

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Antibakteriální účinky rostlinných olejů s obsahem
mastných kyselin o střední délce řetězce**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Klára Laloučková

Vedoucí práce: Doc. MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci "Antibakteriální účinky rostlinných olejů s obsahem mastných kyselin o střední délce řetězce" zpracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou v práci citovány a uvedeny v seznamu literatury na konci této práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 7. dubna 2016

Poděkování

Děkuji vedoucí své diplomové práce, doc. MVDr. Evě Skřivanové, Ph.D., za veškerou projevenou pomoc a podporu, bez které by tato práce rozhodně nevznikla. Poděkování patří také Ing. Petře Hovorkové, která mi ukázala, jak na to v laboratoři, a která mi také poskytla řadu podnětů pro psaní práce. Slova díky patří i mým přátelům a rodině, kteří si konečně oddychnou.

Antibakteriální účinky rostlinných olejů s obsahem mastných kyselin o střední délce řetězce

Souhrn

Předložená diplomová práce se zabývá studiem antibakteriálních účinků rostlinných olejů s obsahem mastných kyselin o střední délce řetězce (MCFA). Minimální inhibiční koncentrace (MIC) osmi vybraných olejů byly stanoveny jako modus nejnižších zaznamenaných koncentrací olejů, které vedly k 80% úbytku růstu 13 kmenů patogenních a 6 komenzálních bakterií oproti kontrole. Testovány byly kokosový (*Cocos nucifera*), palmový (*Elaeis guineensis*), palmový červený (*Elaeis guineensis*), palmojádrový (*Elaeis guineensis*), *Cuphea* (*C. lanceolata* a *C. ignea*), babassu (*Attalea speciosa*, syn. *Orbignya speciosa*), tucuma (*Astrocaryum vulgare*) a muru-muru (*Astrocaryum murumuru*) olej. Jejich antibakteriální aktivita byla stanovena vůči bakteriím *Bifidobacterium animalis*, *B. longum*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus cecorum*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *S. infantis*, *S. typhimurium* a *Staphylococcus aureus*. U všech olejů byly plynovou chromatografií identifikovány hodnoty koncentrací jednotlivých mastných kyselin v nich obsažených. MIC jednotlivých olejů byly stanoveny na základě mikrodilučního testu v 96-jamkové mikrotitrační destičce. Byla zjištěna nutnost štěpení vybraných olejů lipázou pro aktivaci jejich antibakteriálních účinků. Žádný z olejů nebyl účinným inhibitorem růstu gramnegativních bakterií ani po naštěpení. Palmový a palmový červený olej nebyl aktivní vůči žádnému z testovaných bakteriálních kmenů. Nejnižší stanovená MIC byla 0,14 mg/ml oleje tucuma vůči *C. perfringens*; ostatní oleje poté inhibovaly růst *C. perfringens* v koncentracích od 0,25 do 4,5 mg/ml. Kokosový, babassu, *Cuphea*, palmojádrový, muru-muru a tucuma olej inhiboval bakterie *E. cecorum* při koncentracích 1,12 – 4,5 mg/ml. Citlivost *L. monocytogenes* byla prokázána pouze u oleje ze semen rostliny *Cuphea* v koncentraci 1,12 mg/ml. MIC olejů inhibujících *S. aureus* nabývaly hodnot od 0,56 do 2,25 mg/ml a byly jimi kokosový, babassu, *Cuphea*, palmojádrový, muru-muru a tucuma olej. Příznivým efektem byla nezjištěná citlivost bakterií *B. animalis*, *B. longum*, *L. acidophilus* a *L. fermentum* vůči žádnému z testovaných olejů. Lze konstatovat, že rostlinné oleje s obsahem MCFA mají po naštěpení lipázou antibakteriální účinky vůči grampozitivním bakteriím, aniž by ovlivňovaly komenzální mikrobiotu trávicího traktu.

Klíčová slova: mastné kyseliny, bakterie, inhibice, antibakteriální, výživa

Antibacterial effect of plant oils containing medium-chain fatty acids

Summary

This diploma thesis focuses on antibacterial effect of plant oils containing medium-chain fatty acids (MCFA). The minimum inhibitory concentration (MIC) of eight chosen plant oils was defined as the mode of the lowest concentrations that were able to reduce the bacterial growth of 13 pathogenic and 6 beneficial intestinal strains of bacteria by 80 %. Coconut (*Cocos nucifera*), palm, red palm and palm kernel (*Elaeis guineensis*), *Cuphea* (*C. lanceolata* and *C. ignea*), babassu (*Attalea speciosa*, syn. *Orbignya speciosa*), tucuma (*Astrocaryum vulgare*), and muru-muru (*Astrocaryum murumuru*) oils were selected. Their antibacterial activity was tested towards following bacteria: *Bifidobacterium animalis*, *B. longum*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus cecorum*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *S. infantis*, *S. typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. To identify the fatty acids composition of tested oils a gas chromatography was used. Consequently, the MIC of each oil towards all the bacteria was determined by a broth-microdilution test in 96-well microtitration plates. The essentiality of cleavage of selected oils by lipase was observed, in order to activate their antibacterial effect. None of the tested oils exhibited any potential to inhibit the growth of Gramnegative bacterial strains even after cleavage. Furthermore palm and palm red oil did not exhibit any antibacterial action towards any of the tested bacterial strains. The strongest antibacterial activity was observed in tucuma oil, that inhibited *C. perfringens* by MIC=0.14 mg/ml. Other oils inhibited the growth of *C. perfringens* in concentrations from 0.25 to 4.5 mg/ml. The growth of *E. cecorum* was inhibited by coconut, babassu, *Cuphea*, palm kernel, muru-muru and tucuma oil in MIC range between 1.12 – 4.5 mg/ml. The only compound active against *L. monocytogenes* was *Cuphea* oil (MIC 1.12 mg/ml). Oils that were able to inhibit the growth of *S. aureus* strain showed MIC from 0.56 to 2.25 mg/ml (coconut, babassu, *Cuphea*, palm kernel, muru-muru and tucuma oil). Undetected susceptibility of *B. animalis*, *B. longum*, *L. acidophilus* and *L. fermentum* bacterial strains to tested oils was evaluated as a positive effect. According to the foregoing statements, it can be concluded that the plant oils containing MCFA show antibacterial effect towards Grampositive strains of bacteria after their cleavage by lipase. No showed influence to beneficial intestinal microflora can be a big advantage.

Keywords: fatty acids, bacteria, inhibition, antibacterial, nutrition

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Hypotéza a cíl práce.....	2
2.1	Hypotéza.....	2
2.2	Cíl práce.....	2
3	Literární rešerše.....	3
3.1	<i>Bifidobacterium spp.</i>	3
3.1.1	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	3
3.1.2	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	4
3.2	<i>Campylobacter spp.</i>	4
3.2.1	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	4
3.3	<i>Clostridium spp.</i>	5
3.3.1	<i>Clostridium perfringens</i>	5
3.4	<i>Escherichia spp.</i>	8
3.4.1	<i>Escherichia coli</i>	9
3.5	<i>Enterococcus spp.</i>	11
3.5.1	<i>Enterococcus cecorum</i>	12
3.6	<i>Lactobacillus spp.</i>	12
3.6.1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	13
3.6.2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	13
3.7	<i>Listeria spp.</i>	14
3.7.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	15
3.8	<i>Salmonella spp.</i>	15
3.8.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	15
3.8.2	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium.....	16
3.9	<i>Staphylococcus spp.</i>	16

3.9.1	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	17
3.10	Epidemiologická situace výskytu alimentárních infekcí a otrav ve světě a v ČR	17
3.11	Historie používání antibiotik a antibiotických stimulatorů růstu.....	22
3.12	Bakteriální rezistence k antibiotikům.....	24
3.13	Alternativy antibiotik a neantibiotické stimulatory růstu v živočišné produkci.....	25
3.13.1	Probiotika.....	26
3.13.2	Prebiotika.....	27
3.13.3	Synbiotika.....	28
3.13.4	Enzymy.....	28
3.13.5	Organické kyseliny.....	28
3.13.5.1	Mastné kyseliny o střední délce řetězce	29
3.13.6	Bakteriociny.....	29
3.13.7	Bakteriofágy	29
3.13.8	Rostlinné extrakty	29
3.13.9	Zinek a oxid zinečnatý	30
3.13.10	Jílové minerály	30
3.14	Charakteristika a vlastnosti mastných kyselin	31
3.15	Mastné kyseliny o střední délce řetězce	33
3.16	Antibakteriální účinky mastných kyselin o střední délce řetězce	34
3.16.1	Kyselina kapronová.....	36
3.16.2	Kyselina kaprylová.....	37
3.16.3	Kyselina kaprinová.....	37
3.16.4	Kyselina laurová	38
3.17	Rostlinné oleje s obsahem MK o střední délce řetězce	38
3.17.1	Kokosový olej	39
3.17.2	Palmový olej	40
3.17.3	Palmový červený olej.....	41

3.17.4	Palmojádrový olej	41
3.17.5	<i>Cuphea</i> olej	42
3.17.6	Tucuma olej	43
3.17.7	Babassu olej	43
3.17.8	Muru-muru olej	44
4	Materiál a metody	45
4.1	Teoretická část	45
4.2	Praktická část	45
4.2.1	Materiál použitý v praktické části práce.....	45
4.2.1.1	Bakteriální kmeny a kultivační média.....	45
4.2.1.2	Rostlinné oleje	47
4.2.2	Metody použité v praktické části práce.....	47
4.2.2.1	Extrakce oleje	47
4.2.2.2	MCFA v použitých rostlinných olejích.....	47
4.2.2.3	Příprava olejů pro mikrodiluční test.....	48
4.2.2.4	Testování antibakteriálních účinků MK.....	48
4.2.2.5	Stanovení minimální inhibiční koncentrace	49
5	Výsledky	50
5.1	Plynová chromatografie rostlinných olejů MCFA.....	50
5.2	MIC vybraných rostlinných olejů MCFA	51
6	Diskuze	56
7	Závěr.....	61
8	Seznam použité literatury	62
	Přílohy.....	II

Seznam grafů, obrázků a tabulek

Seznam grafů

Graf 1: Medianová hodnota počtu úmrtí z onemocnění z potravy vyvolaných bakteriemi v roce 2010 při $\alpha=0,05$	19
Graf 2: Medianová hodnota let ztraceného života s disabilitou z onemocnění z potravy vyvolaných bakteriemi v roce 2010 při $\alpha=0,05$	19
Graf 3: Medianová hodnota počtu onemocnění z potravy vyvolaných bakteriemi v roce 2010 při $\alpha=0,05$	20
Graf 4: Procentuální podíl členských států se systémem kontroly rezistence u bakterií obecně a u kauzativních původců tuberkulózy, malárie, chřipky a infekce virem HIV v Evropském regionu	25
Graf 5: MK složení kokosového oleje.....	39
Graf 6: MK složení palmového oleje	40
Graf 7: MK složení palmojádrového oleje	42
Graf 8: MK složení tucuma oleje	43
Graf 9: MK složení babassu oleje	44
Graf 10: MK složení muru-muru oleje.....	44
Graf 11: Skladba a koncentrace vybraných rostlinných olejů s obsahem MCFA v mg/kg	51
Graf 12: MIC rostlinných olejů vůči kmenům <i>C. perfringens</i>	55
Graf 13: MIC rostlinných olejů vůči kmenům <i>E. cecorum</i>	55
Graf 14: MIC rostlinných olejů vůči <i>L. monocytogenes</i>	55
Graf 15: MIC rostlinných olejů vůči kmenům <i>S. aureus</i>	55

Seznam obrázků

Obrázek 1: Nekrotizující kolon v důsledku infekce <i>C. perfringens</i> typ A	7
Obrázek 2: Interakce EPEC a hostitelské buňky	10
Obrázek 3: Struktura MK	31
Obrázek 4: Schématické znázornění možných cílů a mechanismů MK v buňce	36
Obrázek 5: Design mikrodiluční destičky pro experiment	49

Seznam tabulek

Tabulka 1: Použití antimikrobiálních látek v krmivu.....	23
Tabulka 2: Mikroorganismy používané jako probiotika	26
Tabulka 3: Zdroje prebiotik	27
Tabulka 4: MK dle dvojných vazeb	33
Tabulka 5: Shrnutí strukturálního efektu na antimikrobiální aktivitu MK.....	35
Tabulka 6: Procentuální zastoupení MCFA v druzích rostliny <i>Cuphea</i>	42
Tabulka 7: Bakteriální druhy a kmeny použité v praktické části práce	45
Tabulka 8: Složení média Wilkins-Chalgren (Oxoid, VB)	46
Tabulka 9: Složení Nutrient Broth No. 2, Preston <i>Campylobacter</i> Selective Supplement a <i>Campylobacter</i> Growth Supplement (Oxoid, Velká Británie) pro kultivaci <i>Campylobacter</i> spp.	47
Tabulka 10: Koncentrace MCFA ve vybraných olejích v mg/kg	50
Tabulka 11: MIC vybraných rostlinných olejů MCFA v mg/ml	53
Tabulka 12: Souhrnné zobrazení MIC testovaných olejů v mg/ml.....	54

Seznam zkratek

ATCC	– Americká sbírka typových kultur
ATP	– adenosintrifosfát
CCM	– Česká kolekce mikroorganismů
CDC	– Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí
CFU	– kolonie tvořící jednotka
CIP	– Kolekce bakterií a virů Pasteurova institutu
CNCTC	– Česká národní sbírka typových kultur
DAEC	– difúzně adherentní <i>Escherichia coli</i>
DMSO	– dimethyl sulfoxid
DNA	– kyselina deoxyribonukleová
EAggEC	– enteroagregativní <i>Escherichia coli</i>
ECDC	– Evropské centrum pro prevenci a kontrolu onemocnění
EFSA	– Evropský úřad pro kontrolu potravin
EHEC	– enterohemoragická <i>Escherichia coli</i>
EIEC	– enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
EPEC	– enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ETEC	– enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
ExPEC	– extraintestinální <i>Escherichia coli</i>
FDA	– Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GC	– guanin-cytosin báze
GRAS	– obecně považovaný za bezpečný
LCFA	– mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
MAG	– monoacylglyceroly
MCFA	– mastné kyseliny o střední délce řetězce
MCT	– triacylglyceroly o střední délce řetězce
MIC	– minimální inhibiční koncentrace
MK	– mastná kyselina
MRSA	– methycillin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MUFA	– mononenasyčené mastné kyseliny
NMEC	– neonatálně meningitidní <i>Escherichia coli</i>

PUFA	– polynenasycené mastné kyseliny
SAFA	– nasycené mastné kyseliny
SCFA	– mastné kyseliny s krátkým řetězcem
STEC	– Shiga toxin produkující <i>Escherichia coli</i>
TAG	– triacylglyceroly
TSI	– triple-sugar iron agar
U	– unit; jednotka
UPEC	– uropatogenní <i>Escherichia coli</i>
V–P	– Voges-Proskauerova reakce
VLCFA	– mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem
VRE	– vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus</i>
VTEC	– Vero cytotoxin produkující <i>Escherichia coli</i>
WHO	– Světová zdravotnická organizace

1 Úvod

Antibiotické účinky látek přírodního charakteru jsou známy již od starověku (Bassett *et al.*, 1980; Cook *et al.*, 1989; Nelson *et al.*, 2010). Použití antibiotických preparátů v živočišné výrobě je úzce spjato s jejím směřováním k co nejvyšší produkci s ideálním hospodářským výsledkem (Jukes *et al.*, 1950; Moore *et al.*, 1946). Ruku v ruce s masivním používáním antibiotik se však objevila i schopnost bakterií těmto látkám vzdorovat.

Rezistence patogenních mikroorganismů a variabilita jejich adaptačních mechanismů vůči antibiotickým preparátům se časem ukázala být závažným problémem (Starr a Reynolds, 1951). Jedním z pokusů ke snížení jejich neuvážlivého používání se stala osvěta o užívání antibiotik v humánní medicíně a v zemědělství pak zákaz antibiotických stimulátorů růstu (EU, 2003).

Toto omezení však může být důvodem rozvoje onemocnění způsobených enteropatogenními bakteriemi v chovech hospodářských zvířat, která byla dříve omezována právě zkrmováním antibiotických stimulátorů růstu, a k možnému snížení bezpečnosti potravinářských produktů živočišného původu.

Vzhledem k těmto okolnostem se zvýšila poptávka po alternativních zdrojích látek s antibakteriálním účinkem. Jedním z nich jsou prokazatelně organické kyseliny (Freitas *et al.*, 2006; Roth a Kirchgessner, 1998), mezi které jsou řazeny i mastné kyseliny o střední délce řetězce (MCFA; medium-chain fatty acids). Zdroji MCFA jsou rostlinné oleje řady palem a jiných rostlin především tropických oblastí, kde je jejich antibakteriální potenciál využíván již po řadu staletí v lidové medicíně (Avancini *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2015).

V mezích rozsahu této práce dosud nebyly studovány antibakteriální účinky rostlinných olejů, které obsahují mastné kyseliny o střední délce řetězce, proti enteropatogenním bakteriím. Zejména pak v literatuře chybí poznatky o účinku těchto olejů vůči trávení prospěšným bakteriím, jakými jsou *Lactobacillus spp.* a *Bifidobacterium spp.*, ale také vůči patogenním enterokokům.

2 Hypotéza a cíl práce

2.1 Hypotéza

Oleje s obsahem mastných kyselin o střední délce řetězce vykazují antibakteriální aktivitu.

2.2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo stanovit minimální inhibiční koncentrace olejů s obsahem mastných kyselin pro vybrané enteropatogenní bakterie. Aktivitu stanovit s nebo bez předchozího štěpení triacylglycerolů pomocí *in vitro* inkubace daného oleje s pankreatickou lipázou.

3 Literární rešerše

3.1 *Bifidobacterium* spp.

Bakterie rodu *Bifidobacterium* (čeleď *Bifidobacteriaceae*) jsou anaerobní, grampozitivní, nepohyblivé tyčinky variabilního tvaru, které netvoří spóry a nejsou odolné vůči kyselému prostředí. Lze je nalézt v podobě krátkých, pravidelných, úzkých buněk se špičatým koncem; buněk pravidelného kokoidního tvaru; dlouhých buněk s drobnými ohyby či výčnělky anebo rozsáhle větvených. Na koncích mohou být buňky lehce rozdvojeného kloubového či špachtlovitého tvaru. Buňky jsou často spojeny do podoby řetízků, mohou se však vyskytovat také samostatně či jako agregáty ve tvaru hvězdy, písmene „V“ nebo palisády (Whitman, 2005a).

Optimální kultivační teplota se pohybuje mezi 37–41 stupni Celsia (s výjimkami). Schopnost růstu při teplotě 45 stupňů Celsia od sebe odlišuje lidské a zvířecí druhy bifidobakterií – zvířecí jsou toho na rozdíl od lidských při této teplotě schopny. Optimální pH pro nastartování vývoje je 6,5 až 7,0 a při kyselém (4,5–5,0) a i zásaditém (8,0–8,5) pH nerostou (Whitman, 2005a).

Bifidobakterie vykazují tyto biochemické znaky: jako zdroj dusíku se uplatňuje amoniak. Neprodukují oxid uhličitý. Kataláza negativní. Metabolickými procesy tvoří malé množství kyseliny máselné a propionové. Bakterie vykazují sacharolytickou aktivitu. Barvení methylenovou modří dává nepravidelnou odpověď (Biavati a Mattarelli, 2005).

Vyskytují se ve střevě člověka, různých druhů zvířat včetně včel medonosných. Přítomnost lze detekovat také v siláži a fermentovaných mléčných produktech (Gavini *et al.*, 1991). Množství GC je 47–67 mol%. Druhovým představitelem je *Bifidobacterium bifidum* (Biavati a Mattarelli, 2005).

3.1.1 *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*

Morfologie buněk tohoto poddruhu se nijak neodlišuje od jiných bakterií rodu *Bifidobacterium*. Nefermentuje pentózy. Predominantní možnost izolace je především z výkalů mláďat krmených mateřským mlékem (Biavati a Mattarelli, 2005).

3.1.2 *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*

Kmen *B. animalis* subsp. *animalis* vykazuje znaky typické pro celý rod *Bifidobacterium*, jak je popsáno výše. Kultury nerostou ani v kyslíkové atmosféře obohacené oxidem uhličitým a v médiích, kde základem je mléko. Optimální teplota pro kultivaci je mezi 39–41 stupňů Celsia. Zdrojem tohoto poddruhu jsou především myši výkaly (Biavati a Mattarelli, 2005).

3.2 *Campylobacter* spp.

Rod *Campylobacter* (čeleď *Campylobacteraceae*) zahrnuje gramnegativní, mikroaerofilní, chemoorganotrofní bakterie s respiratorním typem metabolismu, jehož buňky představují tyčinky o velikosti 0,2–0,8 x 0,5–5 µm, spirálovitě zakřivené či ve tvaru písmene „S“, tvořící krátké řetězky a ve starých kulturách měnící tvar buněk na sférický nebo zakulacený (Brenner, 2005; Ng *et al.*, 1985).

Charakteristický vývrtkovitý pohyb většiny druhů umožňuje bičík, který je 2 až 3krát delší než samotná buňka, a který je umístěn na jednom nebo na obou koncích buňky. Optimální kultivační teplota bakterií je 35–37 stupňů Celsia, přičemž inhibice nastává při teplotě pod 4 stupně Celsia. (Brenner, 2005; Ketley, 1997; Smibert, 1978). *Campylobaktery* vykazují tyto biochemické znaky: oxidáza pozitivní (výjimka *C. gracilis*, *C. concisus* a *C. showae*), Vogel-Proskauerova (V–P) reakce a barvení methylovou červení dává negativní odpověď. Většina druhů redukuje nitráty. *Campylobaktery* netvoří žádná barviva ani pigmenty (Vandamme *et al.*, 2005).

Bakterie rodu *Campylobacter* lze nalézt v orgánech reprodukčního aparátu, v trávicím traktu a v ústní dutině většiny zvířat i člověka, kde působí patogenně (Smibert, 1974). Obsah GC bází se pohybuje od 29 do 47 mol%. Druhovým představitelem je *Campylobacter fetus* (Vandamme *et al.*, 2005).

3.2.1 *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*

Buněčná stěna tohoto poddruhu obsahuje buď samotnou D-galaktózu či kombinaci D-galaktózy s D-glukózou a D-mannózou (Smibert, 1970). Buňky samotné mohou obsahovat 1–5 plasmidů (Tenover *et al.*, 1985) s prevalencí 19 (Austen a Trust, 1980) až 95 % (Lee *et al.*, 1994), s čímž je spojená plazmidově zprostředkovaná rezistence vůči některým druhům antibiotik (kanamycin, tetracyklin a chlaramfenikol) (Taylor, 1992).

Jako patogen způsobuje aborty především ovcí, ale i koz a skotu. Může způsobovat průjmová onemocnění zvířat a je spojován se žloutenkou u některých druhů ptactva. U člověka je celosvětově nejrozšířenějším původcem gastroenteritid, způsobuje septikémii a potraty (Vandamme *et al.*, 2005). Nákaza určitými kmeny *C. jejuni* subsp. *jejuni* je predispozičním faktorem k neurologickému syndromu Guillain-Barré (Nachamkin *et al.*, 1998) a k Miller-Fisher syndromu (akutní zánětlivá demyelinizační polyneuropatie) (Roberts *et al.*, 1987).

3.3 *Clostridium spp.*

Rod *Clostridium* zahrnuje grampozitivní (alespoň v raných vývojových stádiích), sporulující, obligátně anaerobní bakterie tyčinkovitého tvaru, které pokud vykazují schopnost pohybu, jsou obrvené podél celého obvodu buňky. Získávání energie probíhá z vazeb uvnitř anorganických i organických látek (chemoorganotrofie, chomoautotrofie, chemolitotrofie) za produkce směsi organických kyselin a alkoholů obvykle ze sacharidů či peptonů. Mohou vykazovat sacharolytickou a (nebo) proteolytickou aktivitu, a proto mezi substráty metabolických cest patří sacharidy, alkoholy, aminokyseliny, puriny, steroidy, ale i jiné organické látky. Některé druhy klostridií jsou schopné fixovat vzdušný dusík, avšak žádné nejsou schopny bakteriální redukce sulfátů (Whitman, 2005b).

Klostridie vykazují tyto biochemické znaky: většina ze 168 druhů je kataláza negativní. Tolerance ke kyslíku je značně variabilní, jelikož některé druhy jsou v přítomnosti atmosférického kyslíku schopné plnohodnotného růstu, avšak nesporelují. Pro většinu klostridií je optimální pH pro růst mezi 6,5 a 7 a teplota 30–37 stupňů Celsia. Obsah GC 22–53 mol% a druhovým představitelem je *Clostridium butyricum* (Rainey *et al.*, 2009).

3.3.1 *Clostridium perfringens*

Na peptonových kultivačních půdách s přidavkem kvasnic a glukózy se buňky o velikosti 0,6–2,4 x 1,3–19 μm vyskytují samostatně či v párech. Spóry mohou být zřídka spatřeny v podmínkách *in vivo*, v opačném případě jsou však velké, oválné, centralizované či subterminální a zvětšují svou velikost buňku. Teplotně rezistentních kmeny vykazují vyšší rezistenci k letálním dávkám gama radiace. Optimální kultivační teplota jednotlivých typů se také liší - pro typ A, D a E je to 45 stupňů Celsia, pro typy B a C je to shodně 37 i 45 stupňů Celsia. Zvýšený tlak kyslíku působí baktericidně na všechny typy *C. perfringens*. Na krevních agarrech lze rozlišit tři stupně hemolýzy – alfa delta a théta (Whitman, 2005b). Dále byla také

popsána synergická hemolýza *C. perfringens* a *Streptococcus agalactiae* (CAMP fenomén) (Gubash, 1978).

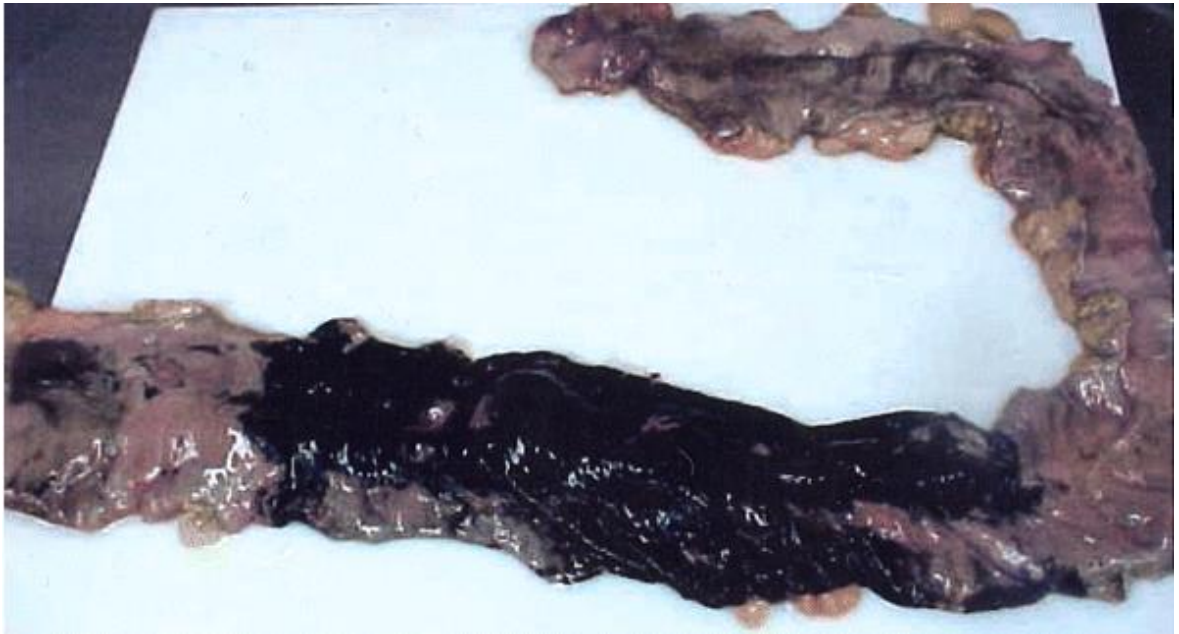
K biochemickým znakům většiny kmenů patří zkvašování sacharózy (95 % kmenů), glycerolu, inulinu a sorbózy; produkce amoniaku, sulfanu, resazurinu a acetyl-methylkarbinolu; hydrolýza hippurátu; redukce neutrální červeně a produkce lecithinázy. Kultury všech typů produkují velké množství kyseliny octové, máselné a mléčné a naopak malé množství kyseliny propionové, mravenčí a jantarové. (Rainey *et al.*, 2009).

C. perfringens je charakteristická produkcí značného množství rozpustných substancí – díky 17 genům kódujícím exo- a endotoxiny (Songer, 1996) – způsobujících různé toxické efekty v podmínkách *in vitro* i *in vivo*. Rozlišuje se pět typů *C. perfringens* (A, B, C, D a E) na základě převažujícího toxinu. Typ A produkuje alfa toxin; typ B alfa, beta a epsilon toxin; typ C produkuje alfa a beta toxin; typ D alfa a epsilon toxin a typ E produkuje alfa a jóta toxin (Petit *et al.*, 1999). Žádný z uvedených typů nemůže být definován na základě celulární či koloniální morfologie, biochemických reakcí či na základě analýzy mastných či jiných organických kyselin jakožto koncových produktů metabolismu za pomoci plynové nebo kapalinové chromatografie (Rainey *et al.*, 2009).

