

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2017

BARBORA ŽIŽLAVSKÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin



Antimikrobiální vlastnosti rostlinných látek
Diplomová práce

Vedoucí práce:
Ing. Libor Kalhotka, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Barbora Žižlavská

Brno 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci:

.....
vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Liborovi Kalhotkovi, Ph.D., za odborné vedení a cenné rady při zpracování diplomové práce. Dále děkuji doktorandům Ing. Evě Burdové a Ing. Petru Kouřilovi za asistenci a pomoc při realizaci vlastní mikrobiologické analýzy.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá antimikrobiálními vlastnostmi rostlinných látek. Charakteristika těchto látek, včetně mechanismu působení na mikroorganismy a jejich průmyslové využití, je uvedena v teoretické části. Cílem mikrobiologické analýzy bylo zjistit rozsah působení ředěných (10%) a koncentrovaných silic izolovaných z hřebíčku (*Syzygium aromaticum*), skořice (*Cinnamomum*) a tymiánu (*Thymus vulgaris*) na bakterie (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) a kvasinky (*Yarrowia lipolytica*, *Candida tropicalis* a *Saccharomyces cerevisiae*). Pro stanovení byla použita disková difúzní metoda. Výsledky potvrdily antimikrobiální účinek testovaných silic. Největší inhibiční vliv na použité druhy mikroorganismů měla koncentrovaná tymiánová silice.

Klíčová slova: hřebíček, skořice, tymián, bakterie, kvasinky, disková difúzní metoda, silice

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the antimicrobial properties of herbal substances. Characteristics of these substances, including mechanism of action on microorganisms and their industrial use, is presented in the theoretical part. The aim of microbiological analysis was to determine the extent of diluted (10%) and concentrated essential oils isolated from clove (*Syzygium aromaticum*), cinnamon (*Cinnamomum*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) and yeast (*Yarrowia lipolytica*, *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*). To determine them, the disc diffusion method was used. The results confirmed an antimicrobial effect of tested essential oils. Concentrated thyme essential oil had the highest inhibitory activity on all used microbial strains.

Key words: clove, cinnamon, thyme, bacteria, yeast, disc diffusion method, essential oils

OBSAH

1	Úvod	9
2	Cíl práce	10
3	Literární přehled	11
3.1	Látky rostlinného původu s antimikrobiálními vlastnostmi.....	11
3.1.1	Fenoly a polyfenoly	11
3.1.1.1	Jednoduché fenoly a fenolové kyseliny	11
3.1.1.2	Chinony	12
3.1.1.3	Flavonoidy.....	13
3.1.1.4	Taniny	14
3.1.1.5	Kumariny.....	14
3.1.2	Terpenoidy	15
3.1.3	Alkaloidy	16
3.1.4	Další látky s antimikrobiálním účinkem.....	17
3.1.5	Mechanismy účinku rostlinných látek na mikroorganismy	17
3.1.6	Esenciální oleje	18
3.1.7	Využití látek s antimikrobiálním účinkem.....	19
3.2	Obecná charakteristika vybraných druhů rostlin.....	20
3.2.1	Hřebíčkovce vonný (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	20
3.2.2	Skořicovník (<i>Cinnamomum</i>).....	21
3.2.3	Tymián obecný (<i>Thymus vulgaris</i>)	21
3.3	Obecná charakteristika testovaných druhů mikroorganismů	23
3.3.1	Bakterie	23

3.3.1.1	Rod <i>Escherichia</i>	23
3.3.1.2	Rod <i>Enterococcus</i>	24
3.3.2	Kvasinky	25
3.3.2.1	Rod <i>Saccharomyces</i>	25
3.3.2.2	Rod <i>Candida</i>	26
3.3.2.3	Rod <i>Yarrowia</i>	26
4	Metodika	28
4.1	Izolace mikroorganismů.....	28
4.2	Použité živné půdy	29
4.2.1	Plate Count Agar (PCA)	29
4.2.2	Chloramphenicol Glucose Agar.....	29
4.2.3	Compass <i>Enterococcus</i> Agar	29
4.2.4	Tryptone Soya Broth (TBS).....	30
4.3	Identifikace mikroorganismů	30
4.4	Testování antimikrobiálních účinků (antimikrobiálního působení silic na vybrané mikroorganismy)	32
4.4.1	Testované silice.....	32
4.4.2	Sbírkové kmeny a izoláty mikroorganismů	32
4.4.3	Pomnožení mikroorganismů	33
4.4.4	Disková difúzní metoda	33
5	Výsledky a diskuze	34
5.1	Identifikace izolovaných kultur.....	34
5.2	Vyhodnocení diskové difúzní metody	36

5.2.1	Vyhodnocení kontrolních vzorků	36
5.2.2	Vyhodnocení inhibičního účinku silic	38
5.2.3	Porovnání výsledků zjištěných po 20 a 44 h kultivace	47
6	Závěr	52
7	Přehled použité literatury	53
8	Seznam obrázků.....	60
9	Seznam zkratk.....	62
10	Přílohy	63
11	Seznam příloh	75

1 ÚVOD

Již od antických dob nacházeli lidé v různých rostlinách zdroj léčivé síly. Postupem času bylo u řady rostlinných látek popsáno množství pozitivních vlastností, jako je například antioxidační aktivita, protizánětlivé působení, antidiabetická a antikarcinogenní účinnost. Zároveň mohou být tyto přírodní látky použity proti bakteriím, plísním, virům, prvokům a hmyzu.

Díky těmto schopnostem se využívají nejen v oblasti medicíny a farmacie, ale také například v potravinářském průmyslu, zemědělství a kosmetice. Řada rostlin s antimikrobiálním účinkem slouží jako potravinové prostředky, kterými lze dosáhnout zlepšení či zvýraznění vůně, chuti a celkového aroma konečného produktu. Jsou používány nejen v rámci průmyslové výroby, ale také v mnoha domácnostech. K jejich oblibě u spotřebitelů přispívá také snadná dostupnost v tržní síti, nenáročné pěstování a jednoduché použití při kulinární úpravě různých pokrmů.

Neustále se zvyšující odolnost mikroorganismů vůči antibiotikům a konvenčním, chemicky syntetizovaným přípravkům, je vážný celosvětový problém. Z tohoto důvodu stoupá v poslední době zájem o možné využití přírodních antimikrobiálních látek izolovaných z různých druhů rostlin. Bylo zveřejněno mnoho studií, které dokládají jejich účinnost. Mezi pozitivní faktory jejich použití patří také jejich minimální toxicita pro ostatní organismy, obnovitelnost zdrojů a dobrá odbouratelnost v životním prostředí. Velice důležitým negativním činitelem jejich praktických aplikací však stále zůstává vysoká cenová nákladnost.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je zpracovat literární rešerši, v níž budou shrnuty poznatky o antimikrobiálním působení účinných látek z rostlin. Dále charakterizovat nejvýznamnější rostlinné látky s antimikrobiálním účinkem a objasnit jejich působení na mikroorganismy. Popsat možnosti jejich využití, zvláště v potravinářském průmyslu. V experimentální části stanovit antimikrobiální působení vybraných silic. Získaná data zpracovat a vyhodnotit. Výsledky uvést v závěru práce.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Látky rostlinného původu s antimikrobiálními vlastnostmi

Schopnost rostlin syntetizovat aromatické látky, zejména fenoly a jejich kyslíkaté substituované deriváty, je téměř neomezená. Bylo objeveno více než 100 000 různých sekundárních metabolitů, přičemž přibližně 10 000 z nich je chemicky definovaných. Tyto látky se podílejí na charakteristickém zbarvení a vůni rostlin. Dále jsou zodpovědné za obranné mechanismy, a to nejen proti býložravcům a hmyzu, ale také proti bakteriím, virům a plísním (Cowan, 1999; Razzaghi-Abyaneh et Shams-Ghahfarokhi, 2011).

Mezi významné skupiny sekundárních metabolitů rostlin, které vykazují antimikrobiální účinky, patří například fenolické a polyfenolické sloučeniny, terpenoidy a alkaloidy. Lipofilní směsi tvořené některými z těchto látek jsou označovány jako esenciální oleje neboli silice.

3.1.1 Fenoly a polyfenoly

Jedná se o velice různorodou skupinu, vyskytující se prakticky ve všech potravinách. Některé fenoly se vyznačují významnými biologickými účinky a můžeme je tedy řadit mezi tzv. fytoalexiny, přírodní antioxidanty nebo přirozené toxické látky. Jiné fenoly patří k látkám chuťovým, aromatickým či do kategorie přírodních barviv (Velíšek et Hajšlová, 2009). Antimikrobiální vlastnosti vykazují zejména jednoduché fenoly, fenolové kyseliny, chinony, flavonoidy, taniny a kumariny.

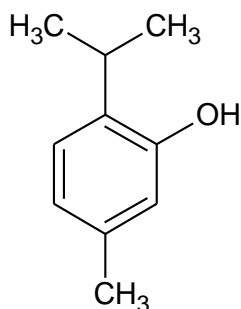
3.1.1.1 Jednoduché fenoly a fenolové kyseliny

Nejjednodušší fenoly se skládají z jednoho substituovaného fenolického kruhu. Patří mezi ně například katechol a pyrogallol, u kterých byly prokázány toxické účinky proti mikroorganismům. Ty byly zjištěny také u fenolických kyselin, jako je například kyselina kávová a skořicová. Kyselina kávová se vyskytuje v běžně rostoucích bylinách (estragon, tymián), které lze aplikovat proti virům, bakteriím i plísním (Cowan, 1999).

Dále bylo prokázáno, že s rostoucím počtem hydroxylových skupin v molekule roste také toxicita dané látky. Mechanismus působení pravděpodobně spočívá v inhibici enzymů oxidovanými sloučeninami, a to v důsledku reakcí s thiolovými skupinami nebo skrze více nespécifikované reakce s proteiny (Cowan, 1999).

Do skupiny jednoduchých fenolů se řadí také látky, které jsou součástí silic. Jedná se o fenolické sloučeniny obsahující v bočním řetězci tři uhlíky v nižším oxidačním stupni. Patří sem například eugenol (přítomný v silici hřebíčku), který potlačuje růst bakterií a plísní. Další zástupci jsou thymol a karvakrol, chavicol (nachází se v bazalce, novém koření), isoeugenol, guajakol a další (Velíšek et Hajšlová, 2009; Cowan, 1999).

Thymol (2-isopropyl-5-methylfenol, obr. 1), nazývaný také jako hydroxycymen, je hlavním monoterpenovým fenolem nacházejícím se v rostlinách z čeledi hluchavkovité – *Lamiaceae* (rody *Thymus*, *Ocimum*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, *Monarda*). Biosyntetizován je z γ -terpinenu, ze kterého vzniká p-cymen, který je následně hydroxylován na thymol. Jeho využití je velmi široké, používá se například v kosmetice, v potravinářství (dodání vůně, ochrana před patogenními mikroorganismy) nebo jako součást insekticidních a fungicidních přípravků. V posledních dvou desetiletích proběhlo několik studií zabývajících se jeho antibakteriální aktivitou (Marchese et al., 2016). Například práce Mathela et al.(2010) potvrdila inhibiční účinky thymolu na grampozitivní (*Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*) i gramnegativní (*E. coli*) bakterie.



Obr. 1: Thymol

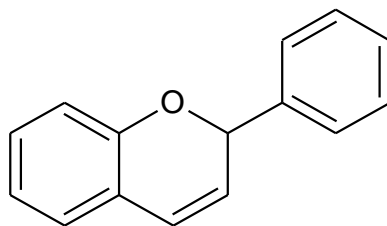
3.1.1.2 Chinony

Chinony jsou složeny z aromatického kruhu se dvěma keto skupinami. Nejčastěji jsou odvozeny od benzo-1,4-chinonu, anthra-9,10-chinonu a nafto-1,4-chinonu. Jedná se především o žlutě, červeně a hnědě zbarvené sloučeniny s vysokou reaktivitou. Vznikají například v průběhu enzymového hnědnutí při krájení ovoce či zeleniny. V přírodě se vyskytují v různých částech vyšších rostlin, lišejnících, vyšších houbách i mikroorganismech (Velíšek et Hajšlová, 2009; Cowan, 1999).

Jejich antimikrobiální aktivita je způsobena poškozením proteinů. Chinony vytváří ireversibilní komplexy s nukleofilními aminokyselinami, které jsou zabudované v bílkovinách. Tyto bílkoviny ztrácí svoji funkčnost, což vede k inaktivaci celého organismu (Cowan, 1999).

3.1.1.3 Flavonoidy

Jejich základní strukturu tvoří dva benzenové kruhy, které jsou spojené tříuhlíkatým řetězcem. Tento řetězec je součástí heterocyklického kruhu odvozeného od pyranu. Flavonoidy se tedy řadí mezi deriváty flavanu (obr. 2). Z chemického hlediska je lze klasifikovat podle jejich molekulární struktury, rozdílů v heterocyklickém kruhu nebo stupně jejich oxidace. Mezi základní struktury patří katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly a anthokyanidiny (Velíšek et Hajšlová, 2009).



Obr. 2: Flavan

Flavonoidy jsou nejběžnější skupinou fenolických látek vyskytujících se v rostlinách, a to téměř ve všech jejich částech. Jejich dobrými zdroji jsou ovoce a zelenina, dále víno, čaj, semena, oříšky, borůvky, ostružiny, červené fazole, propolis a med. Nejčastěji přítomnou flavonoidní látkou ve stravě je kvercetin (Ahmad et al., 2015).

Mezi vlastnosti flavonoidů patří vychytávání volných radikálů a antioxidační aktivita. Působí také proti rakovině, protialergicky, protizánětlivě a proti mikroorganismům (Razzaghi-Abyaneh et Shams-Ghahfarokhi, 2011).

Nedávné studie vysvětlují antibakteriální aktivitu flavonoidů třemi různými mechanismy. První způsob popisuje perforaci cytoplazmatické membrány a tím zhoršení membránové fluidity. Dále se jedná o inhibiční efekt působící na energetický metabolismus nebo o inhibici syntézy nukleových kyselin. Flavonoidy mohou také neutralizovat bakteriální toxiny. Bylo prokázáno, že katechiny brání toxinům bakterie

Staphylococcus aureus (in vitro, in vivo). Podobně inhibuje také isoflavan genistein exotoxiny a dále má ochranný efekt proti infekci způsobené bakterií *Vibrio vulnificus* (Ahmad et al., 2015).

U flavonoidů jako je rutin, morin, kvercetin, apigenin, hesperidin, katechin a další, byly prokázány antivirotické vlastnosti. Tyto látky jsou efektivní například proti viru chřipky a herpes simplex viru. Proti viru HIV účinně působí glycyrrhizin, chrysin a swertiofranchetin (Ahmad et al., 2015; Cowan, 1999).

3.1.1.4 Taniny

Taniny neboli třísloviny jsou obecně popisovány jako skupina polymerních fenolů vyznačujících se adstringentní chutí. Hojně se vyskytují například v zeleném čaji nebo červeném víně. Z chemického hlediska se rozdělují na dvě velké skupiny – taniny hydrolyzované a kondenzované. Kondenzované taniny označované také jako flavolany jsou deriváty monomerních flavonoidů. U hydrolyzovaných tříslovin je základní struktura tvořena estery kyseliny gallové a glukózy, jedná se o tzv. polygalloylestery (Velíšek et Hajšlová, 2009; Cowan, 1999). Jsou rozpustné ve vodě a mají schopnost srážet proteiny a alkaloidy (Ekambaram et al., 2016).

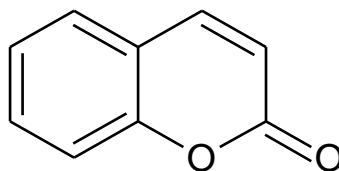
Tříslovinám je připisována řada pozitivních vlastností, jako je stimulace fagocytujících buněk, protizánětlivé působení nebo protinádorová aktivita. Jsou schopny léčit a předcházet různým onemocněním (Cowan, 1999).

Antibakteriální účinky taninů spočívají v tvorbě kovalentních vazeb s povrchovými proteiny mikroorganismů. Potlačují růst plísní, kvasinek a bakterií. Kyselina tříslová obsažená například v kakaových bobech, hroznech a čaji inhibuje růst intestinálních bakterií jako je *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae* a *Bacteroides fragilis* (Cowan, 1999; Ekambaram et al., 2016).

3.1.1.5 Kumariny

Jednoduché kumariny jsou strukturně odvozené od δ -laktonu kyseliny hydroxyskořicové. Základní látkou je kumarin (obr. 3), který je typický svou vůní po čerstvém jeteli. Ve větším množství se nachází u čeledi bobovitých (komonice), mořenovitých (svízel vonný) a lipnicovitých (tomkovice vonná) (Velíšek et Hajšlová, 2009).

Kumariny jsou známé pro své antitrombotické, vazodilatační a protizánětlivé vlastnosti. Jsou vysoce toxické pro hlodavce. Antibakteriální účinky byly popsány u extraktu z mařinky vonné (Cowan, 1999).

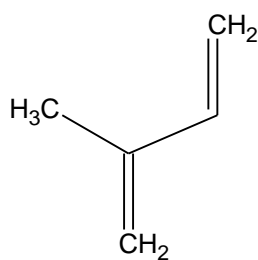


Obr. 3: Kumarin

3.1.2 Terpenoidy

Terpeny a terpenoidy tvoří rozsáhlou skupinu sekundárních metabolitů, které jsou biosyntetizované mnoha různými druhy rostlin. Bylo identifikováno téměř 30 000 odlišných terpenoidů. V rostlinách plní řadu základních funkcí, jako je například růst a vývoj, ochrana proti fotooxidačnímu stresu, obrana vůči patogenům a býložravcům a další (Velíšek et al., 2008).

Jedná se o modifikované oxidované terpeny, jejichž základní struktura je tvořena pětiuhlíkatými jednotkami isoprenu (2-methylbuta-1,3-dienu, obr. 4). Lze je rozdělit na monoterpeny (C₁₀), seskviterpeny (C₁₅), diterpeny (C₂₀), triterpeny (C₃₀) a tetraterpeny (C₄₀). Synteticky získané i přírodní deriváty terpenů a terpenoidů jsou široce využívány jako aroma v parfumerii nebo jako ochucující aditiva v potravinářském průmyslu (Velíšek et al., 2008).



Obr. 4: Isopren

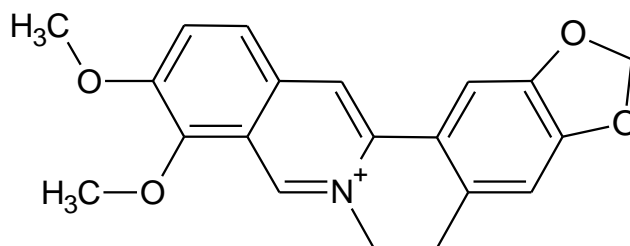
Terpeny i terpenoidy aktivně působí proti bakteriím, houbám, virům a prvokům. Díky svému lipofilnímu charakteru narušují membránu buněk. Výsledkem je zvýšená membránová fluidita a permeabilita, poškození proteinů membrány a inhibice respirace. Kyselina betulinová (triterpen) je jedna z mála terpenoidů, u kterých byly objeveny inhibiční účinky proti viru HIV (Cowan, 1999; Trombetta et al., 2005).

3.1.3 Alkaloidy

Alkaloidy jsou sekundární metabolity rostlin obsahující ve své molekule atom dusíku. Je pro ně charakteristická nízká molekulová hmotnost a heterocyklická struktura (Razzaghi-Abyaneh a Shams-Ghahfarokhi, 2011). Většina alkaloidů je syntetizována rostlinami (listy, kůra, kořeny, semena), dále mohou být izolovány z mechů, plísní, některých bakterií a dokonce i ze zvířat, jako jsou například mravenci, mnohonožky, berušky, brouci, motýli, korýši, žáby, ropuchy a mloci (Velíšek et al., 2008).

Alkaloidy jsou vysoce reaktivní látky, které účinkují již v nízkých koncentracích. Podle základní N-heterocyklické struktury a hlavních prekurzorů biosyntézy se obecně rozdělují na tři hlavní skupiny. Právě alkaloidy jsou N-heterocyklické báze odvozené od stejných prekurzorů. Mohou se dále dělit na alkaloidy pyridinové (nikotin, nornikotin), piperidinové (piperin), pyrrolidinové, pyrrolizidinové (senecionin), chinolizidinové (lupin, lupinin) a chinolinové (chinin, chinidin). Protoalkaloidy se odvozují od aminokyselin, jedná se o alifatické aminosloučeniny. Do této skupiny patří kapsaicinoidy. Pseudoalkaloidy jsou pak deriváty N-heterocyklických bází, které vznikly z jiných prekurzorů. Řadí se sem alkaloidy purinové (kofein, theobromin) a terpenoidní (solanin, tomatin) (Velíšek et al., 2008).

Antimikrobiální aktivita byla prokázána například u solamarginu (glykoalkaloid izolovaný z bobulí *Solanum khasianum*) a dále u diterpenových alkaloidů, které se běžně vyskytují v rostlinách z čeledi *Ranunculaceae* (pryskyřníkovité). Proti trypanosomám a plasmodiím je účinný berberin (obr. 5). Kapsaicin působí na jednotlivé mikroorganismy rozdílně. Bylo prokázáno, že na bakterie má vliv inhibiční (například *Helicobacter pylori*), zatímco u *Candida albicans* růst podporuje. Mechanismus působení alkaloidů na mikroorganismy je spojen s interkalací do struktury DNA (Cowan, 1999).



Obr. 5: Berberin

3.1.4 Další látky s antimikrobiálním účinkem

Kromě výše jmenovaných sloučenin jsou významné také některé peptidy, které mají schopnost kontrolovat nebo zastavovat růst mikroorganismů. Antimikrobiální peptidy (AMPs) mohou být izolovány z velkého množství rostlin, nebo jejich částí. Jsou důležitou složkou vrozeného imunitního systému a signálních drah. AMPs interagují s grampozitivními i gramnegativními bakteriemi, prvoky, kvasinkami, plísněmi a viry. Mechanismus účinku spočívá v porušení cytoplazmatické membrány. Kationtové peptidy mohou také inhibovat transport proteinů nebo enzymů, reagovat s DNA a RNA, způsobovat inhibici iontových kanálků a přerušovat syntézu peptidoglykenu (Menegueti et al., 2017).

Antimikrobiální vlastnosti dále vykazují polyaminy, isothiokyanáty a glukosidy (Cowan 1999).

3.1.5 Mechanismy účinku rostlinných látek na mikroorganismy

Přehled základních způsobů inhibičního působení vybraných rostlinných látek na mikroorganismy je uveden v tabulce 1.

Tab. 1: Mechanismy účinku rostlinných látek na mikroorganismy (Cowan, 1999 - upraveno)

Zařazení	Antimikrobiální látka	Mechanismus účinku
Jednoduché fenoly	Epikatechin	Porušení membrány
Chinony	Hypericin	Vytvoření komplexu s buněčnou stěnou, inaktivace enzymů
Flavonoidy	Chrysin	Vytvoření komplexu s buněčnou stěnou
Flavony	Abyssinon	Inaktivace enzymů, inhibice reverzní transkriptázy u HIV viru
Taniny	Elagitanin	Vazba na proteiny, inhibice enzymů, vytvoření komplexu s buněčnou stěnou, porušení membrány
Kumariny	Warfarin	Interakce s DNA
Terpenoidy	Kapsaicin	Porušení membrány
Alkaloidy	Berberin, Piperin	Interkalace do buněčné stěny a/nebo DNA

3.1.6 Esenciální oleje

Esenciální oleje patří mezi sekundární metabolity aromatických bylin, keřů i stromů. Jejich úkolem je chránit rostlinu před mikroorganismy a hmyzem. Silice mohou být syntetizovány v různých rostlinných orgánech, jako například v poupatech, květech, listech, stoncích, větvích, semenech, bobulích, kořenech, dřevu nebo kůře. Následně jsou uloženy v sekrečních buňkách, dutinách nebo kanálcích, dále v epidermálních buňkách a trichomech. Pro průmyslové využití jsou často získávány pomocí destilace vodní parou nebo superkritickou fluidní extrakcí (SFE), zejména za použití oxidu uhličitého (Andrade et al., 2014). Jako další možné způsoby získání silic uvádí Velíšek také extrakci nepolárními rozpouštědly nebo lisování rostlinných částí a následné oddělování vrstev (Velíšek et Hajšlová, 2009).

Z chemického hlediska se jedná o heterogenní hydrofobní kapalnou směs složenou z těkavých aromatických sloučenin (alkoholy, aldehydy, fenoly, terpeny, terpenoidy, karotenoidy, kumariny a další). Za látky, které mají důležitou roli ve složení různých druhů silic, jsou považovány především aromatické fenoly (karvakrol, thymol, safrol, eugenol), terpeny (pinen, myrcen, limonen, p-cymen, terpinen) a terpenoidy (Razzaghi-Abyaneh et Shams-Ghahfarokhi, 2011; Pandey et al., 2017).

