Wen, X., Li, B., Jiang, H., Li, X., 2020. Genomic sequencing reveals the diversity of seminal bacteria and relationship to reproductive potential in boar semen. *Front. Microbial.* 11,1873.

## **9. Seznam použitých zkratek a symbolů**

EO – esenciální olej

ATB – antibiotika

MIC – minimální inhibiční koncentrace

FIC – frakční inhibiční koncentrace