Výše zmíněné „exotoxiny“ jsou považovány za hlavní faktor virulence tohoto druhu klostridií. Alfa toxin je fosfolipáza C hydrolyzující lecitin na fosforylcholin a diglycerid a je produkována všemi pěti typy *C. perfringens*. Letálním efektem tohoto toxinu je lýze buněčné membrány, pravděpodobně jako následek hydrolýzy membránového lecitinu (Awad *et al.*, 2001; Songer, 1996; Titball *et al.*, 1999). Působením alfa toxinu dochází ke svalové smrti při myonekróze způsobené plynovou snětí z infekce *C. perfringens* u člověka i zvířat. Alfa toxin způsobuje také intravaskulární hemolýzu, enterotoxikémii ovcí, čerstvě narozených alpak, v lidské péči chovaných divokých koz, sobů a dále také kuřat. U prasat vyvolává hypersensitivitu vedoucí k artritidě s eventuální deformací kloubů, k parakeratóze a proliferativní glomerulonefritidě. U člověka dochází u *C. perfringens* typu A a u některých kmenů typů C a D také k produkci enterotoxinu, který je uvolňován sporulací pozřených spór v gastrointestinálním traktu, kde poté dochází k hromadění tekutin (tenké střevo) a způsobuje tím syndrom otravy z jídla, který může vyústit v letální enteritidu (Rainey *et al.*, 2009). *C. perfringens* typ A je také nejčastějším původcem nekrotické enteritidy drůbeže (Cooper a Songer, 2009; Crespo *et al.*, 2007; Gholamiandehkordi *et al.*, 2007) – viz Obrázek 1. Dalším

toxinem, který je primárně spojován s kmeny *C. perfringens* typu A je tzv. B-podobný toxin nekrotické enteritidy (NetB), který byl izolován z kuřat, která prodělala NE (Keyburn *et al.*, 2006; Van Immerseel *et al.*, 2009). NetB toxin sdílí 38% podobnost s beta-toxinem *C. perfringens* a 31% podobnost s alfa-toxinem *S. aureus*, avšak byl izolován i v případě kuřat, která nevykazovala žádné znaky nekrotické enteritidy (Martin a Smyth, 2009).

Obrázek 1: Nekrotizující kolon v důsledku infekce *C. perfringens* typ A (Bos *et al.*, 2005)



Mechanismus účinku beta toxinu, který je produkován typem B a C, není jasně znám, ale předpokládá se, že se jedná o jedno-řetězcový polypeptid, který je značně citlivý k působení trypsinu, a který způsobuje zvýšení kapilární propustnosti. Intravenózně způsobuje beta toxin uvolňování endogenních katecholaminů. Působením beta toxinu je nejvíce zasažen gastrointestinální trakt v případě typu B u člověka, jehňat, telat, selat, ovcí a v případě typu C u hříbat, jehňat, ovcí a koz. Významným kofaktorem pro rozvinutí tohoto onemocnění vyvolaného beta toxinem je absence trypsinu v trávicím traktu mláďat (Rainey *et al.*, 2009). Tweten (2001) poukazuje na významnou roli beta toxinu při tvorbě pórů v cévách.

Epsilon toxin je považován za čtvrtou nejjedovatější látku světa (Gill, 1982). Tepelně labilní epsilon toxin je aktivován proteolytickými enzymy trávicího traktu (trypsin) z potenciálně netoxického prototoxinu, který je produkován *C. perfringens* typu B a D. Tento toxin v těle aktivuje adenylcyklázu, která způsobuje zvýšení vaskulární permeability a následně vyvolává nekrózu tkání. Tímto efektem je nejvíce ohrožen mozek, u kterého dochází k cerebrálnímu edému a odumírání mozkové tkáně, způsobující smrt. Epsilon toxin je cytotoxický pro

peritoneální makrofágy morčat a králíků. Toxin *C. perfringens* typu D způsobuje enterotoxikémii jehňat, ovcí, koz, skotu, činčil a vzácně i člověka (Rainey *et al.*, 2009; Stiles *et al.*, 2013).

Ióta toxin je produkován pouze kmeny typu E. Toxin se skládá ze dvou částí a je produkován ve formě prototoxinu aktivovaného proteolytickými enzymy organismu. Letalita spočívá ve zvýšení propustnosti cév a epidurální nekróze především pro ovce a skot, vzácně však pro telata; u králíků pak způsobuje antimikrobiálně-indukované kolitidy (Rainey *et al.*, 2009; Sakurai *et al.*, 2009; Stiles *et al.*, 2013).

Značné množství kmenů *C. perfringens* je citlivé k bakteriocinům, které produkují enterokoky (např. *Streptococcus faecium*) (Krämer a Brandis, 1975). *C. perfringens* z půdních izolátů může produkovat aktivní inhibitory *C. botulinum* typu A, B, E a F (Smith, 1975). Určité kmeny *C. perfringens* také produkují bakteriociny, které jsou aktivní vůči jiným kmenům *C. perfringens*. Bakteriociny působí na makromolekulární úrovni především inhibicí syntézy DNA, RNA a proteinů (Mahony a Li, 1978).

Většina betalaktamových antibiotik vykazuje poměrně dobrou účinnost proti infekcím způsobeným *C. perfringens*, avšak je pozorována zvyšující se rezistence, obzvlášť k penicilinu G (Williamson, 1983). Chloramfenikol, klindamycin a metronidazol jsou vysoce aktivní k většině izolátů, naopak erythromycin a tetracyklin jsou aktivní méně (Schwartzman *et al.*, 1977). Již se vyskytují případy rezistence právě k tetracyklinu, erythromycinu, ale i lincomycinu a klindamycinu především u kmenů izolovaných z výkalů prasat a drůbeže, kterým byla podávána v rámci prevence v krmivu (Osman a Elhariri, 2013;).

Tento druh je celosvětově nejrozšířenějším patogenním mikroorganismem. Různé kmeny se mohou objevovat v půdě, ale i v trávicím traktu. Typy B, C, D a E jsou navíc obligátními parazity zvířat, příležitostně také člověka. Mezi zdroje *C. perfringens* patří půdní i mořský sediment, oblečení, čerstvé mléko, sýry, polokonzervované masné produkty a zvěřina, a jako patogen patří mezi ty nejčastěji izolované při infekcích u člověka (Rainey *et al.*, 2009).

3.4 *Escherichia spp.*

Buňky bakterií rodu *Escherichia* (čeleď *Enterobacteriaceae*) představují rovné cylindrické tyčinky se zakulacenými okraji o velikosti 1,1–1,5 x 2,0–6,0 µm, které se běžně vyskytují samostatně či v párech; nepohyblivé, ale i pohyblivé díky bičíkům po obvodu buňky.

Escherichie jsou gramnegativní, chemoorganotrofní, aerobní či fakultativně anaerobní (vyskytují se však i anaerobní biotypy) bakterie s respiratorním i fermentativním metabolismem (Scheutz a Strockbine, 2005). Teplotní nároky většiny kmenů se pohybují ve středních hodnotách (15–45 stupňů Celsia) s optimem mezi 21 až 37 stupni Celsia, přičemž některé kmeny jsou schopné přežít v teplotách okolo 7,5 (Shaw *et al.*, 1971) i 49 stupňů Celsia (Herendeen *et al.*, 1979). Optimální pH pro růst je mezi 5 a 9 (Scheutz a Strockbine, 2005).

Biochemická aktivita bakterií rodu *Escherichia*: oxidáza negativní, laktózu zkvašuje většina kmenů *Escherichia coli*. Neroste v prostředí s přidavkem KCN a obvykle neprodukuje sulfan. Mezi diferenciační testy jednotlivých druhů rodu *Escherichia* patří růst na půdách s KCN, utilizace malonátu a produkce kyselin z D-adonitolu, celobiózy, dulcitolu, laktózy, D-mannitolu, melibiózy, D-sorbitolu a mukátu (Scheutz a Strockbine, 2005). Množství GC v DNA je 48–59 mol% a druhovým představitelem je *Escherichia coli* (Garrity, 2005).

3.4.1 *Escherichia coli*

E. coli je charakteristickým zástupcem celého rodu. Je přirozenou a nezbytnou součástí bakteriální mikrobioty trávicího ústrojí člověka i zvířat. Většina kmenů *E. coli* je nepatogenním komenzálem tlustého střeva (Hudault *et al.*, 2001). Avšak jisté sérotypy hrají významnou roli při intra- i extraintestinálních onemocněních především z důvodu širokého spektra virulenčních faktorů, kterými disponují, a tím pádem se dostávají do role oportunistického patogenu (Sousa, 2006).

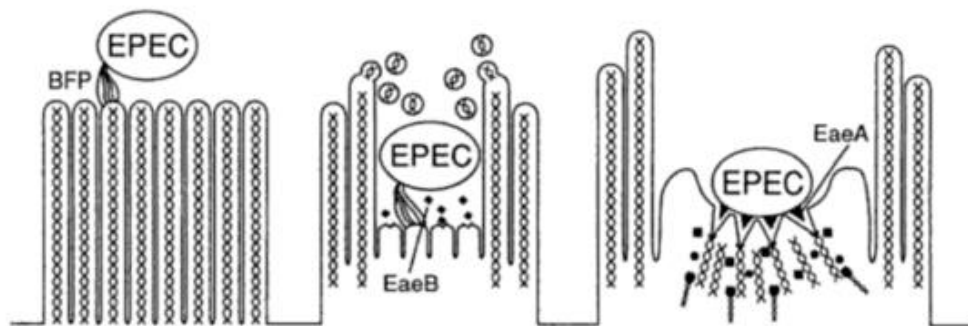
Kmeny izolované z intestinálních infekcí (intraintestinální onemocnění) mohou být rozřazeny na základě epidemiologické evidence, fenotypových vlastností, klinických příznaků nemoci, kterou způsobují, a specifických virulenčních faktorů do minimálně šesti různých skupin: enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), enteroagregativní *E. coli* (EAaggEC), difúzně adherentní *E. coli* (DAEC), Shiga toxin produkující *E. coli* (STEC) neboli Vero cytotoxin produkující *E. coli* (VTEC) (Scheutz a Strockbine, 2005). Novější pohled na rozdělení escherichií podává Mainil (2013).

EPEC byla první skupina *E. coli*, která se začala rozlišovat jako seskupení kmenů způsobující dětská průjemová onemocnění. S postupujícím poznáním však byla Edelmanem a Levinem (1983) EPEC definována jako „průjemová onemocnění způsobující *E. coli* náležící k séroskupinám epidemiologicky považovaným za patogenní, jejíž patogenita však není

způsobena ani teplotně labilními či stabilními enterotoxiny, avšak ani *Shigella*-podobnou invazivitou“. V současné době došlo k redefinici na základě O:H antigenní výbavy sérotypů vázaných k určitému onemocnění (Kaper, 1996). Mechanismus patogenního účinku pak spočívá ve schopnosti adherence k enterocytům, cytoskeletální přestavbě a následnému vyhlazení mikrokloků pomocí vezikul uvolňujících se z lézí na povrchu epitelu (Nataro a Kaper, 1998) – viz Obrázek 2.

Obrázek 2: Interakce EPEC a hostitelské buňky

1. počáteční adherence, 2. vyhlazování mikrokloků, 3. konečné přilnutí (Sussman, 1997)



Kmeny ETEC jsou významnou příčinou průjemových onemocnění jak člověka, tak domácích zvířat. ETEC přímo nenapadají epitelální buňky střev, ale produkují alespoň jeden či více enterotoxinů, které jsou buď termolabilní (podobnost s cholera toxinem), či termostabilní (Cohen a Giannella, 1995). Tyto enterotoxiny způsobují zvýšenou střevní sekreci aktivací guanylátcyklázy (termostabilní toxiny) nebo adenylátcyklázy (termolabilní toxiny). ETEC kmeny jsou hostitelsky specifické na základě interakce faktorů bakteriální kolonizace a epitelálních receptorů (Gaastra a Svennerholm, 1996).

EIEC kmeny jsou velice podobné bakteriím rodu *Shigella*, a proto mají značnou schopnost invaze a množení v buňkách epitelu tlustého střeva člověka. Přibližně dvě třetiny EIEC kmenů je laktóza negativní (Acheson a Keusch, 1995).

Skupina EAggEC je charakteristická významnou schopností agregativní adherence (autoaglutinace bakteriálních buněk k sobě) k buňkám *in vitro* (Nataro *et al.*, 1987). Některé druhy EAggEC způsobují průjem a další střevní problémy včetně borborygmů a křečí (Nataro a Steiner, 1995). Dle epidemiologických studií je EAggEC původcem takzvaných „cestovatelských“ průjmů (Scotland *et al.*, 1994; Vargas *et al.*, 1998).

DAEC jsou definovány schopností difúzní adherence k buňkám na povrchu fimbrií za pomoci adhezínů (Scaletsky *et al.*, 1984). Mechanismus jejich patogenity spočívá ve schopnosti adherence k HeLa a HEp-2 buňkám za pomoci různě kódovaných proteinů (Croxen a Finlay, 2010).

STEC neboli VTEC kmeny jsou charakteristické schopností produkce jednoho či obou z dvou antigeně rozdílných, obvykle pomocí bakteriofágů zprostředkovaných, cytotoxinů Stx2 nebo VT2 (Konowalchuk *et al.*, 1978). V rámci této skupiny je rozlišována ještě podskupina enterohemoragických kmenů *E. coli* (EHEC), které způsobují hemoragické kolitidy (Scheutz a Strockbine, 2005).

Kmeny způsobující extraintestinální infekce u člověka dělíme do skupiny extraintestinálně patogenních *E. coli* (ExPEC), které produkují množství toxinů schopných lýzu eryocytů (α -hemolysin), do skupiny uropatogenních *E. coli* (UPEC), způsobujících například pyelonefritidy (Katouli, 2010) a do skupiny neonatálně meningitidní *E. coli* (NMEC) (Scheutz a Strockbine, 2005). U hospodářských zvířat jsou kmeny *E. coli* schopny vyvolat různá onemocnění včetně kolibakteriálních průjmů, kolibakteriální toxémie prasat, koliformní mastitidy a infekce močového traktu (Garrity, 2005).

3.5 *Enterococcus spp.*

Enterokoky (čeleď *Enterobacteriaceae*) mají sférické či oválné buňky o rozměrech 0,6–2,0 x 0,6–2,5 μm . V tekutém médiu se vyskytují v párech či v krátkých řetězcích. Jsou to grampozitivní, fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní bakterie s fermentativním metabolismem, které netvoří endospory, a které jsou také často pohyblivé díky nepatrnému bičíku. Vyznačují se nezřetelně viditelným pouzdem (kapsulou). Bakterie rodu *Enterococcus* mají komplexní živinové požadavky. Determinujícím znakem je schopnost růstu na agarech při pH 9,6 s přidavkem 6,5 % NaCl a s 40% přidavkem žluči. Teplotní optimum pro kultivaci je 35–37 stupňů Celsia, avšak některé druhy jsou schopné růstu při 42–45, ale i 10 stupních Celsia, a proto vykazují vysokou rezistenci k vysušení (Whitman, 2005b). Enterokoky vykazují tyto biochemické znaky: kataláza negativní (některé druhy vykazují pseudokatalázovou aktivitu při kultivaci na agaru s příměsí krve), ureáza negativní (Švec a Devriese, 2009).

Vyskytují se běžně v přírodě a jsou součástí střevní mikrobioty savců a ptáků (přítomnost ve výkalech) a i dalších zvířat (Vankerckhoven *et al.*, 2008). Jiné druhy jsou propojeny s rostlinnou říší, další mohou být izolovány z vodního prostředí. Některé druhy jsou původci pyogenních infekcí (Devriese a Pot, 1995; Wood *et al.*, 2002). Ačkoliv jsou enterokoky přirozeně komenzálové, mohou být také příležitostným patogenem a vyvolávat onemocnění (Arias *et al.*, 2010) – infekce močového aparátu, bakteriémie a endokarditidu (Weng *et al.*, 2013). Obsah GC je 35,1–44,9 mol%. Druhovým představitelem je *Enterococcus faecalis* (Whitman, 2005b).

3.5.1 *Enterococcus cecorum*

E. cecorum, v překladu enterokok divertiklu tlustého střeva, vykazuje hemolýzu na agaru s ovčí krví a slabý růst při pH 9,6. Kmeny nepřežívají vystavení teplotě 60 stupňů Celsia po dobu 30 minut, preferují zvýšenou koncentraci oxidu uhličitého v atmosféře (Švec a Devriese, 2009). Lze ho izolovat ze vzorků zvířat, člověka a z vody (Devriese *et al.*, 1992; Švec a Devriese, 2009).

3.6 *Lactobacillus spp.*

Buňky rodu *Lactobacillus* (čeleď *Lactobacillaceae*) mají podobu různě dlouhých, štíhlých, občas zahnutých tyčinek, často koryneformních kokobacilů. Jsou to nesporeující, gramnegativní, fakultativně anaerobní, nepohyblivé bakterie. Některé kmeny obsahují vnitřní granule a jejich vzhled může být snadno pozměněn gramovým barvením či methylenovou modří. Vyznačují se fermentativním metabolismem a obligátně sacharolytickou aktivitou. Minimálně polovinou koncových produktů je laktát, který není dále fermentován. Pigmenty mají žlutou, oranžovou až červenou barvu, avšak jejich produkce je vzácná (Hammes a Hertel, 2009).

Laktobacily vykazují následující biochemickou aktivitu: kataláza a cytochromoxidáza negativní (z důvodu chybějících porfyrinů). Některé kmeny však v přítomnosti hemu rozkládají peroxid vodíku pomocí kataláz či pseudokataláz. Kasein není tráven, ale většina kmenů produkuje menší množství rozpustného dusíku (Hammes a Hertel, 2009). Bakterie rodu *Lactobacillus* mají komplexní požadavky na růstové podmínky zahrnující aminokyseliny, peptidy, deriváty nukleových kyselin, vitamíny, soli, mastné kyseliny, estery mastných kyselin a zkvasitelné sacharidy (Elli *et al.*, 2000). Tyto nároky jsou charakteristické

pro jednotlivé druhy (Rogosa *et al.*, 1961) nebo dokonce kmeny (Ledesma *et al.*, 1977). Optimální kultivační teplota se pohybuje v rozmezí od 30 do 40 stupňů Celsia, avšak některé druhy jsou schopny růstu v rozmezí 2–53 stupňů Celsia. Bakterie jsou acidotolerantní, pH optimum obvykle mezi 5,5–6,2 a růst je redukován při neutrálním a alkalickém pH (Hammes a Hertel, 2009).

Bakterie rodu *Lactobacillus* lze nalézt v mléčných produktech, jaderném krmivu, masu a rybích produktech, pivu, víně, ovoci a ovocných džusech, nakládané zelenině, kyselém zelí, silážích, vodě, půdě a odpadních vodách. Laktobacily jsou součástí přirozené mikrobioty dutiny ústní a trávicího traktu a také vaginální mikrobioty člověka i mnoha druhů zvířat. Nejsou patogenními organismy, avšak mohou být příčinou pro vznik jiných onemocnění či pro vstup jiných patogenů do organismu (Whitman, 2005b). Obsah GC bazí je 32–55 mol% a druhovým představitelem je *Lactobacillus delbrueckii*. (Hammes a Hertel, 2009)

3.6.1 *Lactobacillus acidophilus*

Buňky tohoto rodu jsou nepohyblivé, obligátně homofermentativní tyčinky se zaoblenými konci o celkové velikosti 0,6–0,9 μm x 1,5–6 μm , které se běžně vyskytují samostatně, v páru či v krátkých řetězcích. Kolonie na TGA agaru jsou hrubé s rozptýlenými okraji. Většina kmenů *L. acidophilus* fermentuje škrob a má specifické živinové požadavky – pantothenát vápenatý, kyselina mravenčí, niacin a riboflavin jsou esenciální; pyridoxal, tiamin, tymidin a vitamín B₁₂ nejsou vyžadovány. *L. acidophilus* byl izolován ze vzorků střev člověka i zvířat, lidské dutiny ústní, vaginy a vína. Pozice ve fylogenetickém stromu rodu je ve skupině *Lactobacillus delbrueckii* (Hammes a Hertel, 2009).

3.6.2 *Lactobacillus fermentum*

Bakterie *L. fermentum* představují obligátně heterofermentativní nepohyblivé tyčinky 0,5–0,9 μm široké a variabilně dlouhé, které se objevují jednotlivě či v párech. Živinové požadavky – esenciální pantothenát vápenatý, niacin a tiamin a neesenciální riboflavin, pyridoxal a kyselina mravenčí. Nálezy tohoto rodu jsou běžné v droždí, mléčných a kvašených výrobcích, zkvašeném rostlinném materiálu, hnoji, odpadní vodě, dutině ústní a ve výkalech člověka. Fylogeneticky náleží ke skupině *Lactobacillus reuteri* (Hammes a Hertel, 2009).

3.7 *Listeria spp.*

Rod *Listeria*, pojmenovaný podle Lorda Listera, anglického chirurga a průkopníka antiseptiky, představují pravidelné, krátké tyčinky o velikosti 0,4–0,5 μm x 1–2 μm , ukončené paralelně či tupě a vyskytující se jednotlivě či v podobě krátkých řetízků. Ve starších kulturách či u kultur v hrubé fázi růstu se vyvíjejí filamenta delší jak 6 μm . Jsou to grampozitivní (ve starších kulturách bývá pozitivní odpověď na Gramovo barvení ztracena), ne-acidorezistentní bakterie, které netvoří ani spory, ani kapsuly. Při kultivaci v prostředí pod 30 stupňů Celsia se u všech druhů vytváří bičíky po celém obvodu buňky a umožňují tím buňkám pohyb. Ve vztahu ke kyslíku jsou listerie fakultativně anaerobní až aerobní. Kolonie do 48 hodin stáří jsou do 1,5 mm široké v průměru, kulaté, průsvitné, lehce konvexní, s hladkým a celistvým povrchem, bez pigmentů (McLauchlin a Rees, 2009).

Růst je limitován teplotami pod 0 a nad 45 stupňů Celsia; optimální kultivační teploty pro listerie jsou v rozmezí 30–37 stupňů Celsia. Deaktivace bakterií probíhá při zahřátí nad 60 stupňů Celsia po dobu 30 minut. Optimální pH pro růst je mezi 6 až 9 (McLauchlin a Rees, 2009). Mezi biochemické znaky bakterií rodu *Listeria* patří: produkce cytochromových enzymů pozitivní; homofermentativní, anaerobní, katabolický metabolismus glukózy s koncovými produkty čítajícími L(\pm)kyselinu mléčnou, kyselinu octovou a jiné. Pro vývoj vyžadují organické růstové faktory (Whitman, 2005b).

Listerie jsou široce rozšířené v přírodě a byly izolovány jak z půdy, vegetace, odpadních vod, vody, krmiv pro zvířata, čerstvého i zmraženého kuřecího masa, jatečních zbytků, tak z výkalů zdravých zvířat i člověka. *L. monocytogenes* je patogenem člověka a společně s *L. ivanovii* také patogenem různých zvířat, především však ovcí a koz. Predominantním kontaminantem je pak jídlo a krmivo znečištěné přítomností listerií. Vzhledem ke schopnosti přežít v různých prostředích (včetně těch ošetřených konzervanty, jako je chlorid sodný nebo dusičnan sodný) po dlouhou dobu i při nízkých teplotách je *L. monocytogenes* považována za rizikový faktor i pro chlazené pokrmy (Farber a Peterkin, 1991). Obsah GC v DNA je 36–45,5 mol%. Druhovým představitelem tohoto rodu je *Listeria monocytogenes* (McLauchlin a Rees, 2009).

3.7.1 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes je široce rozšířena v přírodě, vč. půdy a bahna, odpadní vody a vegetace, i ve výkalech zvířat a člověka, jejichž je patogenem. Většina případů nálezů je z potravy či krmiv. U člověka způsobuje systémová onemocnění (většinou septikémii a meningitidu) u osob se sníženou imunitou a také u nenarozených dětí (McLauchlin a Rees, 2009).

3.8 *Salmonella* spp.

Bakterie rodu *Salmonella* náleží do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jsou to fakultativně anaerobní gramnegativní rovné tyčinky o velikosti 0,7–1,5 x 2–5 µm, obvykle pohyblivé, s bičíky po celém obvodu. Tvoří kolonie o průměru 2–4 mm. Životní optimum se pohybuje okolo 37 stupňů Celsia. Energií získávají rozkladem chemických organických látek respiratorní i fermentativní metabolickou cestou (Popoff a Le Minor, 2005).

Salmonely vykazují tyto biochemické znaky: oxidáza negativní, kataláza pozitivní, indol a V–P negativní, methylová červeň a Simmonsův citrát pozitivní, dekarboxylace lysinu a ornitinu pozitivní, variabilní reakce při dehydrolizaci argininu (Garrity, 2005).

Vyskytují se u člověka, teplo- i studenokrevných zvířat, v potravinách a v přírodě. Jsou patogenem člověka i mnoha druhů zvířat. Některé sérovary jsou druhově specifické. Původce paratyfu, břišního tyfu, gastroenteritidy a septikémie (Ewing, 1969). Druhovým představitelem je *S. choleraesuis*. V Kauffmann-Whiteově schématu jsou sérovary odlišovány čísly a písmeny přiřazenými k různým antigenům – O (somatický), Vi (kapsulární) a H (bičíkový) (McWhorter-Murlin a Hickman-Brenner, 1994). Množství GC v DNA je 50–53 (Garrity, 2005).

3.8.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar **Enteritidis**

Antigenní vzorec serovaru Enteritidis je 1,9,12:g,m:-. Přítomnost faktoru O1 je spojena s lyzogenizací. Je všudypřítomným patogenem a původcem infekcí člověka a zvířat. V posledním desetiletí také velice častou příčinou salmonelového zánětu žaludku u člověka (Popoff a Le Minor, 2005).

3.8.2 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium

Antigenní vzorec serovaru Typhimurium je 1,4,[5],12:i:1,2. Přítomnost faktoru O1 je stejně jako u serovaru *enteritidis* spojena s lyzogenizací, v tomto případě konvertovacího fágu *iota* nebo PLT22. Je také kosmopolitním a frekventovaným původcem gastroenteritid člověka (Popoff a Le Minor, 2005).

3.9 *Staphylococcus* spp.

Bakterie rodu *Staphylococcus* mají sférické, 0,5–1,5 µm velké buňky kulatého tvaru, vyskytující se jednotlivě, v párech, tetádách, krátkých řetězcích (3–4 buňky) a charakteristických hroznovitých nepravidelných útvarech. Stafylokoky jsou nepohyblivé, grampozitivní bakterie, které netvoří klidová stadia, ani kapsulu kolem buňky. Jejich buněčná stěna obsahuje peptidoglykan (diamino kyselina – L-lysin) a kyselinu teichoovou (Schleifer a Bell, 2009).

Jsou to fakultativní anaerobové (s výjimkou *S. aureus* subsp. *anaerobius* a *S. saccharolyticus*) a chemoorganotrofové s respiratorním i fermentativním metabolismem. Zdrojem uhlíku a energie jsou sacharidy a aminokyseliny. Pro většinu druhů je konečným produktem fermentace glukózy v anaerobních podmínkách kyselina mléčná, v aerobních podmínkách potom oxid uhličitý a kyselina octová. Živinové požadavky stafylokoků jsou různé. Většina druhů vyžaduje organický zdroj dusíku (např. aminokyseliny a vitaminy skupiny B) (Schleifer a Bell, 2009).

Stafylokoky vykazují následující biochemické vlastnosti: kataláza pozitivní, oxidáza negativní reakce. Buňky stafylokoků jsou citlivé k lýze lyzostafinem, avšak rezistentní k lýze lysozymem. Některé druhy jsou také odolné vůči novobiocinu, erytromycinu, bacitracinu a naopak citlivé k furazolidonu, nitrofuranu, fenolům, salicylanilidům, karbanilidům a halogenům (Schleifer a Bell, 2009).

Přirozené populace stafylokoků jsou přítomny na kůži, v kožních žlázách a na mukózních membránách teplokrevných zvířat. Různé druhy mají úzké, anebo naopak široké jak hostitelské spektrum, tak ekologickou niku výskytu. Další druhy jsou oportunistickými patogeny člověka a/nebo zvířat (Vandenesch *et al.*, 1995). Množství GC rodu *Staphylococcus* je 27–41 mol%, druhovým představitelem je *Staphylococcus aureus* (Schleifer a Bell, 2009).

3.9.1 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

S. aureus subsp. *aureus* je nepohyblivý, nesporotvorný, grampozitivní kok o velikosti 0,5–1,0 µm, který se vyskytuje samostatně, v párech nebo v útvarech. Kolonie jsou větší než 5mm v průměru, mají vyvýšený profil, jsou hladké, lesklé, průhledné, s celistvými okraji. Zabarvení je šedé, žluté až oranžové. Kmeny, které jsou opouzdřené, vytvářejí menší a vypouklejší kolonie (Schleifer a Bell, 2009). Jsou to fakultativní anaerobi, a proto vykazují nejlepší růst při teplotách 30–37 stupňů Celsia v médiích s až 10 % chloridu sodného. Z glukózy tvoří v anaerobních podmínkách D- a L-laktát (Whitman, 2005b). *S. aureus* subsp. *aureus* je citlivý k novobiocinu, ale rezistentní k penicilinu G a methicilinu (MRSA – methicilin-rezistentní *S. aureus*) (Cox *et al.*, 1995).

Některé kmeny jsou schopné produkce enterotoxinů (A, B, C – 3 typy, D a E). Odpovědí na vstup do organismu je produkce enterotoxin-podobných proteinů, způsobujících syndrom toxického šoku. K přesnějšímu určení kmenů *S. aureus* slouží fagotypizace. Chromozomová a plazmidová DNA může být přenesena do příslušné buňky příjemce transdukcí nebo transformací (Altemeier *et al.*, 1982).