Jako lipofilní sloučeniny prochází silice přes buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu až do buňky mikroorganismů. Cytotoxická aktivita je zřejmě spojena s narušením struktury polysacharidů, mastných kyselin a fosfolipidů. Díky tomuto mechanismu působení může být zasaženo více cílů ve stejnou dobu. Antimikrobiální působení silic je ovlivněno nejen jejich složením, ale také složením vnějších struktur mikroba, jejich propustností a nábojem (Andrade et al., 2014).

Mezi nejvýznamnější účinky silic patří jejich antioxidační, antimikrobiální a insekticidní aktivita. Dále jsou studovány pro své antifungální, antivirotické, antihelmintické, ovocidní, larvicidní a moluskocidní vlastnosti. Působí také proti vředům a zánětům. Díky širokému spektru pozitivních účinků jsou využívány v řadě průmyslových odvětví, například ve farmacii a krmivářství. Své uplatnění našly také v kosmetickém průmyslu, kde slouží jako aditiva ke zvýraznění vůně mýdel či parfémů (Pandey et al., 2017).

3.1.7 Využití látek s antimikrobiálním účinkem

Společně s živými kulturami mikroorganismů, produkty mikrobiální fermentace a primárními metabolity rostlin, mohou být výše uvedené látky využívány jako součást doplňkových směsí pro hospodářská zvířata. Bylo například prokázáno, že směs triterpenových saponinů, izolovaných z některých druhů bakopy, chrání zvířata před infekcí, urychluje jejich růst, zvyšuje jejich imunitu, produktivitu, doživost, kvalitu mléka a vajec. Mezi výhody použití těchto látek patří nesporně také to, že jsou získávány z obnovitelných zdrojů, nevzniká na ně rezistence mikroorganismů, nehromadí se v životním prostředí a tudíž ho ani neznečišťují (Opletal et Šimerda, 2009).

Alkaloidy se kvůli svým významným biologickým vlastnostem v současnosti používají především ve farmacii. Například atropin, získávaný z rulíku zlomocného (*Atropa belladonna*), se vyznačuje svými protikřečovými účinky a je vhodný k léčení zánětů tlustého střeva. Z rostliny *Erythroxylon coca*, která se nachází v oblasti Střední Ameriky, se pro farmaceutické účely získává kokain (působí anesteticky a stimulačně na centrální nervový systém). Dále se využívá také reserpin (jako sedativum a trankvilizér) a efedrin, který snižuje překrvení sliznic (McMurry, 2007).

Esenciální oleje extrahované z různých druhů rostlin (například *Anacardium occidentale*, *Myristica fragrans*, *Ricinus communis* nebo *Cocos nucifera*) jsou využívány k syntéze stříbrných nanočástic (AgNPs). V procesu jejich přípravy mají hlavní význam nízkomolekulární aromatické a alifatické terpenoidy. AgNPs se uplatňují v textilní výrobě a mikroelektronice. Jejich použití v biologických aplikacích zahrnuje oblast zemědělství, výrobu potravin i nakládání s odpady. Pro své antimikrobiální, antiparazitické, antidiabetické, antioxidantní a protinádorové vlastnosti se využívají při léčbě, biomolekulární detekci a diagnostice (Mashwani et al., 2016).

V potravinářství jsou rostlinné látky s antimikrobiálním účinkem rovněž často využívány. Již od počátků lidské civilizace se silice používají k ochucování pokrmů a nápojů. Jejich další možná aplikace souvisí s ochranou potravin před hmyzem, patogenními houbami a bakteriemi v průběhu jejich skladování. Nedávné studie potvrzují, že použití silic prodlužuje dobu trvanlivosti. Například skořicová silice eliminovala houbové choroby vyskytující se na banánech a tím zvýšila dobu jejich skladování o 28 dní. Přestože dostupná literatura označuje silice za vysoce specifické, biodegradabilní, s minimálním vlivem na necílené organismy a netoxické pro člověka,

jejich komerční využití má i své nevýhody. Jedná se především o cenovou efektivitu (Pandey et al., 2017; Andrade et al., 2014). Překážkou jejich použití je také nedostatečná reprodukovatelnost. Kvůli vysokému počtu bioaktivních látek, které obsahují je často jejich biologická účinnost značně rozdílná. Dalším limitujícím faktorem, který omezuje jejich použití je i jejich výrazné aroma (Ribeiro-Santos et al., 2017).

Esenciální oleje mohou být přidávány přímo do potravin nebo začleněny do jejich obalů. Jsou ceněny zejména pro své ochranné antimikrobiální a antioxidační účinky. Používanými silicemi jsou například silice z bazalky (*Ocimum basilicum*), rozmarýny (*Rosmarinus officinalis*), kardamomového semene (*Elettaria cardamomum*) a heřmánkového květu (*Matricaria chamomilla*) (Ribeiro-Santos et al., 2017).

3.2 Obecná charakteristika vybraných druhů rostlin

3.2.1 Hřebíčkovec vonný (*Syzygium aromaticum*)

Pojem hřebíček označuje sušená květní poupata pocházející z hřebíčkovce vonného (*Syzygium aromaticum*, čeled' myrtovité), který je široce rozšířen v mnoha tropických zemích (Ramadan et al., 2013). Jedná se o stálezelený strom, vysoký 8 – 12 m, výjimečně až 20 m. Má hustou kuželovitou korunu. Listy jsou na líci tmavě zelené, lesklé, na rubu světlejší. Jejich tvar je podlouhlý, eliptický nebo kopinatý. Květy jsou uspořádány do hustých vrcholičnatých květenství. Plodem je bobule obsahující 1 – 2 semena (Valíček, 2005).

Hřebíček obsahuje širokou škálu potenciálně bioaktivních sloučenin, jako jsou například seskviterpeny, taniny a terpenoidy. Jeho hlavní vonnou složkou je eugenol (4-allyl-2-methoxyfenol), u kterého byla prokázána antifungální aktivita (Ramadan et al. 2013). Andrade et al. (2014) ve své studii uvádí, že eugenol je v hřebíčkové silici obsažen v množství 83,63 %. Dále je zde přítomný β -karyofylen (12,39 %), α -humulen (3,05 %) a eugenol acetát (0,95 %).

U hřebíčkového esenciálního oleje bylo zjištěno mnoho biologických účinků, jako jsou antimikrobiální, insekticidní a antioxidační vlastnosti. Tradičně je přidáván do potravin ke zlepšení aroma. Jeho přítomnost v sýrech a mase vykazuje antilisterickou aktivitu. Může být ovšem použit také v řadě nepotravinářských aplikací. Je například účinný proti bakteriím přítomným v dutině ústní, které způsobují zubní kaz a parodontopatii. Dále chrání proti tkáňovým onemocněním očních čoček a srdečního

svalu. Při testu provedeném na diabetických kryších bylo prokázáno, že hřebíčková léčba významně snižuje zvýšenou hladinu cukru v krvi a peroxidaci lipidů (Ramadan et al., 2013).

3.2.2 Skořicovník (*Cinnamomum*)

Skořicovník se řadí k čeledi *Lauraceae* (vavřínovité). Ve světě je jedním z nejdůležitějších druhů koření tradiční rostlinné medicíny. Široce je rozšířen zejména v Číně, Indii, Vietnamu, Malajsii, na Madagaskaru, Srí Lance a Seychelských ostrovech (Jeyaratnam et al., 2016).

Rod *Cinnamomum* zahrnuje přibližně 200 druhů rostlin. Hospodářsky nejvýznamnější je skořicovník cejlonský (*Cinnamomum zeylanicum*, syn. *Cinnamomum verum*) a skořicovník čínský (*Cinnamomum cassia*). V obou případech se jedná o stálezelené stromy (popřípadě keře). Listy jsou vstřícné, jednoduché a nápadně žilkované. Nenápadné drobné květy, žlutě zbarvené, vyrůstají v řídkých vrcholičnatých květenstvích. Plodem je bobule modročerné barvy (Valíček, 2005).

Skořicový esenciální olej je známý svými antioxidačními, antibakteriálními a protizánětlivými vlastnostmi. V současné době je široce využíván v kosmetice, potravinářství a farmaceutickém průmyslu (Xing et al., 2014). Pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) identifikoval Unlu et al. (2010) devět hlavních složek skořicové silice (*Cinnamomum zeylanicum*), které představují 99,24 % z celkového vzorku. Jedná se o α -pinen (1,64 %), benzaldehyd (9,94 %), 1,8-cineol (1,55 %), limonen (4,42 %), linalool (1,38 %), cinnamaldehyd (68,95 %), eugenol (2,77 %), cinnamyl acetát (7,44 %) a skořicovou kyselinu (1,15 %).

Kromě výše uvedených vlastností byly u silice z *Cinnamomum cassia* prokázány protialergické a protinádorové účinky. Antimutagenní aktivita je zřejmá také u esenciálního oleje z *Cinnamomum zeylanicum*. Mezi jeho další příznivé vlivy patří insekticidní a akaricidní působení (Jeyaratnam et al., 2016; Unlu et al., 2010).

3.2.3 Tymián obecný (*Thymus vulgaris*)

Thymus vulgaris (z řeckého slova thymos – odvážný, silný) patří do čeledi *Lamiaceae*, neboli hluchavkovité. Tato čeleď obsahuje přibližně 220 rodů, přičemž nejvíce příbuznými tymiánu jsou *Origanum*, *Satureja*, *Micromeria* a *Thymbra*. Tymián je široce rozšířen v oblasti Středozemního moře, která je také označována za původní

centrum jeho výskytu. Konkrétně se jedná o západní část Středozeří. V současnosti je běžně pěstován například v Itálii, Španělsku, Francii nebo Řecku. Roste ale také v oblasti USA a na jihovýchodní a jihozápadní Sibiři a Zakavkazsku (Morales, 2002; Valíček, 2005).

Charakteristickými morfologickými znaky pro tymián jsou jednoduché celokrajné listy s krátkými řapíky, dále čtyřhranná lodyha, která ve spodní části dřevnatí, a drobné květy uspořádané do květenství lichoklas složený z lichopřeslenů. Zbarvení dvoupyskaté koruny může být fialové, růžové, krémové či bílé barvy. Výška rostliny je 20 – 40 cm (Morales, 2002; Valíček, 2005).



Obr. 6: Tymián obecný

Z chemického hlediska obsahuje tymián flavonoidy, taniny, saponiny, fenolické sloučeniny a zvláště esenciální oleje, jejichž dominantním zástupcem je monoterpen thymol. Hlavní složky komerčně dostupné tymiánové silice jsou: thymol (23 – 60 %), γ -terpinen (18 – 50 %), p-cymen (8 – 44 %), karvakrol (2 – 8 %) a linalool (2 – 4 %). Na základě převažujícího zastoupení jednotlivých monoterpenoidů v esenciálním oleji se rozlišuje několik různých variant a kultivarů tymiánu obecného (Satyal et al., 2016; Ferreira et al., 2016).

Využití tymiánu je velmi široké. Již od antických dob je používán v potravinářství. Přidává se do likérů, k masu a k sýrům pro ochucení. V dnešní době je také součástí provensálského koření a tzv. Bouquet garni (svazek bylinek vhodných

pro přípravu polévek, vývarů a dalších pokrmů). Díky své typické vůni je často součástí kosmetických produktů, jako například deodorantů, zubních past a ústních vod. V medicíně je dobře známou bylinkou, která se po tisíce let využívá například proti kašli, zubnímu plaku, bronchitidě, kožním infekcím, alopecii a gastrointestinálním problémům (Satyal et al., 2016; Tohidi et al., 2017).

3.3 Obecná charakteristika testovaných druhů mikroorganismů

3.3.1 Bakterie

Bakterie patří mezi prokaryotické organismy, které jsou charakteristické tím, že bakteriální chromozom je v cytoplazmě uložen volně. Jejich velikost se nejčastěji pohybuje v rozmezí 0,5 – 1,5 μm . Tvary buněk jsou tyčinkovité, méně často pak kulovité nebo vláknité. Dle stavby buněčné stěny lze bakterie rozdělit na grampozitivní a gramnegativní druhy. Pokud se Gramův barvicí roztok z buněk nevymývá, jedná se o grampozitivní bakterie. Ty mají v buněčné stěně silnou vrstvu peptidoglykanu, která je vyplněna teichoovou kyselinou. Na peptidoglykan jsou dále navázány ještě polysacharidy skládající se z glukosy, galaktosy, mannosy a tak dále. Buněčná stěna gramnegativních bakterií je složena z tenké peptidoglykanové vrstvy a z vnější membrány, která je složena z fosfolipidů, proteinů, lipoproteinů a lipopolysacharidů. Prostor mezi těmito strukturami se označuje jako periplazmatický (Šilhánková, 2002).

3.3.1.1 Rod *Escherichia*

Taxonomické zařazení rodu *Escherichia* je následující: doména: *Bacteria*, kmen: *Proteobacteria*, třída: *Gamma Proteobacteria*, řád: *Enterobacteriales*, čeleď: *Enterobacteriaceae* (Sedláček, 2007).

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* jsou spojeny s mnoha problémy týkajícími se bezpečnosti a trvanlivosti potravin. Mohou být přítomny například v nedostatečně zpracovaných mléčných produktech. Enzymatickým rozkladem proteinů nebo lipidů vyvolávají kažení výrobků, které vede k podstatným ekonomickým ztrátám (Ntuli et al., 2016).

Escherichia coli je součástí normální intestinální mikroflóry člověka i dalších savců (Fratamico et al., 2016). Vyskytuje se ve spodní části střevního traktu a tudíž také ve výkalech. Pokud je přítomna ve vodě nebo potravinách, je zřejmé, že došlo k jejich kontaminaci fekáliemi. *Escherichia coli* patří do skupiny gramnegativních tyčinek,

fermentuje jednoduché cukry za vzniku organických kyselin (kyselina mléčná, pyrohroznová, octová, mravenčí), oxidu uhličitého a vodíku (Šilhánková, 2002).

K sérotypizaci *E. coli* se tradičně využívá test založený na reakci protilátky a určitého antigenu, který je umístěn na povrchu buňky. V současné době rozlišujeme přibližně 186 O-antigen sérotypů a 53 sérotypů s H-antigenem. Patogenní skupiny *E. coli*, které způsobují řadu onemocnění lidí a zvířat, lze rozdělit na druhy způsobující průjemová a extraintestinální onemocnění (zánět močových cest, meningitida, pneumonie, septikémie a další). Podle faktorů virulence, které *E. coli* nese, se dále rozlišuje na kmeny enteropatogenní (EPEC), enterotoxigenní (ETEC), enteroinvazivní (EIEC), enteroagregační (EAEC), Shiga-toxin produkující *E. coli* (STEC), difúzně adherentní (DEAC) a adherentně invazivní (AIEC) (Fratamico et al., 2016).

3.3.1.2 Rod *Enterococcus*

Z fylogenetického hlediska patří rod *Enterococcus* do skupiny grampozitivních druhů. Jako samostatný rod vznikl v roce 1984, vyčleněním z rodu *Streptococcus*. Bakterie *Streptococcus faecalis* a *Streptococcus faecium* byly reklasifikovány na *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*. Společně s rody *Bavariicoccus*, *Catelicoccus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* a *Vagococcus* se řadí do čeledi *Enterococcaceae* (Lebreton et al., 2014).

Zástupci tohoto rodu se vyskytují v gastrointestinálním traktu lidí a zvířat. Stejně tak jsou přítomni také ve střevech hmyzu, v tradičních fermentovaných výrobcích, v mléčných produktech, na rostlinách, v půdě a ve vodě. Jsou označováni jako indikátorové bakterie fekálního znečištění (Lebreton et al., 2014). Ekologické studie ukazují, že jejich široké rozšíření je způsobeno jejich snadnou adaptací. Bakterie jsou schopny růstu v aerobním i anaerobním prostředí, které obsahuje 5 – 10 % chloridu sodného. Dále snáší až 40 % solí žlučových kyselin a hodnoty pH v rozmezí 4,6 – 9,9. Přežívají teplotu 63,5 °C po dobu třiceti minut. V nemocničním prostředí mohou u imunokompromitovaných pacientů způsobovat vznik infekcí (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2017).

Enterococcus faecalis a *Enterococcus faecium* jsou obecně nejčastěji se vyskytujícími enterokoky v potravinách. Díky svým proteolytickým a esterolytickým vlastnostem, schopnosti produkovat diacetyl a další významné aromatické sloučeniny, jsou často využívány například při výrobě salámů, klobás nebo při zrání tradičních sýrů

vyráběných ve Středozeří (Řecko, Itálie, Španělsko, Portugalsko). Jejich množství se pohybuje v rozmezí $10^4 - 10^6$ CFU/g. Naopak jako kontaminující mikroflóra se vyskytují u fermentovaných španělských zelených oliv (Lebreton et al., 2014).

3.3.2 Kvasinky

Kvasinky se řadí do říše houby (*Fungi*). Jedná se o heterotrofní eukaryotní mikroorganismy. Jejich český název je odvozen od schopnosti zkvašovat monosacharidy, některé disacharidy a popřípadě také trisacharidy (Šilhánková, 2002). V potravinářském průmyslu mají jak pozitivní význam (například výroba piva, vína, lihu a kvasnic), tak také negativní (kažení masa, ryb, drůbeže a podobně) (Görner et Valík, 2004).

Pro svůj růst vyžadují kvasinky kyslík. Při jeho nedostatku však mohou přeměnit svůj metabolismus na fermentační, kdy dochází ke zkvašování jednoduchých cukrů za vzniku ethanolu a oxidu uhličitého. Teploty, které jsou příznivé pro kvasinky, se pohybují v rozmezí $0 - 45^\circ\text{C}$. Široké rozpětí je také u hodnot pH ($3 - 11$), přičemž některé druhy snášejí hodnoty pH až 1,5 (Görner et Valík, 2004).

3.3.2.1 Rod *Saccharomyces*

Rod *Saccharomyces* patří mezi rody tvořící askospory. Ty mají kulovitý až elipsoidní tvar, v asku se nachází v počtu $1 - 4$. Kvasinky náležející do tohoto rodu nikdy nevyužívají jako zdroj uhlíku laktosu a jako zdroj dusíku dusičnan (NO_3^-). Jejich tvar je většinou krátce elipsoidní, vejčité nebo až protáhlý (Šilhánková, 2002). Optimální hodnoty pH pro *Saccharomyces cerevisiae*, která náleží do tohoto rodu, se pohybují v rozmezí $2,5 - 8,5$. Nicméně jako acidofilní organismus lépe roste v prostředí s kyselým pH (Liu et al., 2015).

Již v dávné minulosti využívali lidé schopnosti kvasinek přeměnit cukry na ethanol a žádoucí vonné sloučeniny. Získávali tak potraviny a nápoje s prodlouženou trvanlivostí, bohaté na sensoricky aktivní látky, s lepší stravitelností, a díky přítomnosti alkoholu způsobující dobrou náladu. Jako čisté kultury se začaly používat až v 19. století, a to díky průkopnické práci Louise Pasteura a Emila Christiana Hansena (Gallone et al., 2016).

Saccharomyces cerevisiae je jedna z nejrozšířenějších kvasinek v prostředí, často označována jako pekařská nebo pivní kvasinka. Kromě využití v pekařském

průmyslu a pivovarnictví se používá například při výrobě bourbonské whisky, jablečného cideru nebo fermentovaného rýžového nápoje, běžně nazývaného jako saké. Pro jednotlivé komodity existují specifické kmeny, které se liší například tvorbou různých organických kyselin a esterů ovlivňujících výslednou vůni výrobku. Ve formě pekařského droždí je *Saccharomyces cerevisiae* dobrým zdrojem bílkovin a vitamínů skupiny B, s výjimkou kobalaminu. Často je využívána také jako doplněk stravy, zvláště v zemích, kde je v potravě nedostatek proteinů (Moyad, 2007).

3.3.2.2 Rod *Candida*

Jako symbiotické organismy se kvasinky rodu *Candida* vyskytují u 75 % zdravých jedinců a u kompromitovaných pacientů mohou způsobovat vznik infekčních onemocnění. Za nejvíce patogenní druh je obecně považována *Candida albicans* a dále *Candida tropicalis* (Weerasekera et al., 2016).

Pro *Candida tropicalis* jsou charakteristické kulovité nebo mírně elipsoidní buňky o velikosti 4,3 – 7,2 x 5,8 – 10,8 μm, které snadno tvoří pseudomycelium. Kolonie jsou měkké, krémovité, hladké nebo kučeravé. Jako kontaminant se často vyskytuje v kvasném průmyslu, kdy díky svým nízkým nárokům na prostředí vytlačuje z fermentace jiné kvasinky. Pod názvy *Candida kefir* či *Candida murmanica* se používá pro výrobu droždí z netradičních substrátů, které je určeno pro krmné účely (Kalhotka, 2014).

Vznik infekcí způsobených *Candida tropicalis* může být u lidí spojen s antineoplastickou léčbou, výskytem akutní leukémie nebo neutropenie. Rychlé šíření a vysoká mortalita je zřejmě způsobena řadou faktorů virulence, které se u *Candida tropicalis* nachází. Jedná se například o produkci hemolytických faktorů, sekreci lytických enzymů (především fosfolipáz a proteáz, které hrají důležitou roli při invazi a přežití v hostitelské tkáni) a dobrou přilnavost k povrchu buňky (Brilhante et al., 2016).

3.3.2.3 Rod *Yarrowia*

Rod *Yarrowia* byl vytvořen Van der Walt a Von Arx v roce 1980, kdy David Yarrow z Delfské mikrobiologické laboratoře tento rod identifikoval. Většina kmenů rodu je striktně aerobní a není schopna růstu při teplotě vyšší než 32 °C (Nicaud, 2012).

Yarrowia lipolytica (dříve označovaná jako *Candida lipolytica*) je v přírodě široce rozšířena. Nachází se také v masných výrobcích, včetně párků, a v mléčných produktech, zvláště v sýrech. Může se vyskytovat také na fekáliích, orofaryngeálních výtěrech a kožních stěrech asymptomatických osob. Přesto, že byla dříve považována za kvasinku s nízkou virulencí, bylo zjištěno, že se může podílet na vzniku nozokomiálních nákaz (Zhao et al., 2015).

V mnoha biotechnologických a environmentálních oblastech neustále roste zájem o využití této kvasinky. *Yarrowia lipolytica* je schopna rozkládat a využívat široké spektrum uhlíkových zdrojů, jako je glukosa, alkoholy, acetáty, hydrofobní substráty (alkany, mastné kyseliny, oleje), ale také některé nízkomolekulární látky. Dále je schopna je biotransformovat na produkty s vyšší přidanou hodnotou (například organické kyseliny, jednoduché buněčné proteiny, tuky, enzymy). Její intenzivní sekreční činnost je využívána také v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Slouží například pro výrobu aromatických látek, organických kyselin, polyalkoholů a dalších látek (Bellou et al., 2014; Zhao et al., 2015).

4 METODIKA

V rámci experimentální části diplomové práce byla na vybraných druzích mikroorganismů izolovaných z masných výrobků nebo získaných z České sbírky mikroorganismů (CCM) testována antimikrobiální aktivita vybraných silic a jejich směsí.

4.1 Izolace mikroorganismů

Izoláty bakterií byly získány v rámci mikrobiologických analýz masných výrobků z poloprovozů na ústavu Technologie potravin Mendelovy univerzity. Navážka 10 g masného výrobku byla spolu s 90 ml fyziologického roztoku homogenizována 3 minuty pomocí homogenizátoru typu STOMACHER. Příslušné desítkové ředění vzorku bylo inokulováno do sterilních jednorázových Petriho misek a bylo zalito rozehřátou a zchlazenou živnou půdou. Po uplynutí doby kultivace byly po vyhodnocení Petriho misek odebrány stěry vybraných charakteristických kolonií a přeočkovány na nové Petriho misky. Následně byly narostlé kolonie křížovým roztěrem přeočkovávány až do získání čistých kultur mikroorganismů vhodných pro identifikaci (obr. 8).



Obr. 7: Kultivace kvasinek na Chloramphenicol Glucose Agar

Zájmovou skupinou byly tyto mikroorganismy:

Enterokoky – stanovení proběhlo na živné půdě Compass *Enterococcus* Agar při 44 °C za 48 h. Následné pomnožení a přečištění probíhalo na téže půdě při 37 °C po dobu

72 h. Mikromycety (kvasinky) – ke stanovení byla využita živná půda Chloramphenicol Glucose Agar, na které byly kvasinky kultivovány 3 – 5 dnů při 25 °C. Získání čisté kultury probíhalo za stejných podmínek.