S. aureus subsp. *aureus* byl izolován z nazální membrány (anteriorní nozdry, nasopharynx) a kůže teplokrevných živočichů. Může být příčinou infekcí, otravy jídla a syndromu toxického šoku (Whitman, 2005b).

3.10 Epidemiologická situace výskytu alimentárních infekcí a otrav ve světě a v ČR

Dle Světové zdravotnické organizace (2015a) – World Health Organisation, WHO – jsou mezi patogeny způsobující onemocnění trávicího traktu řazeny bakterie rodu *Aeromonas spp.*; bakteriální toxiny produkující *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, a *Staphylococcus aureus*; *Brucella spp.*; *Campylobacter spp.*; *Clostridium botulinum*; enteroagregativní *E. coli*; enteropatogenní *E. coli*; enterotoxická *E. coli*; *Helicobacter pylori*; *Leptospira spp.*; *Listeria monocytogenes*; *Mycobacterium bovis*; *Vibrio cholerae*.; *Salmonella spp.* (tyfoidní o netyfoidní); Shiga-toxin produkující *E. coli*; *Shigella spp.* a *Yersinia spp.*

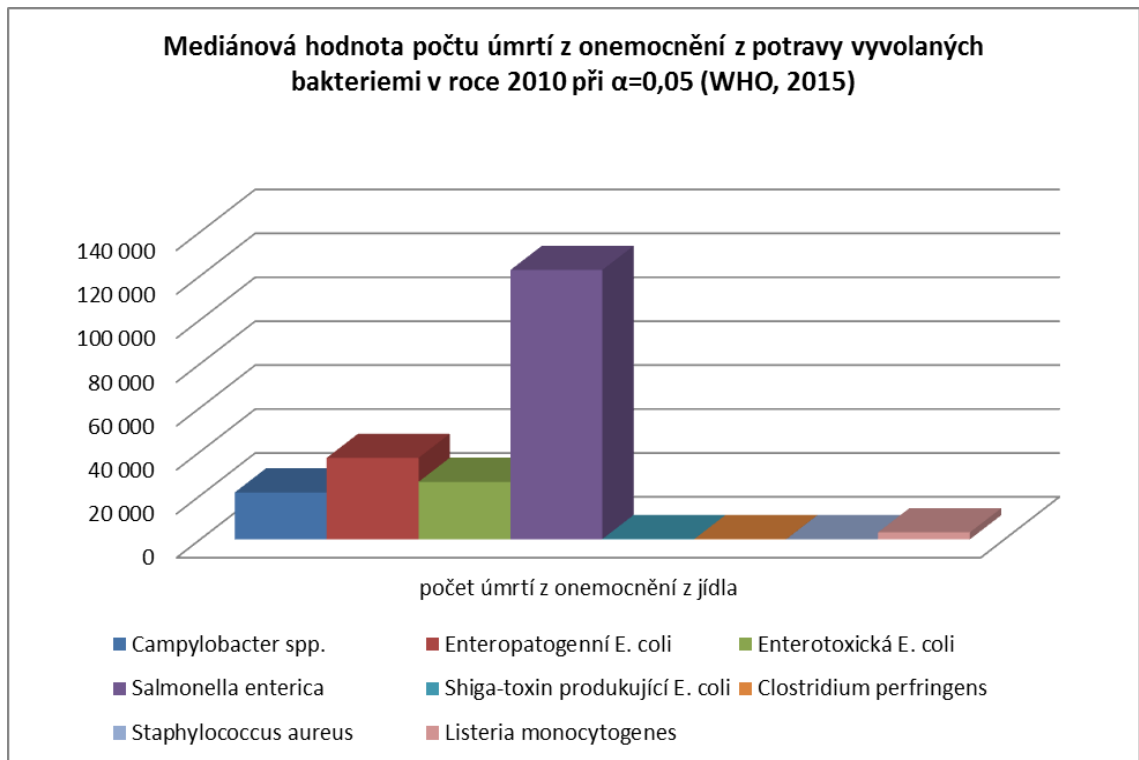
Nejčastější příčinou úmrtí kvůli nemocím indukovaným potravou a zároveň o nejvíce let života připravující disabilitou jsou bakterie rodu *Salmonella spp.*, přenášející se na člověka konzumací kontaminovaných potravin živočišného původu, převážně z masa, drůbeže, vajec a

mléka (WHO, 2015a) – viz Graf 1 a 2. Invazivní salmonelové infekce jsou hlavní příčinou onemocnění s nejvyšší mortalitou v oblastech rozvojového světa, obzvláště potom v subsaharské Africe a částech indického a asijského subkontinentu (Kariuki *et al.*, 2015).

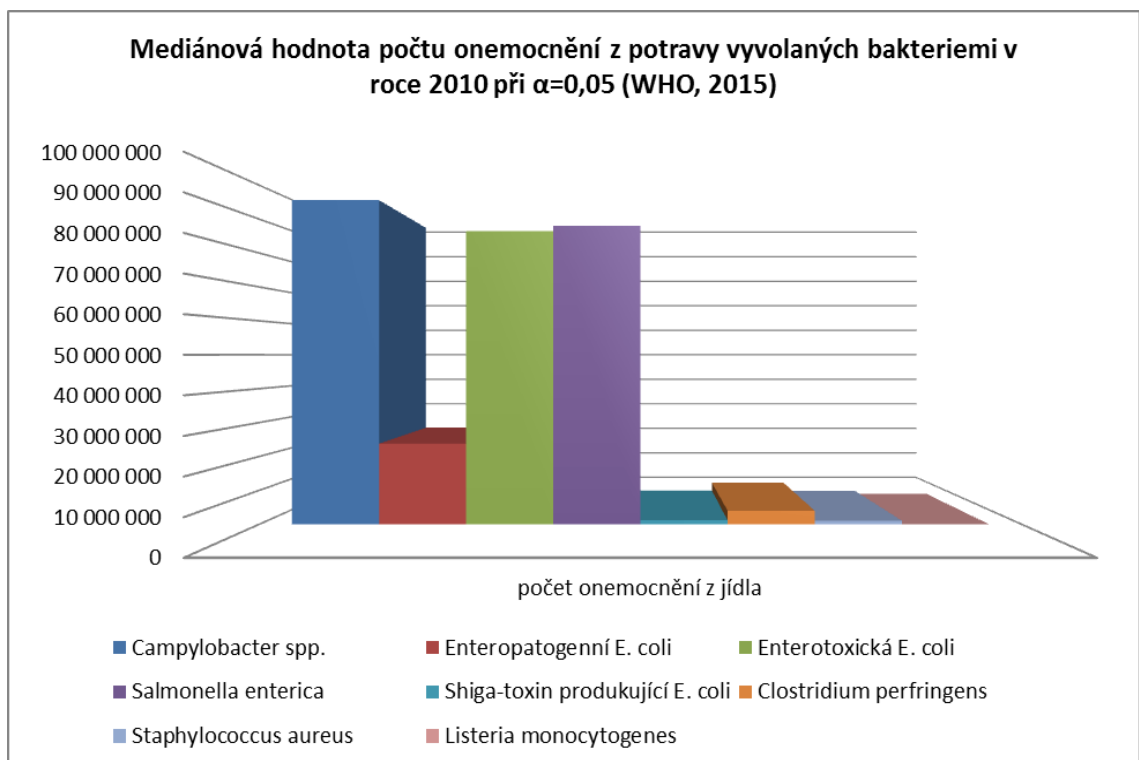
Nejvíce ohroženou skupinou jsou děti mladší pěti let, u kterých je až 30 % úmrtí zaviněno kontaminovanou potravou (WHO, 2015b). Nejvíce případů dětské nákazy invazivní netyfoidní salmonelou vykazuje věková skupina od šesti měsíců do tří let, což podporuje význam pasivní získané humorální imunity v prevenci invazivních onemocnění (Gordon *et al.*, 2008). Invazivní netyfoidní *S. enterica* je nejvýznamnějším patogenem způsobujícím infekce krevního oběhu oblastí subsaharské Afriky, obzvláště u dětí a HIV pozitivních dospělých, kteří vykazují nízkou hodnotu CD4 T-lymfocytů, s mortalitou mezi 10–30 % (Reddy *et al.*, 2010). V Evropském společenství došlo meziročně k 15,3% nárůstu výskytu onemocnění způsobených bakteriemi *Salmonella spp.* na 23,4 případů mezi 100 tisíci obyvateli (EFSA, 2015). Ve Spojených státech amerických dosahuje míra onemocnění způsobených salmonelami hodnoty 15,2 na 100 tisíc obyvatel (CDC, 2015).

Mezi hlavní, celosvětově rozšířené původce průjemových onemocnění, patří především v rozvojových zemích EPEC a ETEC; dohromady způsobující ca 63 tisíc úmrtí (WHO, 2015a) – viz Graf 2. Je známa rezistence a transdukce genů této rezistence vůči antibiotikům u jistých patogenních druhů *E. coli* (Johnson *et al.*, 2007). Významným přenašečem patogenních *E. coli* je také drůbež a potenciálně důležitým místem pro koncentraci a množení je v chovech stelivo (Diarrassouba *et al.*, 2007). Rozvinuté země mají v systému evidence onemocnění z potravy séroskupinu O157, náležící mezi enterohemoragické *E. coli*, způsobující onemocnění z potravy v důsledku produkce Shiga toxinu, a která je proto řazena mezi STEC (VTEC) (Lim *et al.*, 2010). Evropský úřad pro kontrolu potravin – European Food and Safety Authority, EFSA – (2015) uvádí výskyt onemocnění způsobených séroskupinou O157 *E. coli* v míře 1,56 na 100 tisíc obyvatel v EU a Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí – Centres for Disease Control and Prevention, CDC – (2015) v míře 1,15 na 100 tisíc obyvatel v USA.

Graf 1: Mediánová hodnota počtu úmrtí z onemocnění z potravy vyvolaných bakteriemi v roce 2010 při $\alpha=0,05$ (WHO, 2015a)

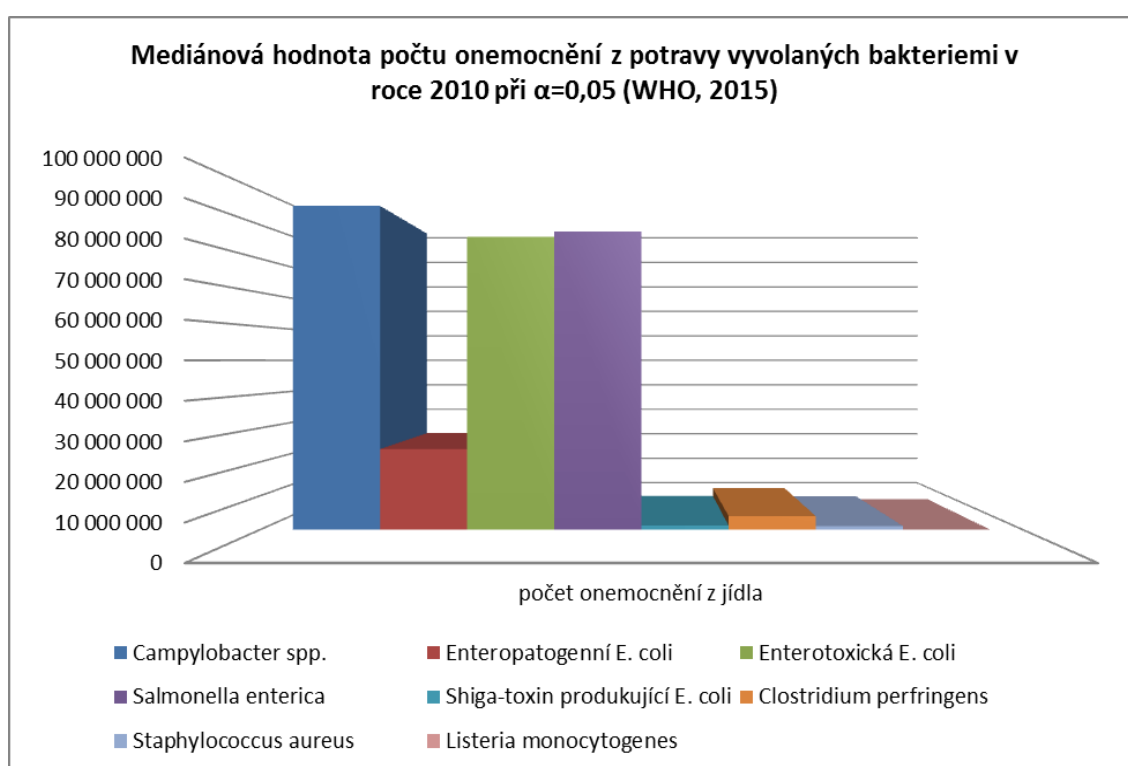


Graf 2: Mediánová hodnota let ztraceného života s disabilitou z onemocnění z potravy vyvolaných bakteriemi v roce 2010 při $\alpha=0,05$ (WHO, 2015a)



WHO (2016a) také uvádí, že celosvětově nejvíce rozšířeným patogenem, který způsobuje gastroenteritidy, jsou bakterie rodu *Campylobacter spp.* prostřednictvím kontaminovaného, nedostatečně tepelně ošetřeného drůbežního masa nebo kontaminované vody – viz Graf 3. Ke kolonizaci dochází expozicí s kontaminovaným prostředím, přičemž z většiny zvířat se stávají asymptomatictí přenašeči onemocnění (Humphrey *et al.*, 2007). Nejčastějšími patogeny gastrointestinálního traktu člověka jsou shodně v Evropském společenství již od roku 2005 kampylobakterie s rostoucím trendem výskytu mezi roky 2013 a 2014 o 9,6 %, s úmrtností 0,01 % a výskytem 71 případů na 100 tisíc obyvatel (EFSA, 2015).

Graf 3: Mediánová hodnota počtu onemocnění z potravy vyvolaných bakteriemi v roce 2010 při $\alpha=0,05$ (WHO, 2015a)



Předpokládá se, že oficiální údaje o výskytu kampylobakterií jsou značně podhodnoceny a skutečné hodnoty mohou být 10 až 100krát vyšší, jelikož u více než 75 % kuřat chovaných a poražených v zemích Evropského společenství je možné nalézt bakterie rodu *Campylobacter spp.* (EFSA, 2010). CDC (2015) uvádí výskyt kampylobakterií v USA v míře 14,28 případů na 100 tisíc obyvatel. Dle statistik EFSA (2015) je v České republice dlouhodobě zaznamenáván nejvyšší výskyt salmonelózy a kampylobakterií ze všech členských států Evropské unie (126,1 resp. 197,4 výskytů onemocnění na 100 tisíc obyvatel).

Vzhledem k vysoké míře úmrtnosti patří mezi důležitá onemocnění z potravy také listerióza (Behravesch *et al.*, 2011). *L. monocytogenes* představuje největší hrozbu pro osoby se sníženou imunitou a projevuje se komplexní septikémií, meningitidou, meningoencefalií a aborty (Doganay, 2003). EFSA (2015) hlásí za rok 2014 30% nárůst výskytu listeriózy oproti roku 2013 – 0,52 případů na 100 tisíc obyvatel Evropského společenství s celkovým počtem 210 úmrtí (nejvyšší hodnota od roku 2009). Incidence v USA je 0,3 hlášených onemocnění na 100 tisíc obyvatel (CDC, 2015). Mezi nejohroženější skupiny v EU náleží osoby starší 85 let, v USA potom těhotné ženy (EFSA, 2015; CDC 2015).

C. perfringens patří mezi nejvýznamnější patogeny vzhledem ke svému rozsáhlému rozšíření v prostředí, spórám schopným přežít jak v půdě, tak v trávicím traktu člověka i zvířat a vzhledem ke schopnosti rychlého růstu a produkci velkého spektra toxinů (Lindström *et al.*, 2011). Díky výše uvedenému vykazuje různé klinické symptomy od infekcí kůže a měkkých tkání (Shin *et al.*, 2003), přes gastroenteritidy (East *et al.*, 1998), plynné sněti (Fujita *et al.*, 2010), nekrotizující enteritidy (East *et al.*, 1998), abscesy jater (Tabarelli *et al.*, 2009), endophthalmitidy (Lauer *et al.*, 2005) a bakterémie až po septický šok s akutní hemolýzou (Fujita *et al.*, 2010; Kapoor *et al.*, 2007).

Úmrtnost pacientů s bakterémií *C. perfringens* se v období 30 dnů pohybuje od 27 do 44 % a je závažná z důvodu minimálních symptomů (Chen *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2009). V roce 2014 bylo ve státech Evropského společenství hlášeno celkem 840 případů otravy z jídla v důsledku bakteriálních toxinů, z čehož toxiny *C. perfringens* byly původcem 124 z nich (14,7 % všech případů) (EFSA, 2015).

Zvyšující se rezistence gramnegativních organismů k antibiotikům způsobuje sekundární infekce při pooperačních stavech a u jedinců se sníženou obranyschopností organismu (Jarvis, 2001). Archibald a Jarvis (2011) konstatují, že 18 % infekčních epidemií mezi léty 1946–2005 bylo v USA způsobeno organismy se zvýšenou odolností k určitému druhu léčiv (*S. aureus*, *E. faecalis* aj.). Proto je důležitá kontrola šíření MRSA, který je nejvýznamnějším nemocničním patogenem zvyšujícím morbiditu i mortalitu, výdaje za nemocniční péči a prodlužujícím samotnou dobu léčení (Monecke *et al.*, 2011). Stejně tak je narůstající rezistence enterokoků k vankomycinu (VRE – vankomycin rezistentní enterokok) pokládána za závažný problém vzhledem ke zdraví člověka (Kwon *et al.*, 2012) na základě schopnosti získat a dál předávat geny rezistence, čímž se tyto bakterie staly závažným nozokomiálním patogenem (Jahan *et al.*, 2015).

3.11 Historie používání antibiotik a antibiotických stimulátorů růstu

Antimikrobiální látky jsou pravděpodobně jednou z nejúspěšnějších forem chemoterapie v historii medicíny (Aminov, 2010). Oproti běžnému předpokladu, že vystavení látkám s antibiotickým účinkem je datováno až ve 20. století, byla zjištěna přítomnost tetracyklinu v lidských ostatcích ze starověké Núbie z období 350–550 našeho letopočtu (Bassett *et al.*, 1980; Nelson *et al.*, 2010), či ze vzorků získaných ze stehenních kostí člověka z římského období z oázy Dakhleh v Egyptě (Cook *et al.*, 1989). Distribuce tetracyklinu v kostech pochází z materiálu obsahujícího tuto látku, který byl součástí diety tehdejšího člověka (Aminov, 2010), a je důvodem nízké míry infekčních onemocnění v núbijské populaci a absence infekce kostí ze vzorků z oázy Dakleh (Armelagos, 1969; Cook *et al.*, 1989). Dalším zdrojem antimikrobiálních látek používaných po staletí je tradiční čínská medicína (Wong *et al.*, 2010).

Paradigmatem pro budoucí výzkum léčiv s antimikrobiálním účinkem je považován objev tří látek – Salvarsanu, Prontosilu a penicilinu (Aminov, 2010). Salvarsan, který syntetizovali Ehrlich a Halta (1910), byl po rozsáhlém výzkumu a následném systematickém screeningu používán k léčbě syfilitidy. Oproti tomu Prontosil, vykazující antimikrobiální aktivitu u řady onemocnění (Domagk, 1935), byl od počátků lehce dostupný, a je proto spojován s rozšířenou sulfonamidovou rezistencí, která je založena na mobilních genetických elementech a je podporována absencí antibiotické selekce (Enne *et al.*, 2004).

Vzhledem ke strmému populačnímu růstu je maximalizace živočišné produkce logickým řešením problému podvýživy více jak 10 % obyvatel Země (FAO *et al.*, 2015). Jednou z cest, jak naplnit potenciál produkce jsou antibiotické stimulátory růstu, které se začaly v živočišné produkci používat přibližně ve čtyřicátých letech minulého století z důvodu zefektivnění produkce u drůbeže (Moore *et al.*, 1946) a prasat (Jukes *et al.*, 1950) a z důvodu prevence a léčby infekčních onemocnění. Jelikož některé bakteriální druhy soutěží se svým hostitelem o živiny (Mitsuhiro a Jun-ichi, 1994) a až 6 % energie krmné dávky prasat je ztraceno činností mikrobioty trávicího traktu (Vervaeke *et al.*, 1979), bylo dlouhodobou analýzou prokázáno, že použití antibiotik v období předvýkrmu prasat stimuluje růst v průměru o 16,4 % a zlepšuje využití krmiva o 6,9 % (Cromwell, 2002) redukcí celkového počtu a/nebo snížením počtu druhů bakterií v trávicím traktu zvířat (Close, 2000; Collier *et al.*, 2003).

Již v roce 1951 (Starr a Reynolds) jsou zaznamenány první známky antibiotické rezistence po zkrmování antibiotických aditiv potravinovým zvířatům v experimentu, při kterém byl podáván krūtám streptomycin. První návrh k zákazu sub-terapeutického používání antibiotických stimulátorů růstu v krmivech, v souvislosti s vytvářením rezistence u lidských patogenů, byl podán britskému parlamentu v roce 1969 (Swann).

Terapeutické používání antibiotik je využíváno u nemocných jedinců, avšak v živočišné produkci bylo a někde ještě je obvyklé a efektivnější využívání schémat hromadné medikace krmiv či vody, především u skupin zvířat se zvýšeným infekčním tlakem, jako je transport, či odstav (McEwen a Fedorka-Cray, 2002) – viz Tabulka 1. V nedávné minulosti byl cílem výzkumů především vývoj nových látek schopných bojovat proti nově či opakovaně vznikající rezistenci patogenů vůči látkám s antimikrobiálním účinkem pomocí modifikace stávajících antibiotik (Chopra *et al.*, 2002).

Tabulka 1: Použití antimikrobiálních látek v krmivu (McEwen a Fedorka-Cray, 2002)

Typ použití	Účel použití	Způsob použití	Podání	Projevy onemocnění
Terapeutické	Terapie	Injekčně, krmivo, voda	Individuální Skupinové	Nemocní jedinci; pokud skupinové, někteří neprojevují známky onemocnění
Metafylaxe	Profylaxe, terapie	Injekčně, krmivo, voda	Skupinové	U některých jedinců
Profylaxe	Prevence onemocnění	Krmivo	Skupinové	Nejsou zřetelné, avšak někteří jedinci v subklinické fázi onemocnění
Subterapeutické	Stimulace růstu	Krmivo	Skupinové	Nejsou
	Zefektivnění konverze krmiva	Krmivo	Skupinové	Nejsou
	Nákazová profylaxe	Krmivo	Skupinové	Nejsou

První zemí, omezující zákonem použití antibiotik jako stimulátorů růstu, bylo Švédsko v roce 1986 (Aarestrup, 2003). Vzhledem ke zvyšujícím se problémům s výše zmíněnou rezistencí širokého množství bakterií k látkám s antimikrobiální aktivitou (NAS, 2006; WHO, 2014) bylo nařízením Evropské komise (Nařízení č. 1831/2003/CE) roku 2006 sub-terapeutické používání antibiotických stimulátorů růstu v krmivech pro zvířata v rámci Evropské unie značně omezeno (Castanon, 2007). Jelikož toto omezení mělo v některých zemích negativní účinek na zdraví a produktivitu zvířat (Casewell *et al.*, 2003), je v současnosti kladen velký důraz na hledání nových krmných aditiv, která by byla schopna udržet zvířata v maximální

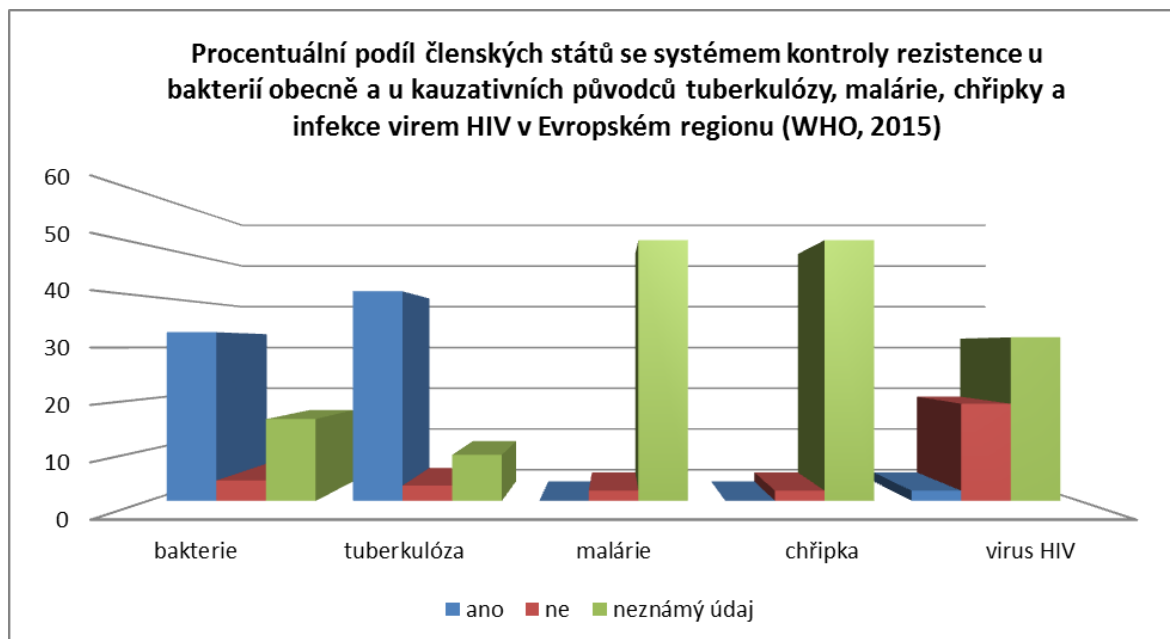
zdravotní i produkční kondici (Bomba *et al.*, 2006; Castillo *et al.*, 2008; Castro, 2005; Chen *et al.*, 2005; Hammer *et al.*, 1999; Ljungh *et al.*, 2006).

3.12 Bakteriální rezistence k antibiotikům

Rezistence bakterií vůči antibiotikům může být způsobena různými mechanismy, rozdělenými do dvou skupin – (A) přímé vlastnosti bakteriální buňky způsobující antibiotickou rezistenci: (a) modifikace genová – např. mutace ADP-ribosyl transferázy způsobující rezistenci k rifampinu (Mazel a Davies, 1999); (b) modifikace enzymová – např. methylace adeninových reziduí ve 23S rRNA udělující rezistenci k makrolidům (Zalacain a Cundliffe, 1990); (c) nahrazování – např. ochrana ribozomů proti navázání antibiotika pomocí proteinu Tet(O) způsobující rezistenci k tetracyklinu (Li *et al.*, 2013); (d) ochrana na buněčné či populační úrovni – např. schopnost sekrece velkého množství exopolysacharidů, tvořících bariéru proti navázání antibiotik (Nwodo *et al.*, 2012); a (B) bakteriemi iniciovaná přeměna antibiotika způsobující jeho deaktivaci: (a) modifikace antibiotik – např. acetylace aminoglykosidů (Ramirez a Tolmasky, 2010); (b) destrukce antibiotik – např. působení β -laktamáz na β -laktamová antibiotika (Sandanayaka a Prashad, 2002) a (c) vytlačení antibiotika z buňky – např. využití výtokové pumpy (Soto, 2013). Ne všechny mechanismy mohou být zařazeny k jedné či druhé skupině, jako například koncept takzvané „příbuzenské selekce“, na úrovni populace až systému, kdy rezistentní bakterie poskytují ochranu jiným, senzitivním buňkám (Lee *et al.*, 2010).

Již před masivním rozvojem uplatnění penicilinu naznačovala některá pozorování schopnost bakterií jeho inaktivace enzymatickou degradací (Abraham a Chain, 1940). Pozdější nadměrné používání antibiotik vedlo k rozvoji rezistentních patogenních kmenů bakterií (Budiño *et al.*, 2005; Wegener *et al.*, 1998) a ke kontaminaci potravního řetězce antibiotickými rezidui (Chen *et al.*, 2005; Roselli *et al.*, 2005). Dle zprávy Evropského centra pro prevenci a kontrolu onemocnění (2009) – European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC – každoročně okolo 25 000 pacientů v Evropské unii umírá na následky infekcí bakteriemi, které jsou rezistentní vůči různým druhům léčiv. Zvýšená pozornost je proto věnována programům na zodpovědné používání antibiotik nejen v terapii onemocnění způsobených právě bakteriemi, ale například i při léčbě tuberkulózy, malárie, chřipky a viru HIV (WHO, 2015c) – viz Graf 4.

Graf 4: Procentuální podíl členských států se systémem kontroly rezistence u bakterií obecně a u kauzativních původců tuberkulózy, malárie, chřipky a infekce virem HIV v Evropském regionu (WHO, 2015c)



3.13 Alternativy antibiotik a neantibiotické stimulatory růstu v živočišné produkci

Značným problémem je nejen stávající rezistence bakterií, ale i schopnost odolávat i modernějším léčivům, jako je tomu v případě patogenních bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, u nichž se vyvinula rezistence nejen k původně používanému penicilinu, ale i semi-syntetickým penicilinům, cefalosporinům a novějším karbapenemům (Kumarasamy *et al.*, 2010). Je proto důležité hledat nové alternativy antibiotických léčiv, jakými může být v humánní medicíně pasivní imunizace (Keller a Stiehm, 2000), nebo fágová terapie (Monk *et al.*, 2010). Možností je také farmakologické inženýrství produkující antibiotika s hybridní aktivitou, jako jsou rifamycin-chinolonová léčiva (Robertson *et al.*, 2008). Dalším přístupem ke snížení rezistence bakterií vůči antibiotikům jsou nové zdroje antimikrobiálních látek, například mořský ekosystém (Rahman *et al.*, 2010), živočišné a rostlinné peptidy (Hancock a Sahl, 2006), či přírodní lipopeptidy bakterií a hub (Makovitzki *et al.*, 2006) s antimikrobiální aktivitou.

V živočišné produkci se v současnosti v zemích, kde došlo k omezení, či zákazu používání antibiotických stimulatorů růstu, uplatňují takzvané neantibiotické stimulatory růstu, mezi které patří prebiotika a probiotika, enzymy, organické kyseliny (Marounek *et al.*, 2007),

synbiotika (Bomba *et al.*, 2002), bakteriociny, bakteriofágy (Caly *et al.*, 2015), rostlinné extrakty (Jouany a Morgavi, 2007), oxid zinečnatý (Ou *et al.*, 2007) a jílové minerály (Phillips *et al.*, 2002).

3.13.1 Probiotika

Probiotika jsou definována jako „živá mikrobiální hmota použitelná jako krmné aditivum s příznivým efektem na příjemce v důsledku zlepšení intestinální mikrobiální rovnováhy“ (Fuller a Tannock, 1999). Probiotika mohou také zlepšit hostitelovu imunitu, morfologii střevní sliznice, nebo mohou stimulovat metabolismus, a tudíž snižovat riziko infekce oportunistickými patogeny (Caly *et al.*, 2015). Probiotické bakterie mají také schopnost produkce molekul s antimikrobiální aktivitou vůči specifickým patogenům, tzv. bakteriocinům, nebo mohou přímo inhibovat adhezi patogenů, či produkci patogenních toxinů (Joerger, 2003; Pan a Yu, 2014). Některé z prospěšných bakterií mohou také působit jako soupeři patogenních kmenů uvnitř trávicího traktu hostitele (Marinho *et al.*, 2007). Mezi probiotika patří kvasinky (Hatoum *et al.*, 2012); některé druhy rodu *Bacillus* produkující bakteriociny a antimikrobiální peptidy (Cochrane a Vederas, 2016; Lee, 2011; Mongkolthanaruk, 2012); enterokoky produkující kyseliny mléčného kvašení a enterociny (Cao *et al.*, 2013) a bakterie mléčného kvašení (Cao *et al.*, 2012) – viz Tabulka 2.

Tabulka 2: Mikroorganismy používané jako probiotika (Fooks a Gibson, 2002; Kumprecht *et al.*, 1994; Lodemann *et al.*, 2006; Ouwehand *et al.*, 2002)

Rod	Bakteriální druh
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>
	<i>L. casei</i>
	<i>L. rhamnosus</i>
	<i>L. reuteri</i>
	<i>L. plantarum</i>
	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. brevis</i>
	<i>L. helveticus</i>
	<i>L. delbrückei</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. pentosaceus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>
	<i>B. cereus</i>
	<i>B. toyoi</i>
	<i>B. natto</i>

Pokračování Tabulky 2

<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. mesentericus</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. pseudolongum</i> <i>B. breve</i> <i>B. thermophilum</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Avirulentní Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>

3.13.2 Prebiotika

Prebiotika jsou krmná aditiva, většinou v podobě nestravitelných oligosacharidů – viz Tabulka 3, která stimulují přirozenou komenzální mikrobiotu a zlepšují příznivý efekt probiotik na hostitele (Patel a Goyal, 2012). Tyto sacharidy s krátkým řetězcem vyvolávají změnu v morfologii střev a snižují pH tráveniny, čímž přispívají ke snížení počtu patogenních bakterií (Abd El-Khalek *et al.*, 2012). Příklad do krmné dávky ovlivňuje obsah těkavých mastných kyselin, podíl rozvětvených řetězců u kyselin a obsah kyseliny mléčné a amoniaku v trávicím traktu (Pié *et al.*, 2007). Zvýšená koncentrace mastných kyselin s krátkým řetězcem stimuluje přirozenou bakteriální aktivitu, proliferační aktivitu bifidobakterií a kyselin mléčného kvašení a zvyšuje také produkci butyrátu, který je hlavním energetickým zdrojem enterocytů (Houdijk *et al.*, 2002).

Tabulka 3: Zdroje prebiotik (Tuohy *et al.*, 2005; Zimmermann *et al.*, 2001)

Nestravitelné oligosacharidy	Vznik
Manooligosacharidy	enzymatická syntéza z manózy
Galaktooligosacharidy	trans-galaktosylace laktózy spolu
Fruktooligosacharidy	částečná enzymatická hydrolýza inulinu, či trans-fruktosylace ze sacharózy
Olygosacharidy sóji	extrakce ze sójové syrovátky
Isomaltooligosacharidy	enzymatická hydrolýza škrobu, nebo trans-glukosylace maltózy
Xylooligosacharidy	enzymatická hydrolýza xylanu
Inulin	izolace z čekankového kořene

3.13.3 Synbiotika

Synbiotika jsou preparáty obsahující probiotickou i prebiotickou složku, zvyšující pasáž probiotických bakterií horní části střev a napomáhající kolonizaci jejich lokálních receptorů (Bomba *et al.*, 2002; Maxwell *et al.*, 2004). Mají signifikantní synergický stimulačně–růstový efekt (Kumprecht a Zobac, 1998; Shim *et al.*, 2005), snižují mortalitu, zvyšují počty bakteriálních druhů přirozeně se vyskytujících v trávicím traktu (Frece *et al.*, 2009) a navíc také zvyšují produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem (Bird *et al.*, 2009). Synbiotický efekt vykazuje také inkorporace nenasycených mastných kyselin do probiotických preparátů (Bomba *et al.*, 2002; Bontempo *et al.*, 2004; Ringø *et al.*, 1998).

3.13.4 Enzymy

Přídavek enzymů do krmných směsí je běžnou praxí v drůbežářském průmyslu vzhledem k vysoké viskozitě tráveniny drůbeže, kterou beta-glukanázy a arabinoxylázy snižují (Almirall *et al.*, 1995), čímž zvyšují absorpci živin, redukují dostupnost substrátů pro nežádoucí mikrobiální proliferaci v ileu a céku (Almirall a Esteve-Garcia, 1994), čímž zlepšují kvalitu podestýlky a čistotu vajec (Brufau *et al.*, 2006).

3.13.5 Organické kyseliny

Přídavek organických kyselin a jejich solí ke krmivu vykazuje antimikrobiální účinky a příznivý efekt na stravitelnost a resorpci živin (Freitas *et al.*, 2006; Roth *et al.*, 1998). Antimikrobiální efekt organických kyselin spočívá v tom, že snižují pH žaludku pod hodnotu 6 a také v tom, že jsou schopny penetrovat ve své nedisociované formě bakteriální stěnu, a tím pádem ničit určité druhy mikroorganismů (Hansen *et al.*, 2007). Dle efektu, kterým působí, lze rozdělit organické kyseliny do dvou skupin: první skupina zahrnuje kyselinu mléčnou, fumarovou a citrónovou a je charakteristická nepřímým efektem redukce bakteriální populace díky snížení pH žaludku; druhá skupina zahrnuje kyselinu mravenčí, octovou, propionovou a sorbovou a charakterizuje ji přímý efekt nízkého pH v trávicím traktu na buněčnou stěnu gramnegativních bakterií, čímž zabraňuje replikaci jejich DNA (Castro, 2005; Hansen *et al.*, 2007). Organické kyseliny přispívají ke stabilizaci intestinální mikrobioty svým biocidním efektem a také svou schopností zlepšit enzymatické trávení (Kirchgesner *et al.*, 1995; Marinho *et al.*, 2007; Roth a Kirchgesner, 1998).

3.13.5.1 Mastné kyseliny o střední délce řetězce

Antimikrobiální, antifungální a baktericidní účinky volných mastných kyselin a jejich esterů jsou známy již řadu let (Chattaway *et al.*, 1956; Glassman, 1948), mezi nimi i ty mastných kyselin o střední délce řetězce (Kabara, 1984). Přestože není přesný mechanismus účinku zcela objasněn, na kůži se antibakteriální efekt uplatňuje prostřednictvím: destabilizace bakteriální membrány díky schopnosti snižovat povrchové napětí (Greenway a Dyke, 1979); rozpojení syntézy ATP (Galbraith a Miller, 1973); hydroxyperoxidáz mastných kyselin, které vytvářejí oxidační stres (Knapp a Melly, 1986); zvyšování propustnosti membrány inkorporací do nenasycených mastných kyselin fosfolipidů (Chamberlain *et al.*, 1991) a inhibice *de novo* syntézy mastných kyselin (Sado-Kamdem *et al.*, 2009).

3.13.6 Bakteriociny

Bakteriociny jsou malé, ribosomy syntetizované peptidy, které produkuje celá řada bakterií, a které jsou klasifikovány na základě své velikosti, struktury a post-translačních modifikací (Cotter *et al.*, 2013). Jeden z hlavních benefitů, který bakteriociny poskytují, je vysoce specifická antimikrobiální aktivita, která umožňuje použití bakteriocinů k léčbě specifických infekcí bez narušení obvyklé mikrobioty střev (Cavera *et al.*, 2015). Použití čistých bakteriocinů nebo bakteriálních druhů bakteriociny produkující, představuje možnou alternativu ke konvenčním antibiotikům (Caly *et al.*, 2015).

3.13.7 Bakteriofágy

Bakteriofágy jsou vysoce druhově specifické viry, které infikují a ničí bakterie produkcí endolysinů následně po své replikaci v hostitelské buňce, a které cílí na peptidoglykany, čímž způsobují lýzi bakteriální buněčné stěny, opětovné uvolnění fágů z buňky a jejich šíření do jiných buněk (Nakonieczna *et al.*, 2015). Fágová terapie byla široce rozšířena ve čtyřicátých letech minulého století pro léčbu bakteriálních infekcí a v současnosti zažívá vzestup na oblibě vzhledem k tomu, že může být alternativou k léčbě onemocnění, způsobených bakteriemi rezistentními k antibiotikům (Caly *et al.*, 2015).

3.13.8 Rostlinné extrakty

Rostlinné extrakty byly po staletí součástí tradiční medicíny v mnoha kulturách. Nyní, po zákazu používání antibiotických stimulátorů růstu, jsou mimo jiné užívány jako alternativní

zdroje antimikrobiálních látek v krmivech, zejména pro brojlerů a prasata. Nejedná se pouze o využití souhrnných extraktů, ale i jednotlivých účinných látek (Borovan, 2004; Hernandez *et al.*, 2004). Uplatnění nachází především díky svým antimikrobiálním (Costa *et al.*, 2007; Namkung *et al.*, 2004), protizánětlivým, antioxidačním (Liu *et al.*, 2008) a antiparazitickým vlastnostem (Mägi *et al.*, 2006). Antibakteriální aktivita rostlinných extraktů závisí na jejich chemickém složení a také koncentraci (Russo *et al.*, 1998). Mezi nejvýznamnější rostlinné bioaktivní látky s výše zmíněnými účinky patří taniny (Mueller-Harvey, 2006) a saponiny (Cheeke, 2000). Mezi rostliny, které mají významný účinek na stimulaci růstu, patří oregano, skořice, mexický pepř (Hernandez *et al.*, 2004; Manzanilla *et al.*, 2004), tymián, hřebíček (Namkung *et al.*, 2004), česnek (Tatara *et al.*, 2008) a heřmánek (Zanchi *et al.*, 2008).

3.13.9 Zinek a oxid zinečnatý

V těle hojně zastoupený zinek je prvkem podílejícím se na celé řadě buněčných funkcí včetně replikace, transkripce a přenosu signálu (Vallee a Falchuk, 1993). Je součástí řady enzymů a díky své roli v regulaci metabolismu proteinů a aminokyselin je rovněž důležitým dietetickým faktorem (Ou *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Dále je zinek stabilizátorem citlivé bakteriální mikrobioty, inhibuje růst některých patogenů a stimuluje imunitní odpověď organismu (Case a Carlson, 2002; Han a Thacker, 2009; Højberg *et al.*, 2005). Snižuje virulenci některých mikroorganismů jako *Staphylococcus aureus* (Walsh *et al.*, 1994), *Salmonella typhi*, *Aeromonas hydrophilia* (Filteau a Tomkins, 1994) a je schopen redukce intenzity průjmů způsobených ETEC (Li *et al.*, 2006; Roselli *et al.*, 2005).

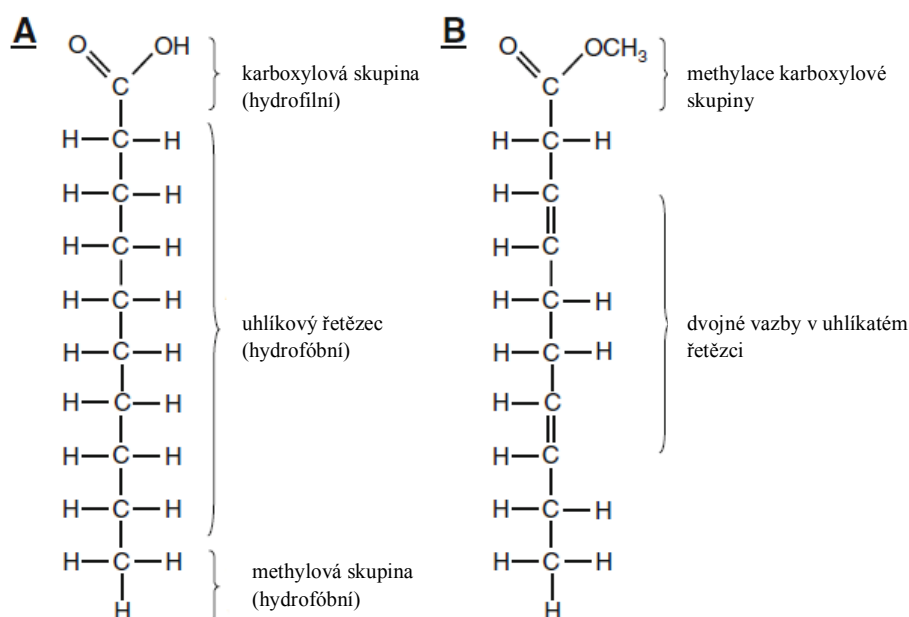
3.13.10 Jílové minerály

Přírodní extrahované jíly (bentonit, zeolit, kaolin atd.) jsou kombinací různých jílových minerálů, které se liší svým chemickým složením (Vondruskova *et al.*, 2010). Přídavkem jílu do krmné dávky lze imobilizovat toxický materiál v gastrointestinálním traktu zvířat a značně snížit biologickou dostupnost a toxicitu těchto látek v těle (Lemke *et al.*, 2001; Phillips *et al.*, 2002). Jílové minerály jsou schopné dekontaminace aflatoxinů (Magnoli *et al.*, 2008; Phillips *et al.*, 2002; Thieu *et al.*, 2008), rostlinných metabolitů (Dominy *et al.*, 2004), těžkých kovů (Abbès *et al.*, 2007; Katsumata *et al.*, 2003) a toxinů (Knezević a Tadić, 1993).

3.14 Charakteristika a vlastnosti mastných kyselin

Mastné kyseliny (MK) jsou monokarboxylové, alifatické organické kyseliny obsažené v esterifikované formě v rostlinných, či živočišných tucích, oleji a vosku. Přírodní MK mají řetězec složený ze 4 až 28 uhlíků (obvykle nerozvětvených, v sudém počtu) a mohou být nasycené i nenasycené (McNaught, 1997) – viz Obrázek 3.

Obrázek 3: Struktura MK – A – nasycená MK, B – nenasycená MK s methylací karboxylové skupiny (Desbois a Smith, 2010)



Dle délky řetězce lze rozdělit MK do čtyř skupin: (a) MK s krátkým řetězcem (SCFA – short-chain fatty acids; řetězec do šesti uhlíků), (b) MK se středně dlouhým řetězcem (MCFA; C₆ až C₁₂) (Huang *et al.*, 2011; Khan a Iqbal, 2016), (c) MK s dlouhým řetězcem (LCFA – long-chain fatty acids; C₁₃ až C₂₁) (Dayrit, 2015; Huang *et al.*, 2011), (d) MK s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA – very long-chain fatty acids; řetězec s více jak 22 uhlíky) (Olson *et al.*, 2014).

MK jsou amfipatické – karboxylová skupina je hydrofilní a ionizovatelná ve vodě, uhlíkatý řetězec je hydrofóbní (Desbois a Smith, 2010). Rozpustnost MK ve vodě je v nepřímé korelaci s délkou uhlíkatého řetězce – rozpustnost klesá úměrně k prodloužení; MK s krátkým řetězcem jsou vzhledem k polaritě karboxylové skupiny ve vodě mírně rozpustné a MK s dlouhým řetězcem jsou v podstatě nerozpustné. Prodlužováním uhlíkatého řetězce a

snížením počtu dvojných vazeb v tomto řetězci dochází ke zvyšování bodu tání MK (Stoker, 2012). MK jsou vzhledem ke svým nízkým disociačním konstantám řazeny ke slabým kyselinám; v podstatě nerozpustné LCFA a VLCFA neovlivňují hodnotu pH roztoku (Cullum, 1994; Rustan a Drevon, 2005).

Geometrická izomerie nenasycených MK představuje dvojí možnost navázání vodíků na uhlíkový řetězec – v případě diagonálně rozdílné polohy dvou vodíků vázaných na uhlíky spojené dvojnou vazbou se jedná o polohu *trans*, v případě umístění na stejné straně řetězce se jedná o polohu *cis* (Valenzuela a Morgado, 1999). *Trans* izomery mohou být produkovány průmyslovým zpracováním (hydrogenací) nenasycených olejů a vznikají také v gastrointestinálním traktu přežvýkavců; *cis* izomery jsou méně termodynamicky stabilní a mají nižší bod tání než *trans* izomery (Almendingen *et al.*, 1995). Dvojná vazba MK s *cis* konfigurací je v přírodě naprosto běžná, zatímco *trans* izomery jsou vzácné (Nelson *et al.*, 2008). Vzhledem k nejnovějším studiím nejsou hydrogenované oleje, které jsou primárním zdrojem průmyslově produkováných *trans* MK, dle amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv – Food and Drug Administration, FDA – od června 2015 ve výživě člověka považovány za bezpečné (GRAS status – generally recognised as safe) (FDA, 2015a).

Počet dvojných vazeb poté dělí MK do tří dalších skupin – viz Tabulka 4: (i) SAFA – saturated fatty acids – nasycené mastné kyseliny neobsahují žádnou dvojnou vazbu, (ii) MUFA – mono unsaturated fatty acids – monoenoové kyseliny s jednou dvojnou vazbou v řetězci uhlíků, (iii) PUFA – poly unsaturated fatty acids – polyenoové kyseliny s více jak jednou dvojnou vazbou v uhlíkatém řetězci (Rustan a Drevon, 2005).

MK jsou vysokoenergetickým zdrojem (37 kJ g^{-1} tuku), úložištěm energie (např. adipózní tkáň), izolantem těla (teplotním, elektrickým i mechanickým) (Rustan a Drevon, 2005), jsou součástí buněčných membrán (fosfolipidy) a hrají důležitou roli při přenosu signálu v těle (eikosanoidy, genová regulace – transkripce) (Weber, 2002).

Gurr a Harwood (1991) konstatují, že MK se běžně nevyskytují jako volné karboxylové kyseliny, protože vykazují vysokou afinitu k řadě proteinů, což může být demonstrováno například jejich inhibičním účinkem na většinu enzymů. Zvýšené množství MK tedy svědčí o proběhlém, či přetrvávajícím buněčném poškození lipázami (Gurr a Harwood, 1991).

Tabulka 4: MK dle dvojných vazeb (Rustan a Drevon, 2005)

SAFA	MUFA	PUFA
kyselina kapronová (C _{6:0})	kyselina myristoolejová (C _{14:1})	kyselina linolová (C _{18:2n6c})
kyselina kaprylová (C _{8:0})	kyselina palmitoolejová (C _{16:1})	kyselina γ -linolenová (C _{18:3n6})
kyselina kaprinová (C _{10:0})	kyselina olejová – cis izomer (C _{18:1n9c})	kyselina α -linolenová (C _{18:3n3})
kyselina laurová (C _{12:0})	kyselina elaidová – trans izomer (C _{18:1n9t})	kyselina arachidonová (C _{20:4n6})
kyselina myristová (C _{14:0})	kyselina eikosenová (C _{20:1})	kyselina eikosapentaenová (C _{20:5n3} ; EPA)
kyselina palmitová (C _{16:0})	kyselina eruková (C _{22:1n9})	kyselina dokosaheptaenová (C _{22:6n3} ; DHA)

Triacylglyceroly (TAG; MK vázané s glycerolem) živočišného původu, které obsahují relativně vysoký podíl nasycených MK, se při pokojových teplotách vyskytují především v pevném skupenství; oproti tomu TAG rostlinného původu, které obsahují spíše větší podíl nenasyčených MK, jsou obvykle tekuté (Nelson *et al.*, 2008). V rostlinném materiálu lze MK nalézt v podobě esterů glycerolu, či jako součást lipidů, které představují až 7 % váhy sušiny listů vyšších rostlin a jsou důležitou součástí buněčných stěn, chloroplastů a mitochondrií. Lipidy jsou důležitým zdrojem energie v průběhu klíčení, a proto se ve velkém množství nacházejí v semenech a v plodech rostlin, ze kterých mohou být získávány v podobě olejů (Baxter *et al.*, 1999). Harwood (1980) uvádí, že lipidové složení listů vyšších rostlin je nejen druhově specifické, ale i relativně konstantní, a proto je i obsah MK druhově charakteristický, avšak oproti semenům je skladba MK listů chudší.

Řada autorů konstatuje, že právě MK jsou zodpovědné za antibakteriální účinky konečných produktů vzniklých během frakcionace rostlinných extraktů (Hemsworth a Kochan, 1978; McGaw *et al.*, 2002; Wille a Kydonieus, 2003; Yff *et al.*, 2002).

3.15 Mastné kyseliny o střední délce řetězce

Jak již bylo uvedeno výše, skupina MK kyselin o střední délce řetězce zahrnuje nasycené monokarboxylové kyseliny s uhlíkatým řetězcem o délce šesti až deseti (Marten *et al.*, 2006), podle některých autorů až dvanácti (Huang *et al.*, 2011; Khan a Iqbal, 2016) uhlíků. Bohatým

zdrojem MCFA je kromě triglyceridů se středně dlouhým řetězcem například kokosový olej (Wang *et al.*, 2015) a mléčný tuk (Legrand, 2008). Marten *et al.* (2006) uvádí, že MCFA představují z celkového obsahu MK v kokosovém a palmo-jádrovém oleji více jak 50 hm.%. V kravském mléce C_{6:0} – C_{10:0} představují 4 – 12 % a C_{12:0} 2 – 5 % z celkového obsahu MK s ohledem na fázi laktace, genetické založení jedince a úroveň výživy (Jensen, 2002). MCFA v organismu oproti jiným skupinám MK nepotřebují binding (vázající) protein (Hamilton, 1989), transportní proteiny (Ahowesso *et al.*, 2015), ani translokázu mastných kyselin (Labarthe *et al.*, 2005) a jsou vynikajícím zdrojem energie vzhledem k jejich upřednostňování během β -oxidace (Yamada *et al.*, 2012).

Intraluminální hydrolyza triglyceridů o střední délce řetězce a následná absorpce MCFA je rychlejší a efektivnější v porovnání s LCFA. MCFA stimulují produkci cholecystokininu, žlučových fosfolipidů a cholesterolu výrazně méně než LCFA a oproti nim mohou být také absorbovány i při deficitu žlučových solí v organismu. Po průchodu střevní stěnou jsou MCFA transportovány portální žílou do jater na rozdíl od LCFA, které jsou zabudovávány do chylomikronů a poté cirkulují v lymfatickém systému (Bach a Babayan, 1982). Esterifikace MCFA je v hepatocytech i v jiných buňkách limitována (Papamandjaris *et al.*, 1998). MCFA se chovají v určitém smyslu spíše jako glukóza, než jako tuky, a proto mají značnou tendenci k oxidaci (Babayan, 1987). Jak již bylo uvedeno výše, to, že MCFA nevyžadují navázání k binding proteinu MK, transportním proteinům, ani k translokáze MK, ovlivňuje některé regulační mechanismy v organismu, což vede například ke snížení bazální úrovně inzulínu, normalizaci glukózové tolerance (Labarthe *et al.*, 2005) a k útlumu symptomů metabolického syndromu (Hajri *et al.*, 2001). Minoritní frakce MCFA, která nepodléhá metabolizaci v játrech je distribuována do periferních tkání (Bach a Babayan, 1982; Nj a Skillman, 1969). Zde je tato část MCFA zabudovávána do adipocitárních triglyceridů a ovlivňuje metabolismus takovým způsobem, že může do značné míry redukovat množství tukové tkáně a zlepšovat inzulínovou senzitivitu (Han *et al.*, 2003).

3.16 Antibakteriální účinky mastných kyselin o střední délce řetězce

Obecné mechanismy antibakteriálního účinku organických kyselin byly popsány výše v kapitole 3.13.5 a lze konstatovat, že obrana proti mikrobům pomocí MK je v přírodě široce rozšířena jak u savců (Georgel *et al.*, 2005; Hemsworth a Kochan, 1978), tak u rostlin (Weber, 2002), měkkýšů (Benkendorff *et al.*, 2005), mořských řas (Küpper *et al.*, 2006), i

obojživelníků (Rickrode *et al.*, 1986). Samotná antimikrobiální aktivita MK je silně ovlivněna strukturou a tvarem řetězce (Desbois a Smith, 2010). Často se uvádí, že nenasycené MK vykazují vyšší antimikrobiální aktivitu oproti nasyceným MK se stejným počtem uhlíků (Desbois *et al.*, 2008; Feldlaufer *et al.*, 1993; Greenway a Dyke, 1979; Kabara *et al.*, 1972; Zheng *et al.*, 2005). Účinnější jsou potom *cis* izomery MK (Feldlaufer *et al.*, 1993; Galbraith *et al.*, 1971; Kabara *et al.*, 1972). Bylo prokázáno, že MCFA a LCFA jsou více aktivní proti grampozitivním bakteriím než proti bakteriím gramnegativním (Galbraith *et al.*, 1971; Knapp a Melly, 1986; Kodicek a Worden, 1945). Výraznější efekt na gramnegativní bakterie byl prokázán u SCFA (Kabara, 1980). Nejvyšší antibakteriální aktivitu z nasycených kyselin vykazují dle některých autorů MK o délce řetězce 10 a 12 uhlíků (Bergsson *et al.*, 2001; Galbraith *et al.*, 1971; Kabara *et al.*, 1972; Sun *et al.*, 2003), či MK s 14 až 18 uhlíky (Wille a Kydonieus, 2003) – viz Tabulka 5. Rozdíly v neshodě lze přičíst především nestejným metodickým postupům, které autoři použili (Desbois a Smith, 2010).

Tabulka 5: Shrnutí strukturálního efektu na antimikrobiální aktivitu MK

Struktura MK	Bakteriální toxicita
krátký řetězec	gramnegativní bakterie (ve vyšších koncentracích, pH dependentní)
dlouhý řetězec	grampozitivní bakterie (v nižších koncentracích, pH nezávislé)
izomerie	<i>cis</i> izomer účinnější než <i>trans</i> izomer
nenasycenost	zvýšení aktivity proti grampozitivním bakteriím

Přesný účinek MK na bakterie zůstává stále nejasný, ale bylo prokázáno, že primárním cílem je buněčná stěna a procesy na ní probíhající (Desbois a Smith, 2010) – viz Obrázek 4. MCFA působí jako anionová povrchově aktivní činidla na buněčnou stěnu bakterií a zvyšují její propustnost vytvářením dočasných či trvalých pórů (Glassman, 1948). Inhibice růstu i zánik buňky mohou být zapříčiněny inkorporací MCFA do bakteriální membrány, čímž dojde ke zvýšení její fluidity a vyplavování vnitřního obsahu z buňky (Chamberlain *et al.*, 1991; Greenway a Dyke, 1979). Jiní autoři přičítají antimikrobiální efekt MCFA jejich schopnosti vyvolat autolýzu bakteriální buněčné membrány (Kenny *et al.*, 2009).