4.2 Použité živné půdy

Kultivace mikroorganismů proběhla na živných médiích (půdách), což jsou tekuté, polotuhé nebo tuhé směsi přesně definovaných látek. Skládají se z přírodních nebo syntetických součástí, které umožňují pomnožení nebo zachování životaschopnosti mikroorganismů (Burdychová et Sládková, 2007). Pro mikrobiologickou analýzu byly použity následující půdy:

4.2.1 Plate Count Agar (PCA)

Jedná se o neselektivní nutričně bohatou půdu, která je vhodná pro kultivaci celkového počtu mikroorganismů. Obsahuje 5,0 g tryptonu; 2,5 g kvasničného extraktu; 1,0 g glukózy a 12,0 g bakteriologického agaru. Pro jeho přípravu se odváží 20,5 g, které se následně rozpustí v 1 000 ml destilované vody. Pomocí kyseliny octové (popř. hydroxidu sodného) se pH půdy upraví na hodnotu $7 \pm 0,2$ při 25 °C. Sterilizace probíhá v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Půda je vyráběna firmou Biokar Diagnostics, Francie.

4.2.2 Chloramphenicol Glucose Agar

Agarová půda s kvasničným extraktem, glukózou a chloramfenikolem se používá pro kvasinky a plísňe. Je složena z kvasničného extraktu 5 g; glukózy 20 g; chloramfenikolu 0,1 g (inhibuje růst bakterií) a bakteriologického agaru 15 g. Příprava probíhá obdobným způsobem jako u PCA agaru. Navážka o hmotnosti 40,1 g se rozpustí v 1 000 ml destilované vody, pH půdy se upraví na $6,6 \pm 0,2$ při 25 °C a sterilizuje se 15 minut při 121 °C. Výrobcem půdy je Biokar Diagnostics, Francie.

4.2.3 Compass *Enterococcus* Agar

Jde o selektivní pomnožovací půdu, která je určená pro enterokoky. Jednotlivé buňky zde rostou modrou barvou (obr. 7). Médium obsahuje pepton 27,5 g; kvasničný extrakt 5 g; chlorid sodný 5 g; tween 80 1 g; selektivní agens 0,3 g, X-glukosid 0,1 g a bakteriologický agar 14,0 g. Hmotnost navážky potřebné k přípravě je 52,9 g.

Po rozpuštění v 1 000 ml destilované vody se pH upraví na $7,5 \pm 0,2$ a následuje sterilizace při 121°C po dobu 15 minut. Výrobce půdy je Biokar Diagnostics, Francie.



Obr. 8: Compass *Enterococcus* Agar s modře narostlými koloniemi

4.2.4 Tryptone Soya Broth (TBS)

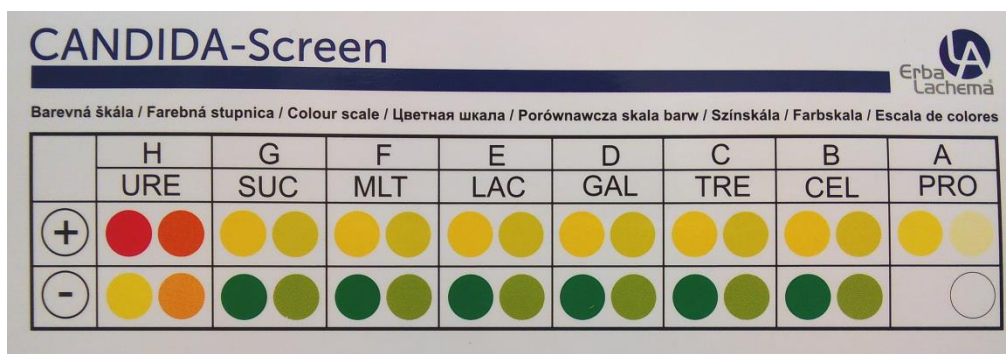
Trypton-sójový bujón se skládá z tryptonu 17 g, enzymaticky natrávené sójové moučky 3 g, glukózy 2,5 g, hydrogenfosforečnanu draselného 2,5 g a chloridu sodného 5 g. Na přípravu se použije 30 g. Navážka se smíchá s 1000 ml destilované vody. Po úplném rozpuštění se upraví hodnota pH na $7,3 \pm 0,2$ při teplotě 25°C . Následně proběhne sterilizace v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut. Výrobce je rovněž Biokar Diagnostics, Francie.

4.3 Identifikace mikroorganismů

Identifikace enterokoků a kvasinek probíhala pomocí biochemických Microlatestů dodaných od firmy Erba Lachema (Česká republika). Před vlastním provedením jednotlivých testů bylo nutné vytvořit si 24 h staré kultury.

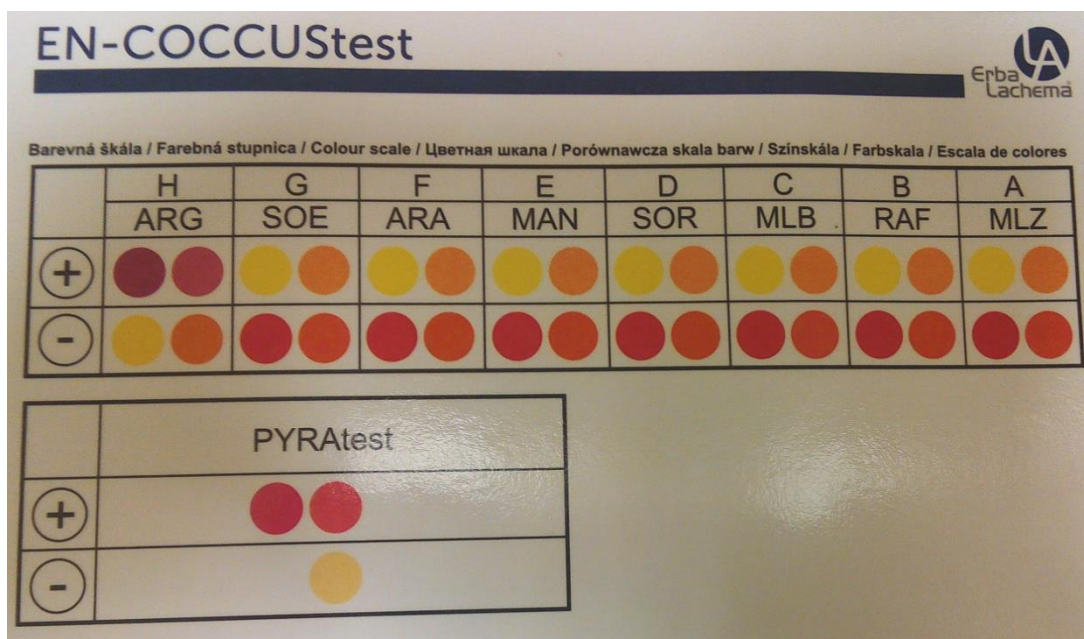
Pro identifikaci kvasinek byl použit CANDIDA-Screen test, založený na osmi dílčích testech (ureáza, sacharóza, maltóza, laktóza, galaktóza, trehalóza, celobióza a prolin). Do příslušných jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno vždy 0,1 ml dobře zhomogenizované mikrobiální suspenze o hustotě 3 McF a jamky byly následně převrstveny několika kapkami sterilizovaného parafinového oleje. Inkubace probíhala 24 h při teplotě 25°C . Na základě barevných reakcí byla provedena identifikace (obr. 9).

Pro potvrzení správného výsledku a vyloučení možné chyby způsobené nežádoucí kontaminací byl tento test opakován dvakrát.



Obr. 9: Barevná škála pro vyhodnocení CANDIDA-Screen testu

24 h stará kultura enterokoků pro ENCOCCUStest byla připravena na selektivní půdě Compass *Enterococcus* Agar. ENCOCCUStest umožňuje provést identifikaci 36 kmenů, pomocí biochemických testů pro arginin, sorbózu, arabinózu, mannitol, sorbitol, melibiózu, raffinózu a melezitózu. Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 0,1 µl bakteriální suspenze, jejíž hustota činila 2 McF. Jamka H (test pro arginin) byla převrstvena kapkou sterilního parafinového oleje. Inkubace proběhla při teplotě 37 °C. Po 24 h byl pomocí barevné srovnávací stupnice test vyhodnocen (obr. 10). Jako doplňkový test pro potvrzení či vyvrácení výsledku byl použit PYRAtest, který je založený na rychlé detekci aktivity pyrrolindolarylamidázy. Zóna testovacího proužku byla nejdříve navlhčena 20 µl destilované vody a poté byl proveden stěr z příslušného agaru. Inkubace proběhla za laboratorní teploty. Po 10 minutách bylo pomocí kapátka přidáno speciální činidlo pro PYRAtest. Jako pozitivní reakce byl hodnocen vznik červeného zbarvení.



Obr. 10: Barevná škála pro vyhodnocení EN-COCCUStestu

4.4 Testování antimikrobiálních účinků (antimikrobiálního působení silic na vybrané mikroorganismy)

4.4.1 Testované silice

K experimentu byly použity čtyři vzorky silice, získané od firmy SYNPO. Jednalo se o extrakty z hřebíčku, skořice, tymiánu a jejich směs v poměru 1:1:1. Tyto látky byly testovány vždy ve dvou koncentracích – neředěné a 10%. Ředěná silice byla připravena smícháním 1,8 ml dimethylsulfoxidu s 0,2 ml koncentrátem.

4.4.2 Sbírkové kmeny a izoláty mikroorganismů

Rostlinné silice byly testovány na třech kmenech bakterií – *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, a třech kvasinkách – *Yarrowia lipolytica*, *Candida tropicalis* a *Saccharomyces cerevisiae*. Druhy *Enterococcus faecium* a *Yarrowia lipolytica* byly získány vlastní izolací z masných výrobků. Ostatní testované mikroorganismy byly dodány ve formě čistých sbírkových kultur od CCM (Česká sbírka mikroorganismů; Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta). *Escherichia coli* CCM 7929, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Candida tropicalis* CCM 8223 a *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8191.

4.4.3 Pomnožení mikroorganismů

Jako živné médium k pomnožení mikroorganismů byl použit TBS bujón. Sbírkové kultury dodané ve formě želatinových disků a izolované druhy byly kultivovány na inkubované třepačce při 37 °C pro bakterie a 25 °C pro kvasinky. Celková doba pomnožení byla 18 h.

4.4.4 Disková difúzní metoda

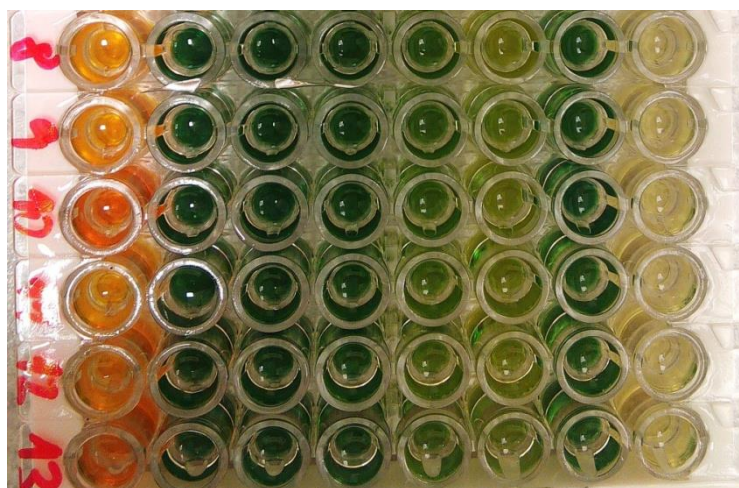
Princip diskové difúzní metody je založen na měření průměru inhibiční zóny (v mm), která vznikla v okolí papírového disku napuštěného určitou antimikrobiální látkou. Zjištěné výsledky se zpracovávají pomocí statistických testů.

Osmnáctihodinová kultura bakterií (kultivace pomocí TBS bujónu při teplotě 37 °C) a kvasinek (kultivace pomocí TBS bujónu při teplotě 25 °C) byla zcentrifugována (při 3 000 otáčkách, po dobu 20 minut). Supernatant byl odstraněn a zbylý sediment následně pomocí vortexu rozmíchán v 15 ml fyziologického roztoku. Hustota takto připravené bakteriální suspenze byla upravena na 1 McF. Pouze u kmene *Candida tropicalis* se v průběhu kultivace nepodařilo získat dostatečné množství buněk, takže výsledná hustota odpovídala hodnotě 0,68 McF. Na předem připravené Petriho misky s PCA bylo inokulováno 0,1 ml vzorku. Pomocí jednorázové plastové tyčinky byl proveden roztěr po celém povrchu agaru. Dalším krokem byla příprava a ředění silic. Na sterilní papírové disky bylo nanášeno vždy 30 µl příslušné silice. Takto připravené disky byly vyžíhanou pinzetou přeneseny na povrch živné půdy (dva disky na jednu Petriho misku). Pro každý vzorek silice proběhlo testování na třech miskách, celkově tedy v šesti opakováních. Byla provedena také kontrola na růst mikroorganismů a pro zjištění, zda výsledky nebudou ovlivněny použitým dimethylsulfoxidem. Inkubace proběhla v termostatech při 25°C (pro kvasinky) a 37°C (pro enterokoky a *E. coli*). Odečítání výsledků bylo realizováno dvakrát, v intervalech 20 a 44 h od počátku inkubace.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Identifikace izolovaných kultur

Na základě biochemického testu CANDIDA-Screen byla provedena identifikace šesti čistých kultur kvasinek vyizolovaných z masných výrobků (obr. 12). Podle barevných změn jednotlivých jamek mikrotitrační destičky (obr. 11) bylo zjištěno, že všech šest vzorků náleží ke stejnému druhu. Jedná se o druh *Yarrowia lipolytica* (*Candida lipolytica*). Tento závěr byl potvrzen i ve druhém opakování testu, který byl uskutečněný po dalším přeočkování mikroorganismů. Důvodem přeočkování bylo ověření, zda se jedná o skutečně čistou kulturu.

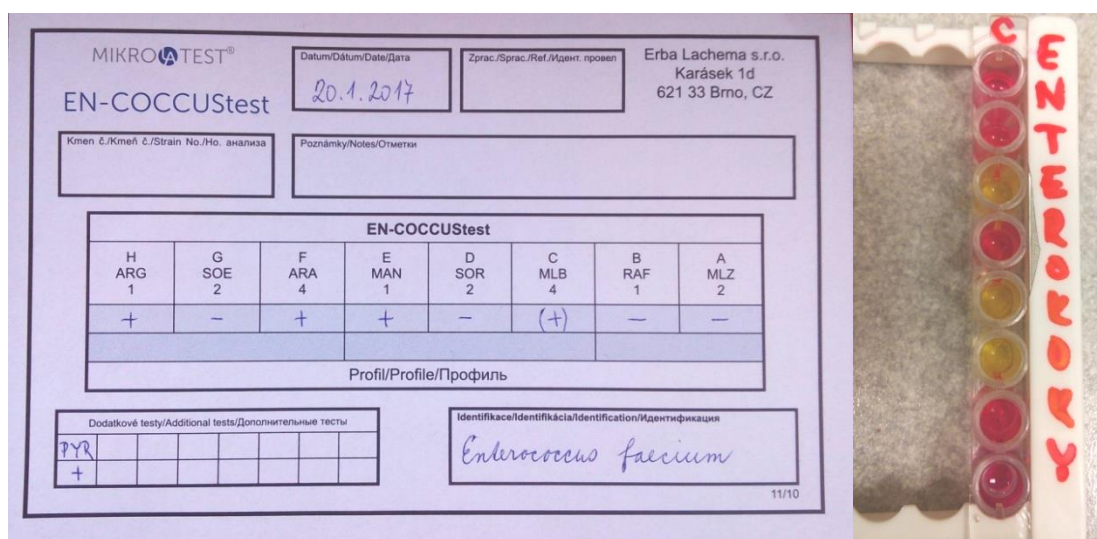


Obr. 11: Zbarvení mikrotitrační destičky pro CANDIDA-Sreen po 24 h

MIKROLATEST®		Datum/Dátum/Date/Дата	Zprac./Sprac./Ref./Идент. провед		Erba Lachema www.erbalachema.com		
CANDIDA-Screen		23.1.2017					
Kmen č./Кмеш č./Strain No./Но. анализа		Poznámky/Notes/Отметки					
H URE 1	G SUC 2	F MLT 4	E LAC 1	D GAL 2	C TRE 4	B CEL 1	A PRO 2
+	-	-	-	-	-	-	+
= Profil/Profile/Профиль							
Dodatkové testy/Additional tests/Дополнительные тесты				Identifikace/Identifikácia/Identification/Идентификация			
				Candida lipolytica			
03/14							

Obr. 12: Vyhodnocovací formulář pro CANDIDA-Screen test

Identifikace mikroorganismů z rodu *Enterococcus* proběhla pomocí biochemického testu EN-COCCUStest a doplňkového testu pro detekci pyrrolindolarylamidázy (PYRAtest). Zbarvení jamek mikrotitrační destičky odpovídalo druhu *Enterococcus faecium* (obr. 13). Tento výsledek potvrdil také PYRAtest. Po jedné až dvou minutách od přidání speciálního činidla na proužek došlo v místě, kde byly přítomny bakterie, ke vzniku červené barvy (obr. 14). Reakci byla tedy vyhodnocena jako pozitivní.



MIKROTEST®
EN-COCCUStest

Datum/Datum/Date/Data: 20.1.2017
Zprac./Sprac./Ref./Идент. проевен: Erba Lachema s.r.o. Karásek 1d 621 33 Brno, CZ

Kmen č./Кмењ č./Strain No./No. анализа:
Poznámky/Notes/Отметки:

EN-COCCUStest							
H ARG 1	G SOE 2	F ARA 4	E MAN 1	D SOR 2	C MLB 4	B RAF 1	A MLZ 2
+	-	+	+	-	(+)	-	-
Profil/Profile/Профиль							

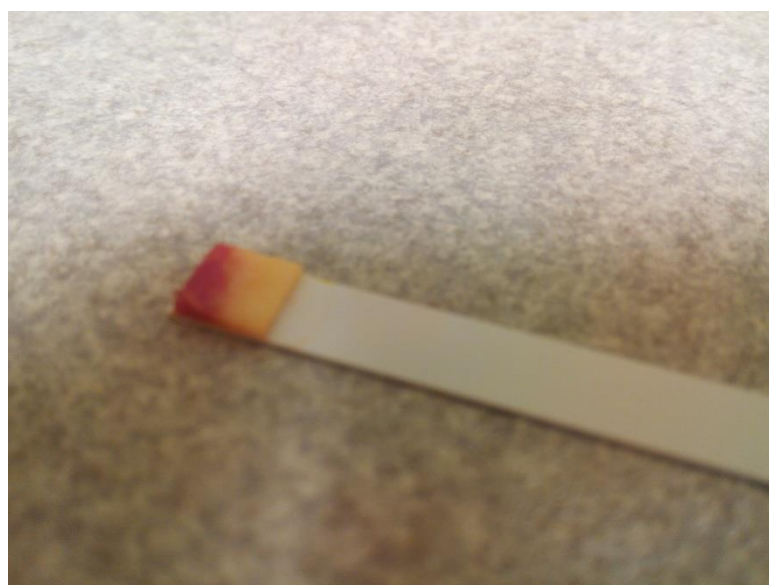
Dodatkové testy/Additional tests/Дополнительные тесты

PYR							
+							

Identifikace/Identifikácia/Identification/Идентификация: *Enterococcus faecium*

11/10

Obr. 13: Vyhodnocení EN-COCCUStestu



Obr. 14: Vyhodnocení PYRAtestu

5.2 Vyhodnocení diskové difúzní metody

Vyhodnocení diskové difúzní metody proběhlo na základě zjištěných průměrů inhibičních zón, které byly u všech vzorků měřeny dvakrát, vždy v intervalu 20 a 44 h od počátku inkubace. Pokud se u testované látky neprojeví antimikrobiální účinky, byla velikost inhibiční zóny rovna průměru papírového disku (9 mm).

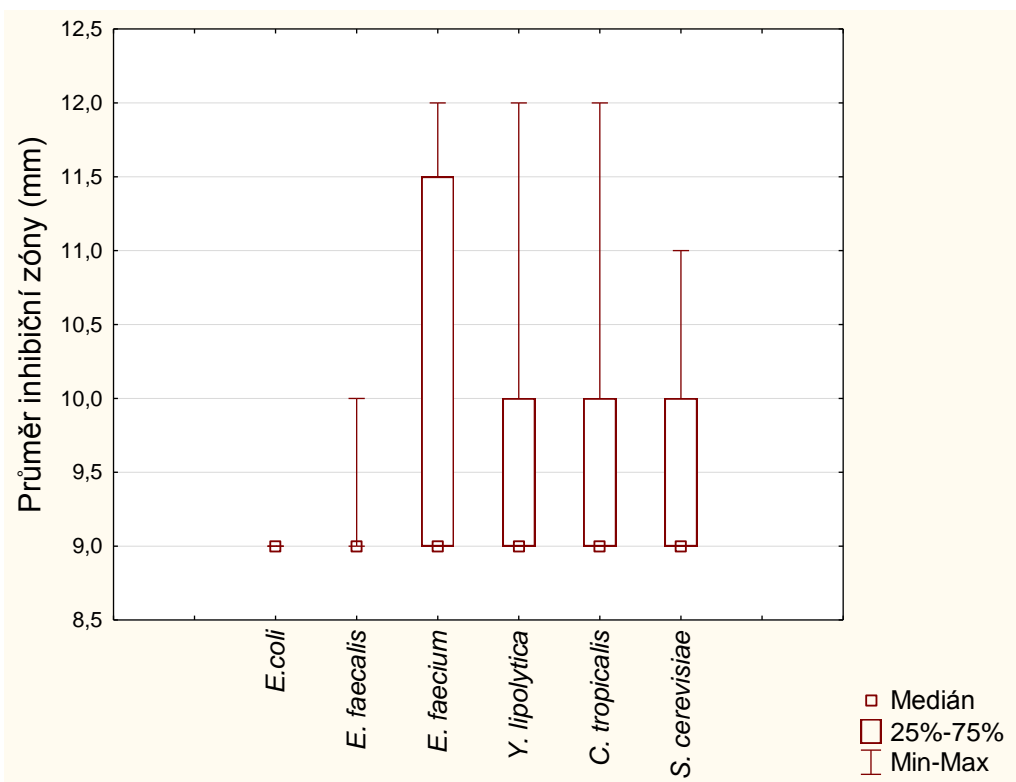
5.2.1 Vyhodnocení kontrolních vzorků

Životaschopnost použitých kultur byla ověřena pomocí kontrolního testu, kdy na Petriho misky byly naočkovány pouze příslušné kmeny mikroorganismů. U všech šesti testovaných druhů byl již po dvacetihodinové kultivaci zřetelně viditelný jejich růst (obr. 15).