Navázáním na vnitřní membránu buněčné stěny, či na elektronové přenašeče, způsobují MCFA snížení protonového gradientu a membránového potenciálu narušením elektronového transportního řetězce (Galbraith a Miller, 1973; Peters a Chin, 2003; Sheu a Freese, 1972), čímž vyvolávají nedostatečný přísun substrátů ATP-syntáze, rozpojení oxidativní fosforylace a následné snížení produkce energie buňky (Beck *et al.*, 2007; Sheu a Freese, 1972). Dalším

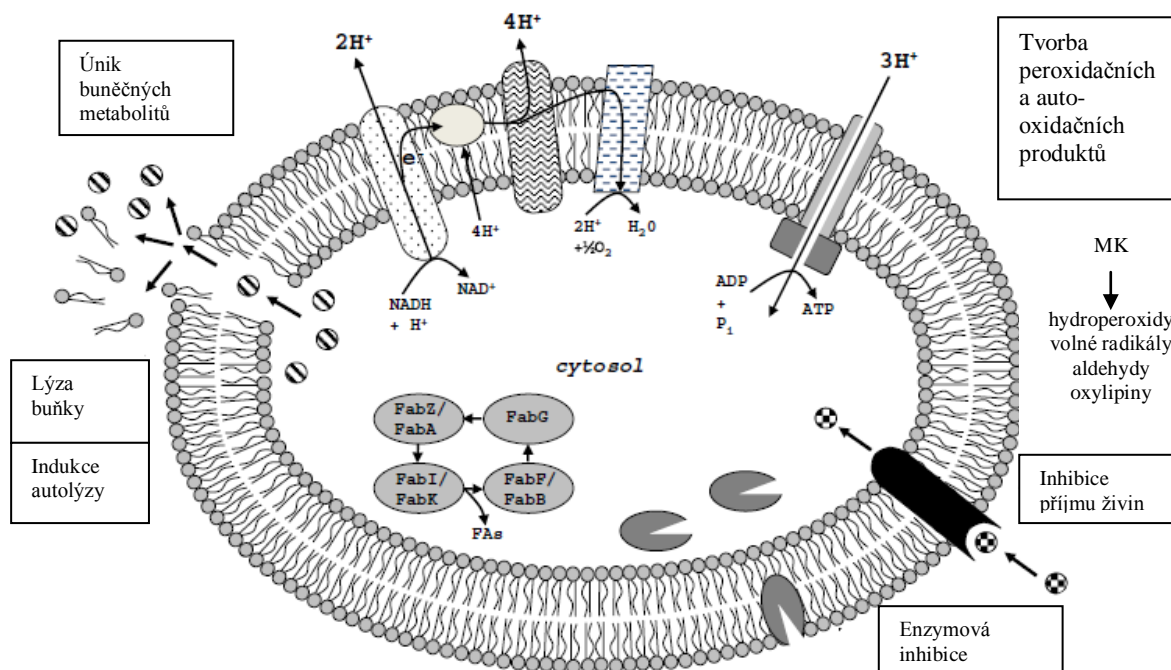
z efektů MCFA, který umožňuje potlačení bakteriálního růstu, je inhibice enzymů na membráně, či v cytosolu (Sado-Kamdem *et al.*, 2009; Won *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2005), inhibice příjmu živin (např. aminokyseliny) (Shibasaki a Kato, 2010). Jiní autoři uvádí, že produkty, vznikající degradací MK, mohou být příčinou jejich antimikrobiálního působení – peroxid vodíku a reaktivní formy kyslíku vznikající peroxidací (Knapp a Melly, 1986; Schönfeld a Wojtczak, 2008), oxylipiny a aldehydy s krátkým řetězcem vznikající auto-oxidací (Adolph *et al.*, 2004).

3.16.1 Kyselina kapronová

Kyselina kapronová (kyselina hexanová) – $C_6H_{12}O_2$ – je běžnou součástí mléčného tuku (2 %), kokosového oleje (<1%) a jiných olejů získávaných z palem a využívá se při výrobě farmak, umělých dochucovadel, gumárenských chemikálií, laků a pryskyřice (Budavari, 1998). Může být uvolňována při kažení potravy, živočišného odpadu a vegetace (Graedel *et al.*, 2012).

Huang *et al.* (2011) pozoruje antibakteriální účinek kyseliny kapronové na orální mikrobiotu (konkrétně *Fusobacterium nucleatum* a *Streptococcus mutants*) a konstatuje, že hexanová kyselina potlačuje růst kvasinek rodu *Candida*.

Obrázek 4: Schématické znázornění možných cílů a mechanismů MK v buňce (převzato z Desbois, 2010)



3.16.2 Kyselina kaprylová

Kyselina kaprylová (kyselina oktanová) – $C_8H_{16}O_2$ – je součástí tuku kravského mléka, kde představuje 0,53 až 1,04 % z celkového množství MK (Hall, 1981), tvoří asi 8 % MK kokosového oleje (Hess *et al.*, 1995) a je součástí esenciálních olejů získávaných z cypřiše himalájského, kryptomerie japonské, kafrovníku, muškátového oříšku, citrónové trávy, citrusů, tabákových listů, pelyňku, heřmánku a jiných rostlin (Burdock, 2009). Uplatňuje se mimo jiné při výrobě různých barviv, léčiv, parfémů, antiseptik a fungicidů, syntetických ochucovadel, hydraulických kapalin, řezných olejů a při separaci rud (Elvers, 2010).

Antibakteriální účinky kyseliny kaprylové na grampozitivní bakterie jsou velice dobře známy (Feldlaufer *et al.*, 1993; Galbraith *et al.*, 1971; Kollanoor-Johny *et al.*, 2012). Feldlaufer *et al.* (1993) dokazuje schopnost inhibice růstu *Bacillus larvae* a Kollanoor-Johny *et al.* (2012) pozoruje schopnost kyseliny kaprylové snížit počet bakterií *Salmonella enteritidis* v trávicím traktu kuřat při jejím doplnění do krmné dávky. Kyselina kaprylová vykazuje inhibiční účinky také vůči řasám, což dokazuje McGrattan *et al.* (1976) testem schopnosti inhibice růstu *Chlorella pyrenoidosa in vitro* difúzní diskovou metodou. Může také způsobovat snížení počtu prvoků v batoru, čímž omezí ruminální methanogenezi (Dohme *et al.*, 2001). Byla prokázána její toxicita na larvy žábřonožek solných (Curtis *et al.*, 1974).

3.16.3 Kyselina kaprinová

Kyselina kaprinová (kyselina dekanová) – $C_{10}H_{20}O_2$ – se přirozeně vyskytuje v jedlých a kosmetických tucích (kokosový olej – 9,7 %; olej z vavřínu vznešeného – 37 %; máslo – 2,7 %) (ECB, 2000). Kyselina a její estery se používají při výrobě parfémů, ovocných příchutí, změkčovadel, pryskyřic a jako meziproduct vzniká ve výrobě různých potravinářských aditiv (Elvers, 2010).

Bergsson *et al.* pozorují antibakteriální aktivitu kyseliny kaprinové vůči bakteriím *Chlamydia trachomatis* (1998) a *Neisseria gonorrhoeae* (1999) a Hanczakowska *et al.* (2011) zjišťují, že přídavek kyseliny kaprinové do krmné dávky selat omezuje výskyt *E. coli* a *Clostridium spp.* v jejich trávicím traktu. Stejně jako kyselina kaprinová, účinkuje i tato kyselina proti grampozitivním bakteriím (Feldlaufer *et al.*, 1993; Galbraith *et al.*, 1971; Kabara *et al.*, 1972), řasám (McGrattan *et al.*, 1976) a prvokům (Bergsson *et al.*, 1998; Dohme *et al.*, 2001). Navíc vykazuje také antivirotickou (Hilmarsson *et al.*, 2006) a antifungální aktivitu (Bergsson *et al.*, 2001; Kabara *et al.*, 1972).

3.16.4 Kyselina laurová

Kyselina laurová (kyselina dodekanová) – $C_{12}H_{24}O_2$ – se používá při výrobě alkydových pryskyřic, smáčedel, mýdel, detergentů, kosmetiky, potravinářských aditiv, jako inertní látka v insekticidech a v jiných výrobcích (Lewis, 2007). Je přirozenou součástí řady esenciálních olejů včetně jalovce, mandarinky, kokosu, jahod, arekového másla a oleje kanju (Budavari, 1998).

Kyselina laurová je MCFA s nejširším potenciálem účinku na mikroorganismy: působí proti růstu řas (McGrattan *et al.*, 1976), gramnegativním (Bergsson *et al.*, 1998; Bergsson *et al.*, 1999) i grampozitivním bakteriím (Feldlaufer *et al.*, 1993; Galbraith *et al.*, 1971; Kabara *et al.*, 1972), proti houbám (Bergsson *et al.*, 2001; Kabara *et al.*, 1972) i prvokům (Dohme *et al.*, 2001; Thormar *et al.*, 2006). Byla prokázána schopnost kyseliny laurové redukovat virulenci faktory bakterií, jakými je produkce β -laktamázy, toxinu vyvolávajícího syndrom toxického šoku (Ruzin a Novick, 2000) a hemolyzinů (Liaw *et al.*, 2004).

3.17 Rostlinné oleje s obsahem MK o střední délce řetězce

Rostlinné oleje jsou cenově dostupné a celosvětově běžně používané přírodní produkty (Oguntibeju *et al.*, 2010), obsahující směsi esterů glycerolu a tří mastných kyselin o různé délce řetězce a stupni saturace, tvořící TAG (Aluyor a Ori-Jesu, 2008; Matulka *et al.*, 2006). Vzhledem k jejich nutričním a zdravotním benefitům přitahují pozornost veřejnosti i vědců především oleje z nekonvenčních zdrojů, které obsahují různé množství bioaktivních složek (Idouraine *et al.*, 1996). Panuje obecné přesvědčení, že k léčbě mnoha onemocnění mohou značně přispívat právě bioaktivní součásti jako vitamíny, kyselina lipová, deriváty polyfenolů a jiné složky rostlinných olejů (Gulaboski *et al.*, 2013).

TAG o střední délce řetězce jsou definovány jako estery triglyceridů a nasyčených mastných kyselin s řetězcem obsahujícím šest až dvanáct uhlíků (Dierick *et al.*, 2002a). TAG se středně dlouhým řetězcem hrají důležitou roli ve snižování inkorporace a ukládání tuků a olejů z potravy do tukové tkáně (Nosaka *et al.*, 2003). Štěpením těchto triglyceridů v trávicím traktu jsou uvolňovány volné mastné kyseliny o střední délce řetězce (Marten *et al.*, 2006), jejichž antibakteriální efekt byl již popsán výše. Na MCFA je bohatý především olej tropických palem jihovýchodní Asie (Nielsen, 2002) a jihoamerického kontinentu (Pesce, 1985), ale i olej získávaný ze semen cévnatých rostlin rodu *Cuphea* (čeleď *Lythraceae*,

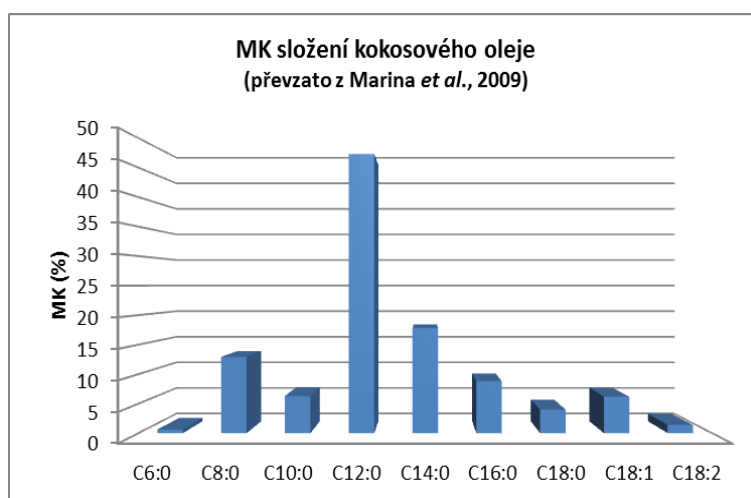
kyprejovité) (Graham *et al.*, 1981; Graham a Kleiman, 1987; Wilson *et al.*, 1960; Wolf *et al.*, 1983).

3.17.1 Kokosový olej

Kokosový olej je získáván z dřevě olejovité konzistence endokarpu plodů kokosovníku ořechoplodého (*Cocos nucifera*; čeleď *Arecaceae*, arekovité, syn. palmy) (Andrade *et al.*, 2004), jehož habitem jsou tropické oblasti celého světa (Purseglove, 1972). Endokarp, tzv. kopra, obsahuje 65 až 75 % oleje (Singla, 2011). Hlavními složkami oleje jsou kyselina laurová, která může být zastoupena až v 50% množství – viz Graf 5, a α -tokoferol (Arlee *et al.*, 2013; Marina *et al.*, 2009).

V tradiční medicíně je kokosový olej na Fidži používán jako prevence proti vypadávání vlasů (Singh, 1986), na Haiti je součástí masti na popáleniny (Weniger *et al.*, 1986), v Indonésii potom masti na poranění (Sachs *et al.*, 2002). Jsou prokázány účinky panenského oleje proti kvasince *Candida albicans* (Borate *et al.*, 2013), antivirotický efekt zahrnuje viry s lipidovou kapsulou (Visna virus, cytomegalovirus a virus Epstein-Barrové) (Arora *et al.*, 2010). Vzhledem k obsahu MCFA testovali Singla *et al.* (2011) antibakteriální aktivitu různých druhů výluhů kokosového endokarpu Kirby-Bauerovou difúzní diskovou metodou a došli k závěru, že vodné roztoky vykazovaly silné antimikrobiální účinky vůči *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* a *M. luteus*; za studena destilované extrakty inhibovaly růst *B. subtilis* a *Aspergillus spp.*

Graf 5: MK složení kokosového oleje (převzato z Marina *et al.*, 2009)

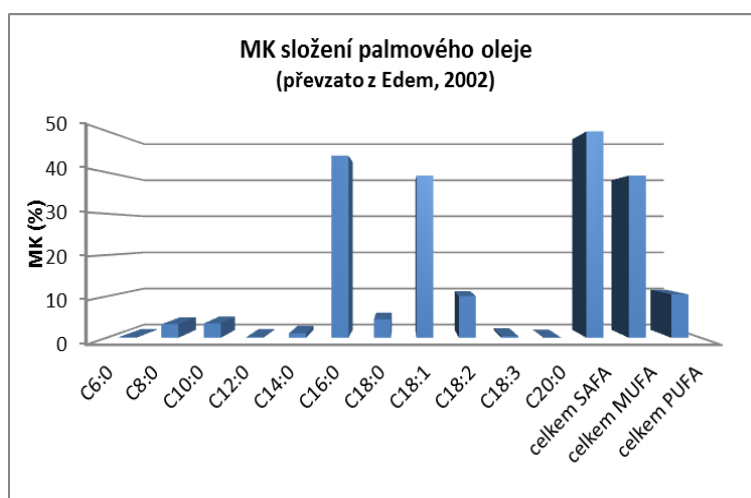


3.17.2 Palmový olej

Palma olejná (syn. olejnice guinejská; *Elais guineensis*, čeleď *Arecaceae*, arekovité, syn. palmy) je starobylou tropickou rostlinou původem ze západoafrického regionu, kde je její olej již po staletí tradičně užíván nejen při vaření (Mancini *et al.*, 2015). V dnešní době je získáván z mesokarpu extrakcí mokrou či suchou cestou (Mba *et al.*, 2015). Palmový olej obsahuje 50 % SAFA (v nejvyšší míře kyselina palmitová – 44 %), 40 % MUFA (hlavně kyselinu olejovou) a 10 % PUFA (nejvíce kyselina linolová) (Edem, 2002; Gee, 2007; Sambanthamurthi *et al.*, 2000) – viz Graf 6.

Na africkém kontinentu je palmový olej už po řadu generací používán především jako médium pro smíchání jednotlivých složek a pro vytvoření homogenní léčivé směsi (Gruca *et al.*, 2014). V lidovém léčitelství je palmový olej používán k léčbě nádorů, bolestí hlavy, revmatismu, jako afrodisiakum, diuretikum a linimentum (Belay *et al.*, 2011). Olej získaný z mesokarpu je používán v balzámech na externí ošetření kožních onemocnění (Sasidharan *et al.*, 2010).

Graf 6: MK složení palmového oleje (převzato z Edem, 2002)



3.17.3 Palmový červený olej

Palmový červený olej (neboli hrubý palmový olej) se získává extrakcí suchou či mokrou cestou a obsahuje jak zdraví prospěšné součásti jako TAG, vitamín E, karotenoidy či fytosteroly, tak fosfolipidy, pryskyřice, MK a produkty oxidace lipidů, jejichž aktivita v organismu může přispívat k rozvoji kardiovaskulárních onemocnění (Sambanthamurthi *et al.*, 2000). Palmový červený olej představuje nejbohatší přírodní zdroj karotenoidů (500 až 700 ppm), tokoferolů a tokotrienolů (600 až 1200 ppm) (Edem, 2002; Mba *et al.*, 2015; Sundram *et al.*, 2003). Antioxidativní vlastnosti, manifestované především proti reaktivním kyslíkovým radikálům, hrají významnou roli v procesu stárnutí, při kardiovaskulárních onemocněních a v prevenci nádorových onemocnění (Edem, 2002; Ong a Goh, 2002; Sen *et al.*, 2007). Tokoferoly jsou také přirozenými inhibitory syntézy cholesterolu (Edem, 2002).

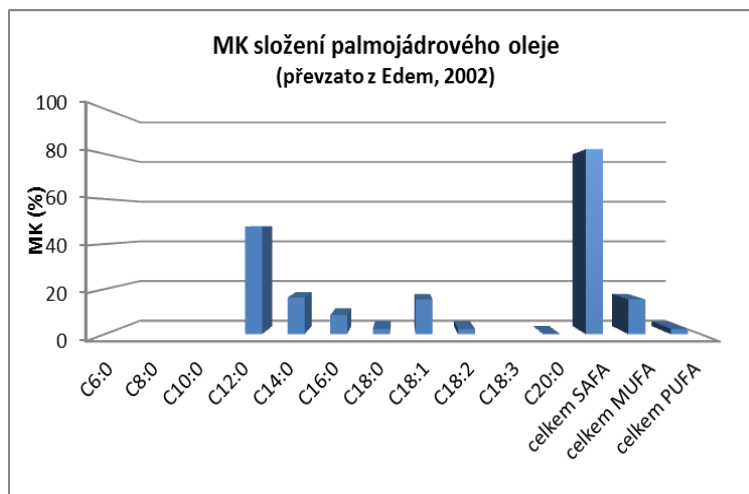
Palmový červený olej je jediným rostlinným olejem s vyrovnaným složením nasycených a nenasyčených MK jak před, tak i po zpracování (Edem a Akpanabiatu, 2006).

3.17.4 Palmojádrový olej

Palmojádrový olej je produkován extrakcí endospermu semen palmy olejně. Palmový a palmojádrový olej mají rozdílné fyzikální a chemické vlastnosti nejen vzhledem k jejich rozdílnému složení (viz Graf 6 a 7), ale také vzhledem k jejich zamýšlené aplikaci (Mba *et al.*, 2015; Ong a Goh, 2002). Palmojádrový olej sestává z 85 % ze SAFA, v nejvyšší míře z kyseliny laurové a myristové (Edem, 2002; Gee, 2007; Sambanthamurthi *et al.*, 2000) – viz Graf 7.

Lidé z východní Nigérie používají palmojádrový olej již od prehistorických dob na ošetřování kůže (Ubgogu *et al.*, 2006). Ubgogu *et al.* (2006) ve své práci dokazují difúzní diskovou metodou na různých vzorcích palmojádrového oleje jeho inhibiční efekt na *S. aureus* a *Streptococcus spp.*, avšak nepotvrzuje inhibiči kvasinky *C. albicans*. Byla prokázána vyšší antimikrobiální aktivita palmojádrového oleje vůči grampozitivním bakteriím (*S. aureus*), než bakteriím gramnegativním (*S. typhi* a *E. coli*) (Loung *et al.*, 2014). Zullo *et al.* (2007) navrhuje použití palmojádrového oleje, vzhledem k vysokému obsahu C_{12:0}, ke konzervaci nepotravinářských produktů, které snadno podléhají zkáze.

Graf 7: MK složení palmojádrového oleje (převzato z Edem, 2002)



3.17.5 *Cuphea* olej

Původem z Nového Světa (od severu USA po severojižní Ameriku), většinou jednoleté, i po snaze o zkulturnění stále divoce rostoucí (Graham a Kleiman, 1987), rostliny rodu *Cuphea* (čeleď *Lythraceae*, kyprejovité) jsou potenciálním zdrojem MCFA (obsah oleje v semenech od 16 do 42 %), přestože se obsah těchto MCFA u jednotlivých rodů značně liší (Graham *et al.*, 1981; Graham a Kleiman, 1987; Wilson *et al.*, 1960; Wolf *et al.*, 1983) – viz Tabulka 6.

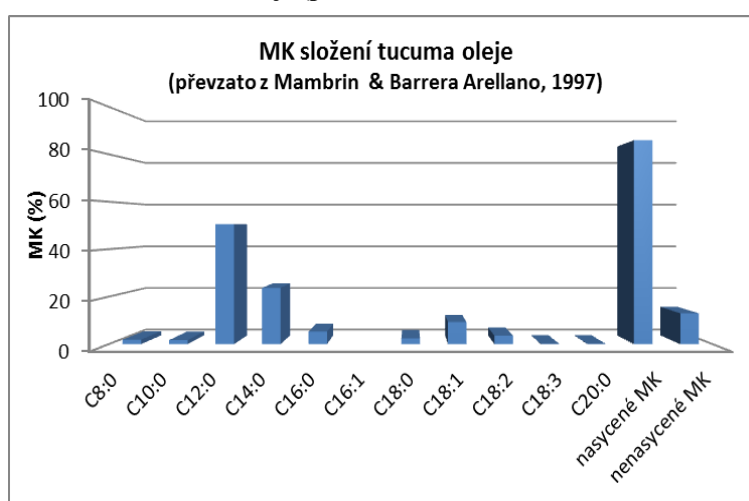
Tabulka 6: Procentuální zastoupení MCFA v druzích rostliny *Cuphea* (převzato z Kleiman, 1990)

Druh	% zastoupení MK				
	C _{8:0}	C _{10:0}	C _{12:0}	C _{14:0}	ostatní
<i>C. painteri</i>	73,0	20,4	0,2	0,3	6,1
<i>C. hookeriana</i>	65,1	23,7	0,1	0,2	10,9
<i>C. koehneana</i>	0,2	95,3	1,0	0,3	3,2
<i>C. lanceolata</i>	-	87,5	2,1	1,4	9,0
<i>C. viscosissima</i>	9,1	75,5	3,0	1,3	11,1
<i>C. carthagenensis</i>	-	5,3	81,4	4,7	8,6
<i>C. laminuligera</i>	-	17,1	62,6	9,5	10,8
<i>C. wrightii</i>	-	29,4	53,9	5,1	11,6
<i>C. lutea</i>	0,4	29,4	37,7	11,1	21,4
<i>C. epilobiifolia</i>		0,3	19,6	67,9	12,2
<i>C. stigulosa</i>	0,9	18,3	13,8	45,2	21,8

3.17.6 Tucuma olej

Tucuma olej pochází z jader plodů palmy *Astrocaryum vulgare* a *Astrocaryum aculeatum* (čeleď *Arecaceae*, arekovité) (Pesce, 1985). Tyto palmy mají habitat v tropických oblastech Jižní až Střední Ameriky, kde jsou jejich plody oblíbenou součástí jídelníčku (Shanley, 2011), a ve svém oleji obsahují značné množství kyseliny laurové (Mambrim a Barrera-Arellano, 1997) – viz Graf 8. Extrakty z dřene a kůry plodu palem tucuma vykazují dle studie provedené Jobimem *et al.* (2014) antimikrobiální aktivitu vůči grampozitivním bakteriím (*E. faecalis*, *B. cereus* a *L. monocytogenes*) a antifungální aktivitu vůči *C. albicans*.

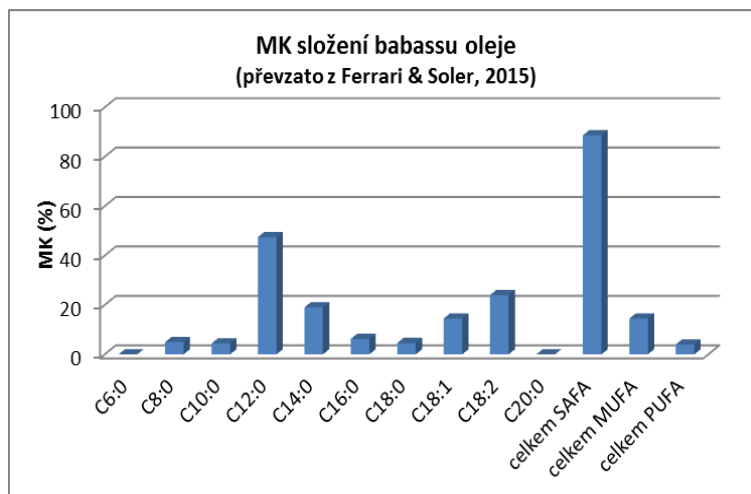
Graf 8: MK složení tucuma oleje (převzato z Mambrim a Barrera-Arellano, 1997)



3.17.7 Babassu olej

Babassu (*Attalea speciosa*, syn. *Orbignya speciosa*; čeleď *Arecaceae*, arekovité) je druh palem humidních tropických oblastí Brazílie, s výskytem na často vypalovaných a degradovaných půdách (Ferrari a Soler, 2015; Jackson a Longenecker, 1944). Olej je získáván z jader plodů, které obsahují kolem 65 % lipidů, s predominantním výskytem kyseliny laurové (Soler *et al.*, 2007; Urioste *et al.*, 2008) – viz Graf 9. Jsou známé antibakteriální a protizánětlivé účinky babassu oleje, vzhledem k vysokému obsahu kyseliny laurové, na kůži (Yang *et al.*, 2009).

Graf 9: MK složení babassu oleje (převzato z Ferrari a Soler, 2015)

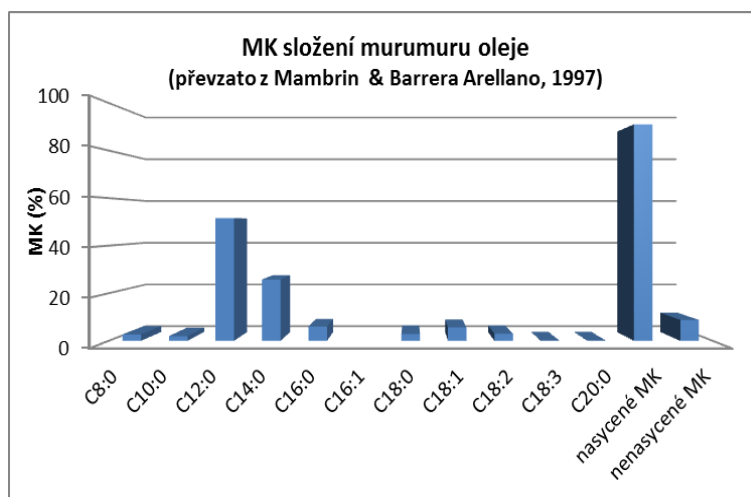


3.17.8 Muru-muru olej

Olej z palmy *Astrocaryum murumuru* (čeleď *Arecaceae*, arekovité), vyskytující se v oblasti brazilského tropického pralesa, je velice bohatý na MCFA, obzvláště na kyselinu laurovou (Saraiva *et al.*, 2009) – viz Graf 10

Právě obsah těchto MK v TAG může zvyšovat zdravotní a výživovou kvalitu tohoto oleje (Sengupta *et al.*, 2015). Protizánětlivý účinek, antimikrobiální aktivitu a dobrou stravitelnost dokazuje studie Carlsona *et al.* (2015).

Graf 10: MK složení muru-muru oleje (převzato z Mambrin a Barrera-Arellano, 1997)



4 Materiál a metody

4.1 Teoretická část

V teoretické části této práce byl proveden systematický přehled literatury zahrnující poznatky o enteropatogenních bakteriích, antibiotických preparátech a jejich substituentech ve výživě hospodářských zvířat a o rostlinných olejích s obsahem mastných kyselin o střední délce řetězce. Relevantní zdroje byly hledány v databázích Web of Science, Science Direct, Springer Link, SCOPUS, Willey Online Library apod. K vyhledávání byla primárně použita tato klíčová slova: mastné kyseliny, bakterie, inhibice, antibakteriální a výživa (v anglickém jazyce: fatty acids, bacteria, inhibition, antibacterial, nutrition).

4.2 Praktická část

4.2.1 Materiál použitý v praktické části práce

4.2.1.1 Bakteriální kmeny a kultivační média

Bakteriální kmeny použité pro posouzení antibakteriální aktivity olejů – viz Tabulka 7:

Tabulka 7: Bakteriální druhy a kmeny použité v praktické části práce

Druh	Kmen
<i>Bifidobacterium animalis</i>	CCM 4988 MA5
<i>Bifidobacterium longum</i>	CCM 4990 TP1
<i>Campylobacter jejuni</i>	CCM 6189 CAMP/VFU 612/21
<i>Clostridium perfringens</i>	CIP 105178 CNCTC 5454 UGent 56
<i>Enterococcus cecorum</i>	CCM 3659 ^T CCM 4285
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 29522 C6
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCM 4833
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CCM 91
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076
<i>Salmonella infantis</i>	K2
<i>Salmonella typhimurium</i>	K3
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923

Jednotlivé kmeny pocházely z následujících zdrojů:

- ATCC – Americká sbírka typových kultur (Manassas, USA)
- CCM – Česká sbírka mikroorganismů (Masarykova Univerzita, Brno)
- CNCTC – Česká národní sbírka typových kultur (Státní zdravotní ústav, Praha)
- CIP – Kolekce bakterií a virů Pasteurova institutu (Paříž, Francie)
- *Clostridium perfringens* UGent 56 poskytnuto Prof. F. Van Immerseelem (University of Ghent, Belgie)
- *Clostridium jejuni* CAMP/VFU 612/21 poskytnuto Prof. I. Steinhauserovou (Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno)
- *Escherichia coli* C6 poskytnuta Prof. A. Milonem (National Veterinary College v Toulouse, Francie)
- *Lactobacillus fermentum* CCM 23 a *Bifidobacterium animalis* MA5 jsou izoláty ze sbírky kultur České zemědělské univerzity v Praze
- *Salmonella infantis* K2 a *Salmonella typhimurium* K3 jsou izoláty z Ústavu chemické technologie v Praze

Pro kultivaci výše uvedených druhů s výjimkou bakterií rodu *Campylobacter spp.* bylo použito tekuté médium Wilkins-Chalgren firmy Oxoid (Velká Británie), jehož složení je uvedeno v Tabulce 8. Kultivačním médiem pro *Campylobacter spp.* byl Nutrient Broth No. 2 s přidavkem 2 ml směsi sterilního roztoku vody a acetonu (1:1), Preston *Campylobacter* Selective Supplement, *Campylobacter* Growth Supplement a lyzované koňské krve – viz Tabulka 9 – také od firmy Oxoid (Velká Británie).

Tabulka 8: Složení média Wilkins-Chalgren (Oxoid, VB)

Složení	g/l	Složení	g/l
trypton	10	L-arginin	1
želatinový pepton	10	pyruvát sodný	1
výtažek z kvasnic	5	menadion	0,0005
glukóza	1	hemin	0,005
chlorid sodný	5	pH 7,1 ± 0,2 při 25 °C	

Tabulka 9: Složení Nutrient Broth No. 2, Preston *Campylobacter* Selective Supplement a *Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid, Velká Británie) pro kultivaci *Campylobacter* spp.

Nutrient Broth No. 2		Preston <i>Campylobacter</i> Selective Supp.		<i>Campylobacter</i> Growth Supp.	
Složení	g/l	Obsah lahvičky pro 500 ml média		Obsah lahvičky pro 500 ml média	
„Lab Lemco“ prášek	10	polymyxin B	2 500 IU	pyruvát sodný	0,125 g
pepton	10	rifampicin	5,0 mg	metabisulfát sodný	0,125 g
chlorid sodný	5	trimethoprim	5,0 mg	síran železnatý	0,125 g
pH 7,5 ± 0,2		cycloheximid	50,0 mg	voda	2 ml

4.2.1.2 Rostlinné oleje

Rostlinný olej z palmy kokosové (*Cocos nucifera*) a palmojádrový olej (*Elaeis guineensis*), obsahující vysoký podíl kyseliny laurové, byl dodán společností Sigma-Aldrich (ČR). Olej rostliny *Cuphea* spp., bohatý na mastné kyseliny o střední délce řetězce, byl extrahován ze semen rostlin *Cuphea lanceolata* a *C. ignea* (USDA-ARS, Plant Germplasm Inspection Station, USA). Zakoupením u firmy Sweet Natural Botanicals (USA) byl pořízen palmový a palmový červený olej (*Elaeis guineensis*), babassu olej (*Attalea speciosa*), tucuma (*Astrocaryum vulgare*) a muru-muru olej (*Astrocaryum murumuru*).

4.2.2 Metody použité v praktické části práce

4.2.2.1 Extrakce oleje

Olej ze semen rostliny *Cuphea* bylo nutné extrahovat. Tato extrakce byla provedena v laboratoři etnobotaniky a etnofarmakologie Fakulty tropického zemědělství ČZU. Usušený rostlinný materiál byl rozdrcen a vyluhován v 80% methanolu na třepače po dobu 24 hodin. Extrakt byl poté zfiltrován a zkoncentrován sušením na rotační odparce Rotavapor R-200 (Buchi, Švýcarsko) ve vakuu při 40 stupních Celsia. Pro stanovení antibakteriální aktivity byl vysušený vzorek rozpuštěn v dimethyl sulfoxidu (DMSO; Sigma-Aldrich, ČR) a konečný roztok o koncentraci 10 mg/ml byl do doby testování uskladněn při teplotě –20 stupňů Celsia.

4.2.2.2 MCFA v použitých rostlinných olejích

Skladba a koncentrace MCFA v použitých rostlinných olejích byla stanovena plynovou chromatografií (GC-FID) v laboratoři Výzkumného ústavu živočišné výroby (Praha-Uhřetěves, ČR). Extrahované MK byly převedeny na methylestery alkalickou transmethylací dle standardu ISO 5509 (2001). Tyto methylestery byly poté analyzovány na plynovém

chromatografu HP 6890 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) s 60 m DB-23 kapilární kolonou (JaW Scientific, Folsom, USA). Identifikace jednotlivých MK byla provedena na základě porovnání retenčních časů analyzovaných MK se 37 standardy FAME Mix (Sigma-Aldrich, ČR).

4.2.2.3 Příprava olejů pro mikrodiluční test

Jeden gram každého z použitých rostlinných olejů byl rozpuštěn v 1 ml DMSO a doplněn o dvě kapky detergentu Tween 80 (Sigma-Aldrich, ČR), čímž byla vytvořena olejová emulze. Poté bylo 100 µl této emulze rozpuštěno v 9900 µl jednoho z výše uvedených médií s anebo bez přídavku lipázy. Množství porcinní pankreatické lipázy (Sigma-Aldrich, ČR), které bylo přidáváno do média s olejovou emulzí, bylo vypočítáno dle molekulární hmotnosti převažující MK v každém oleji a dle deklarované aktivity této lipázy (1 mg = 100 U; 1 U hydrolyzuje 1 mikroekvivalent MK). Například: kyselina laurová má molekulární hmotnost 200 g/mol, z čehož vyplývá, že 1 g kyseliny laurové (0,005 mol = 5 000 µmol) bylo nutno hydrolyzovat s 5 000 U lipázy, vzhledem k tomu, že 1 mg lipázy obsahuje 100 – 500 U. Na základě výše zmíněného počtu jednotek lipázy schopných hydrolyzovat kyselinu laurovou bylo 50 mg lipázy rozpuštěno v 9,9 ml příslušného média. Lipáza byla do emulze dodána v nadbytku. Maximální obsah kyseliny laurové v rostlinných olejích činil 40 %. Emulze byla poté zahřívána na 37 stupňů Celsia ve vodní lázni během hodiny třepání, čímž byl vytvořen zásobní roztok každého oleje.

4.2.2.4 Testování antibakteriálních účinků MK

Pro určení minimální inhibiční koncentrace rostlinných olejů mastných kyselin o střední délce řetězce *in vitro* byla použita mikrodiluční metoda s živným médiem v 96-jamkové mikrotitrační destičce uzpůsobená dle nejnovějších poznatků (Cos *et al.*, 2006; Hecht *et al.*, 2007). V mikrotitrační destičce byla vytvořena sestupná ředící řada zásobního roztoku oleje v odpovídajícím živném médiu, začínající na koncentraci 4,5 mg/ml. Inokulum bakterií bylo standardizováno na hustotu 1×10^6 CFU/ml měřením v nefelometru na základě McFarlandovy zákalové stupnice a naočkováno do jamek k zásobnímu roztoku oleje v objemu 10 µl – viz Obrázek 5. Mikrotitrační destičky s bakteriemi, vyžadujícími anaerobní, nebo mikroaerofilní podmínky pro růst, byly uzavřeny do sáčků s vyvíječi oxidu uhličitého a absorbenty atmosférického kyslíku (AnaeroGen a CampyGen; Oxoid, ČR), čímž byly

vytvořeny anaerobní, popř. mikroaerobní podmínky. Destičky byly inkubovány 24 hodin (resp. 48 hodin v případě *C. jejuni*) při 37 stupních Celsia – viz Příloha I a II.

4.2.2.5 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Nárůst organismů v médiu byl hodnocen měřením zákalu v jednotlivých jamkách pomocí Infinite® 200 PRO Microplate Reader (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 405 nm. Minimální inhibiční koncentrace (MIC – minimum inhibitory concentration) byly hodnoceny jako nejnižší zaznamenané koncentrace olejů, které způsobily 80 % úbytek růstu bakterií v jamkách oproti kontrole. Konečná koncentrace DMSO nepřesáhla ve vzorcích 1 %. Testováním citlivosti bakterií k penicilinu G byla určena MIC tohoto antibiotika v mikrotitračních destičkách stejným postupem jako stanovení MIC vybraných rostlinných olejů. Všechny vzorky byly testovány ve třech nezávislých experimentech, výslednou MIC byl modus získaných výsledků dané série.

Obrázek 5: Design mikrotitrační destičky pro experiment

	X	Kmen 1			DK			Kmen 2			X	X
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	M	M
B	M	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	M	M
C	M	1,125	1,125	1,125	1,125	1,125	1,125	1,125	1,125	1,125	M	M
D	M	0,5625	0,5625	0,5625	0,5625	0,5625	0,5625	0,5625	0,5625	0,5625	M	M
E	M	0,2812	0,2812	0,2812	0,2812	0,2812	0,2812	0,2812	0,2812	0,2812	M	M
F	M	0,1406	0,1406	0,1406	0,1406	0,1406	0,1406	0,1406	0,1406	0,1406	M	M
G	M	0,0703	0,0703	0,0703	0,0703	0,0703	0,0703	0,0703	0,0703	0,0703	M	M
H	M	PK1	PK1	PK1	NK	NK	NK	PK2	PK2	PK2	M	M

DK – diluční kontrola; **PK** – pozitivní kontrola; **NK** – negativní kontrola; **M** – pouze médium

5 Výsledky

Provedením výše popsaného experimentu byly získány a zpracovány údaje o skladbě a koncentraci MCFA ve zkoumaných olejích a o MIC jednotlivých rostlinných olejů na konkrétní kmeny bakterií, použitých během pokusu, pomocí mikrodiluční metody v tekutém médiu.

5.1 Plynová chromatografie rostlinných olejů MCFA

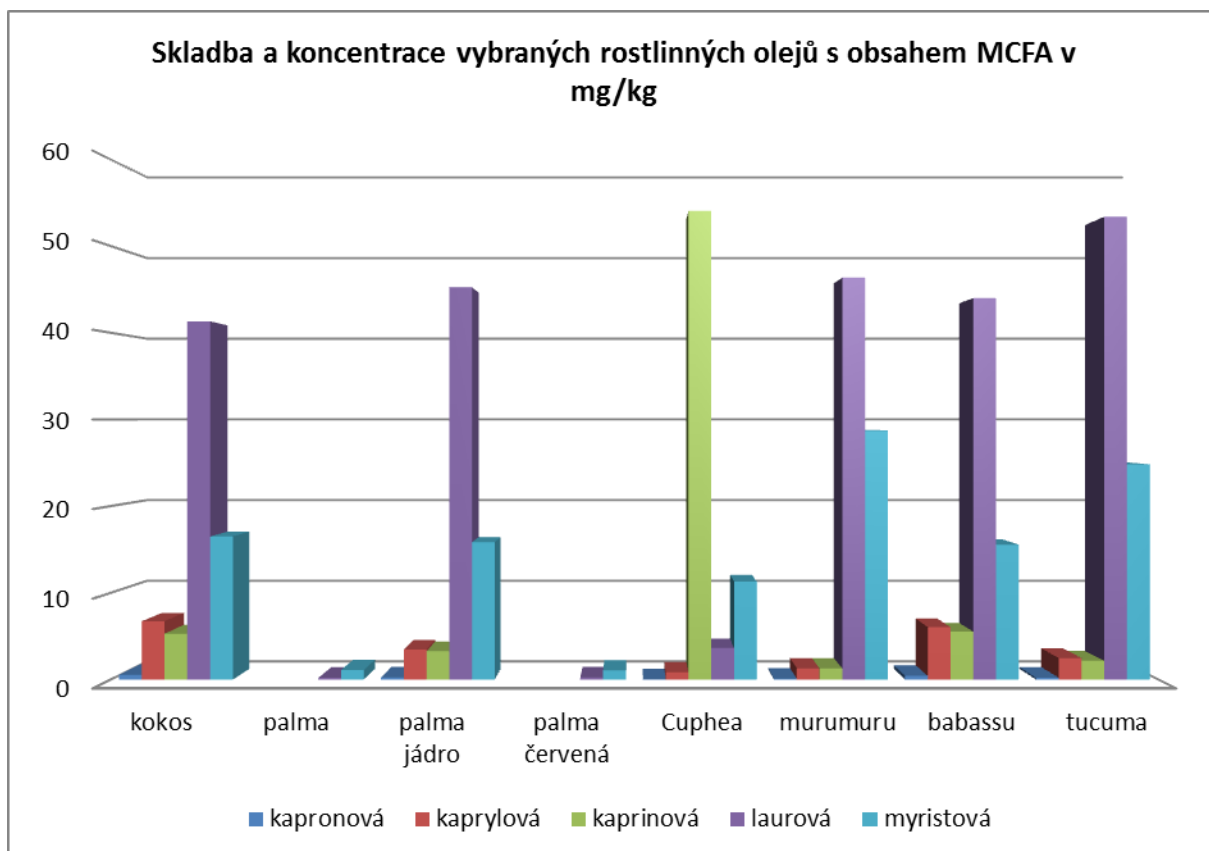
Porovnáním retenčních časů analyzovaných MK se standardy bylo identifikováno složení všech zkoumaných rostlinných olejů.

Jako MCFA o nejvyšší koncentraci byly v rostlinných olejích zjištěny kyselina kaprinová a kyselina laurová. V oleji z rostliny *Cuphea* byla v nejvyšší míře detekována kyselina kaprinová v koncentraci 54,04 mg/kg. Kyselina laurová byla majoritní MCFA v následujících olejích v příslušných koncentracích: kokosový olej – 41,31 mg/kg, palmojádrový olej – 45,24 mg/kg, muru-muru olej – 46,34 mg/kg, babassu olej – 43,98 mg/kg a tucuma olej – 53,37 mg/kg. V palmovém a v červeném palmovém oleji nebyla přítomnost MCFA zjištěna – viz Tabulka 10 a Graf 11.

Tabulka 10: Koncentrace MCFA ve vybraných olejích v mg/kg (průměr dvou analýz, každá v triplikátu)

Původ oleje	Mastná kyselina				
	kapronová	kaprylová	kaprinová	laurová	myristová
kokos	0,55	6,73	5,29	41,31	16,5
palma	-	-	-	0,2	1,1
palma jádro	0,25	3,48	3,27	45,24	15,85
palma červená	-	-	-	0,23	1,05
<i>Cuphea</i>	0,01	0,82	54,04	3,63	11,31
muru-muru	0,10	1,29	1,30	46,34	28,72
babassu	0,43	6,05	5,52	43,98	15,56
tucuma	0,21	2,47	2,15	53,37	24,82

Graf 11: Skladba a koncentrace vybraných rostlinných olejů s obsahem MCFA v mg/kg



5.2 MIC vybraných rostlinných olejů MCFA

Z naměřených hodnot zákalu v jamkách mikrotitračních destiček po inkubaci zásobního roztoku osmi rostlinných olejů a dvaceti bakteriálních kmenů byly vypočítány hodnoty MIC pro vybrané oleje a bakterie. Měřením MIC byla určena i citlivost testovaných bakterií k penicilinu G.

Nebyla pozorována antimikrobiální aktivita rostlinných olejů bez předchozího štěpení lipázou, a proto se níže zmíněné výsledky vztahují pouze na oleje po naštěpení porcinní pankreatickou lipázou. Obecně lze také konstatovat, že ani u testovaných olejů s přidávkou lipázy nebyla prokázána inhibiční aktivita vůči gramnegativním bakteriím a vůči bakteriím *Bifidobacterium spp.* – viz Tabulka 11.

Inhibiční koncentrace olejů MCFA se pohybovala v rozmezí 0,14 až 4,5 mg/ml – viz Tabulka 11.

Nejnižší inhibiční koncentrace byla zjištěna u tucuma oleje při použití na kmen *C. perfringens* CIP 105178 a to 0,14 mg/ml. Druhou nejnižší koncentrací schopnou inhibice (0,28 mg/ml)

vykazovalo zároveň muru-muru a babassu olej opět ke kmeni *C. perfringens* CIP 105178. Tyto hodnoty MIC se nevyskytly u žádných jiných vybraných rostlinných olejů. Minimální inhibiční koncentrace 0,56 mg/ml byla zaznamenána u babassu oleje vůči *C. perfringens* CNCTC 3659 a UGent 56, u kokosového oleje vůči *S. aureus* ATCC 25923, u *Cuphea* oleje vůči *C. perfringens* CIP 105179, u muru-muru oleje vůči *C. perfringens* UGent 56 a u tucuma oleje vůči *S. aureus* ATCC 25923 – viz Tabulka 11.

Nejcitlivějšími bakteriálními kmeny vůči testovaným olejům byli *E. cecorum* CCM 3659, *E. cecorum* CCM 4285 a *S. aureus* ATCC 25923, u kterých došlo k inhibici růstu použitím šesti olejů. Pět olejů ovlivnilo nárůst kolonií *C. perfringens* CIP 105178 a čtyři oleje inhibovaly růst *C. perfringens* CNCTC 3659 a UGent 56. *L. monocytogenes* byla ovlivněna pouze jedním olejem (*Cuphea*) – viz Graf 12 až 15. Ostatní bakteriální kmeny nebyly ovlivněny působením testovaných olejů.

Nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazoval olej ze semen rostliny *Cuphea*, který byl schopen inhibice sedmi různých kmenů bakterií (35 % úspěšnost). Následoval babassu a muru-muru olej, u kterých byla zjištěna inhibiční schopnost u šesti bakteriálních kmenů (30 % úspěšnost). Třetí v pořadí s pěti kmeny (25 % úspěšnost), u kterých se projevilo omezení růstu, byl palmojádrový a tucuma olej. Kokosový olej prokázal inhibiční aktivitu u třech kmenů (15 % úspěšnost). Antimikrobiální účinek nebyl zaznamenán u palmového a palmového červeného oleje – viz Tabulka 12.

Nebylo zjištěno, že by anaerobní bakterie byly citlivější k vybraným olejům oproti aerobním bakteriím či naopak. Nebyl zjištěn antibakteriální účinek rostlinných olejů vůči testovaným prospěšným bakteriím trávicího traktu.

Tabulka 11: MIC vybraných rostlinných olejů MCFA v mg/ml

Bakteriální kmen	Zdroj kmene	Původ oleje								Penicilin G (µg/mL)
		palma	kokos	babassu	palma červená	Cuphea	palma jádro	murru-muru	tucuma	
<i>Bifidobacterium animalis</i>	CCM 4988	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	0,25
	MA5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	0,25
<i>Bifidobacterium longum</i>	CCM 4990	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	0,5
	TP1	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	1
<i>Campylobacter jejuni</i>	CAMP/VFU 612/21	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	25
	CCM 6189	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	25
<i>Clostridium perfringens</i>	CNCTC 3659	> 4,5	> 4,5	0,56	> 4,5	4,50	1,12	1,12	> 4,5	0,03
	UGent 56	> 4,5	> 4,5	0,56	> 4,5	2,25	> 4,5	0,56	1,12	0,03
	CIP 105178	> 4,5	> 4,5	0,28	> 4,5	0,56	2,25	0,28	0,14	0,03
<i>Enterococcus cecorum</i>	CCM 3659	> 4,5	2,25	4,5	> 4,5	2,25	2,25	2,25	2,25	1
	CCM 4285	> 4,5	1,12	2,25	> 4,5	1,12	2,25	1,12	2,25	1
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 29522	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	50
	C6	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	100
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCM 4833	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	0,125
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CCM 91	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	0,125
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	1,12	> 4,5	> 4,5	> 4,5	1
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	10
<i>Salmonella infantis</i>	K2	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	10
<i>Salmonella typhimurium</i>	K3	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 100
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	> 4,5	0,56	1,12	> 4,5	2,25	1,12	1,12	0,56	0,03

Tabulka 12: Souhrnné zobrazení MIC testovaných olejů v mg/ml

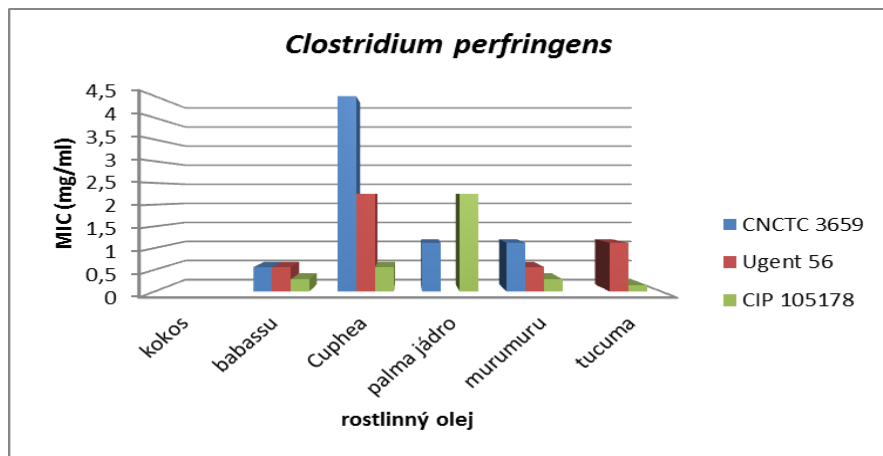
Původ oleje	BA		BL		CJ		CP			ECe		ECo		LA	LF	LM	SE	SI	ST	SA
	CCM 4988	MA5	CCM 4990	TPI	CAMP/VFU 612/21	CCM 6189	CNCTC 3659	UGent 56	CIP 105178	CCM 3659	CCM 4285	ATCC 29522	C6	CCM 4833	CCM 91	ATCC 7644	ATCC 13076	K2	K3	ATCC 25923
kokos																				
palma																				
palma červená																				
palma jádro																				
<i>Cuphea</i>																				
murumuru																				
tucuma																				
babassu																				

BA – *B. animalis*, BL – *B. longum*, CJ – *C. jejuni*, CP – *C. perfringens*, ECe – *E. cecorum*, ECo – *E. coli*, LA – *L. acidophilus*,
 LF – *L. fermentum*, LM – *L. monocytogenes*, SE – *S. enteritidis*, SI – *S. infantis*, ST – *S. typhimurium*, SA – *S. aureus*

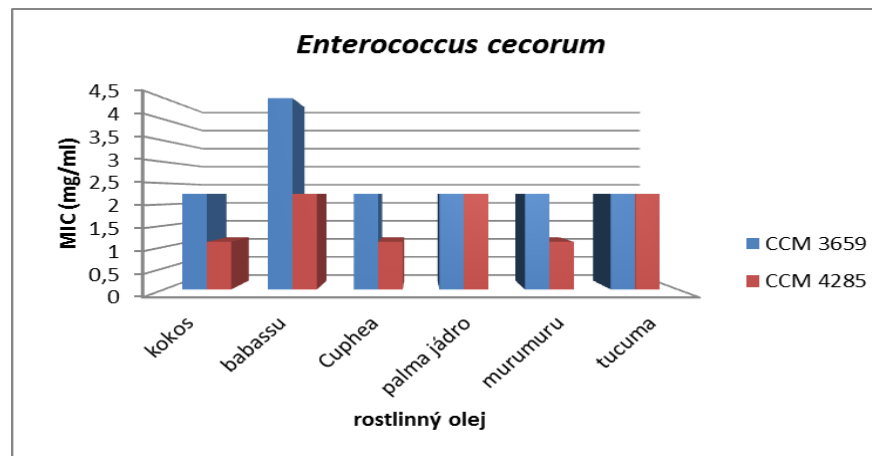
MIC v mg/ml

0,14	0,28	0,56	1,12	2,25	4,5	> 4,5
------	------	------	------	------	-----	-------

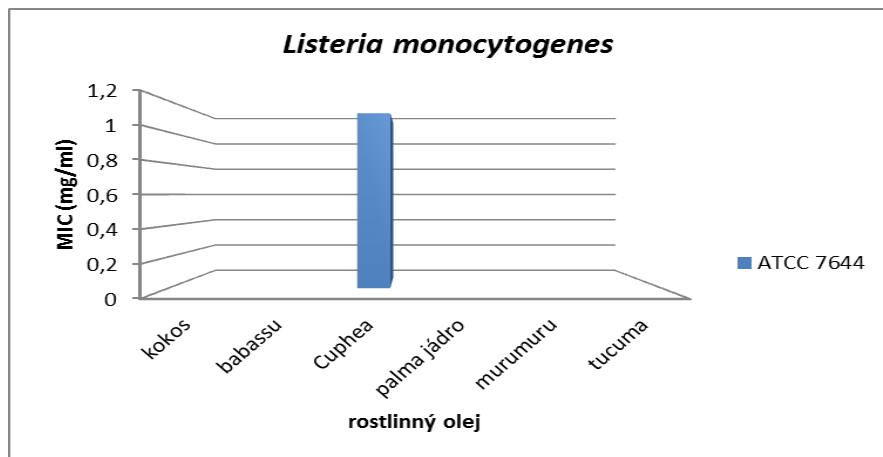
Graf 12: MIC rostlinných olejů vůči kmenům *C. perfringens*



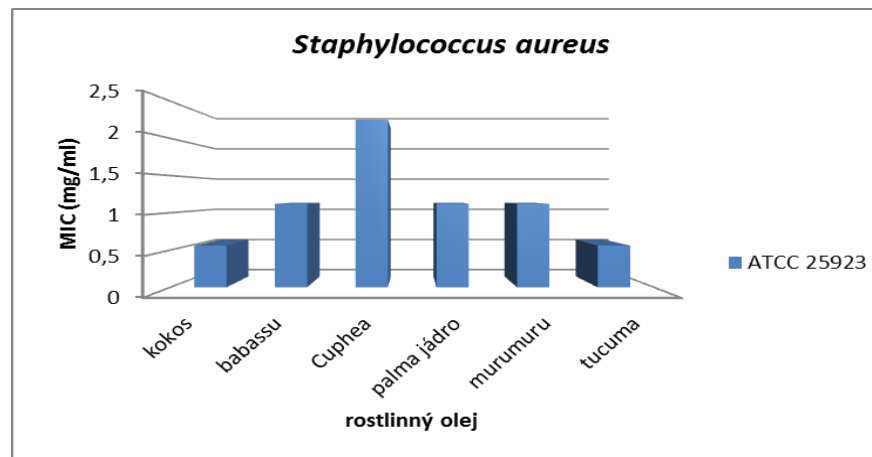
Graf 13: MIC rostlinných olejů vůči kmenům *E. cecorum*



Graf 14: MIC rostlinných olejů vůči *L. monocytogenes*



Graf 15: MIC rostlinných olejů vůči *S. aureus*



6 Diskuze

Alimentární onemocnění způsobená bakteriemi jsou stále jednou z největších hrozeb pro veřejné zdraví (WHO, 2016). Vzhledem k rostoucí rezistenci k léčivům u řady bakterií (Friedman, 2015) a z toho vyplývajícího zákazu užívání antibiotických stimulátorů růstu v chovech hospodářských zvířat (EU, 2003), je nezbytné hledat nové zdroje substancí s antibakteriálními účinky, jejichž největším zdrojem jsou přírodní látky (Clardy a Walsh, 2004). Jedním z těchto zdrojů mohou být rostlinné oleje obsahující MCFA. Tyto lipidy mohou být běžně nalezeny v přírodních produktech, například v mléce, a proto lze předpokládat, že jsou netoxické k mukóze trávicího traktu (alespoň v nízkých koncentracích) a mohou být potenciálními inhibičními faktory vůči řadě humánních i zvířecích patogenů (Isaacs *et al.*, 1994; Isaacs *et al.*, 1995).

V literatuře je k nalezení pouze omezené množství studií antibakteriální aktivity vybraných rostlinných olejů vůči enteropatogenním či komenzálním bakteriím. Ucelená studie, která by se zabývala nejen účinky MCFA na enteropatogenní bakterie, ale i na bakterie trávení prospěšné, nebyla dosud zpracována. Jelikož by však možná inhibice komenzálních bakterií byla kontraproduktivní vlastností látek s obsahem MCFA, jsou tyto chybějící poznatky nezbytné. Nejsou také dostupné žádné informace o antibakteriálních účincích MCFA k testovanému *E. cecorum* a zde uvedené výsledky jsou proto těžce srovnatelné se soudobou literaturou.

V předchozí kapitole zmíněné výsledky dokazují, že MCFA vykazují antibakteriální aktivitu vůči různým druhům bakterií v různých MIC. Vnější membrána gramnegativních bakterií představuje bariéru proti MK (Sun *et al.*, 2003), naopak buněčná stěna grampozitivních bakterií umožňuje začlenění těchto MK do vnitřní bakteriální membrány (Galbraith a Miller, 1973; Sheu *et al.*, 1975; Sheu a Freese, 1972; Zheng *et al.*, 2005).

Tyto poznatky odpovídají výsledkům zjištěným výše uvedeným experimentem, kdy vybrané rostlinné oleje s obsahem MCFA byly aktivní pouze vůči grampozitivním kmenům bakterií, s výjimkou kmenů *Bifidobacterium animalis* a *B. longum*, které také náleží do skupiny grampozitivních bakterií, ale jejichž růst nebyl inhibován ani jedním testovaným. Je však nutno dodat, že testování antimikrobiální citlivosti anaerobních a pomaleji rostoucích bakterií, mezi které bifidobakterie patří, je značně složité a často je pro přesné výsledky nutné provést velké množství opakování. Rezistence k MCFA může být u bakterií *Bifidobacterium spp.*

vyvolávána absencí ferredoxinového systému, který je zodpovědný za metabolizaci výchozích látek a je příčinou rozsáhlé schopnosti odolávat např. metronidazolu, antibiotika účinného vůči prakticky všem obligátním anaerobům (Lim *et al.*, 1993). Negativní antibakteriální efekt i vůči dalším trávení přínosným bakteriím *Lactobacillus acidophilus* a *L. fermentum* pozorovaný ve vlastním experimentu je ve shodě s Kodickem a Wordenem (1945), kteří konstatují, že kyselina kaprylová a kaprinová vykazují pouze malou inhibiční aktivitu vůči *L. helveticus* inokulovaným do média s přidavkem riboflavinu a soli. Tato skutečnost je velice pozitivním a vítaným efektem MCFA. Výjimkou z výše uvedené skutečnosti je prokazatelná aktivita MCFA (obzvláště kyseliny laurové) vůči gramnegativní bakterii *Neisseria gonorrhoeae*, která je původcem kapavky (Bergsson *et al.*, 1999). Tento rozdíl je však pravděpodobně dán rozdílnou metodikou, která byla ve výše zmíněném experimentu použita.