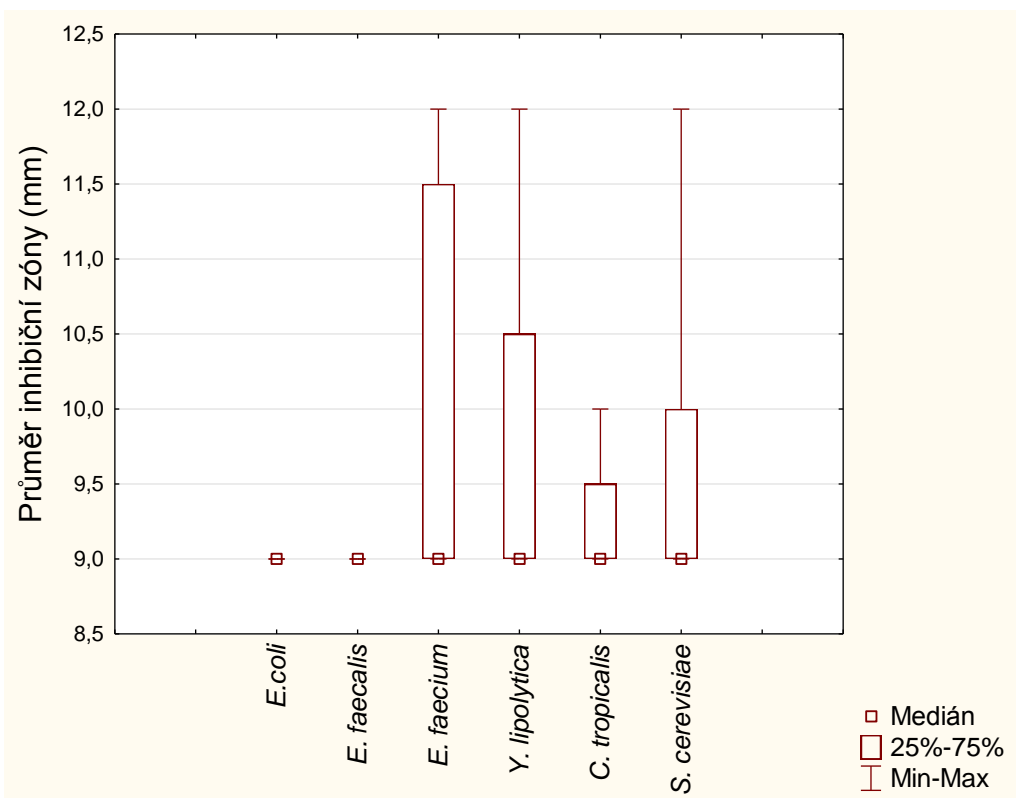


Obr. 15: Kontrola růstu kvasinek (*Y. lipolytica*, *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*)

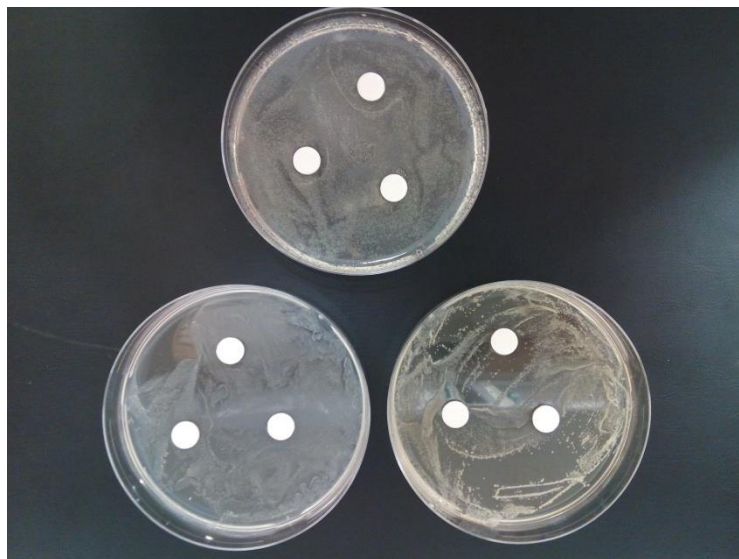
Naměřené hodnoty průměrů inhibičních zón v přítomnosti disků napuštěných pouze ředidlem jsou uvedeny v příloze 5. Z obrázku 16 a 17 vyplývá, že největší vliv DMSO byl zjištěn u kmene *Enterococcus faecium*, (po 20 i 44 h kultivace). Pro statistické vyhodnocení byl použit jednovýběrový Wilcoxonův test, který potvrdil nulovou hypotézu (zjištěné hodnoty průměrů se pohybují okolo čísla 9). Je tedy zřejmé, že použité ředidlo nemá negativní účinky na testované mikroorganismy a neovlivnilo výsledky dalších analýz (obr. 18).



Obr. 16: Graf znázornění velikostí inhibičních zón (mm) u DMSO po 20 h



Obr. 17: Graf znázornění velikostí inhibičních zón (mm) u DMSO po 44 h



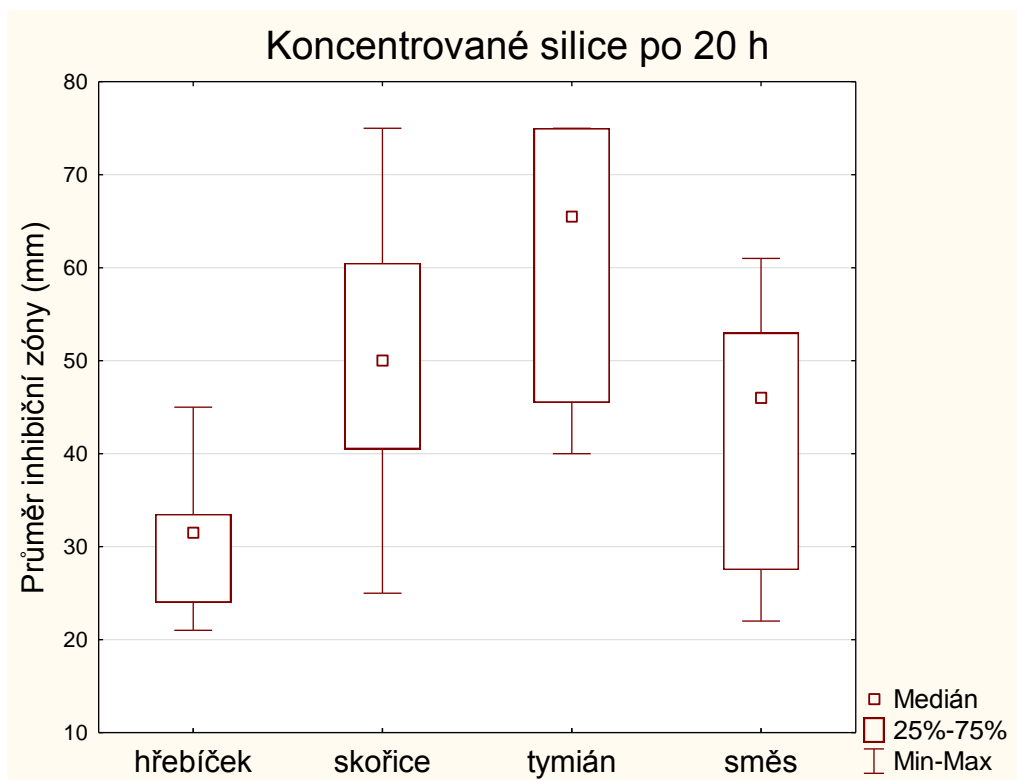
Obr. 18: Kontrola kvasinek při použití ředidla (*Y. lipolytica*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae*)

5.2.2 Vyhodnocení inhibičního účinku silic

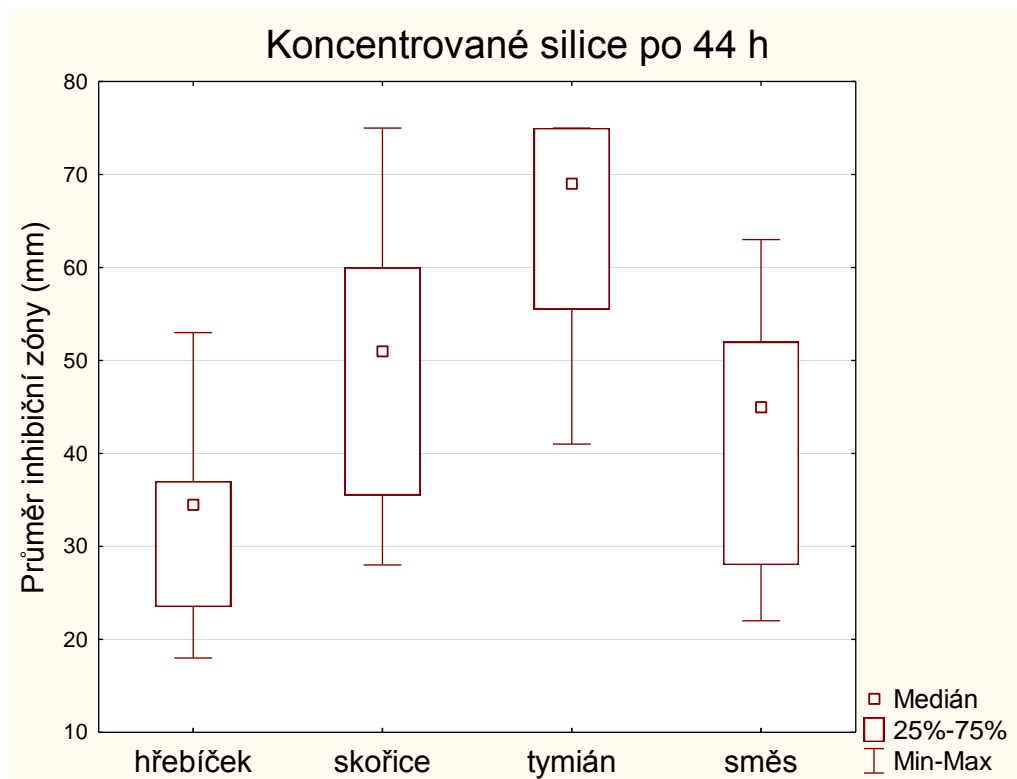
K vyhodnocení inhibičního účinku jednotlivých druhů silic byl použit test Kruskal-Wallisova ANOVA. Z naměřených hodnot uvedených v příloze (příloha 1, 2, 3 a 4) vyplývá, že všechny testované esenciální oleje měly na bakterie i kvasinky inhibiční účinek. Výsledky měření po 20 a 44 h kultivace jsou téměř shodné.

U koncentrovaných silic dosáhl po 20 h kultivace největší inhibiční aktivity tymián a skořice. I přesto, že podle vícenásobného porovnání zde není významný rozdíl, je z grafu zřejmé, že tymiánová silice působí na mikroorganismy nejvíce (obr. 19). Tento závěr potvrzují i naměřené hodnoty po 44 h (obr. 20). Zde jsou průměry inhibičních zón u tymiánu statisticky významně odlišné od působení ostatních silic. Nejnižší účinnost byla v obou případech zjištěna u hřebíčkové silice (obr. 21).

Antimikrobiální aktivita esenciálních olejů různého rostlinného původu byla testována v mnoha studiích. Krisch et al. (2011) uvádí, že mezi nejlepší inhibitory růstu kvasinek patří silice z tymiánu a oregána. Důvodem je přítomnost fenolických látek thymolu a karvakrolu, které způsobují poškození mikrobiální membrány.



Obr. 19: Graf porovnání inhibičních účinků koncentrovaných silic po 20 h kultivace



Obr. 20: Graf porovnání inhibičních účinků koncentrovaných silic po 44 h kultivace

Účinnost hřebíčkového a skořicového esenciálního oleje a jejich smíšené nanoemulze zkoumali Zhang et al. (2017). Testování probíhalo na bakteriích *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella Typhimurium* a *Staphylococcus aureus*. Na rozdíl od výsledků této diplomové práce byla u všech mikroorganismů stanovena vyšší inhibiční aktivita u hřebíčkové silice. Nejvyšší účinek byl zjištěn při použití hřebíčko-skořicové nanoemulze. Znamená to tedy, že tato nanoemulze má vyšší antimikrobiální aktivitu, než jednotlivé esenciální oleje, které jsou její součástí.

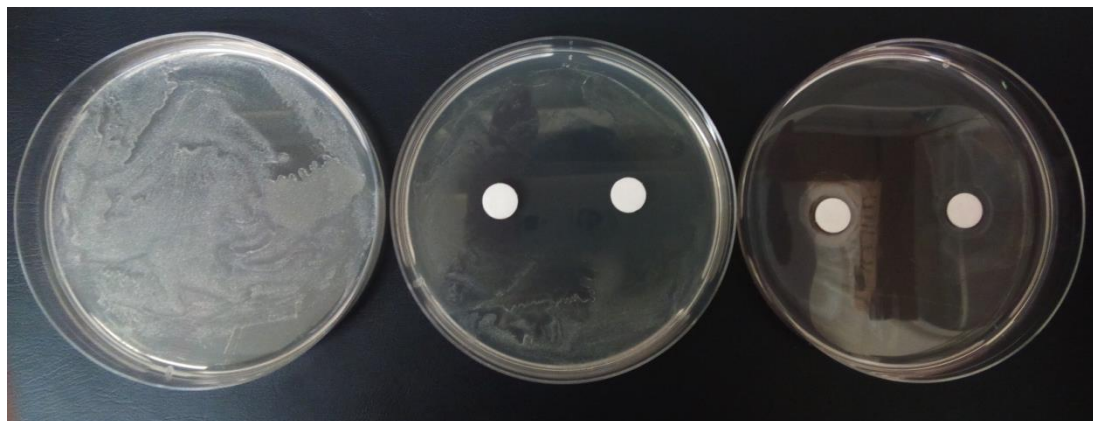
Studie (Ayoola et al., 2008) zabývající se chemickou analýzou a antimikrobiální aktivitou hřebíčkového esenciálního oleje také potvrdila jeho efektivitu proti plísním (*Candida albicans*), gramnegativním (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Paratyphi*, *Citrobacter* spp. a *Enterobacter cloacae*) a grampozitivním bakteriím (*Staphylococcus aureus*). Silice byla získána z květních pupat hřebíčkovce vonného parní destilací. Následná GC-MS analýza určila jako hlavní složku eugenol. Dále zde byl přítomný karyofylen, eugenol acetát a α -humulen. Velikost inhibiční zóny pro bakterii *E. coli* činila 18 mm (při použití extrahovaného hřebíčkového oleje) a 23 mm (při použití olejového extraktu o koncentraci 445 mg/ml). Jako solvent byl použit methanol.



Obr. 21: *Candida tropicalis* – kontrola, 10% a koncentrovaná hřebíčková silice

Chemat et al. (2012) testovali antimikrobiální účinky rostliny *Thymus algeriensis genuinus* na 8 druhů bakterií a 2 druhy kvasinek. Výsledky studie potvrdily vysokou inhibiční aktivitu esenciálního oleje z této byliny. Pomocí diskové difúzní metody byly stanoveny průměry inhibičních zón, u bakterií činila nejvyšší hodnota 75 mm (*Pseudomonas aeruginosa*) a u kvasinek 45 mm (*Saccharomyces cerevisiae*). Podle výsledků této diplomové práce má tymiánová silice (*Thymus vulgaris*) největší

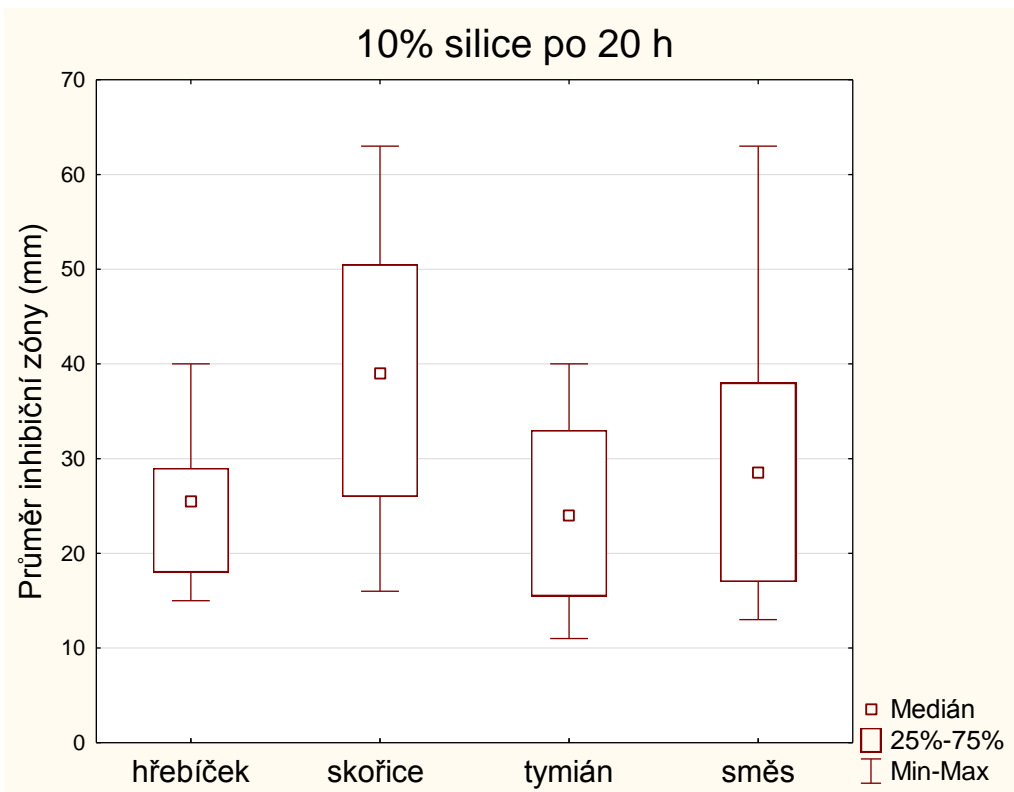
antibakteriální vliv na *E. coli* (64,67 mm). U *Saccharomyces cerevisiae* byla naměřena inhibiční zóna o velikosti 75 mm (obr. 22), což je vyšší hodnota než u silice *Thymus algeriensis genuinus*.



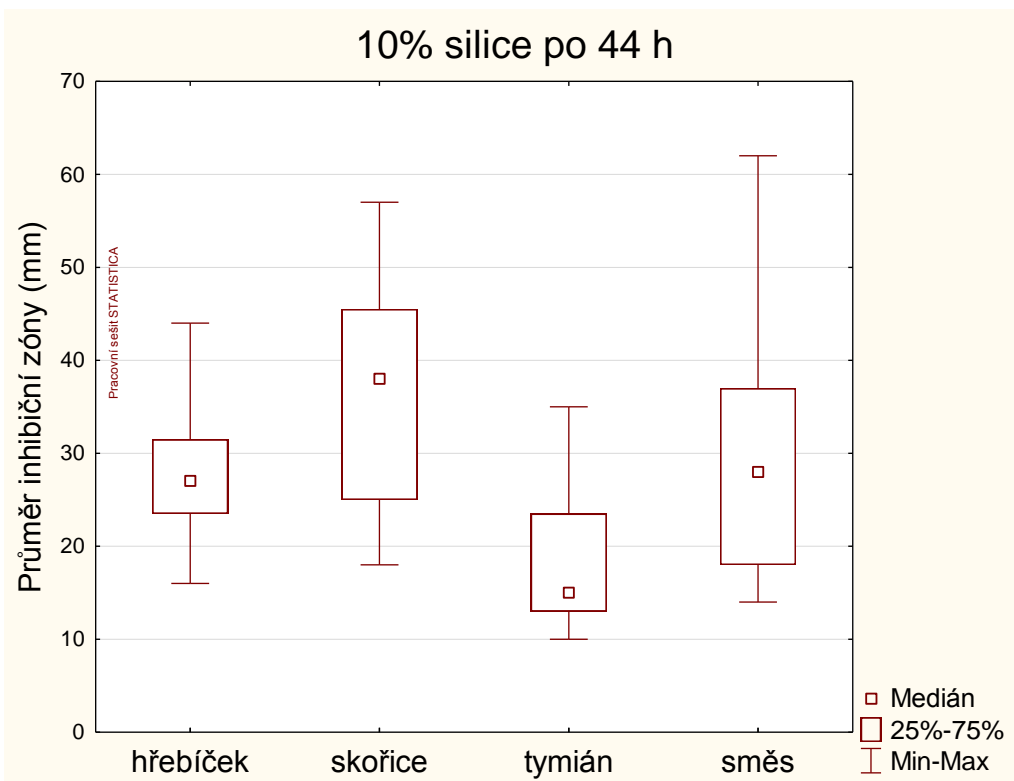
Obr. 22: *Saccharomyces cerevisiae* – kontrola, 10% a koncentrovaná tymiánová silice

Porovnáním účinnosti skořicových esenciálních olejů komerčně zakoupených v lokálním obchodě v Turecku a přírodních silic, které byly získané ze skořicové kůry vodní destilací, se zabývá Kaskatepe et al. (2016). Bylo zjištěno, že antimikrobiální aktivita úzce souvisí s množstvím hlavní složky, trans-cinnamaldehydu. Statisticky významný rozdíl nebyl nalezen mezi testovanými přírodními silicemi a dvěma komerčními. U třetí komerčně získané silice byla antimikrobiální aktivita průkazně nižší, což také odpovídá výrazně nižšímu obsahu trans-cinnamaldehydu. Je tedy zřejmé, že komerčně dostupné silice se od sebe navzájem liší. Největší inhibiční vliv se projevil u kvasinky *Candida albicans*.

Při použití 10% roztoku silic byla po 20 h kultivace zjištěna průkazně největší inhibice mikroorganismů skořicovým esenciálním olejem (obr. 23). Po dalších 24 h však došlo ke změně, kdy je sice z grafu zřejmé, že má skořice opět největší antimikrobiální aktivitu, avšak statisticky tento rozdíl potvrzen nebyl (obr. 24). Nejnižší účinnost vykazovala tymiánová silice. Z výsledků experimentu vyplývá, že koncentrované silice jsou účinnější. Nejvyšší rozdíl v inhibici mezi koncentrovanou a 10% silicí byl zjištěn u tymiánu.



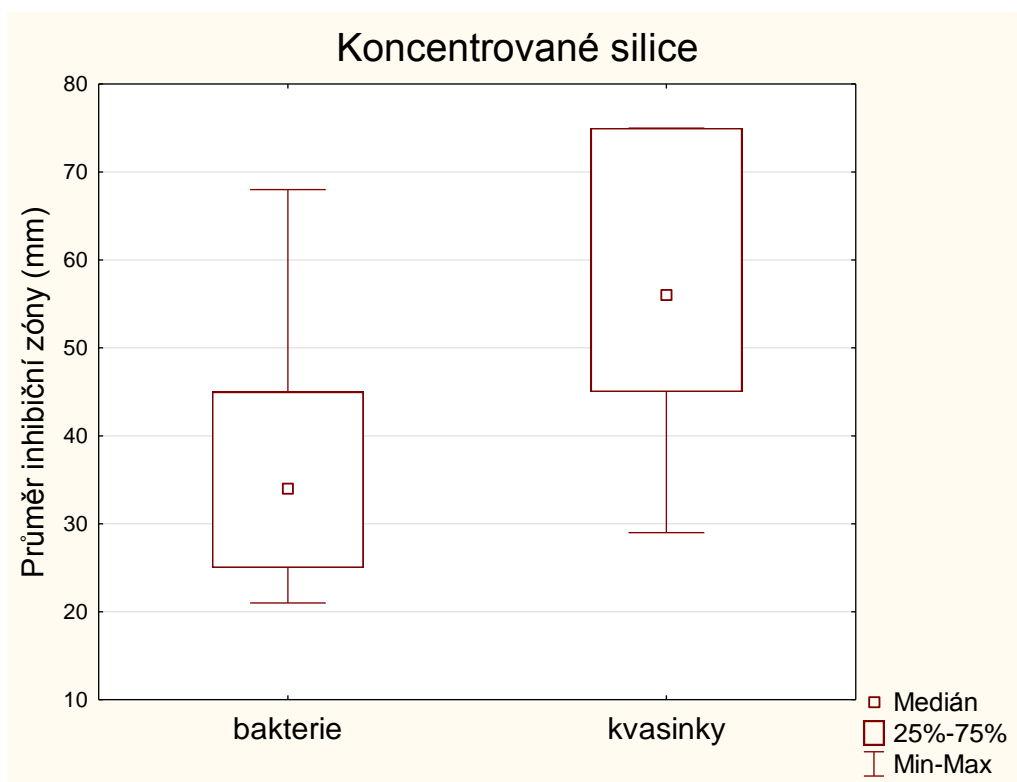
Obr. 23: Graf porovnání inhibičních účinků 10% silic po 20 h kultivace



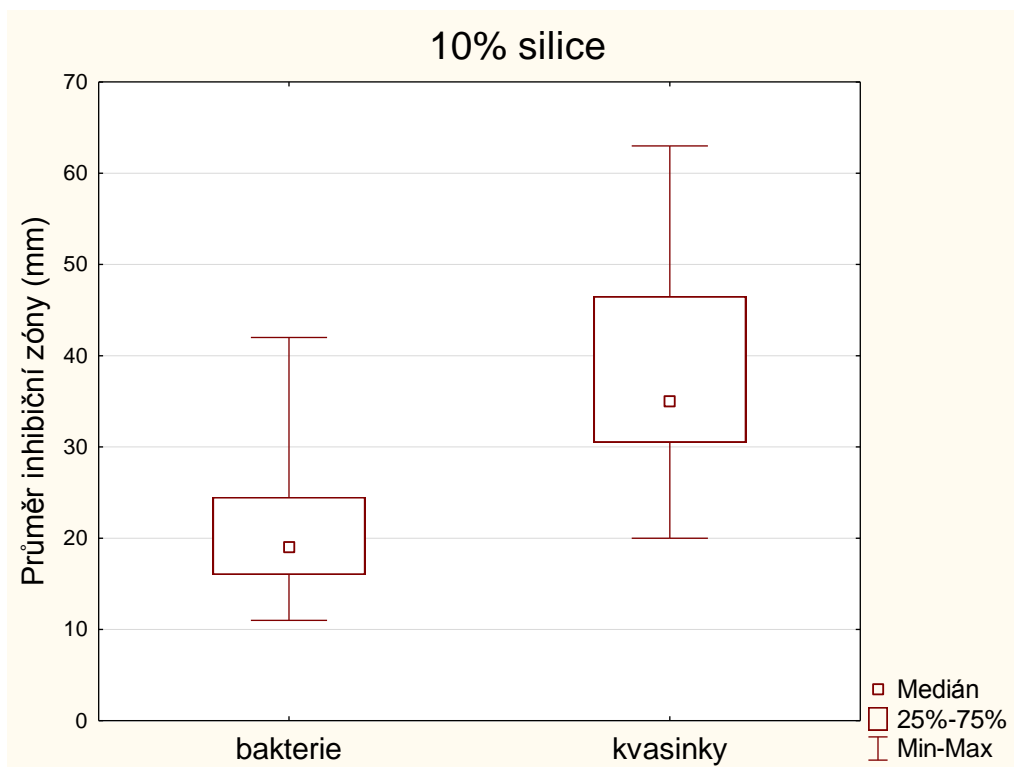
Obr. 24: Graf porovnání inhibičních účinků 10% silic po 44 h kultivace

Solomakos et al. (2008) uvádí, že tymiánový esenciální olej je účinný proti *Listeria monocytogenes* již v koncentraci 0,6 % (testován na TBS bujónu). Dále byla tymiánovaná silice, nisin a jejich směs aplikována na mleté hovězí maso. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití 0,6% silice a v kombinaci s nisinem v množství 1000 IU/g, kdy došlo ke snížení populace bakterie pod oficiální limit Evropské unie. Vyšší koncentrace tymiánové silice (0,9 %) byla z experimentu vyřazena z důvodu nevyhovujících výsledků ze sensorického hodnocení.

Statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) byl nalezen při porovnání inhibičního účinku mezi bakteriemi a kvasinkami. Z následujících grafů (obr. 25, 26) vyplývá, že koncentrované i ředěné silice více potlačují růst testovaných kvasinek než bakterií. Tento výsledek byl zjištěn u všech testovaných silic. Grafy pro jednotlivé silice jsou uvedené v příloze 10.

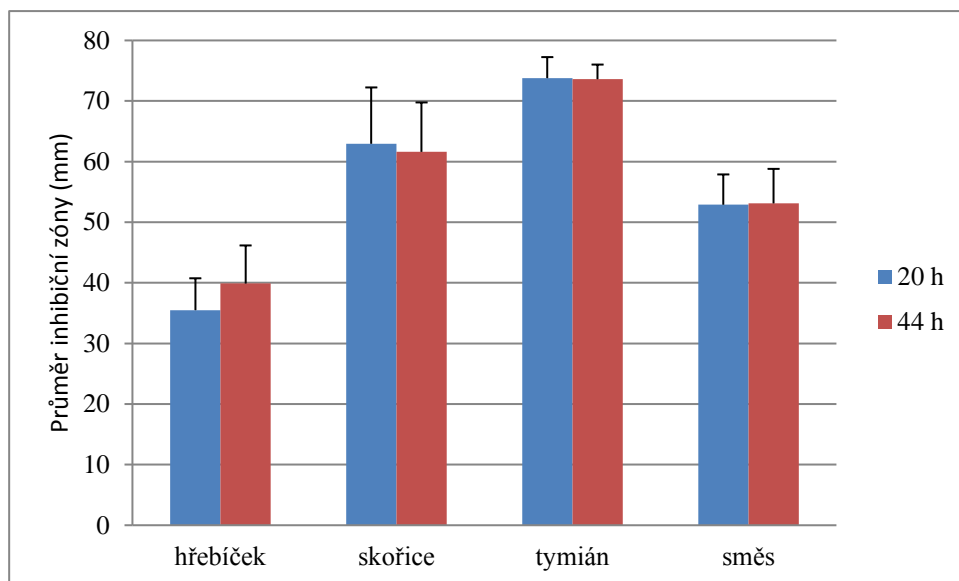


Obr. 25: Graf porovnání inhibičních účinků koncentrovaných silic na bakterie a kvasinky

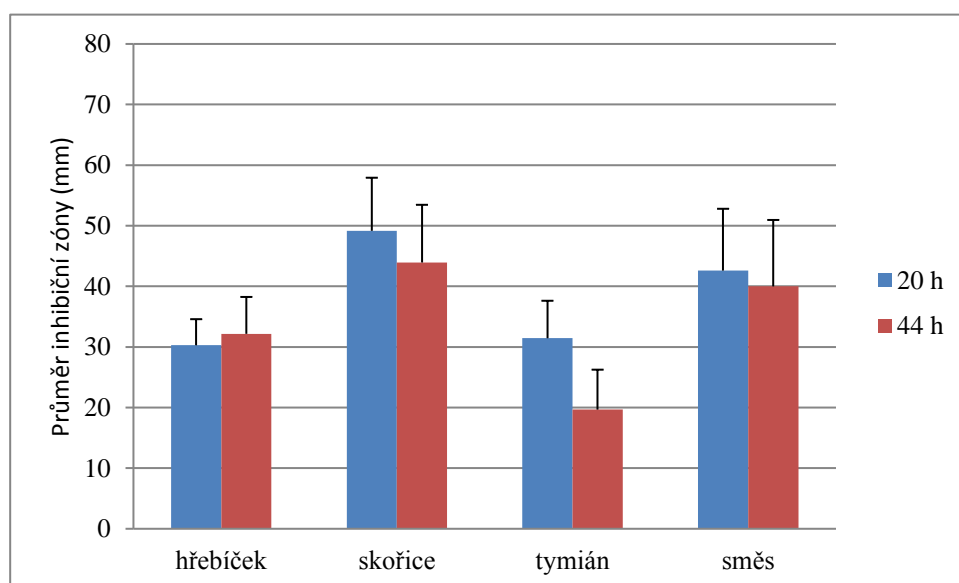


Obr. 26: Graf porovnání inhibičních účinků 10% silice na bakterie a kvasinky

Monu et al. (2016) testovali inhibiční účinky hřebíčkového, skořicového a tymiánového esenciálního oleje a jejich hlavních složek na kvasinky způsobující kažení potravin (*Torulaspora delbrueckii*, *Candida krusei*, *Schizosaccharomyces pombe* a *Zygosaccharomyces bailii*). Experiment probíhal jak na mikrobiologických médiích, tak také v potravinové matrici (salátový dresing). Největší účinnost byla zjištěna u trans-cinnamaldehylu a skořicového esenciálního oleje (minimální inhibiční koncentrace odpovídá 50 mg/l). Na modelovém dresingu byla nejnižší hodnota MIC určena u thymolu a karvakrolu (200 mg/l). Z výsledků této diplomové práce je zřejmé, že na kvasinky kultivované na živném médiu měla největší inhibiční vliv koncentrovaná silice tymiánu a dále skořice (obr. 27). U 10% koncentrací byl největší účinek zjištěn u skořicové a směsné silice (obr. 28).



Obr. 27: Graf porovnání inhibičních účinků koncentrovaných silic na kvasinky



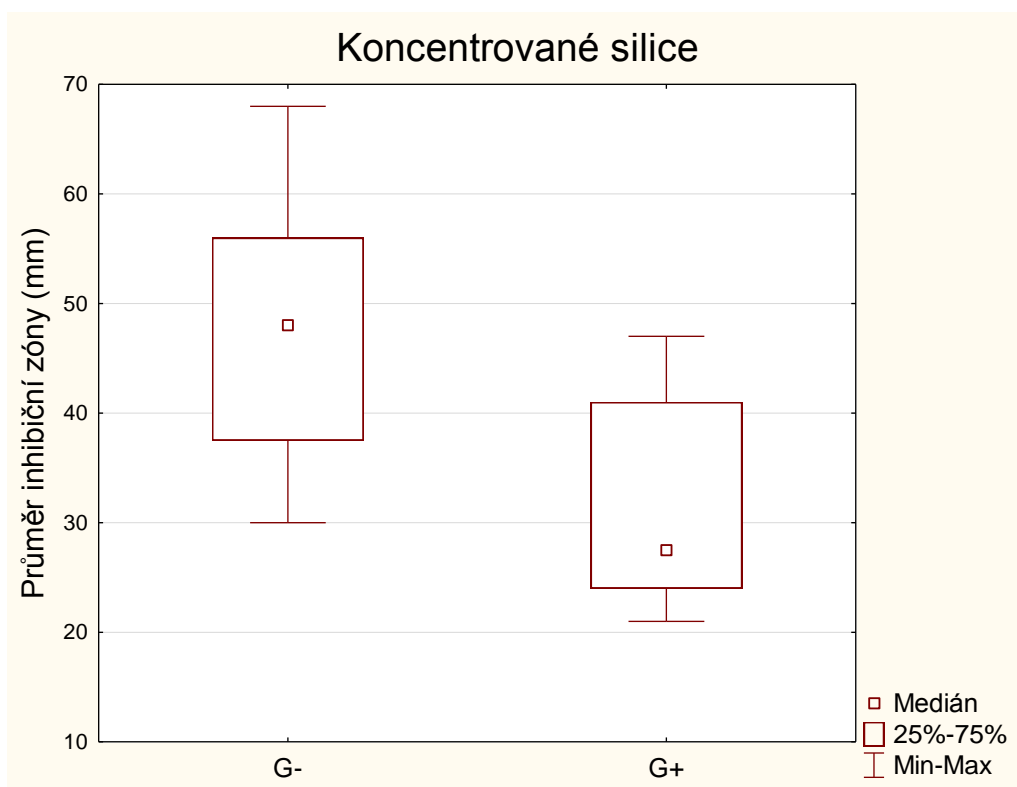
Obr. 28: Graf porovnání inhibičních účinků 10% silic na kvasinky

Andrade et al. (2014) testovali antimikrobiální aktivitu 27 esenciálních olejů různého původu. Podle výsledků má ze zkoušených vzorků obecně nejvyšší inhibiční potenciál silice ze skořice a hřebíčku. Hřebíčkový esenciální olej byl nejúčinnější proti oběma testovaným gramnegativním bakteriím (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), zatímco na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* působila nejvíce silice z černého pepře. Dále byl také potvrzen výrok, uváděný některými autory v literatuře, že grampozitivní bakterie jsou k přírodním látkám citlivější. Struktura buněčné stěny grampozitivních bakterií umožňuje snadnější průnik hydrofobních molekul do buňky.

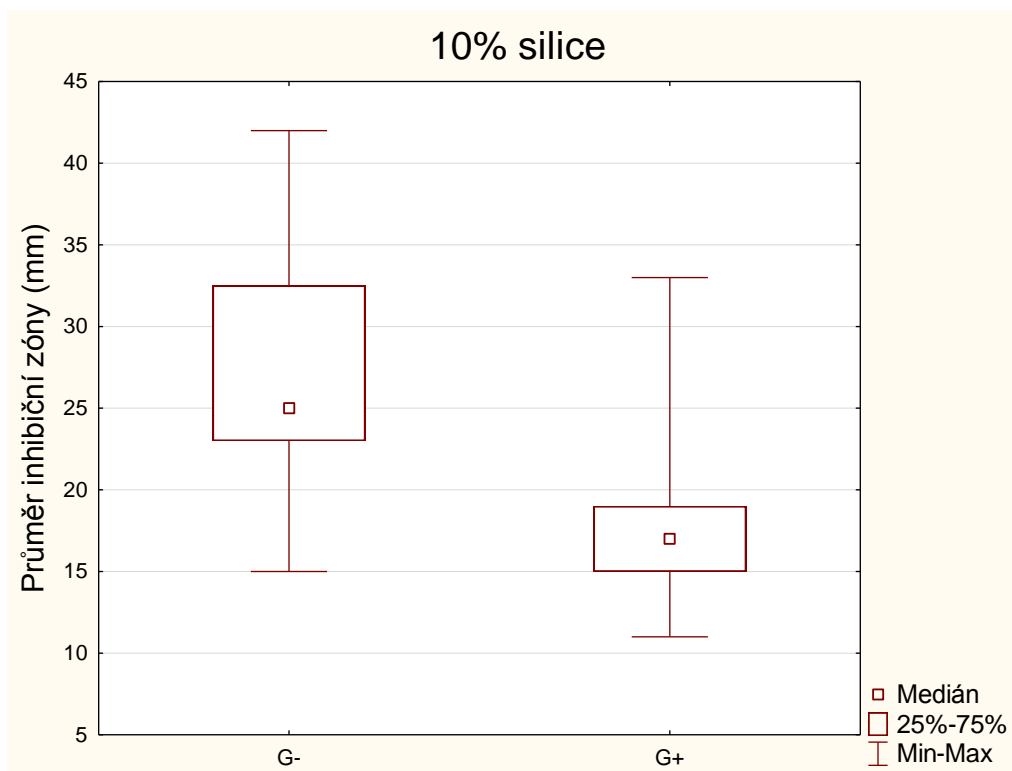
Tyto látky tak působí jak v buněčné stěně, tak také v cytoplazmě. Nízké koncentrace fenolických látek, které jsou součástí silic, narušují enzymy. Vysoké koncentrace způsobují denaturaci proteinů (Nazzaro et al., 2013).

Dorman a Deans (2000) uvádí, že hřebíčková silice působí na grampozitivní a gramnegativní bakterie bez rozdílu. Účinek tymiánového esenciálního oleje je však významnější u grampozitivních druhů. Z šesti testovaných vzorků byla nejvyšší antimikrobiální aktivita stanovena u tymiánu.

Z níže uvedených grafů (obr. 29, 30) vyplývá, že v této práci byly všechny testované silice efektivnější proti gramnegativní bakterii *E. coli*, v koncentrované i ředěné formě. Tento závěr statisticky potvrdil také Mann-Whitneyho test. Grafy pro porovnání výsledků jednotlivých silic jsou uvedeny v příloze 11. Pro objektivnější hodnocení by bylo ovšem třeba provést tento experiment na větším počtu bakterií.



Obr. 29: Graf porovnání účinků koncentrovaných silic na G+ a G- bakterie

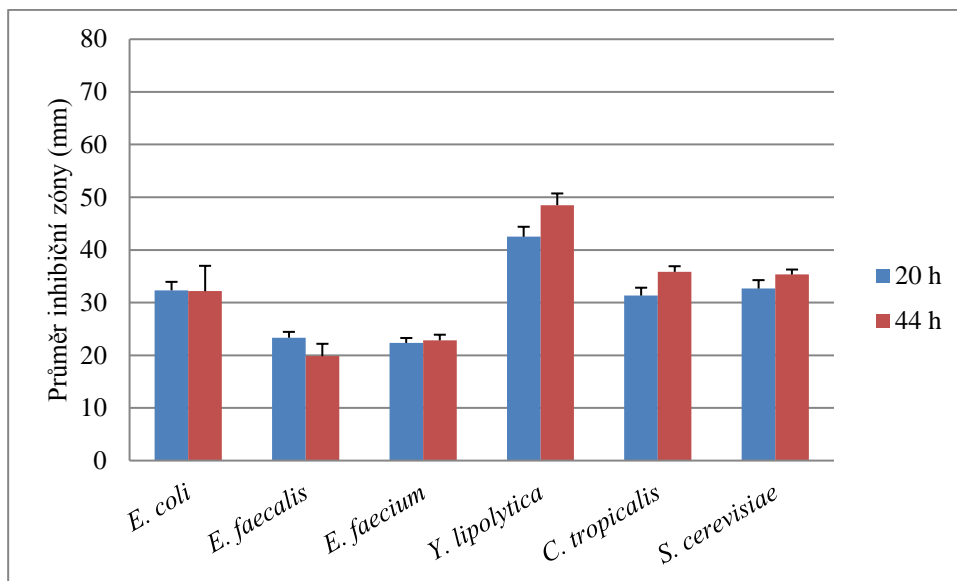


Obr. 30: Graf porovnání účinků 10% silice na G+ a G- bakterie

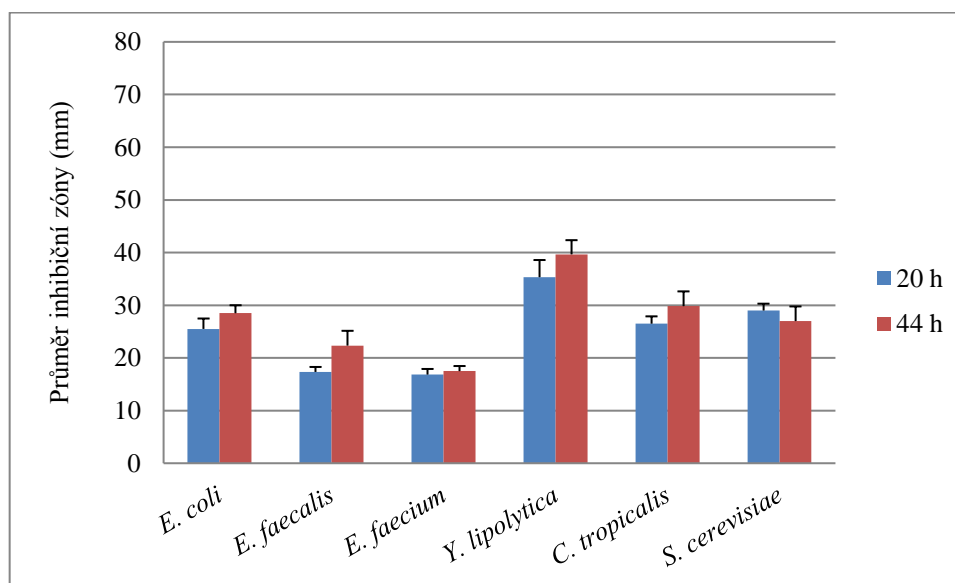
5.2.3 Porovnání výsledků zjištěných po 20 a 44 h kultivace

Porovnání výsledků po 20 a 44 h kultivace mikroorganismů bylo provedeno pomocí statistických testů (Wilcoxonův párový test pro výběry s nenormálním rozložením dat a T-test pro nezávislé vzorky pro výběry mající normální rozložení).

Významný rozdíl (hladina významnosti $\alpha = 0,05$) mezi naměřenými hodnotami nebyl zjištěn při použití 10% skořicové a směsné koncentrované silice, a to u žádného testovaného mikroba. Z obr. 31 lze vyčíst, že průměry inhibičních zón kvasinek měřené u neředěné hřebíčkové silice se po 44 hodinách rozšířily. Podle Wilcoxonova testu u bakterií ke změně nedošlo. Naopak u 10% hřebíčkové silice (obr. 32) nebyl u kvasinek nalezen statisticky významný rozdíl. Větší průměry inhibičních zón byly zjištěny pouze u bakterie *Enterococcus faecalis*. Z tohoto výsledku vyplývá, že působení různě koncentrované hřebíčkové silice v čase se u bakterií a kvasinek liší. Zatímco u koncentrovaného roztoku se po 20 h bakterie již adaptovaly na nepříznivé podmínky, kvasinky byly silicí nadále inhibovány a zóny se zvětšily.



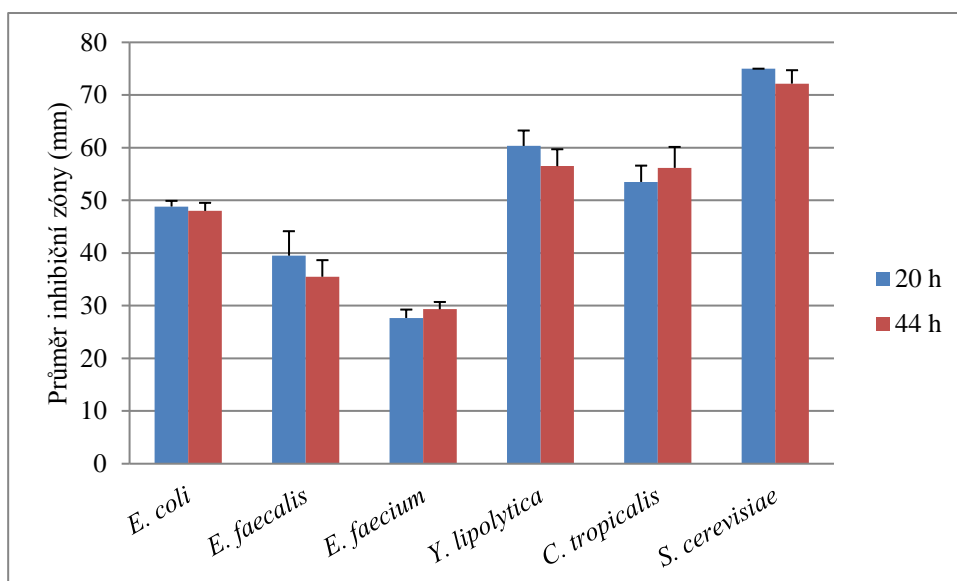
Obr. 31: Graf porovnání inhibičních účinků koncentrované hřebíčkové silice po 20 a 44 h



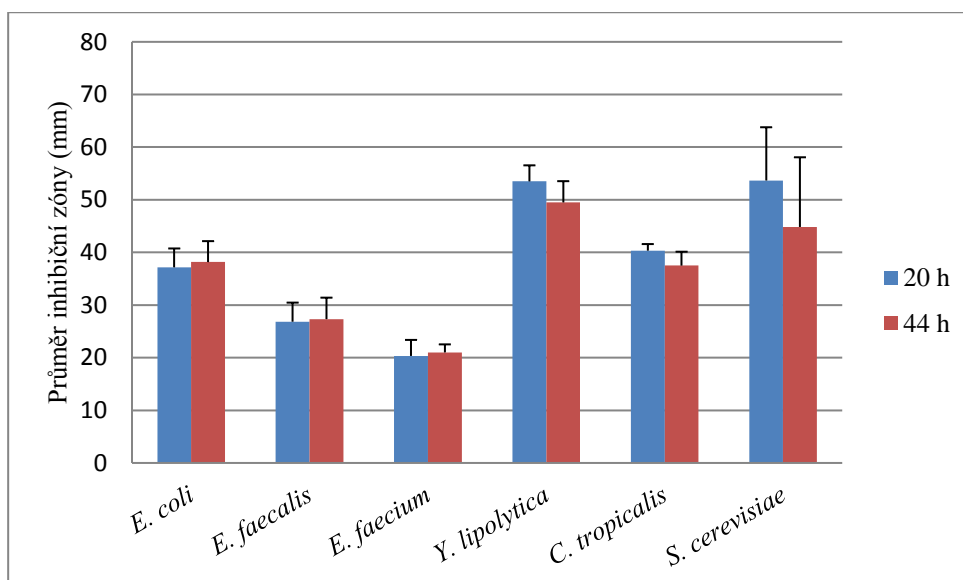
Obr. 32: Graf porovnání inhibičních účinků 10% hřebíčkové silice po 20 a 44 h

Rozdíl mezi inhibičními účinky koncentrované skořicové silice po 20 a 44 h se projevil u bakterie *Enterococcus faecalis* a kvasinek *Yarrowia lipolytica* a *Candida tropicalis* (obr. 33). U prvních dvou mikroorganismů došlo po 44 h k výraznějšímu růstu. Znamená to tedy, že postupně došlo k přizpůsobení mikroorganismů na nepříznivé podmínky, kdy účinné látky silice již přestávají ovlivňovat jejich růst. U *Candida tropicalis* byl překvapivě po 44 h inhibiční vliv skořice ještě výraznější. Nicméně jedná se pouze o malý rozdíl (2,87 mm), který mohl být způsoben například

nepřesným měřením. Přesto ho statistika vyhodnotila jako významný. U 10% skořicové silice nebyly nalezeny průkazné rozdíly u žádného mikroorganismu (obr. 34).

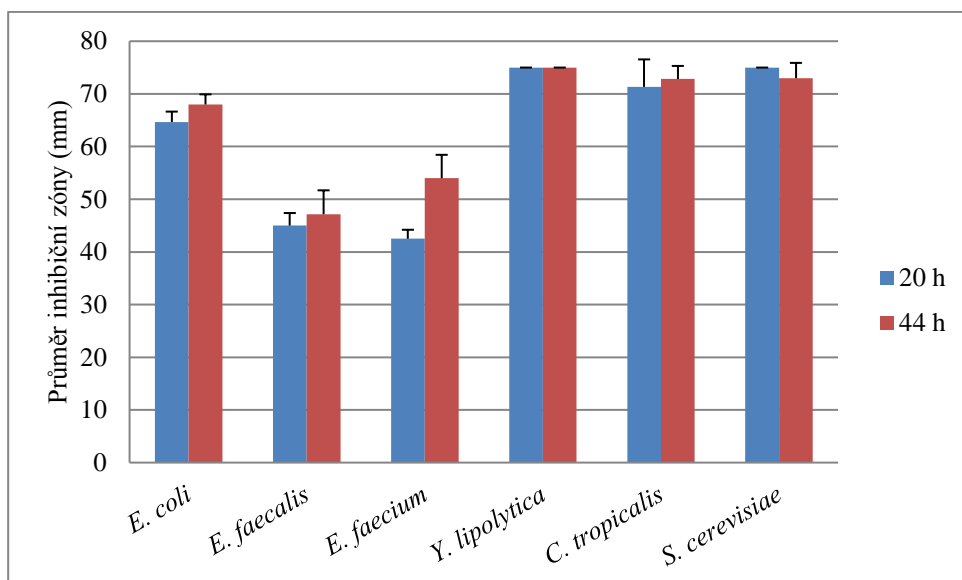


Obr. 33: Graf porovnání inhibičních účinků koncentrované skořicové silice po 20 a 44 h



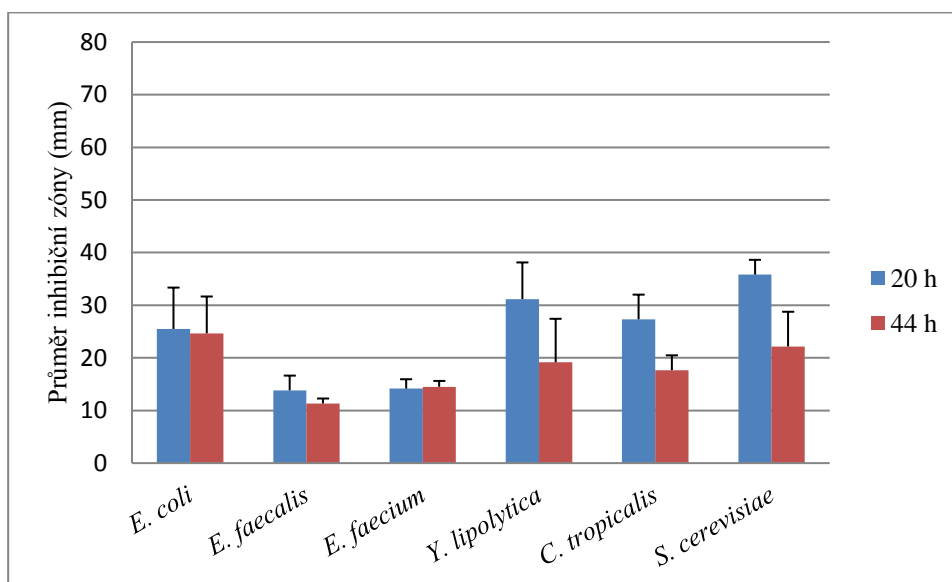
Obr. 34: Graf porovnání inhibičních účinků 10% skořicové silice po 20 a 44 h

Neředěná silice extrahovaná z tymiánu měla na všechny testované kvasinky v čase stejný vliv. Ke zvětšení průměrů inhibičních zón došlo pouze u bakterie *E. coli* a *Enterococcus faecium* (obr. 35).