MK (mezi nimi konkrétně jmenovaná kaprylová, kaprinová a laurová kyselina) (FDA, 2015b) a jejich triacylglyceroly (MCT, medium-chain triacylglycerols) (Sloan, 2012) mají jakožto víceúčelová potravinářská aditiva v lidské potravě americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv uznaný GRAS status, stejně jako kyselina kapronová, která je povoleným aditivem do potravin určených k výživě člověka (FDA, 2015c). Z vybraných olejů, použitých v experimentu, má toto hodnocení přímo také kokosový olej (FDA, 2015d).

Vzhledem k výše uvedené bezpečnosti MCFA simulují Decuypere a Dierick (2002b) jejich přidání spolu s exogenní lipázou do krmné směsi pro selata namísto antibiotických preparátů *in vitro* a konstatují, že přidavek těchto složek vykazuje významné potlačení výskytu nežádoucích mikroorganismů trávicího traktu. V následujícím *in vivo* testu poté zjišťují, že kontrolované uvolňování MCFA se rovná stupni potlačení bakteriálních počtů v žaludku zvířat (Dierick *et al.*, 2002a) a konstatují, že množství MCFA, schopné k potlačení střevní mikrobioty, je 0,35 g na 100 g média. Příznivý efekt MCFA na vývoj trávicího traktu u selat po odstavu zjišťují Tang *et al.* (1999). Pozitivní změny (zvětšení klků) v trávicím traktu pozorují Dierick *et al.* (2003) u selat, kterým byla předkládána krmná dávka s přidavkem semen *Cuphea* a exogenní lipázy, a připisují je shodně s výsledky této práce právě vysokému obsahu kyseliny kaprinové v oleji ze semen *Cuphea*. Převažující obsah kyseliny kaprylové v semenech *C. painteri* a *C. hookeriana*, výše popsány v rešerši, je významný především v souvislosti s její absencí v semenech palem a zároveň k jejímu antibakteriálnímu potenciálu. Je však nutno zmínit, že *Cuphea* semena nejsou běžně dostupnou součástí krmných směsí v Evropě, a proto je jejich využití značně omezené. Příznivý efekt na strukturu epitelu

trávicího traktu pozorují ve svém experimentu s krmením selat směsmi s přídavkem kyseliny kaprylové, kaprinové a/nebo fumarové také Hanczakowska *et al.* (2011). Navíc sledují také snížení úmrtnosti u selat krmených směsmi s těmito MK; efektivnější využití živin krmiva při současném zkrmování kyseliny kaprylové; u směsi s kyselinou fumarovou a kaprinovou uvádí také snížení počtu *C. perfringens* (Hanczakowska *et al.*, 2011), které odpovídá výsledkům experimentu této práce. Zde jsou však pozorovány nižší MIC vůči kmenům *C. perfringens* u olejů s vyšším obsahem kyseliny laurové než kyseliny kaprinové, což je však pravděpodobně dáno tím, že Dierick *et al.* (2003) i Hanczakowska *et al.* (2011) uskutečňují své pokusy v *in vivo* podmínkách, zatímco zde proběhl experiment *in vitro*. Proto nejsou dosažené výsledky stoprocentně srovnatelné. Toxicitu *C. perfringens* ke kyselině kaprinové popisují také Sprong *et al.* (2001).

Kyselinu laurovou jako nejvýznamnější MCFA schopnou inhibice *C. perfringens* potvrzují i jiné práce – Galbraith *et al.* (1971) uvádějí inhibici *C. perfringens* při koncentraci 0,05 mg/ml kyseliny laurové; Skřivanová *et al.* (2005) stanovují ve své práci inhibiční koncentraci kyseliny laurové, při které dochází k utilizaci 50 % glukózy z média po jednodenní inkubaci (IC₅₀), vůči *C. perfringens* 0,04 mg/ml; v další práci potom určují MIC jako koncentraci kyseliny laurové způsobující viditelné potlačení růstu a zároveň snížení pH kultury *C. perfringens* mezi 0,1–0,2 mg/ml v závislosti na testovaném kmenu (Skřivanová *et al.*, 2006). Výše uvedené výsledky se shodují s touto prací, kdy byla nejnižší MIC zjištěna po aplikaci tucuma oleje (obsahujícího cca 64 % kyseliny laurové) vůči *C. perfringens* 0,14 mg/ml. Prevencí kampylobakteriízy v chovech drůbeže tak může být již prokázaný přídavek kyseliny kaprylové (Grilli *et al.*, 2013) a kaprinové (Molatová *et al.*, 2011) do krmné dávky, současně však lze díky výše uvedeným výsledkům uvažovat i o možné inhibici pomocí kyseliny laurové.

Jak již bylo uvedeno, kyselina laurová je v literatuře označována nejčastěji jako MCFA s nejsilnějším antibakteriálním účinkem (Galbraith *et al.*, 1971; Sun *et al.*, 2003). Její prevalence ve většině testovaných rostlinných olejů je proto předpokládaným klíčem jejich antibakteriální aktivity. Vzhledem k tomu, že kokosový, palmojádrový, muru-muru, babassu i tucuma olej obsahují více jak 50 % kyseliny laurové, je zřejmé, odkud pochází jejich schopnost inhibovat bakterie *Staphylococcus aureus*. MIC vybraných rostlinných olejů vůči těmto bakteriím se pohybuje v rozmezí od 0,56 mg/ml (kokosový a tucuma olej – majoritní kyselina laurová), přes 1,12 mg/ml (babassu, palmojádrový a muru-muru olej – majoritní

kyselina laurová), do 2,25 mg/ml (*Cuphea* olej – majoritní kyselina kaprinová), a odpovídají hodnotám MIC, ke kterým docházejí Batovska *et al.* (2009) při testování účinku kyseliny kaprinové (MIC=2,5 mg/ml nebo 5,0 mg/ml dle testovaného kmene) a kyseliny laurové (MIC=1,25 mg/ml) vůči *S. aureus* pomocí diskové difúzní metody. Ubogogu (2006) ve své práci dochází diskovou difúzní metodou k názoru, že palmojádrový olej vykazuje antimikrobiální efekt vůči *S. aureus*, avšak konstatuje, že zjištěný rozsah účinku by v *in vivo* podmínkách byl pravděpodobně vyšší, vzhledem k tomu, že kyselina laurová v těle člověka a zvířat tvoří monolaurin, který vykazuje větší antibakteriální efekt (Enig, 2001).

Ferreira *et al.* (2011) docházejí ve své práci diskovou difúzní metodou k tomu, že babassu olej o koncentraci 10 mg/ml není schopen indukovat inhibiční zónu vůči *S. aureus*, ani *E. coli*. Jejich závěr je dán tím, že neprovedli předchozí štěpení olejů před jejich aplikací, což odpovídá závěru popsanému v kapitole 5.2 této práce, a sice, že rostlinné oleje s obsahem MCFA nevykazují bez předchozího štěpení lipázou žádný antibakteriální efekt vůči testovaným kmenům. Po štěpení porcinní pankreatickou lipázou se však babassu olej jeví jako jeden z neaktivnějších a *S. aureus* inhibuje již při koncentraci 1,12 mg/ml.

Batovska *et al.* (2009) ve výše zmiňované práci také uvádějí hodnoty MIC vůči bakteriím *Listeria monocytogenes*, a sice 2,5 mg/ml u kyseliny kaprylové a kaprinové a 0,31 mg/ml u kyseliny laurové. Vzhledem k rozdílným metodikám tyto výsledky neodpovídají přesně hodnotám naměřeným v této práci (MIC 1,12 mg/ml u *Cuphea* oleje s dominantní kyselinou kaprinovou), avšak potvrzují inhibiční schopnost kyseliny kaprinové vůči tomuto bakteriálnímu rodu.

Dle výsledků Hassinena *et al.* (1951), kteří uvádí, že kyselina kaprinová a laurová inhibují růst grampozitivních i gramnegativních bakterií včetně *Escherichia coli*, a Marounka *et al.* (2003), dle kterých je nejen kyselina kaprinová, ale i kaprylová schopná omezit růst různých kmenů *E. coli*, by bylo možné předpokládat, že *Cuphea* olej by měl vykazovat inhibiční aktivitu vůči *E. coli*, vzhledem k vysokému obsahu kyseliny kaprinové. Stejný výsledek by bylo možné očekávat také u olejů s převažujícím obsahem kyseliny laurové (kokosový, palmojádrový, muru-muru, babassu a tucuma olej). Antimikrobiální účinek kokosového oleje v krémových emulzích proti *E. coli* popisuje ve své práci Oyi (2010). Tento předpoklad se však nepotvrdil, protože ani jeden z vybraných olejů neinhiboval růst *E. coli* v žádné z měřených koncentrací.

Daný výsledek může být dán rozdílnou citlivostí různých kmenů k MCFA a rozdílnými metodikami použitými k určení MIC, kdy Marounek *et al.* (2003) určují tuto jako koncentraci MCFA, při které je utilizováno 50 % glukózy z média po jednodenní inkubaci. Význam může být přisuzován také závislosti antibakteriálního účinku MCFA na pH, při kterém účinkují na bakterie – prokázána vyšší aktivita při pH <6 (Marounek *et al.*, 2003), přičemž pH použitého média bylo $\pm 7,1$ (Wilkins-Chalgren) a $\pm 7,5$ (Nutrient Broth No. 2). U testovaných olejů nebylo pH měřeno.

Nebyla prokázána citlivost bakterií rodu *Salmonella spp.* k vybraným olejům. Tento výsledek je ve shodě se Skřivanovou *et al.* (2004; 2006; 2015), kteří uvádí, že MCFA s výraznými antibakteriálními vlastnostmi vůči *S. enteritidis*, *S. infantis* a *S. typhimurium* je kyselina kaprylová, která však není převažující MCFA v žádném z testovaných olejů (maximální koncentrace zde pouze 7 mg/kg). Antibakteriální efekt kyseliny kaprylové byl pozorován také snížením počtu *S. enteritidis* v trávicím traktu kuřat (Kollanoor-Johny *et al.*, 2012). Duarte *et al.* (2002) konstatují, že vodný roztok rostliny *Cuphea* vykazuje účinky vůči gramnegativním (*E. coli*, *S. typhimurium*) i grampozitivním (*S. aureus*) bakteriím; nespécifikuje však, z kterých částí rostliny byl výluh proveden, ani které biologicky aktivní látky mohou být původci tohoto mechanismu.

Oba testované kmeny *Enterococcus cecorum* patří vedle *S. aureus* k nejcitlivějším kulturám, které byly použity v experimentu, vzhledem k tomu, že byly inhibovány šesti z osmi testovaných olejů. Jak již bylo zmíněno výše, literatura o antibakteriálních účincích MK vůči *E. cecorum* není dostupná, avšak Orhan *et al.* (2011) ve své práci zkoumají vliv jedlých olejů bohatých na LCFA vůči *E. faecalis* a pozorují jejich významnou inhibiční schopnost vůči tomuto bakteriálnímu druhu. Bylo také prokázáno, že během kultivace v přítomnosti monoacylglycerolů (MAG) dochází již při koncentraci 25 mg/l k opoždění růstu (tzv. lag time) *E. faecalis*. Nejúčinnějším se jeví MAG kyseliny laurové, opoždění růstu však způsobují i MAG kyseliny kaprinové a kaprylové (Buňková *et al.*, 2011). Vzhledem k výše uvedenému lze předpokládat, že kyselina laurová a kyselina kaprinová, obsažené v testovaných olejích, jsou příčinou inhibice růstu *E. cecorum*.

7 Závěr

Cíl této diplomové práce, stanovit minimální inhibiční koncentrace olejů s obsahem mastných kyselin pro vybrané enteropatogenní a komenzální bakterie s nebo bez předchozího štěpení pankreatickou lipázou, byl splněn.

Teoretický úvod do tématu v podobě shrnutí soudobých poznatků spojených s antibakteriálními účinky mastných kyselin o střední délce řetězce byl poskytnut v první části práce za pomoci přehledu odborné literatury. Enteropatogenní bakterie jsou kauzálními původci řady onemocnění, která na celém světě způsobují četné ztráty na životech i ekonomickém zisku. Vzhledem k evropskému zákazu užívání antibiotických preparátů ve výživě zvířat (s výjimkou kokcidostatik a histomonostatik), je třeba hledat nové potenciální zdroje látek schopných potlačovat šíření patogenních bakterií trávicího traktu, jakými jsou například bakteriociny, rostlinné extrakty, probiotika, prebiotika, enzymy a organické kyseliny, zahrnující i MCFA, které jsou dle FDA bezpečné pro použití v potravinách určených k výživě člověka, a proto i jako aditiva do krmiv pro hospodářská zvířata.

Praktická část práce prokazuje platnost řady vědeckých poznatků nabytých v rešerši. Výsledky této práce, získané pomocí standardizované mikrodiluční metody v 96-jamkové mikrotitrační destičce, upravené dle nejnovějších poznatků, potvrzují, že rostlinné oleje obsahující MCFA mají po štěpení lipázou antibakteriální účinky vůči řadě enteropatogenních bakterií. Byl zjištěn významný antibakteriální efekt MCFA na růst grampozitivních bakterií. Testované oleje projevily své inhibiční schopnosti v rozmezí koncentrací od 4,5 do 0,14 mg/ml. Olejem s nejširší možností uplatnění byl olej ze semen rostliny *Cuphea*, schopný inhibice 7 testovaných bakteriálních kmenů. Nejefektivnějším byl tucuma olej, který inhiboval růst bakterií *C. perfringens* CIP 105178 již při koncentraci 0,14 mg/ml. Neúčinný vůči všem z 20ti testovaných bakteriálních kmenů byl palmový a palmový červený olej. Neprokázaný antibakteriální efekt testovaných rostlinných olejů vůči bakteriím *E. coli* je třeba vzhledem k rozdílným poznatkům z literární rešerše brát jako nejistý. Kladně lze hodnotit negativní antibakteriální efekt MCFA vůči trávení prospěšným bakteriím (*Lactobacillus spp.* a *Bifidobacterium spp.*).

Lze konstatovat, že MCFA jsou vhodnou alternativou k antibiotickým látkám se zakázaným stimulačním účinkem vzhledem k nízkým koncentracím, ve kterých jsou schopny účinkovat v podmínkách *in vitro*, což potvrzuje prvotní hypotézu této práce.

8 Seznam použité literatury

- Aarestrup, F. M. 2003.** Effects of termination of AGP use on antimicrobial resistance in food animals. In: Carlsson, S., Pedersen, L. T. (eds). *Working papers for the WHO international review panels evaluation: Beyond Antimicrobial Growth Promoters in Food Animal Production*. World Health Organization. Geneve. p. 6-11. ISSN: 13979892.
- Abbès, S., Salah-Abbès, J. B., Nahdi, K., Younes, R. B., Hetta, M. M., El-Kady, A. A., Abdel-Wahhab, M. A., Oueslati, R. 2007.** Inactivation of cadmium induced immunotoxicological alterations in rats by Tunisian montmorillonite clay. *International immunopharmacology*. **7 (6)**. 750-760.
- Abd El-Khalek, E., Kalmar, I., De Vroey, M., Ducatelle, R., Pasmans, F., Werquin, G., Janssens, G. 2012.** Indirect evidence for microbiota reduction through dietary mannanoligosaccharides in the pigeon, an avian species without functional caeca. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. **96 (6)**. 1084-1090.
- Abraham, E. P., Chain, E. 1940.** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. **146 (3713)**. 837.
- Acheson, D., Keusch, G. 1995.** *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. In: Blaser, M. J., Smith, P. D., Ravdin, J. F., Greenberg, H. B., Guerrant, R. L. (eds). *Infections of the gastrointestinal tract*. Raven Press. New York. p. 763-775. ISBN: 0781702267.
- Adolph, S., Bach, S., Blondel, M., Cueff, A., Moreau, M., Pohnert, G., Poulet, S. A., Wichard, T., Zuccaro, A. 2004.** Cytotoxicity of diatom-derived oxylipins in organisms belonging to different phyla. *Journal of Experimental Biology*. **207 (17)**. 2935-2946.
- Ahowesso, C., Black, P. N., Saini, N., Montefusco, D., Chekal, J., Malosh, C., Lindsley, C. W., Stauffer, S. R., DiRusso, C. C. 2015.** Chemical inhibition of fatty acid absorption and cellular uptake limits lipotoxic cell death. *Biochemical Pharmacology*. **98 (1)**. 167-181.

- Almendingen, K., Jordal, O., Kierulf, P., Sandstad, B., Pedersen, J. 1995.** Effects of partially hydrogenated fish oil, partially hydrogenated soybean oil, and butter on serum lipoproteins and Lp [a] in men. *Journal of lipid research*. **36 (6)**. 1370-1384.
- Almirall, M., Esteve-Garcia, E. 1994.** Rate of passage of barley diets with chromium oxide: Influence of age and poultry strain and effect of β -glucanase supplementation. *Poultry Science*. **73 (9)**. 1433-1440.
- Almirall, M., Francesch, M., Perez-Vendrell, A. M., Brufau, J., Esteve-Garcia, E. 1995.** The differences in intestinal viscosity produced by barley and b-glucanase alter digesta enzyme activities and ileal nutrient digestibilities more in broiler chicks than in cocks. *Journal of Nutrition*. **125 (4)**. 947-955.
- Altmeier, W., Lewis, S., Schlievert, P., Bergdoll, M., Bjornson, H., Staneck, J., Crass, B. 1982.** *Staphylococcus aureus* associated with toxic shock syndrome: phage typing and toxin capability testing. *Annals of internal medicine*. **96 (6)**. 978-982.
- Aluyor, E. O., Ori-Jesu, M. 2008.** The use of antioxidants in vegetable oils—A review. *African Journal of Biotechnology*. **7 (25)**. 4836-4842.
- Aminov, R. I. 2010.** A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*. **1 (1)**. 134.
- Andrade, A. M. d., Passos, P. R. d. A., Marques, L. G. d. C., Oliveira, L. B., Vidaurre, G. B., Rocha, J. D. S. 2004.** Pirólise de resíduos do coco-da-baía (*Cocos nucifera* L.) e análise do carvão vegetal. *Revista árvore*. **28 (5)**. 707-714.
- Archibald, L. K., Jarvis, W. R. 2011.** Health care-associated infection outbreak investigations by the Centers for Disease Control and Prevention, 1946–2005. *American journal of epidemiology*. **174 (11)**. 47-64.
- Arias, C. A., Contreras, G. A., Murray, B. E. 2010.** Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinical microbiology and infection*. **16 (5)**. 555-562.
- Arlee, R., Suanphairoch, S., Pakdeechanuan, P. 2013.** Differences in chemical components and antioxidant-related substances in virgin coconut oil from coconut hybrids and their parents. *International Food Research Journal*. **20 (5)**. 2103-2109.

- Armstrong, G. J. 1969.** Disease in ancient Nubia. *Science*. **163 (3864)**. 255-259.
- Arora, R., Chawla, R., Marwah, R., Arora, P., Sharma, R. K., Kaushik, V., Goel, R., Kaur, A., Silambarasan, M., Tripathi, R. P., Bhardwaj, J. R. 2010.** Potential of complementary and alternative medicine in preventive management of novel H1N1 flu (Swine Flu) pandemic: thwarting potential disasters in the bud. *Evidence-Based complementary and alternative medicine*. **1 (1)**. 1-16.
- Austen, R., Trust, T. 1980.** Detection of plasmids in the related group of the genus *Campylobacter*. *FEMS Microbiology Letters*. **8 (4)**. 201-204.
- Avancini, C., Wiest, J. M., Dall'Agnol, R., Haas, J. S., von Poser, G. L. 2008.** Antimicrobial Activity of Plants Used in the Prevention and Control of Bovine Mastitis in Southern Brazil. *Latin American Journal of Pharmacy*. **27 (6)**. 894-899.
- Awad, M. M., Ellemor, D. M., Boyd, R. L., Emmins, J. J., Rood, J. I. 2001.** Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. *Infection and immunity*. **69 (12)**. 7904-7910.
- Babayan, V. K. 1987.** Medium chain triglycerides and structured lipids. *Lipids*. **22 (6)**. 417-420.
- Bach, A. C., Babayan, V. K. 1982.** Medium-chain triglycerides: an update. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **36 (5)**. 950-962.
- Bassett, E. J., Keith, M. S., Armstrong, G. J., Martin, D. L., Villanueva, A. R. 1980.** Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (AD 350). *Science*. **209 (4464)**. 1532-1534.
- Batovska, D. I., Todorova, T., Tsvetkova, V., Najdenski, H. M. 2009.** Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: individual effects and synergistic relationships. *Polish Journal of Microbiology*. **58 (1)**. 43-47.
- Baxter, H., Harborne, J. B. Moss, G. P. 1999.** Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants. *Taylor & Francis*. London. p. 985.

- Beck, V., Jabůrek, M., Demina, T., Rupprecht, A., Porter, R. K., Ježek, P., Pohl, E. E. 2007.** Polyunsaturated fatty acids activate human uncoupling proteins 1 and 2 in planar lipid bilayers. *The FASEB Journal*. **21 (4)**. 1137-1144.
- Behravesh, C. B., Jones, T. F., Vugia, D. J., Long, C., Marcus, R., Smith, K., Thomas, S., Zansky, S., Fullerton, K. E., Henao, O. L. Scallan, E. 2011.** Deaths associated with bacterial pathogens transmitted commonly through food: foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 1996-2005. *The Journal of infectious diseases*. **204 (2)**. 263-267.
- Belay, G., Tariku, Y., Kebede, T., Hymete, A., Mekonnen, Y. 2011.** Ethnopharmacological investigations of essential oils isolated from five Ethiopian medicinal plants against eleven pathogenic bacterial strains. *Phytopharmacology*. **1 (5)**. 133-143.
- Benkendorff, K., Davis, A. R., Rogers, C. N., Bremner, J. B. 2005.** Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **316 (1)**. 29-44.
- Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Karlsson, S. M., Steingrímsson, Ó., Thormar, H. 1998.** In vitro inactivation of *Chlamydia trachomatis* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **42 (9)**. 2290-2294.
- Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Steingrímsson, Ó., Thormar, H. 2001.** Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *Apmis*. **109 (10)**. 670-678.
- Bergsson, G., Steingrímsson, Ó., Thormar, H. 1999.** In vitro susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **43 (11)**. 2790-2792.
- Biavati, B., Mattarelli, P. 2005.** Genus *Bifidobacterium*. In: Whitman, W. B. (ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; Volume 5: The Actinobacteria. Springer. New York. p. 171-206. ISBN: 9780387950433.
- Bird, A. R., Vuaran, M., Crittenden, R., Hayakawa, T., Playne, M. J., Brown, I. L., Topping, D. L. 2009.** Comparative effects of a high-amylose starch and a

fructooligosaccharide on fecal bifidobacteria numbers and short-chain fatty acids in pigs fed *Bifidobacterium animalis*. *Digestive diseases and sciences*. **54** (5). 947-954.

Bomba, A., Jonecova, Z., Koscova, J., Nemcova, R., Gancarikova, S., Mudronova, D., Scirankova, L., Buleca, V., Lazar, G., Posivak, J., Kastel, R., Marekova, M. 2006. The improvement of probiotics efficacy by synergistically acting components of natural origin: a review. *Biologia*. **61** (6). 729-734.

Bomba, A., Nemcova, R., Gancarcikova, S., Herich, R., Guba, P., Mudronova, D. 2002. Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. *British Journal of Nutrition*. **88** (1). 95-99.

Bontempo, V., Sciannimanico, D., Pastorelli, G., Rossi, R., Rosi, F., Corino, C. 2004. Dietary conjugated linoleic acid positively affects immunologic variables in lactating sows and piglets. *The Journal of nutrition*. **134** (4). 817-824.

Borate, P., Disale, S. D., Ghalme, R. 2013. Studies on isolation, analysis and antimicrobial properties of coconut shell oil. *International Journal of Advanced Science and Technology*. **2** (1). 146-157.

Borovan, L. 2004. Plant alkaloids enhance performance of animals and improve the utilizability of amino acids. *Krmivarstvi*. **6** (1). 36-37.

Bos, J., Smithee, L., McClane, B., Distefano, R., Uzal, F., Songer, J. G., Mallonee, S., Crutcher, J. M. 2005. Fatal necrotizing colitis following a foodborne outbreak of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A infection. *Clinical Infectious Diseases*. **40** (10). 78-83.

Brenner, D. (ed). 2005. Bergey's Manual of Systematics Bacteriology; The *Proteobacteria*. Part C: The *Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Springer. New York. p. 1388. ISBN: 9780387241456.

Brufau, J., Francesch, M., Pérez-Vendrell, A. M. 2006. The use of enzymes to improve cereal diets for animal feeding. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **86** (11). 1705-1713.

- Budavari, S. (ed). 1998.** The Merck Index Text Book [online]. *Merck*. New Jersey. [cit. 2016-01-27]. Dostupné z <<https://www.rsc.org/merck-index>>.
- Budiño, F. E. L., Thomaz, M. C., Kronka, R. N., Nakaghi, L. S. O., Tucci, F. M., Fraga, A. L., Scandolera, A. J., Huaynate, R. A. R. 2005.** Effect of probiotic and prebiotic inclusion in weaned piglet diets on structure and ultra-structure of small intestine. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **48 (6)**. 921-929.
- Buňková, L., Buňka, F., Janiš, R., Krejčí, J., Doležálková, I., Pospíšil, Z., Růžička, J., Tremlová, B. 2011.** Comparison of antibacterial effect of seven 1-monoglycerides on food-borne pathogens or spoilage bacteria. *Acta Veterinaria Brno*. **80 (1)**. 29-39.
- Burdock, G. A. 2009.** Fenaroli's handbook of flavor ingredients. Taylor & Francis. London. p. 2159. ISBN: 9781420090772.
- Caly, D. L., D'Inca, R., Auclair, E., Drider, D. 2015.** Alternatives to antibiotics to prevent necrotic enteritis in broiler chickens: A Microbiologist's perspective. *Frontiers in microbiology*. **6 (1)**. 1336.
- Cao, G., Zeng, X., Chen, A., Zhou, L., Zhang, L., Xiao, Y., Yang, C. 2013.** Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poultry science*. **92 (11)**. 2949-2955.
- Cao, L., Yang, X., Li, Z., Sun, F., Wu, X., Yao, J. 2012.** Reduced lesions in chickens with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis by *Lactobacillus fermentum* 1.2029. *Poultry science*. **91 (12)**. 3065-3071.
- Carlson, S. J., Nandivada, P., Chang, M. I., Mitchell, P. D., O'Loughlin, A., Cowan, E., Gura, K. M., Nose, V., Bistrrian, B. R., Puder, M. 2015.** The addition of medium-chain triglycerides to a purified fish oil-based diet alters inflammatory profiles in mice. *Metabolism*. **64 (2)**. 274-282.
- Case, C., Carlson, M. 2002.** Effect of feeding organic and inorganic sources of additional zinc on growth performance and zinc balance in nursery pigs. *Journal of Animal Science*. **80 (7)**. 1917-1924.

- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., Phillips, I. 2003.** The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **52 (2)**. 159-161.
- Castanon, J. 2007.** History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry science*. **86 (11)**. 2466-2471.
- Castillo, M., Martin-Orue, S., Taylor-Pickard, J., Perez, J., Gasa, J. 2008.** Use of mannan-oligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: Effects on microbiota and gut function. *Journal of Animal Science*. **86 (1)**. 94.
- Castro, M. 2005.** Use of additives on the feeding of monogastric animals. *Cuban Journal of Agricultural Science*. **39 (SI)**. 439-445.
- Cavera, V. L., Arthur, T. D., Kashtanov, D., Chikindas, M. L. 2015.** Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *International journal of antimicrobial agents*. **46 (5)**. 494-501.
- CDC. 2015.** Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2013 (Final Report) [online]. *U.S. Department of Health and Human Services*. Atlanta. [cit. 2016-01-27]. Dostupné z <<http://www.cdc.gov/foodnet/reports/annual-reports-2013.html>>.
- Chamberlain, N. R., Mehrtens, B., Xiong, Z., Kapral, F., Boardman, J., Rearick, J. 1991.** Correlation of carotenoid production, decreased membrane fluidity, and resistance to oleic acid killing in *Staphylococcus aureus* 18Z. *Infection and immunity*. **59 (12)**. 4332-4337.
- Chattaway, F., Thompson, C., Barlow, A. 1956.** The action of inhibitors on dermatophytes. *Biochemical Journal*. **63 (4)**. 648.
- Cheeke, P. 2000.** Actual and potential applications of and saponins in human and animal nutrition. *Journal of Animal Science*. **77**. 1-10.
- Chen, Y., Kwon, O., Min, B., Son, K., Cho, J., Hong, J., Kim, I. 2005.** The effects of dietary Biotite V supplementation as an alternative substance to antibiotics in growing pigs. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. **18 (11)**. 1642.

- Chen, Y.-M., Lee, H.-C., Chang, C.-M., Chuang, Y.-C., Ko, W.-C. 2001.** *Clostridium* bacteremia: emphasis on the poor prognosis in cirrhotic patients. *Journal of microbiology, immunology, and infection= Wei mian yu gan ran za zhi.* **34 (2).** 113-118.
- Chopra, I., Hesse, L., O'Neill, A. 2002.** Discovery and development of new anti-bacterial drugs. *Pharmacochimistry Library.* **32.** 213-225.
- Clardy, J., Walsh, C. 2004.** Lessons from natural molecules. *Nature.* **432 (7019).** 829-837.
- Close, W. H. 2000.** Producing pigs without antibiotic growth promoters. *Advances in pork production.* **11.** 47-56.
- Cochrane, S. A., Vederas, J. C. 2016.** Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal research reviews.* **36 (1).** 4-31.
- Cohen, M., Giannella, R. 1995.** Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: Blaser, M. J. (ed). *Infections of the gastrointestinal tract.* Raven Press Ltd. New York. p. 229-310. ISBN: 0781702267.
- Collier, C., Smiricky-Tjardes, M., Albin, D., Wubben, J., Gabert, V., Deplancke, B., Bane, D., Anderson, D., Gaskins, H. 2003.** Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. *Journal of animal science.* **81 (12).** 3035-3045.
- Cook, M., Molto, E., Anderson, C. 1989.** Fluorochrome labelling in Roman period skeletons from Dakhleh Oasis, Egypt. *American journal of physical anthropology.* **80 (2).** 137-143.
- Cooper, K. K., Songer, J. G. 2009.** Necrotic enteritis in chickens: a paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. *Anaerobe.* **15 (1).** 55-60.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., Maes, L. 2006.** Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of ethnopharmacology.* **106 (3).** 290-302.