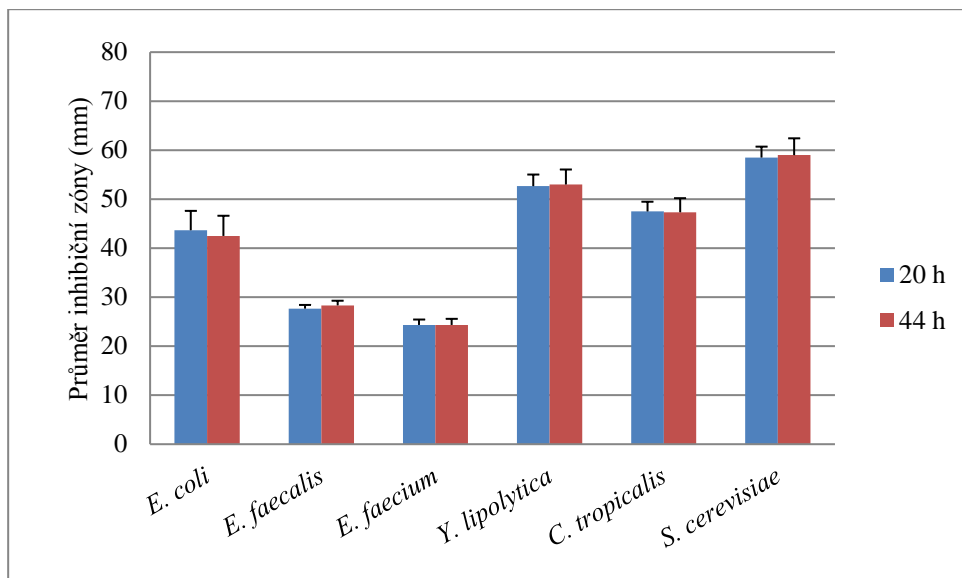
Obr. 35: Graf porovnání inhibičních účinků koncentrované tymiánové silice po 20 a 44 h

10% tymiánová silice působila po 44 h kultivace u bakterií se stejným účinkem jako po 20 h. Statisticky významný rozdíl nastal u kvasinek, kdy se naměřené hodnoty snížily (obr. 36). Ve srovnání s neředěnou tymiánovou silicí je zřejmé, že kvasinky se v průběhu kultivace postupně adaptovaly na 10% silici, zatímco u koncentrované silice se výsledky nezměnily.

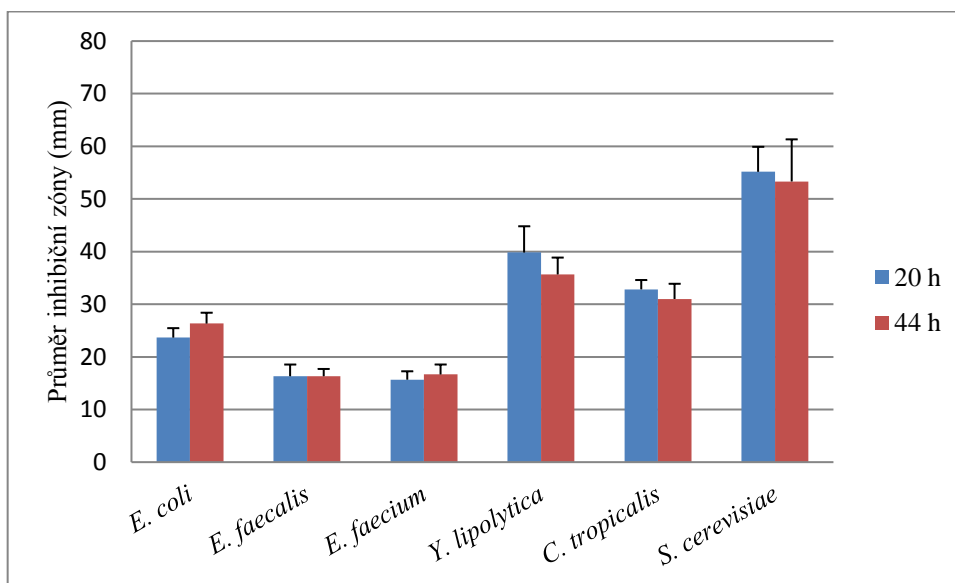


Obr. 36: Graf porovnání inhibičních účinků 10% tymiánové silice po 20 a 44 h

U silice složené z hřebíčku, skořice a tymiánu byla registrována změna pouze u bakterie *E. coli*, a to při použití ředěné formy. Z grafu lze určit, že průměry inhibičních zón se po 44 hodinách zvětšily (obr. 38).



Obr. 37: Graf porovnání inhibičních účinků koncentrované směsné silice po 20 a 44 h



Obr. 38: Graf porovnání inhibičních účinků 10% směsné silice po 20 a 44 h

6 ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo stanovení antimikrobiální aktivity esenciálních olejů rostlin, které se často používají při přípravě pokrmů, k jejich ochucení a dodání charakteristické vůně a celkového aroma. Hřebíček, skořice a tymián jsou běžnou součástí kuchyňského koření a nalezneme je téměř v každé domácnosti. Kromě kulinářského využití našly tyto rostliny mimo jiné uplatnění také v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Jsou známé nejen svými inhibičními účinky na mikroorganismy, viry, některé druhy hmyzu, prvoky a další, ale díky významnému obsahu fenolických látek jsou ceněné také pro své antioxidační vlastnosti. Ty jsem potvrdila i praktickou částí své bakalářské práce, ve které jsem se věnovala antioxidační kapacitě, celkovému množství fenolů a identifikaci jednotlivých fenolických látek u hřebíčku, skořice a dalších druhů koření tradiční čínské medicíny.

Mikrobiologická analýza potvrdila účinnost všech testovaných silic, včetně jejich směsi, na grampozitivní a gramnegativní bakterie i kvasinky. Z výsledků je zřejmé, že nejvyšší inhibice byla způsobena koncentrovanou silicí extrahovanou z tymiánu. Nejnižší vliv měl na testované mikroorganismy extrakt z hřebíčku. Všechny silice působily více na gramnegativní bakterie než na grampozitivní. Ze srovnání bakterií a kvasinek plyne, že odolnější vůči testovaným silicím byly bakterie.

Tato diplomová práce ověřila antimikrobiální účinek hřebíčku, skořice a tymiánu uváděný v literatuře. Silice lze tedy využít při ochraně potravin (případně i krmiv) před znehodnocením jak bakteriemi, tak také kvasinkami. Pozitivní výsledky byly dosaženy také při aplikaci jejich 10% roztoku. Pro zjištění, zda tato koncentrace výrazně ovlivňuje senzoriku hotového výrobku, je ovšem třeba provést další experimenty.

7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

AHMAD A., KALEEM M., AHMED Z., SHAFIQ H., 2015. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections—A review. *Food Research International* [online]. 11., 77, 221–235. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2015.06.021

AYOOLA G. A., LAWORE F. M., ADELOWOTAN T., AIBINU I. E., ADENIPEKUN E., COKER H. A. B., ODUGBEMI T. O., 2008. Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* (clove). *African Journal of Microbiology Research*. 31. 7., 2(7), 162–166. ISSN 1996-0808.

BELLOU S., MAKRI A., TRIANTAPHYLLIDOU I. E., PAPANIKOLAOU S., AGGELIS G., 2014. Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment. *Microbiology* [online]. 1. 4., 160(Pt_4), 807–817. ISSN 1350-0872, 1465-2080. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.074302-0

BRILHANTE R. S. N., OLIVEIRA J. S., EVANGELISTA A. J. J., SERPA R., SILVA A. L., AGUIAR F. R. M., PEREIRA V. S., CASTELO-BRANCO D. S. C. M., PEREIRA-NETO W. A., CORDEIRO R. A., SIDRIM J. J. C., ROCHA M. F. G., 2016. *Candida tropicalis* from veterinary and human sources shows similar in vitro hemolytic activity, antifungal biofilm susceptibility and pathogenesis against *Caenorhabditis elegans*. *Veterinary Microbiology* [online]. 8., 192, 213–219. ISSN 03781135. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetmic.2016.07.022

BURDYCHOVÁ R., SLÁDKOVÁ P., 2007. *Mikrobiologická analýza potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 978-80-7375-116-6.

COWAN M. M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 10., 12(4), 564–582. ISSN 0893-8512.

DORMAN H. J., DEANS S. G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2., 88(2), 308–316. ISSN 1364-5072.

EKAMBARAM S. P., PERUMAL S. S., BALAKRISHNAN A., 2016. Scope of hydrolysable tannins as possible antimicrobial agent. *Phytotherapy Research* [online]. 7., 30(7), 1035–1045. ISSN 0951418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.5616

FERREIRA L. E., BENINCASA B. I., FACHIN A. L., FRANÇA S. C., CONTINI S. S. H. T., CHAGAS A. C. S., BELEBONI R. O., 2016. *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. *Veterinary Parasitology* [online]. 9., 228, 70–76. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetpar.2016.08.011

FRATAMICO P. M., DEBROY CH., LIU Y., NEEDLEMAN D. S., BARANZONI G. M., FENG P., 2016. Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology* [online]. 3. 5., 7 [vid. 2017-03-03]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.00644

GALLONE B., STEENSELS J., PRAHL T., SORIAGA L., SAELS V., HERRERA-MALAYER B., MERLEVEDE A., RONCORONI M., VOORDECKERS K., MIRAGLIA L., TEILING C., STEFFY B., TAYLOR M., SCHWARTZ A., RICHARDSON T., WHITE CH., BAELE G., MAERE S., VERSTREPEN K. J., 2016. Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell* [online]. 9., 166(6), 1397–1410.e16. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2016.08.020

GÖRNER F., VALÍK E., 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin: potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny: mikrobiológia potravinárskych výrob: ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. Bratislava: Malé centrum. ISBN 978-80-967064-9-5.

CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA W., ZADERNOWSKA A., ŁANIEWSKA-TROKENHEIM Ł., 2017. Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 1., 75, 670–676. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2016.10.026

CHEMAT S., CHERFOUH R., MEKLATI B. Y., BELANTEUR K., 2012. Composition and microbial activity of thyme (*Thymus algeriensis genuinus*) essential oil. *Journal of*

Essential Oil Research [online]. 2., 24(1), 5–11. ISSN 1041-2905, 2163-8152. Dostupné z: doi:10.1080/10412905.2012.645303

JEYARATNAM N., NOUR A. H., KANTHASAMY R., NOUR A. H., YUVARAJ A. R., AKINDOYO J. O., 2016. Essential oil from *Cinnamomum cassia* bark through hydrodistillation and advanced microwave assisted hydrodistillation. *Industrial Crops and Products* [online]. 12., 92, 57–66. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2016.07.049

KALHOTKA L., 2014. *Mikromycety v prostředí člověka: vláknité mikromycety (plísňe) a kvasinky*. V Brně: Mendelova univerzita. ISBN 978-80-7375-943-8.

KASKATEPE B., KIYMACI M. E., SIMSEK D., EROL H. B., ERDEM S. A., 2016. Comparison of the contents and antimicrobial activities of commercial and natural cinnamon oils. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 78(4) [vid. 2017-03-29]. ISSN 0250474X. Dostupné z: doi:10.4172/pharmaceutical-sciences.1000150

KRISCH J., TSERENNADMID R., VÁGVÖLGYI C., 2011. Essential oils against yeasts and moulds causing food spoilage [online]. In: MÉNDEZ-VILAS, A, 2011. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Badajoz: Formatex Research Center. ISBN 978-84-939843-1-1.

LEBRETON F., WILLEMS R. J. L., GILMORE M. S., 2014. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. In: GILMORE M. S., CLEWELL D. B., IKE Y., SHANKAR N., ed. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [online]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary [vid. 2017-03-03]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>

LIU X., JIA B., SUN X., AI J., WANG L., WANG CH., ZHAO F., ZHAN J., HUANG W., 2015. Effect of initial pH on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Science* [online]. 4., 80(4), M800–M808. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/1750-3841.12813

MARCHESE A., ORHAN I. E., DAGLIA M., BARBIERI R., DI LORENZO A., NABAVI S. F., GORTZI O., IZADI M., NABAVI S. M., 2016. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*

[online]. 11., 210, 402–414. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.111

MASHWANI Z. R., KHAN M. A., KHAN T., NADHMAN A., 2016. Applications of plant terpenoids in the synthesis of colloidal silver nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 8., 234, 132–141. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/j.cis.2016.04.008

MATHELA CH. S., SINGH K. K., GUPTA V. K., 2010. Synthesis and in vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol derivatives. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 8., 67(4), 375–380. ISSN 0001-6837.

MCMURRY J., 2007. *Organická chemie*. V Brně; V Praze: VUTIUM; Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 978-80-214-3291-8.

MENEGUETTI B. T., MACHADO L. S., OSHIRO K. G. N., NOGUEIRA M. L., CARVALHO C. M. E., FRANCO O. L., 2017. Antimicrobial peptides from fruits and their potential use as biotechnological tools—A review and outlook. *Frontiers in Microbiology* [online]. 10. 1., 7 [vid. 2017-03-06]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.02136

MONU E. A., TECHATHUVANAN CH., WALLIS A., CRITZER F. J., DAVIDSON P. M., 2016. Plant essential oils and components on growth of spoilage yeasts in microbiological media and a model salad dressing. *Food Control* [online]. 7., 65, 73–77. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2016.01.018

MORALES R., 2002. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: *Thyme* [online]. B.m.: CRC Press, Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles [vid. 2017-03-03]. ISBN 978-0-415-28488-2. Dostupné z: doi:10.1201/9780203216859.ch1

MOYAD M. A., 2007. Brewer's/baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and preventive medicine: part I. *Urologic Nursing*. 12., 27(6), 560–561. ISSN 1053-816X.

ANDRADE M. T. B. F., BARBOSA L. N., PROBST I. S., FERNANDES A. J., 2014. Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research* [online]. 2. 1.,

26(1), 34–40. ISSN 1041-2905, 2163-8152. Dostupné z: doi:10.1080/10412905.2013.860409

NAZZARO F., FRATIANNI F., MARTINO L., COPPOLA R., DE FEO V., 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* [online]. 25. 11., 6(12), 1451–1474. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph6121451

NICAUD J. M., 2012. *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* [online]. 10., 29(10), 409–418. ISSN 0749503X. Dostupné z: doi:10.1002/yea.2921

NTULI V., NJAGE P. M. K., BUYS E. M., 2016. Characterization of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae* in producer-distributor bulk milk. *Journal of Dairy Science* [online]. 12., 99(12), 9534–9549. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2016-11403

PANDEY A. K., KUMAR P., SINGH P., TRIPATHI N. N., BAJPAI V. K., 2017. Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives. *Frontiers in Microbiology* [online]. 16. 1., 7 [vid. 2017-03-03]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.02161

RAMADAN M. F., ASKER M. M. S., TADROS M., 2013. Lipid profile, antiradical power and antimicrobial properties of *Syzygium aromaticum* oil. *Grasas y Aceites* [online]. 31. 12., 64(5), 509–520. ISSN 1988-4214, 0017-3495. Dostupné z: doi:10.3989/gya.011713

RAZZAGHI-ABYANEH M., SHAMS-GHAHFAROKHI M., 2011. Natural inhibitors of food-borne fungi from plants and microorganisms. In: RAI M., CHIKINDAS M., ed. *Natural antimicrobials in food safety and quality* [online]. Wallingford: CABI, s. 182–203 [vid. 2017-03-03]. ISBN 978-1-84593-769-0. Dostupné z: doi:10.1079/9781845937690.0182

RIBEIRO-SANTOS R., ANDRADE M., MĚLO N. R., SANCHES-SILVA A., 2017. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 3., 61, 132–140. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2016.11.021

SATYAL P., MURRAY B., MCFEETERS R., SETZER W., 2016. Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods* [online]. 27. 10., 5(4), 70. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods5040070

SEDLÁČEK I., 2007. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4207-0.

SOLOMAKOS N., GOVARIS A., KOIDIS P., BOTSOGLOU N., 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology* [online]. 2., 25(1), 120–127. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2007.07.002

ŠILHÁNKOVÁ L., 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-1024-7.

TOHIDI B., RAHIMMALEK M., ARZANI A., 2017. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry* [online]. 4., 220, 153–161. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.203

UNLU M., ERGENE E., UNLU G. V., ZEYTIÑOGLU H. S., VURAL N., 2010. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* blume (*Lauraceae*). *Food and Chemical Toxicology* [online]. 11., 48(11), 3274–3280. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2010.09.001

VALÍČEK P., 2005. *Koření a jeho léčivé účinky*. Benešov: Start. ISBN 978-80-86231-34-1.

VELÍŠEK J., CEJPEK K., VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE a ÚSTAV CHEMIE A ANALÝZY POTRAVIN, 2008. *Biosynthesis of food components*. Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-12-1.

VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-17-6.

WEERASEKERA M. M., WIJESINGHE G. K., JAYARATHNA T. A., GUNASEKARA CH. P., FERNANDO N., KOTTEGODA N., SAMARANAYAKE L. P., 2016. Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis*

growth, adhesion and biofilm development. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online]. 11., 111(11), 697–702. ISSN 1678-8060. Dostupné z: doi:10.1590/0074-02760160294

XING F., HUA H., SELVARAJ J. N., ZHAO Y., ZHOU L., LIU X., LIU X., 2014. Growth inhibition and morphological alterations of *Fusarium verticillioides* by cinnamon oil and cinnamaldehyde. *Food Control* [online]. 12., 46, 343–350. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2014.04.037

ZHANG S., ZHANG M., FANG Z., LIU Y., 2017. Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 1., 75, 316–322. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2016.08.046

ZHAO Y., CHAN J. F. W., TSANG CH. HC., WANG H., GUO D., PAN Y., XIAO Y., YUE N., CHEN J. H K., LAU S. K. P., XU Y., WOO P. CH. Y., 2015. Clinical characteristics, laboratory identification, and *In Vitro* antifungal susceptibility of *Yarrowia (Candida) lipolytica* isolates causing fungemia: a multicenter, prospective surveillance study. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 11., 53(11), 3639–3645. ISSN 0095-1137, 1098-660X. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01985-15

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Thymol	12
Obr. 2: Flavan	13
Obr. 3: Kumarin	15
Obr. 4: Isopren	15
Obr. 5: Berberin	16
Obr. 6: Tymián obecný	22
Obr. 7: Kultivace kvasinek na Chloramphenicol Glucose Agar.....	28
Obr. 8: Compass <i>Enterococcus</i> Agar s modře narostlými koloniemi.....	30
Obr. 9: Barevná škála pro vyhodnocení CANDIDA-Screen testu	31
Obr. 10: Barevná škála pro vyhodnocení EN-COCCUStestu	32
Obr. 11: Zbarvení mikrotitrační destičky pro CANDIDA-Sreen po 24 h	34
Obr. 12: Vyhodnocovací formulář pro CANDIDA-Screen test	34
Obr. 13: Vyhodnocení EN-COCCUStestu	35
Obr. 14: Vyhodnocení PYRAtestu	35
Obr. 15: Kontrola růstu kvasinek (<i>Y. lipolytica</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. tropicalis</i>)	36
Obr. 16: Graf znázornění velikostí inhibičních zón (mm) u DMSO po 20 h	37
Obr. 17: Graf znázornění velikostí inhibičních zón (mm) u DMSO po 44 h	37
Obr. 18: Kontrola kvasinek při použití ředidla (<i>Y. lipolytica</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>S. cerevisiae</i>)	38
Obr. 19: Graf porovnání inhibičních účinků koncentrovaných silic po 20 h kultivace..	39
Obr. 20: Graf porovnání inhibičních účinků koncentrovaných silic po 44 h kultivace..	39
Obr. 21: <i>Candida tropicalis</i> – kontrola, 10% a koncentrovaná hřebíčková silice.....	40
Obr. 22: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – kontrola, 10% a koncentrovaná tymiánová silice	41
Obr. 23: Graf porovnání inhibičních účinků 10% silic po 20 h kultivace	42
Obr. 24: Graf porovnání inhibičních účinků 10% silic po 44 h kultivace	42
Obr. 25: Graf porovnání inhibičních účinků koncentrovaných silic na bakterie a kvasinky	43
Obr. 26: Graf porovnání inhibičních účinků 10% silic na bakterie a kvasinky.....	44
Obr. 27: Graf porovnání inhibičních účinků koncentrovaných silic na kvasinky	45
Obr. 28: Graf porovnání inhibičních účinků 10% silic na kvasinky	45

Obr. 29: Graf porovnání účinků koncentrovaných silic na G+ a G- bakterie.....	46
Obr. 30: Graf porovnání účinků 10% silic na G+ a G- bakterie.....	47
Obr. 31: Graf porovnání inhibičních účinků koncentrované hřebíčkové silice po 20 a 44 h.....	48
Obr. 32: Graf porovnání inhibičních účinků 10% hřebíčkové silice po 20 a 44 h	48
Obr. 33: Graf porovnání inhibičních účinků koncentrované skořicové silice po 20 a 44 h	49
Obr. 34: Graf porovnání inhibičních účinků 10% skořicové silice po 20 a 44 h.....	49
Obr. 35: Graf porovnání inhibičních účinků koncentrované tymiánové silice po 20 a 44 h.....	50
Obr. 36: Graf porovnání inhibičních účinků 10% tymiánové silice po 20 a 44 h	50
Obr. 37: Graf porovnání inhibičních účinků koncentrované směsné silice po 20 a 44 h51	
Obr. 38: Graf porovnání inhibičních účinků 10% směsné silice po 20 a 44 h	51

9 SEZNAM ZKRATEK

AgNPs	Silver nanoparticles
AIEC	Adherent invasive <i>E. coli</i>
AMPs	Antimicrobial peptides
CCM	Collection of microorganisms
CFU	Colony forming unit
CPM	Celkový počet mikroorganismů
DEAC	Diffusely adherent <i>E. coli</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAEC	Enteroadgregative <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>
GC-MS	Gas chromatography – mass spectrometry
CHL	Chloramphenicol glucose agar
McF	McFarlandovy stupně
MIC	Minimal inhibitory concentration
PCA	Plate count agar
PM	Petriho miska
SFE	Supercritical fluid extraction
STEC	Shiga-toxin producing <i>E. coli</i>
TSB	Tryptone soya broth

10 PŘÍLOHY

Příloha 1: Tabulka průměrů inhibičních zón (mm) u hřebíčkové silice

Mikrob	PM	konc. - 20 h		konc. - 44 h		10 % - 20 h		10 % - 44 h	
		1. disk	2. disk	1. disk	2. disk	1. disk	2. disk	1. disk	2. disk
<i>E. coli</i>	č. 1	30	33	37	32	25	25	27	28
	č. 2	31	33	40	29	29	27	28	27
	č. 3	35	32	28	27	23	24	31	30
<i>E. faecalis</i>	č. 1	24	25	18	18	19	18	25	25
	č. 2	24	22	18	24	17	16	23	18
	č. 3	23	22	19	22	17	17	24	19
<i>E. faecium</i>	č. 1	22	22	22	24	17	18	16	18
	č. 2	22	24	23	24	16	18	17	18
	č. 3	23	21	23	21	17	15	19	17
<i>Y. lipolytica</i>	č. 1	43	42	53	47	32	36	44	41
	č. 2	42	44	49	48	32	40	41	39
	č. 3	39	45	46	48	33	39	36	37
<i>C. tropicalis</i>	č. 1	31	32	35	36	29	25	26	29
	č. 2	33	30	36	34	27	25	28	33
	č. 3	29	33	37	37	25	26	29	34
<i>S. cerevisiae</i>	č. 1	30	32	35	37	27	29	25	24
	č. 2	32	35	34	35	29	30	27	32
	č. 3	34	33	36	35	31	28	25	29

Příloha 2: Tabulka průměrů inhibičních zón (mm) u skořicové silice

Mikroob	PM	konc. - 20 h		konc. - 44 h		10 % - 20 h		10 % - 44 h	
		1. disk	2. disk	1. disk	2. disk	1. disk	2. disk	1. disk	2. disk
<i>E. coli</i>	č. 1	50	50	48	49	32	40	39	45
	č. 2	49	47	45	50	33	38	38	34
	č. 3	48	49	48	48	42	38	40	33
<i>E. faecalis</i>	č. 1	32	45	30	36	23	27	33	25
	č. 2	35	44	35	38	24	30	33	25
	č. 3	40	41	34	40	24	33	23	25
<i>E. faecium</i>	č. 1	27	28	29	32	17	22	22	22
	č. 2	30	25	28	28	16	21	23	19
	č. 3	27	29	30	29	21	25	21	19
<i>Y. lipolytica</i>	č. 1	60	65	53	60	55	55	43	52
	č. 2	61	55	59	53	57	55	49	55
	č. 3	61	60	60	54	48	51	46	52
<i>C. tropicalis</i>	č. 1	50	58	54	63	41	40	32	39
	č. 2	51	51	52	53	41	38	37	39
	č. 3	57	54	60	55	42	40	38	40
<i>S. cerevisiae</i>	č. 1	75	75	75	72	63	33	18	55
	č. 2	75	75	75	73	60	60	40	47
	č. 3	75	75	70	68	50	56	57	52

Příloha 3: Tabulka průměrů inhibičních zón (mm) u tymiánové silice

Mikroob	PM	konc. - 20 h		konc. - 44 h		10 % - 20 h		10 % - 44 h	
		1. disk	2. disk	1. disk	2. disk	1. disk	2. disk	1. disk	2. disk
<i>E. coli</i>	č. 1	65	62	69	69	24	15	25	35
	č. 2	68	66	71	67	23	30	25	20
	č. 3	63	64	67	65	21	40	30	13
<i>E. faecalis</i>	č. 1	45	47	55	41	16	12	11	11
	č. 2	40	45	50	48	19	13	10	13
	č. 3	46	47	44	45	12	11	11	12
<i>E. faecium</i>	č. 1	42	45	56	53	13	11	16	14
	č. 2	40	41	58	45	15	14	14	13
	č. 3	43	44	58	54	16	16	16	14
<i>Y. lipolytica</i>	č. 1	75	75	75	75	33	25	13	11
	č. 2	75	75	75	75	31	38	17	29
	č. 3	75	75	75	75	20	40	13	32
<i>C. tropicalis</i>	č. 1	63	75	73	69	32	25	15	15
	č. 2	65	75	75	75	33	20	20	19
	č. 3	75	75	70	75	30	24	15	22
<i>S. cerevisiae</i>	č. 1	75	75	70	75	32	39	14	28
	č. 2	75	75	75	75	35	40	13	30
	č. 3	75	75	75	68	35	34	22	26

Příloha 4: Tabulka průměrů inhibičních zón (mm) u směsné silice z hřebíčku, skořice a tymiánu

Mikroob	PM	konc. - 20 h		konc. - 44 h		10 % - 20 h		10 % - 44 h	
		1. disk	2. disk	1. disk	2. disk	1. disk	2. disk	1. disk	2. disk
<i>E. coli</i>	č. 1	40	50	43	50	23	23	30	25
	č. 2	43	40	38	39	25	22	26	24
	č. 3	48	41	45	40	22	27	25	28
<i>E. faecalis</i>	č. 1	29	27	28	29	18	13	16	15
	č. 2	27	28	30	27	20	16	15	17
	č. 3	28	27	28	28	16	15	16	19
<i>E. faecium</i>	č. 1	22	25	22	26	16	19	19	19
	č. 2	25	25	24	25	15	15	17	14
	č. 3	25	24	24	25	15	14	16	15
<i>Y. lipolytica</i>	č. 1	48	55	50	58	48	35	39	30
	č. 2	53	55	53	50	35	39	38	38
	č. 3	53	52	51	56	37	45	33	36
<i>C. tropicalis</i>	č. 1	50	46	43	45	34	33	28	27
	č. 2	48	46	50	49	35	34	31	34
	č. 3	45	50	46	51	30	31	31	35
<i>S. cerevisiae</i>	č. 1	54	60	61	61	56	58	43	50
	č. 2	59	59	53	60	63	50	44	61
	č. 3	58	61	63	56	55	49	60	62

Příloha 5: Tabulka průměrů inhibičních zón (mm) u DMSO

Mikrob	PM	po 20 h			po 44 h		
		1. disk	2. disk	3. disk	1. disk	2. disk	3. disk
<i>E. coli</i>	č. 1	9	9	9	9	9	9
	č. 2	9	9	9	9	9	9
	č. 3	9	9	9	9	9	9
	č. 4	9	9	9	9	9	9
<i>E. faecalis</i>	č. 1	9	9	9	9	9	9
	č. 2	10	9	9	9	9	9
	č. 3	9	9	9	9	9	9
	č. 4	9	9	9	9	9	9
<i>E. faecium</i>	č. 1	12	9	9	12	9	9
	č. 2	11	12	12	11	12	12
	č. 3	9	9	9	9	9	9
	č. 4	9	9	9	9	9	9
<i>Y. lipolytica</i>	č. 1	9	9	9	10	9	9
	č. 2	12	12	11	12	12	11
	č. 3	9	9	9	9	9	9
	č. 4	9	9	9	9	9	9
<i>C. tropicalis</i>	č. 1	11	10	12	9	10	10
	č. 2	9	9	9	10	9	9
	č. 3	10	9	9	9	9	9
	č. 4	9	9	9	9	9	9
<i>S. cerevisiae</i>	č. 1	9	9	9	9	9	9
	č. 2	10	10	10	10	10	10
	č. 3	11	9	9	12	9	9
	č. 4	9	9	9	9	9	9

Příloha 6: Tabulka průměrných šířek inhibičních zón (mm) u koncentrovaných silic po 20 h

	hřebíček	skořice	tymián	směs
<i>E. coli</i>	32,33 ± 1,60	48,83 ± 1,07	64,67 ± 1,97	43,67 ± 3,94
<i>E. faecalis</i>	23,33 ± 1,11	39,50 ± 4,65	45,00 ± 2,38	27,67 ± 0,75
<i>E. faecium</i>	22,33 ± 0,94	27,67 ± 1,60	42,50 ± 1,71	24,33 ± 1,11
<i>Y. lipolytica</i>	42,50 ± 1,89	60,33 ± 2,92	75,00 ± 0,00	52,67 ± 2,36
<i>C. tropicalis</i>	31,33 ± 1,49	53,50 ± 3,10	71,33 ± 5,22	47,50 ± 1,98
<i>S. cerevisiae</i>	32,67 ± 1,60	75,00 ± 0,00	75,00 ± 0,00	58,50 ± 2,22

Příloha 7: Tabulka průměrných šířek inhibičních zón (mm) u ředěných (10%) silic po 20 h

	hřebíček	skořice	tymián	směs
<i>E. coli</i>	25,50 ± 1,98	37,17 ± 3,58	25,50 ± 7,85	23,67 ± 1,80
<i>E. faecalis</i>	17,33 ± 0,94	26,83 ± 3,62	13,83 ± 2,79	16,33 ± 2,21
<i>E. faecium</i>	16,83 ± 1,07	20,33 ± 3,04	14,17 ± 1,77	15,67 ± 1,60
<i>Y. lipolytica</i>	35,33 ± 3,25	53,50 ± 3,04	31,17 ± 6,96	39,83 ± 4,98
<i>C. tropicalis</i>	26,50 ± 1,38	40,33 ± 1,25	27,33 ± 4,68	32,83 ± 1,77
<i>S. cerevisiae</i>	29,00 ± 1,29	53,67 ± 10,11	35,83 ± 2,79	55,17 ± 4,74

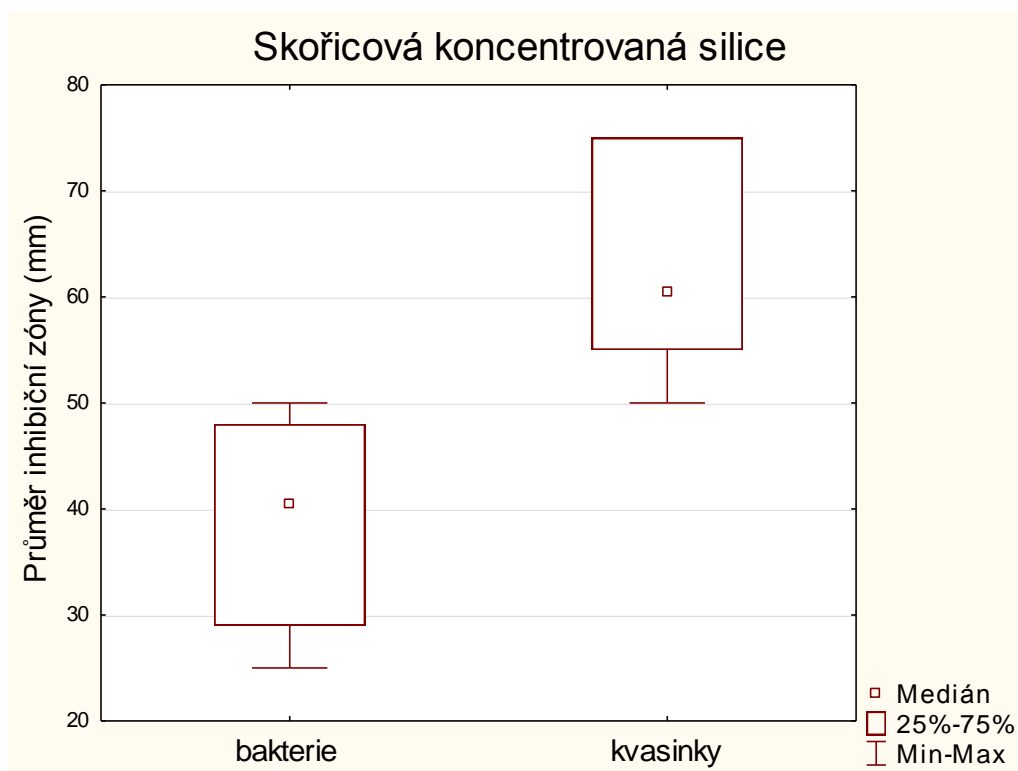
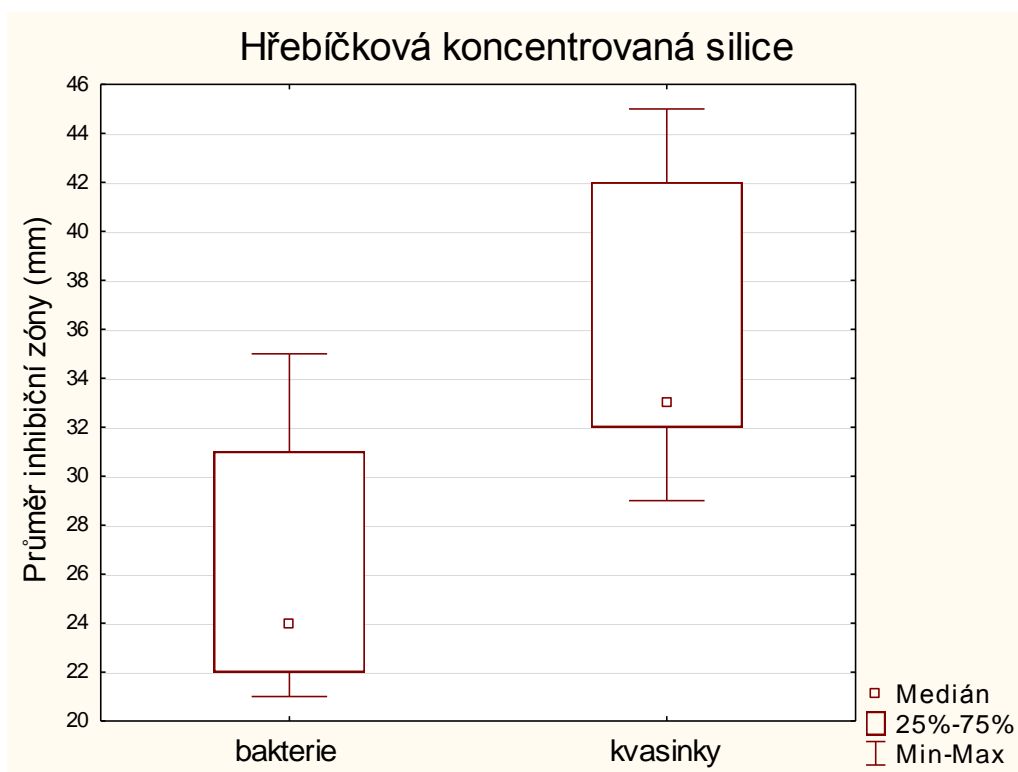
Příloha 8: Tabulka průměrných šířek inhibičních zón (mm) u koncentrovaných silic po 44 h

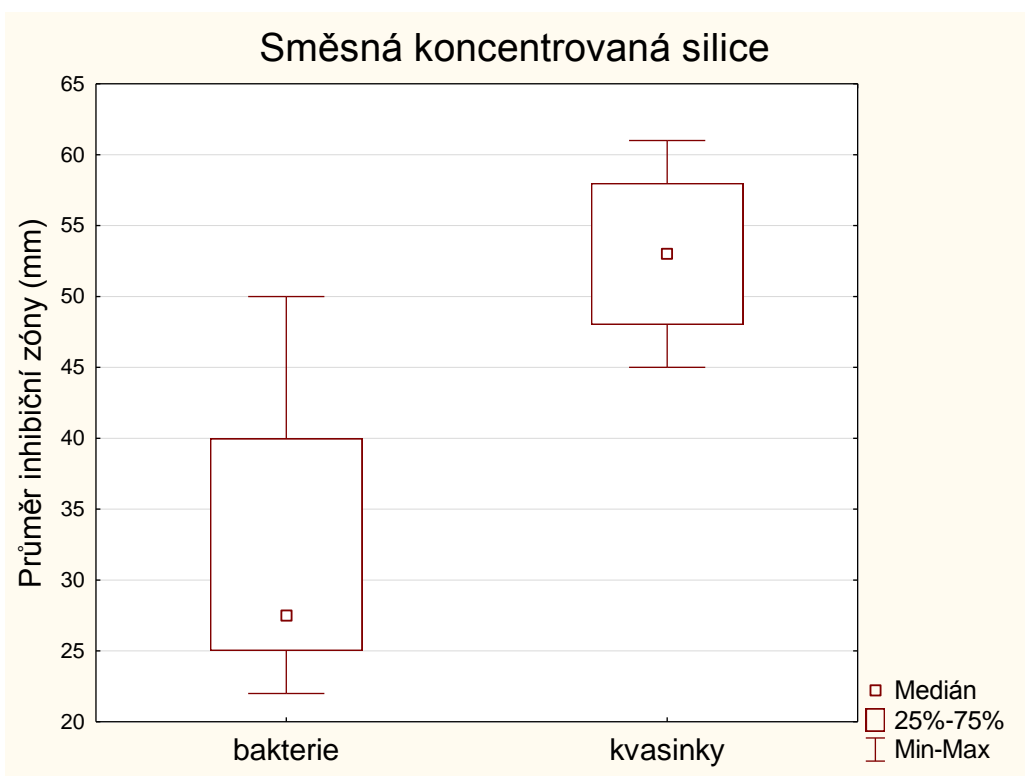
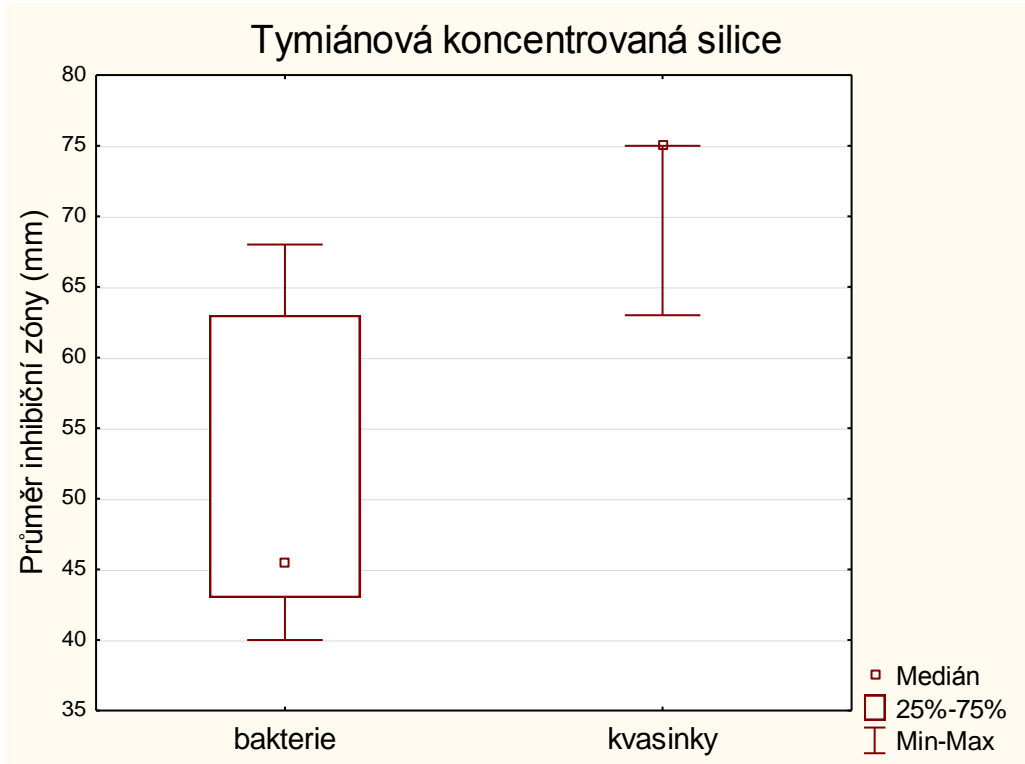
	hřebíček	skořice	tymián	směs
<i>E. coli</i>	32,17 ± 4,81	48,00 ± 1,53	68,00 ± 1,91	42,50 ± 4,11
<i>E. faecalis</i>	19,83 ± 2,34	35,50 ± 3,15	47,17 ± 4,52	28,33 ± 0,94
<i>E. faecium</i>	22,83 ± 1,07	29,33 ± 1,37	54,00 ± 4,43	24,33 ± 1,25
<i>Y. lipolytica</i>	48,50 ± 2,22	56,50 ± 3,20	75,00 ± 0,00	53,00 ± 3,06
<i>C. tropicalis</i>	35,83 ± 1,07	56,17 ± 3,98	72,83 ± 2,48	47,33 ± 2,87
<i>S. cerevisiae</i>	35,33 ± 0,94	72,17 ± 2,54	73,00 ± 2,89	59,00 ± 3,42

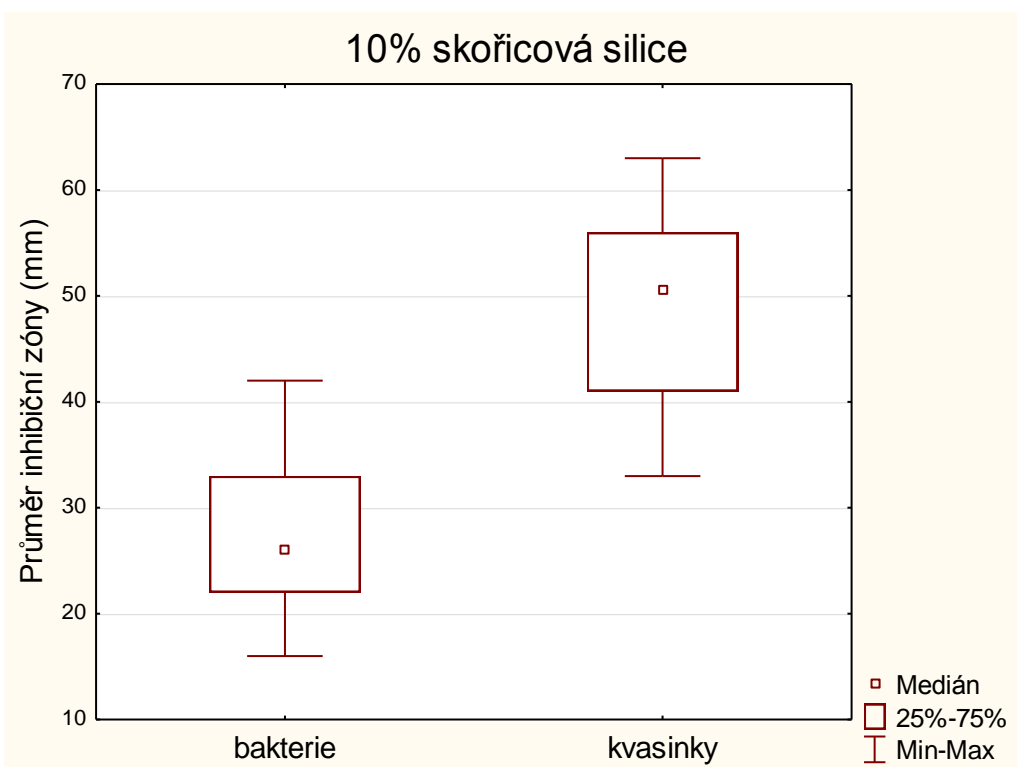
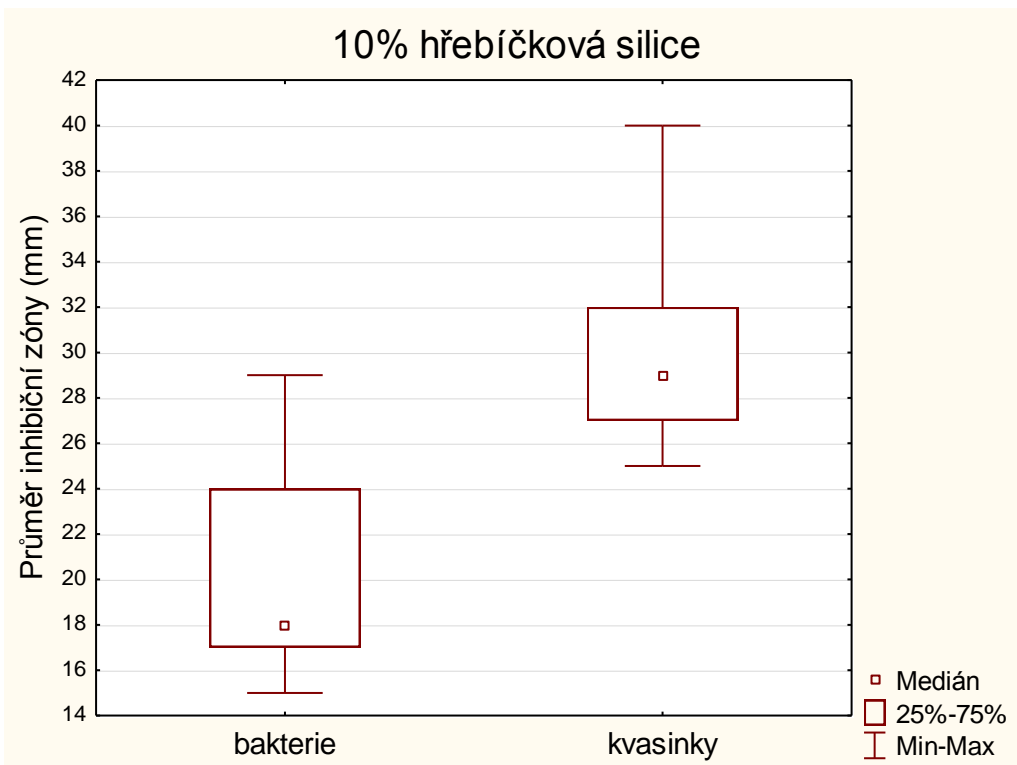
Příloha 9: Tabulka průměrných šířek inhibičních zón (mm) u ředěných (10%) silic po 44 h

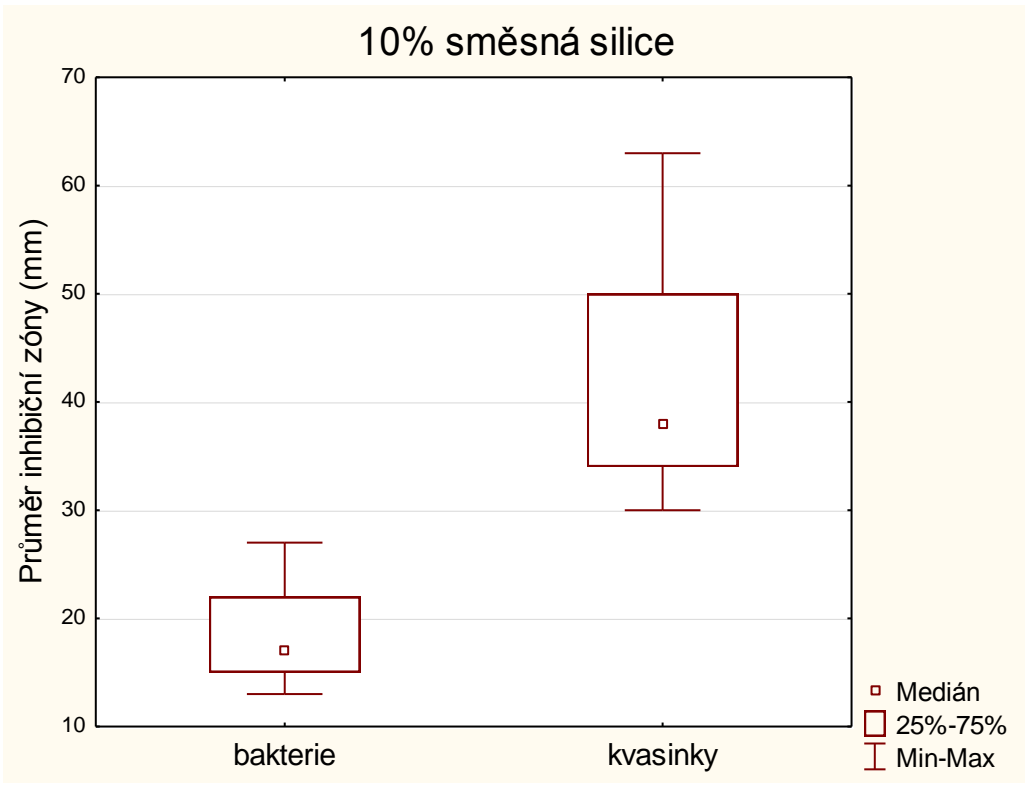
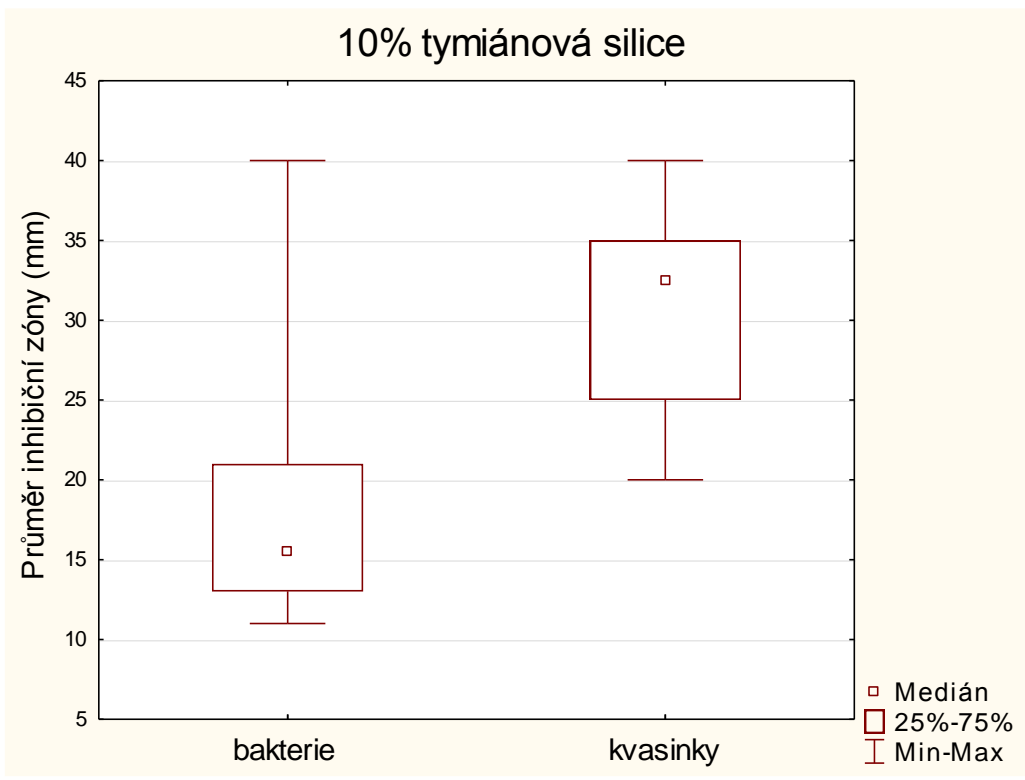
	hřebíček	skořice	tymián	směs
<i>E. coli</i>	28,50 ± 1,50	38,17 ± 3,98	24,67 ± 6,99	26,33 ± 2,05
<i>E. faecalis</i>	22,33 ± 2,81	27,33 ± 4,07	11,33 ± 0,94	16,33 ± 1,37
<i>E. faecium</i>	17,50 ± 0,96	21,00 ± 1,53	14,50 ± 1,12	16,67 ± 1,89
<i>Y. lipolytica</i>	39,67 ± 2,69	49,50 ± 4,03	19,17 ± 8,25	35,67 ± 3,20
<i>C. tropicalis</i>	29,83 ± 2,79	37,50 ± 2,63	17,67 ± 2,81	31,00 ± 2,89
<i>S. cerevisiae</i>	27,00 ± 2,77	44,83 ± 13,23	22,17 ± 6,59	53,33 ± 7,99

Příloha 10: Grafy porovnání inhibičního účinku jednotlivých druhů silic na bakterie a kvasinky

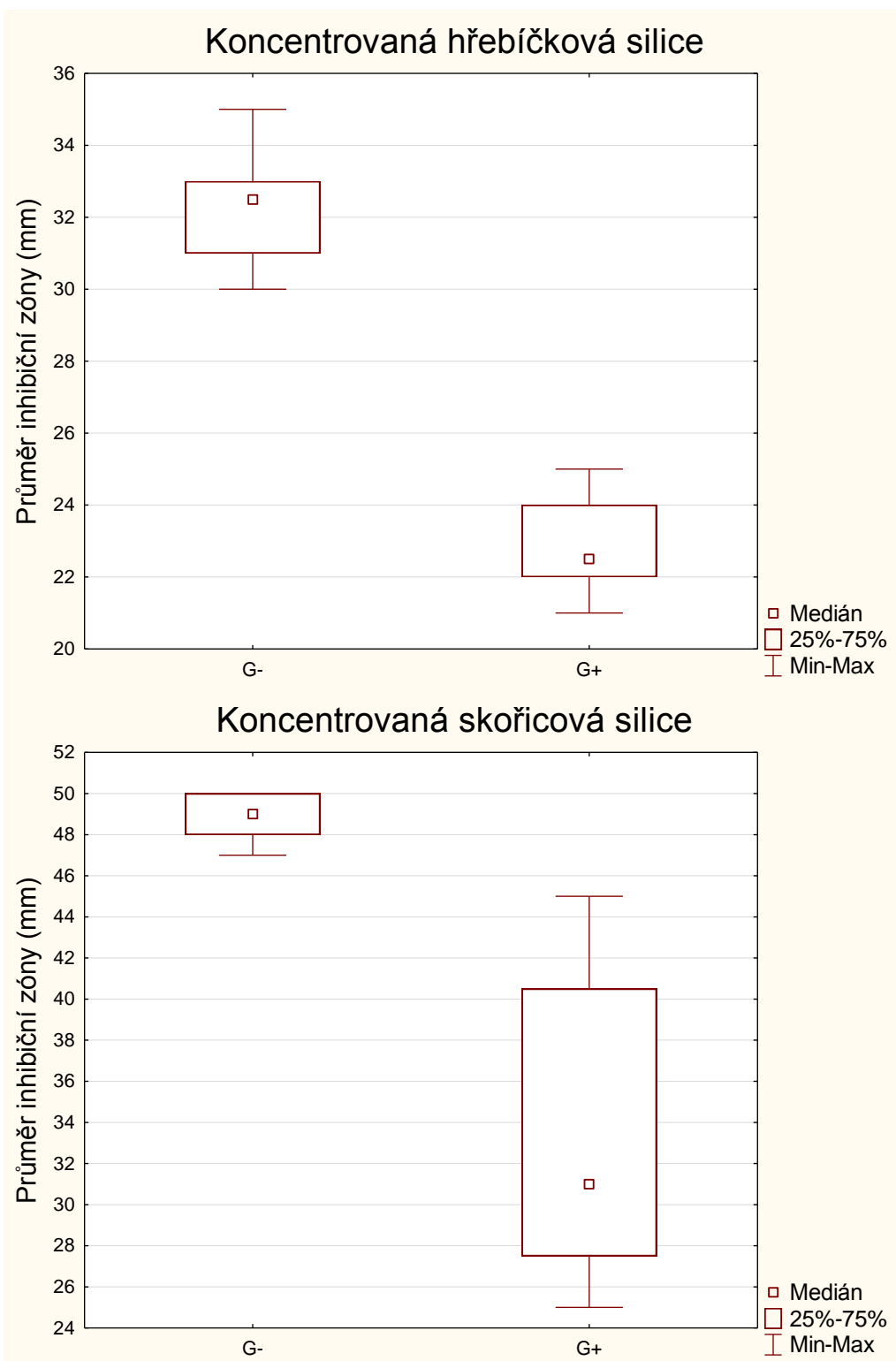




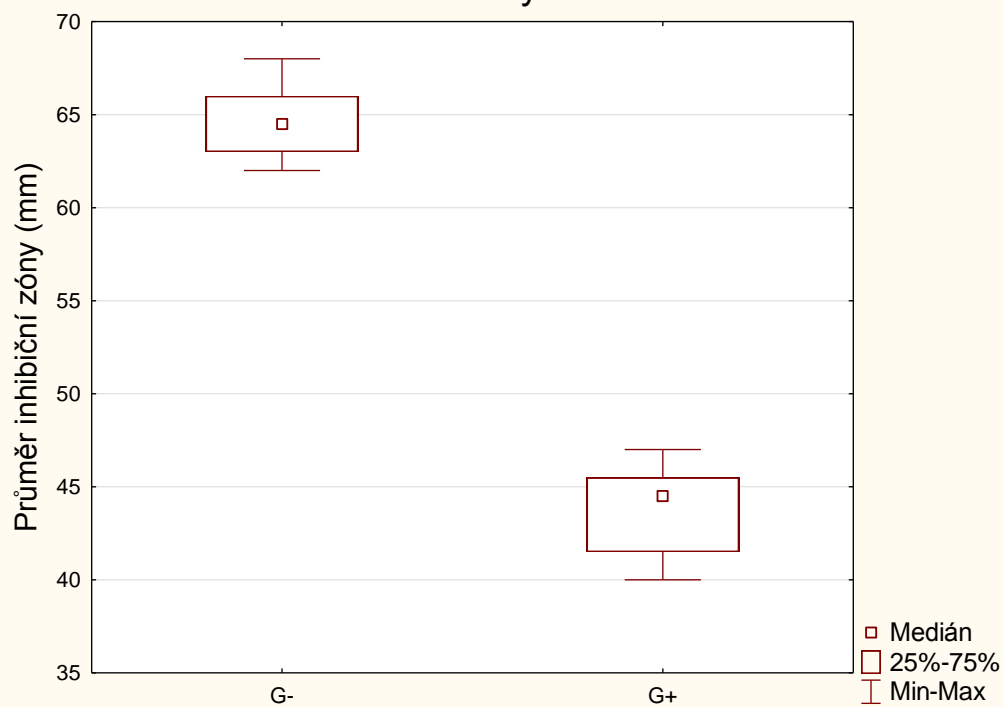




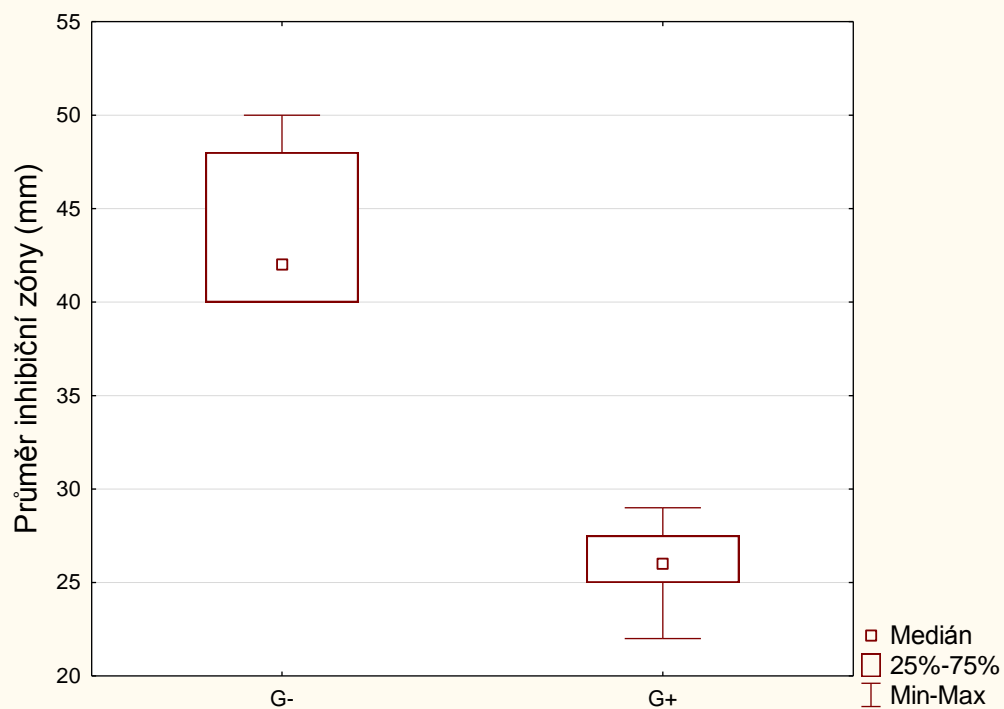
Příloha 11: Grafy porovnání inhibičního účinku jednotlivých druhů silic na G+ a G- bakterie



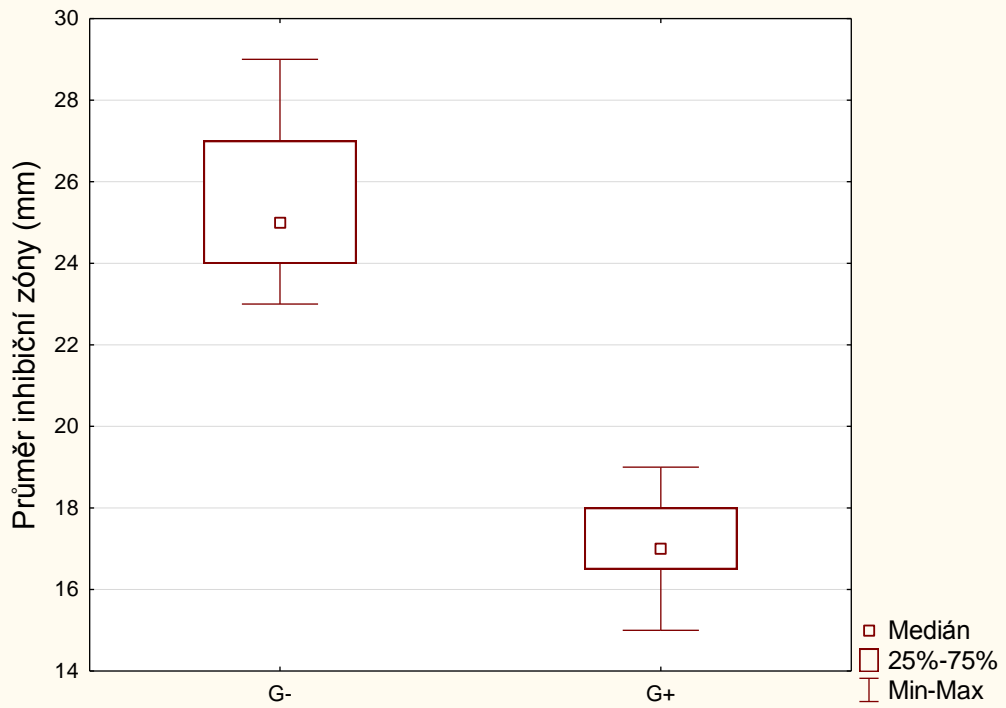
Koncentrovaná tymiánová silice



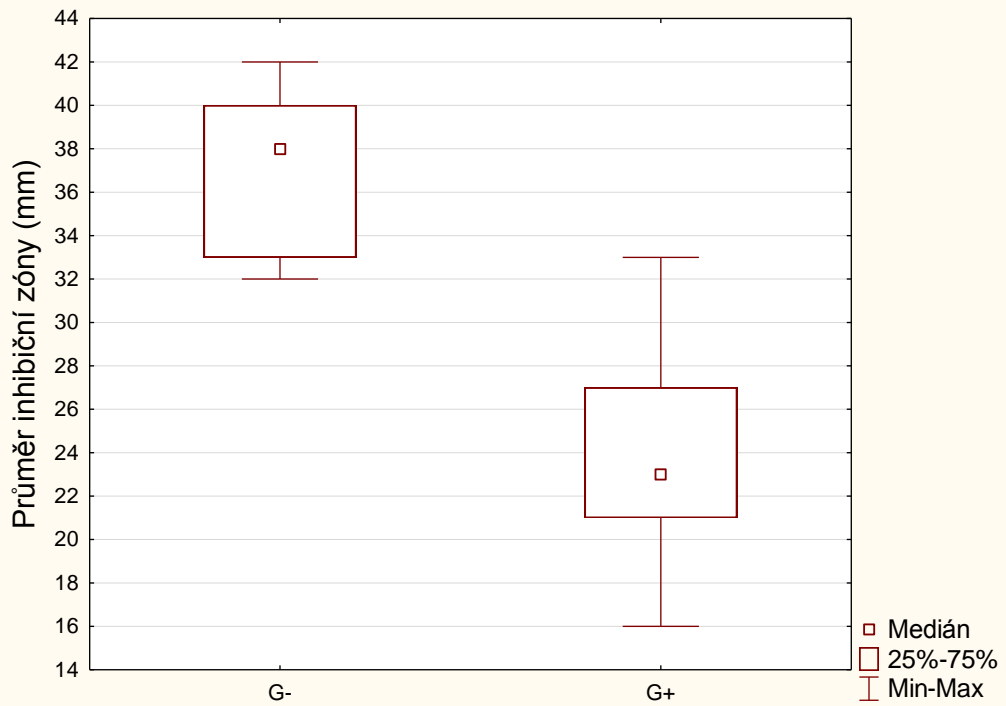
Koncentrovaná směsná silice



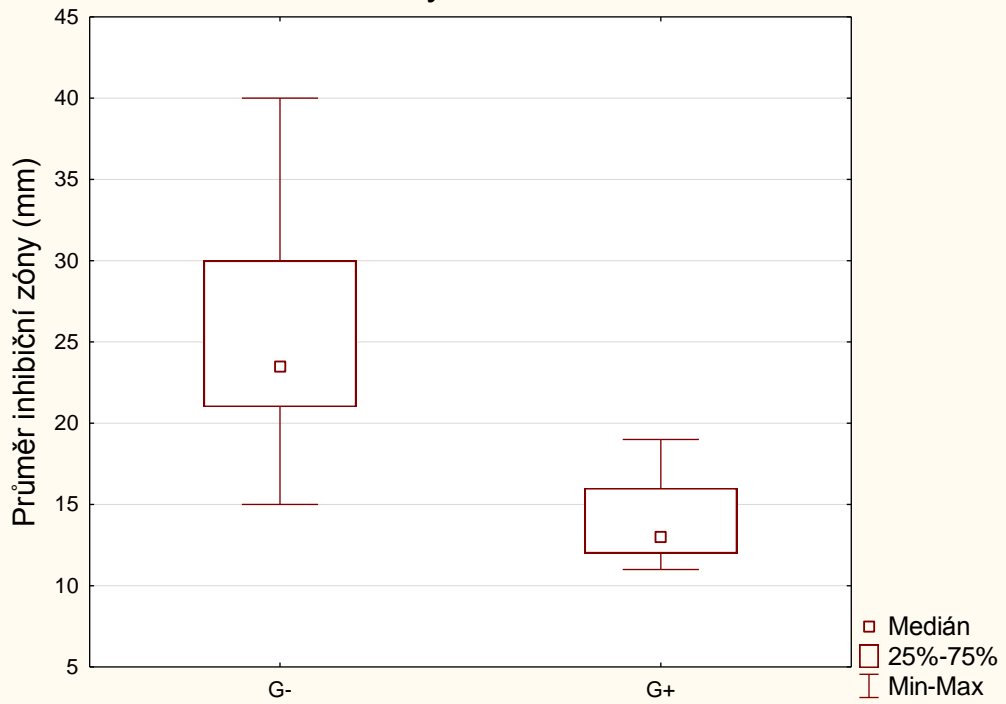
10% hřebíčková silice



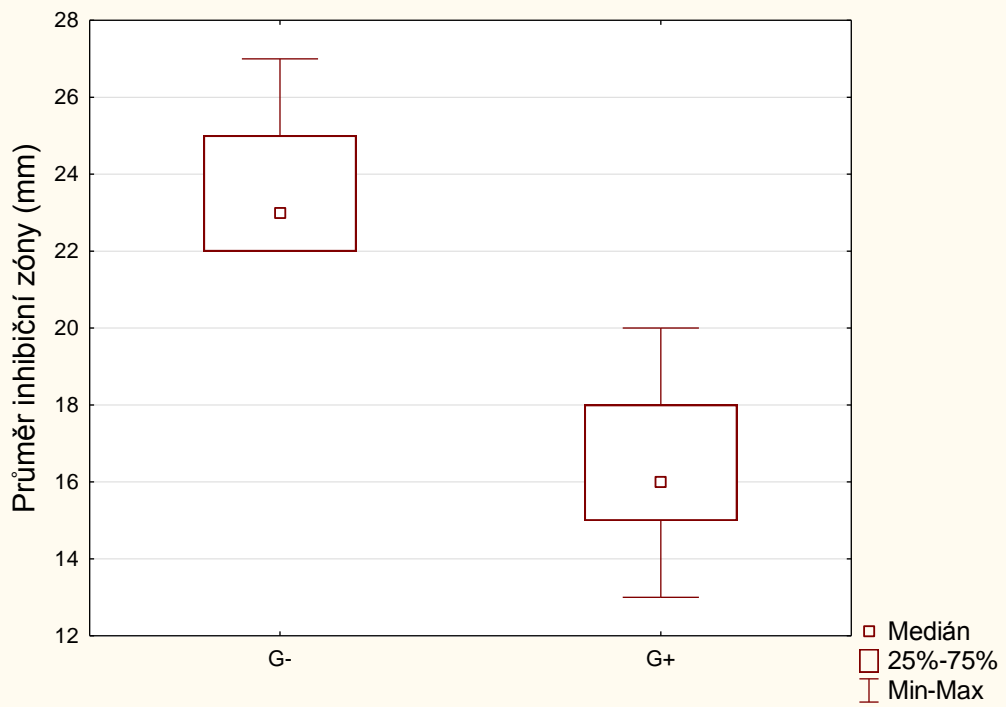
10% skořicová silice



10% tymiánová silice



10% směsná silice



11 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Tabulka průměrů inhibičních zón (mm) u hřebíčkové silice	63
Příloha 2: Tabulka průměrů inhibičních zón (mm) u skořicové silice	63
Příloha 3: Tabulka průměrů inhibičních zón (mm) u tymiánové silice	64
Příloha 4: Tabulka průměrů inhibičních zón (mm) u směsné silice z hřebíčku, skořice a tymiánu.....	64
Příloha 5: Tabulka průměrů inhibičních zón (mm) u DMSO	65
Příloha 6: Tabulka průměrných šířek inhibičních zón (mm) u koncentrovaných silic po 20 h	66
Příloha 7: Tabulka průměrných šířek inhibičních zón (mm) u ředěných (10%) silic po 20 h	66
Příloha 8: Tabulka průměrných šířek inhibičních zón (mm) u koncentrovaných silic po 44 h	66
Příloha 9: Tabulka průměrných šířek inhibičních zón (mm) u ředěných (10%) silic po 44 h	66
Příloha 10: Grafy porovnání inhibičního účinku jednotlivých druhů silic na bakterie a kvasinky	67
Příloha 11: Grafy porovnání inhibičního účinku jednotlivých druhů silic na G+ a G- bakterie.....	71