- Costa, L. B., Tse, M. L. P., Miyada, V. S. 2007.** Herbal extracts as alternatives to antimicrobial growth promoters for weanling pigs. *Revista Brasileira de Zootecnia*. **36 (3)**. 589-595.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. 2013.** Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*. **11 (2)**. 95-105.
- Cox, R., Conquest, C., Mallaghan, C., Marples, R. 1995.** A major outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* caused by a new phage-type (EMRSA-16). *Journal of Hospital Infection*. **29 (2)**. 87-106.
- Crespo, R., Fisher, D. J., Shivaprasad, H., Fernández-Miyakawa, M. E., Uzal, F. A. 2007.** Toxinotypes of *Clostridium perfringens* isolated from sick and healthy avian species. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. **19 (3)**. 329-333.
- Cromwell, G. L. 2002.** Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal biotechnology*. **13 (1)**. 7-27.
- Croxen, M. A., Finlay, B. B. 2010.** Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. **8 (1)**. 26-38.
- ČSN EN ISO 5509. Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Příprava methylesterů mastných kyselin. 2001.** Český normalizační institut. Praha. 40 s.
- Cullum, D. C. (ed.). 1994.** Introduction to surfactant analysis. Blackie Academic & Professional. London. p. 352. ISBN: 9789401113168.
- Curtis, R., Coxon, D., Levett, G. 1974.** Toxicity of fatty acids in assays for mycotoxins using the brine shrimp (*Artemia salina*). *Food and cosmetics toxicology*. **12 (2)**. 233-235.
- Dayrit, F. M. 2015.** The properties of Lauric acid and their significance in coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **92 (1)**. 1-15.
- Desbois, A. P., Lebl, T., Yan, L., Smith, V. J. 2008.** Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied microbiology and biotechnology*. **81 (4)**. 755-764.

- Desbois, A. P., Smith, V. J. 2010.** Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*. **85** (6). 1629-1642.
- Devriese, L., Colque, J., Herdt, P., Haesebrouck, F. 1992.** Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats. *Journal of Applied Bacteriology*. **73** (5). 421-425.
- Devriese, L., Pot, B. 1995.** The genus *Enterococcus*. In: Wood, B. J. B., Holzapfel (eds.). *The genera of lactic acid bacteria*. London. Blackie Academic & Professional. p. 327-367. ISBN: 075140215.
- Diarrassouba, F., Diarra, M. S., Bach, S., Delaquis, P., Pritchard, J., Topp, E., Skura, B. J. 2007.** Antibiotic resistance and virulence genes in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from commercial broiler chicken farms. *Journal of Food Protection*. **70** (6). 1316-1327.
- Dierick, N., Decuypere, J., Degeyter, I. 2003.** The combined use of whole *Cuphea* seeds containing medium chain fatty acids and an exogenous lipase in piglet nutrition. *Archives of Animal Nutrition*. **57** (1). 49-63.
- Dierick, N., Decuypere, J., Molly, K., Van Beek, E., Vanderbeke, E. 2002a.** The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative for nutritional antibiotics in piglet nutrition: I. In vitro screening of the release of MCFAs from selected fat sources by selected exogenous lipolytic enzymes under simulated pig gastric conditions and their effects on the gut flora of piglets. *Livestock production science*. **75** (2). 129-142.
- Dierick, N., Decuypere, J., Molly, K., Van Beek, E., Vanderbeke, E. 2002b.** The combined use of triacylglycerols (TAGs) containing medium chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative to nutritional antibiotics in piglet nutrition: II. In vivo release of MCFAs in gastric cannulated and slaughtered piglets by endogenous and exogenous lipases; effects on the luminal gut flora and growth performance. *Livestock production science*. **76** (1). 1-16.
- Doganay, M. 2003.** Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunology, Medical Microbiology*. **35** (3). 173-175.

- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A., Kreuzer, M. 2001.** Ruminant methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Letters in Applied Microbiology*. **32 (1)**. 47-51.
- Domagk, G. 1935.** Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*. **61 (7)**. 250-253.
- Dominy, N. J., Davoust, E., Minekus, M. 2004.** Adaptive function of soil consumption: an in vitro study modeling the human stomach and small intestine. *Journal of Experimental Biology*. **207 (2)**. 319-324.
- Duarte, M., Soares, I., Brandão, M., Jacome, R., Ferreira, M., Silva, C., Oliveira, A. 2002.** Phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of weed plants. *Lecta*. **20**. 177-182.
- East, L., Savage, C., Traub-Dargatz, J., Dickinson, C., Ellis, R. 1998.** Enterocolitis associated with *Clostridium perfringens* infection in neonatal foals: 54 cases (1988-1997). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **212 (11)**. 1751-1756.
- ECB. 2000.** IUCLID Dataset: Decanoic acid [online]. *European Chemicals Bureau*. Brussels. [cit. 2016-01-23]. Dostupné z <<http://esis.jrc.ec.europa.eu/>>.
- ECDC. 2009.** The bacterial challenge: time to react [online]. *European Center for Disease Prevention and Control*. Solna. [cit. 2016-02-25]. Dostupné z: <http://ecdc.europa.eu/en/press/news/PublishingImages/Forms/ECDC_DispForm.aspx?xID=45>.
- Edelman, R., Levine, M. M. 1983.** Summary of a workshop on enteropathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of infectious diseases*. **147 (6)**. 1108-1118.
- Edem, D. 2002.** Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological and toxicological aspects: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*. **57 (3-4)**. 319-341.
- Edem, D., Akpanabiatu, M. 2006.** Effects of palm oil-containing diets on enzyme activities of rats. *Pak J Nutr*. **5 (4)**. 301-305.

- EFSA. 2015.** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*. **13 (1)**. 4329.
- EFSA. 2010.** Scientific Opinion on Quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. *EFSA Journal*. **8 (1)**. 1437.
- Ehrlich, P., Halta, S. 1910.** Die experimentelle chemotherapie der spirillosen. Springer. Berlin. p. 164. ISBN: 9783642649264.
- Elli, M., Zink, R., Rytz, A., Reniero, R., Morelli, L. 2000.** Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *Journal of Applied Microbiology*. **88 (4)**. 695-703.
- Elvers, B. (ed). 2010.** Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry [online]. Wiley-VCH Verlag. Weinheim. [cit. 2016-01-27]. Dostupné z <<http://eu.wiley.com/WileyCDA/Section/id-407379.html>>.
- Enig, M. G. 2001.** Coconuts: In Support of good health in the 21st Century. *Am J of Clinical Nutr.* **59**. 841-846.
- Enne, V. I., Bennett, P. M., Livermore, D. M., Hall, L. M. 2004.** Enhancement of host fitness by the *sul2*-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **53 (6)**. 958-963.
- EU.** Nařízení č. 1831/2003/CE o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat. In: Úřední věstník Evropské unie L268. **2003**. s. 29-43. Dostupné z <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&rid=1>>.
- Ewing, W. H. 1969.** Excerpts from: "An Evaluation of the *Salmonella* Problem". National Academies. Washington. p. 207. ISBN: 76600461.
- FAO. 2015.** The state of food insecurity in the world 2015. In Meeting the 2015 [online]. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Rome. [cit. 2016-01-27]. Dostupné z <www.fao.org/3/a-i4646e.pdf>.
- Farber, J., Peterkin, P. 1991.** *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological reviews*. **55 (3)**. 476-511.

- FDA. 2015a.** Final Determination Regarding Partially Hydrogenated Oils. *U. S. Food and Drug Administration*. **80**. 34650-34670.
- FDA. 2015b.** Food additives permitted for direct addition to food for human consumption, subpart I: Multipurpose additives [online]. *U. S. Food and Drug Administration*. College Park. [cit. 2016-03-16]. Dostupné z <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=172.860>>
- FDA. 2015c.** Food additives permitted for direct addition to food for human consumption, subpart F: Flavouring agents and related substances [online]. *U. S. Food and Drug Administration*. College Park. [cit. 2016-03-16]. Dostupné z <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=172.515>>
- FDA. 2015d.** Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) opinion: Coconut oil, peanut oil, oleic acid (packaging), and linoleic acid [online]. *U. S. Food and Drug Administration*. College Park. [cit. 2016-03-16]. Dostupné z <<http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/gras/scogs/ucm261259.htm>>
- Feldlaufer, M., Knox, D., Lusby, W., Shimanuki, H. 1993.** Antimicrobial activity of fatty acids against *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. *Apidologie*. **24** (2). 95-99.
- Ferrari, R. A., Soler, M. P. 2015.** Obtention and characterization of coconut babassu derivatives. *Scientia Agricola*. **72** (4). 291-296.
- Ferreira, B. S., De Almeida, C. G., Faza, L. P., De Almeida, A., Diniz, C. G., Silva, V. L. d., Grazul, R. M., Le Hyaric, M. 2011.** Comparative properties of Amazonian oils obtained by different extraction methods. *Molecules*. **16** (7). 5875-5885.
- Filteau, S. M., Tomkins, A. M. 1994.** Micronutrients and tropical infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **88** (1). 1-26.
- Fooks, L., Gibson, G. 2002.** Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*. **88** (1). 39-49.

- Frece, J., Kos, B., Svetec, I. K., Zgaga, Z., Beganović, J., Leboš, A., Šušković, J. 2009.** Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice. *Journal of dairy research*. **76 (1)**. 98-104.
- Freitas, L. S. d., Lopes, D. C., Freitas, A. F. d., Carneiro, J. d. C., Corassa, A., Pena, S. d. M., Costa, L. F. 2006.** Effects of feeding organic acids for piglets from 21 to 49 days old. *Revista Brasileira de Zootecnia*. **35 (4)**. 1711-1719.
- Friedman, M. 2015.** Antibiotic-Resistant Bacteria: Prevalence in Food and Inactivation by Food-Compatible Compounds and Plant Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **63 (15)**. 3805-3822.
- Fujita, H., Nishimura, S., Kurosawa, S., Akiya, I., Nakamura-Uchiyama, F., Ohnishi, K. 2010.** Clinical and epidemiological features of *Clostridium perfringens* bacteremia: a review of 18 cases over 8 year-period in a tertiary care center in metropolitan Tokyo area in Japan. *Internal Medicine*. **49 (22)**. 2433-2437.
- Fuller, R., Tannock, G. 1999.** Probiotics for farm animals. *Probiotics: a critical review*. **1**. 15-22.
- Gaastra, W., Svennerholm, A.-M. 1996.** Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends in microbiology*. **4 (11)**. 444-452.
- Galbraith, H., Miller, T. 1973.** Physicochemical effects of long chain fatty acids on bacterial cells and their protoplasts. *Journal of Applied Bacteriology*. **36 (4)**. 647-658.
- Galbraith, H., Miller, T., Paton, A., Thompson, J. 1971.** Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *Journal of applied Bacteriology*. **34 (4)**. 803-813.
- Garrity, G. M. (ed). 2005.** Bergey's Manual of Systematics Bacteriology; The *Proteobacteria*. Part B: The *Gammaproteobacteria*. Springer. New York. p. 1106. ISBN: 9780387280226.
- Gavini, F., Pourcher, A.-M., Neut, C., Monget, D., Romond, C., Oger, C., Izard, D. 1991.** Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origins. *International journal of systematic bacteriology*. **41 (4)**. 548-557.

- Gee, P. T. 2007.** Analytical characteristics of crude and refined palm oil and fractions. *European journal of lipid science and technology*. **109 (4)**. 373-379.
- Georgel, P., Crozat, K., Lauth, X., Makrantonaki, E., Seltmann, H., Sovath, S., Hoebe, K., Du, X., Rutschmann, S., Jiang, Z. F., Bigby, T., Nizet, V., Zouboulis, C. C., Beutler, B. 2005.** A toll-like receptor 2-responsive lipid effector pathway protects mammals against skin infections with gram-positive bacteria. *Infection and immunity*. **73 (8)**. 4512-4521.
- Gholamiandehkordi, A. R., Timbermont, L., Lanckriet, A., Van den Broeck, W., Pedersen, K., Dewulf, J., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F. 2007.** Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathology*. **36 (5)**. 375-382.
- Gill, D. M. 1982.** Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiological Reviews*. **46 (1)**. 86.
- Glassman, H. N. 1948.** Surface active agents and their application in bacteriology. *Bacteriological reviews*. **12 (2)**. 105.
- Gordon, M. A., Graham, S. M., Walsh, A. L., Wilson, L., Phiri, A., Molyneux, E., Zijlstra, E. E., Heyderman, R. S., Hart, C. A., Molyneux, M. E. 2008.** Epidemics of invasive *Salmonella enterica* serovar enteritidis and *S. enterica* serovar typhimurium infection associated with multidrug resistance among adults and children in Malawi. *Clinical Infectious Diseases*. **46 (7)**. 963-969.
- Graedel, T. E., Hawkins, D. T., Claxton, L. D. 2012.** Atmospheric chemical compounds: sources, occurrence and bioassay. Academic Press. London. p. 732. ISBN: 0122944852.
- Graham, S. A., Kleiman, R. 1987.** Seed lipids of the *Lythraceae*. *Biochemical systematics and ecology*. **15 (4)**. 433-439.
- Graham, S. A., Hirsinger, F., Röbbelen, G. 1981.** Fatty acids of *Cuphea (Lythraceae)* seed lipids and their systematic significance. *American Journal of Botany*. **68 (7)**. 908-917.

- Hess, W. T., Kurtz, A. N., Stanton, D. B. 1995.** Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. John Wiley & Sons Ltd. New York. p. 1116. ISBN: 9780471526841.
- Greenway, D., Dyke, K. 1979.** Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*. **115 (1)**. 233-245.
- Grilli, E., Vitari, F., Domeneghini, C., Palmonari, A., Tosi, G., Fantinati, P., Massi, P., Piva, A. 2013.** Development of a feed additive to reduce caecal *Campylobacter jejuni* in broilers at slaughter age: from in vitro to in vivo, a proof of concept. *Journal of applied microbiology*. **114 (2)**. 308-317.
- Gruca, M., van Andel, T. R., Balslev, H. 2014.** Ritual uses of palms in traditional medicine in sub-Saharan Africa: a review. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. **10 (1)**. 24.
- Gubash, S. M. 1978.** Synergistic hemolysis phenomenon shown by an alpha-toxin-producing *Clostridium perfringens* and streptococcal CAMP factor in presumptive streptococcal grouping. *Journal of clinical microbiology*. **8 (5)**. 480-488.
- Gulaboski, R., Mirčeski, V., Mitrev, S. 2013.** Development of a rapid and simple voltammetric method to determine total antioxidative capacity of edible oils. *Food chemistry*. **138 (1)**. 116-121.
- Gurr, M. I., Harwood, J. L. 1991.** Lipid biochemistry: An Introduction. Chapman & Hall. London. p. 405. ISBN: 9780412266201.
- Hajri, T., Ibrahimi, A., Coburn, C. T., Knapp, F., Kurtz, T., Pravenec, M., Abumrad, N. A. 2001.** Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia, and myocardial hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*. **276 (26)**. 23661-23666.
- Hall, C. W. 1981.** Milk and milk products. In: Hess, W. T., Kurtz, A. N., Stanton, D. B. (eds). *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. 1995. John Wiley & Sons Ltd. New York. p. 1116. ISBN: 9780471526841.
- Hamilton, J. A. 1989.** Medium-chain fatty acid binding to albumin and transfer to phospholipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **86 (8)**. 2663-2667.

- Hammer, K. A., Carson, C., Riley, T. 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*. **86 (6)**. 985-990.
- Hammes, W., Hertel, C. 2005.** Genus *Lactobacillus*. In: Whitman, W. B. (ed). *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*; Volume 3: The *Firmicutes*. Springer. New York. p. 738-828. ISBN: 9780387950419.
- Han, J., Hamilton, J. A., Kirkland, J. L., Corkey, B. E., Guo, W. 2003.** Medium-Chain Oil Reduces Fat Mass and Down-regulates Expression of Adipogenic Genes in Rats. *Obesity research*. **11 (6)**. 734-744.
- Han, Y.-K., Thacker, P. A. 2009.** Performance, nutrient digestibility and nutrient balance in weaned pigs fed diets supplemented with antibiotics or zinc oxide. *J Anim Vet Adv*. **8 (5)**. 868-875.
- Hancock, R. E., Sahl, H.-G. 2006.** Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*. **24 (12)**. 1551-1557.
- Hanczakowska, E., Szewczyk, A., Okon, K. 2011.** Caprylic, capric and/or fumaric acids as antibiotic replacements in piglet feed. *Annals of Animal Science*. **11 (1)**. 115-124.
- Hansen, C. F., Riis, A. L., Bresson, S., Højbjerg, O., Jensen, B. B. 2007.** Feeding organic acids enhances the barrier function against pathogenic bacteria of the piglet stomach. *Livestock Science*. **108 (1)**. 206-209.
- Harwood, J. 1980.** Plant acyl lipids: structure, distribution and analysis. In: Stumpf, P. K. (ed). *The biochemistry of plants*. Academic Press. New York. p. 1-55. ISBN: 9780126754148.
- Hassinen, J., Durbin, G., Bernhart, F. 1951.** The bacteriostatic effects of saturated fatty acids. *Archives of biochemistry and biophysics*. **31 (2)**. 183-189.
- Hatoum, R., Labrie, S., Fliss, I. 2012.** Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Front Microbiol*. **3**. 421.
- Hecht, D. W., Citron, D. M., Cox, M. (eds). 2013.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. **33 (1)**. p. 206. ISBN: 1562388665.

- Hemsworth, G. R., Kochan, I. 1978.** Secretion of antimycobacterial fatty acids by normal and activated macrophages. *Infection and immunity*. **19** (1). 170-177.
- Herendeen, S. L., Vanbogelen, R. A., Neidhardt, F. C. 1979.** Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *Journal of Bacteriology*. **139** (1). 185-194.
- Hernandez, F., Madrid, J., Garcia, V., Orengo, J., Megias, M. 2004.** Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science*. **83** (2). 169-174.
- Hilmarsson, H., Larusson, L., Thormar, H. (2006).** Virucidal effect of lipids on visna virus, a lentivirus related to HIV. *Archives of virology*. **151** (6). 1217-1224.
- Højberg, O., Canibe, N., Poulsen, H. D., Hedemann, M. S., Jensen, B. B. 2005.** Influence of dietary zinc oxide and copper sulfate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets. *Applied and Environmental Microbiology*. **71** (5). 2267-2277.
- Houdijk, J., Hartemink, R., Verstegen, M., Bosch, M. 2002.** Effects of dietary non-digestible oligosaccharides on microbial characteristics of ileal chyme and faeces in weaner pigs. *Archives of Animal Nutrition*. **56** (4). 297-307.
- Huang, C. B., Alimova, Y., Myers, T. M., Ebersole, J. L. 2011.** Short-and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Archives of oral biology*. **56** (7). 650-654.
- Hudault, S., Guignot, J., Servin, A. 2001.** *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germ free mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut*. **49** (1). 47-55.
- Humphrey, T., O'Brien, S., Madsen, M. (2007).** Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *International journal of food microbiology*. **117** (3). 237-257.
- Idouraine, A., Kohlhepp, E. A., Weber, C. W., Warid, W. A., Martinez-Tellez, J. J. 1996.** Nutrient constituents from eight lines of naked seed squash (*Cucurbita pepo* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **44** (3). 721-724.

- Isaacs, C. E., Kims, K., Thormar, H. 1994.** Inactivation of enveloped Viruses in human bodily fluids by purified lipids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **724** (1). 457-464.
- Isaacs, C. E., Litov, R. E., Thormar, H. 1995.** Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. *The Journal of nutritional biochemistry*. **6** (7). 362-366.
- Jackson, F. L., Longenecker, H. E. 1944.** The fatty acids and glycerides of babassu oil. *Oil & Soap*. **21** (3). 73-75.
- Jahan, M., Zhanel, G. G., Sparling, R., Holley, R. A. 2015.** Horizontal transfer of antibiotic resistance from *Enterococcus faecium* of fermented meat origin to clinical isolates of *E. faecium* and *Enterococcus faecalis*. *International journal of food microbiology*. **199**. 78-85.
- Jarvis, W. 2001.** Hospital Infections Program, Centers for Disease Control and Prevention: On-site outbreak investigations, 1990-1999: How often are germicides or sterilants the source. *Association for Professional in Infection Control and Epidemiology*. Washington. 41-48.
- Jensen, R. G. 2002.** The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*. **85** (2). 295-350.
- Jobim, M. L., Santos, R. C. V., Alves, C. F. D., Oliveira, R. M., Mostardeiro, C. P., Sagrillo, M. R., de Souza, O. C. D., Garcia, L. F. M., Manica-Cattani, M. F., Ribeiro, E. E., da Cruz, I. B. M. 2014.** Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. *Microbiological Research*. **169** (4). 314-323.
- Joerger, R. 2003.** Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry science*. **82** (4). 640-647.
- Johnson, T. J., Kariyawasam, S., Wannemuehler, Y., Mangiamele, P., Johnson, S. J., Doetkott, C., Skyberg, J. A., Lynne, A. M., Johnson, J. R., Nolan, L. K. 2007.** The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1: K1: H7 shares

- strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *Journal of bacteriology*. **189** (12). 3228-3236.
- Jouany, J.-P., Morgavi, D. 2007.** Use of ‘natural’ products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal*. **1** (10). 1443-1466.
- Jukes, T. H., Stokstad, E., Tayloe, R., Cunha, T., Edwards, H., Meadows, G. 1950.** Growth-promoting effect of aureomycin on pigs. *Arch Biochem*. **26**. 324-325.
- Kabara, J. J. 1984.** Medium-chain fatty acids and esters as antimicrobial agents. In: Kabara, J. J. (ed). *Cosmetic and Drug Preservation*. Marcel Dekker. New York. p. 275-304. ISBN: 9780824793661.
- Kabara, J. J. 1980.** Lipids as host-resistance factors of human milk. *Nutr Rev*. **38** (2). 65-73.
- Kabara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J., Truant, J. P. 1972.** Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **2** (1). 23-28.
- Kaper, J. 1996.** Defining EPEC. *Revista de Microbiologia*. **27**. 130-133.
- Kapoor, J. R., Monteiro, B., Tanoue, L., Siegel, M. D. 2007.** Massive intravascular hemolysis and a rapidly fatal outcome. *CHEST Journal*. **132** (6). 2016-2019.
- Kariuki, S., Gordon, M. A., Feasey, N., Parry, C. M. 2015.** Antimicrobial resistance and management of invasive *Salmonella* disease. *Vaccine*. **33**. 21-29.
- Katouli, M. 2010.** Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. *Iranian journal of microbiology*. **2** (2). 59-72.
- Katsumata, H., Kaneco, S., Inomata, K., Itoh, K., Funasaka, K., Masuyama, K., Suzuki, T., Ohta, K. 2003.** Removal of heavy metals in rinsing wastewater from plating factory by adsorption with economical viable materials. *Journal of Environmental Management*. **69** (2). 187-191.
- Keller, M. A., Stiehm, E. R. 2000.** Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*. **13** (4). 602-614.

- Kenny, J. G., Ward, D., Josefsson, E., Jonsson, M., Hinds, J., Rees, H. H., Lindsay, J. A., Tarkowski, A., Horsburgh, M. J. 2009.** The *Staphylococcus aureus* response to unsaturated long chain free fatty acids: survival mechanisms and virulence implications. *PLoS One*. **4 (2)**. 4344.
- Ketley, J. M. 1997.** Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*. **143 (1)**. 5-21.
- Keyburn, A. L., Sheedy, S. A., Ford, M. E., Williamson, M. M., Awad, M. M., Rood, J. I., Moore, R. J. 2006.** Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infection and immunity*. **74 (11)**. 6496-6500.
- Khan, S. H., Iqbal, J. 2016.** Recent advances in the role of organic acids in poultry nutrition. *Journal of Applied Animal Research*. **44 (1)**. 359-369.
- Kirchgessner, M., Roth, F., Paulicks, B. 1995.** Nutritive efficacy of sorbic acid in the rearing of piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. **74 (4-5)**. 235-242.
- Kleiman, R. 1990.** Chemistry of new industrial oilseed crops. In: Janick, J., Simon, J. (eds). *Advances in New Crops*. Timber Press. Portland. p. 196-203. ISBN: 978-0881921663.
- Knapp, H. R., Melly, M. A. 1986.** Bactericidal effects of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Infectious Diseases*. **154 (1)**. 84-94.
- Knezević, D., Tadić, V. 1993.** Decontamination with clay or alcoholate of pigs percutaneously poisoned with VX and soman. *Vojnosanitetski pregled*. **51 (6)**. 488-491.
- Kodicek, E., Worden, A. 1945.** The effect of unsaturated fatty acids on *Lactobacillus helveticus* and other Gram-positive micro-organisms. *Biochemical Journal*. **39 (1)**. 78.
- Kollanoor-Johny, A., Mattson, T., Baskaran, S. A., Amalaradjou, M. A. R., Hoagland, T. A., Darre, M. J., Khan, M. I., Schreiber, D. T., Donoghue, A. M., Donoghue, D. J., Venkitanarayanan, K. 2012.** Caprylic acid reduces *Salmonella*

enteritidis populations in various segments of digestive tract and internal organs of 3- and 6-week-old broiler chickens, therapeutically. *Poultry Science*. **91** (7). 1686-1694.

Konowalchuk, J., Dickie, N., Stavric, S., Speirs, J. 1978. Comparative studies of five heat-labile toxic products of *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. **22** (3). 644-648.

Krämer, J., Brandis, H. 1975. Mode of action of two *Streptococcus faecium* bacteriocins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **7** (2). 117-120.

Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C. G., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A. V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie, T., Paterson, D. L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., Rao, B., Ray, U., Sarma, J. B., Sharma, M., Sheridan, E., Thirunarayan, M. A., Turton, J., Upadhyay, S., Warner, M., Welfare, W., Livermore, D. M., Woodford, N. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet infectious diseases*. **10** (9). 597-602.

Kumprecht, I., Zobac, P. 1998. The effect of a combined preparation containing *Enterococcus faecium* M-74 and mannan-oligosaccharides in diets for weaning piglets. *Czech journal of animal science*. **43** (10). 477-481.

Kumprecht, I., Zobac, P., Gasnarek, Z., Robosova, E. 1994. The effect of continuous application of probiotics based on *Saccharomyces cerevisiae* var. *elipsoideus* and *Streptococcus faecium* C-68 (SF 68) on chicken broilers yield. *Živočišná výroba*. **39** (6). 491.

Küpper, F. C., Gaquerel, E., Boneberg, E.-M., Morath, S., Salaün, J.-P., Potin, P. 2006. Early events in the perception of lipopolysaccharides in the brown alga *Laminaria digitata* include an oxidative burst and activation of fatty acid oxidation cascades. *Journal of experimental botany*. **57** (9). 1991-1999.

Kwon, K. H., Hwang, S. Y., Moon, B. Y., Park, Y. K., Shin, S., Hwang, C.-Y., Park, Y. H. 2012. Occurrence of antimicrobial resistance and virulence genes, and

distribution of enterococcal clonal complex 17 from animals and human beings in Korea. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **24** (5). 924-931.

Labarthe, F., Khairallah, M., Bouchard, B., Stanley, W. C., Des Rosiers, C. 2005. Fatty acid oxidation and its impact on response of spontaneously hypertensive rat hearts to an adrenergic stress: benefits of a medium-chain fatty acid. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. **288** (3). 1425-1436.

Lauer, A. K., Riley, K., Wentzien, J., Marsal, S. W. 2005. Acute painful vision loss and acute abdomen: a case of endogenous *Clostridium perfringens* endophthalmitis. *Canadian Journal of Ophthalmology/Journal Canadien d'Ophthalmologie*. **40** (2). 208-210.

Ledesma, O., de Ruiz Holgado, A. P., Oliver, G., Giori, G. S., Raibaud, P., Galpin, J. 1977. A synthetic medium for comparative nutritional studies of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. **42** (1). 123-133.

Lee, C.-Y., Tai, C.-L., Lin, S.-C., Chen, Y.-T. 1994. Occurrence of plasmids and tetracycline resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from whole market chickens and clinical samples. *International journal of food microbiology*. **24** (1). 161-170.

Lee, H. H., Molla, M. N., Cantor, C. R., Collins, J. J. 2010. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature*. **467** (7311). 82-85.

Lee, H. J. 2011. Review: Lantibiotics, Class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *Journal of microbiology and biotechnology*. **21** (3). 229-235.

Legrand, P. 2008. Nutritional interest of different fatty acids from milk fat. *Sciences Des Aliments*. **28** (1-2). 34-43.

Lemke, S. L., Mayura, K., Reeves, W. R., Wang, N., Fickey, C., Phillips, T. D. 2001. Investigation of organophilic montmorillonite clay inclusion in zearalenone-contaminated diets using the mouse uterine weight bioassay. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. **62** (4). 243-258.

Lewis, R. 2007. Hawley's Condensed Chemical Dictionary. Wiley-Interscience. New York. p. 1379. ISBN: 9780470114735.

- Li, W., Atkinson, G. C., Thakor, N. S., Allas, U., Lu, C. C., Chan, K. Y., Tenson, T., Schulten, K., Wilson, K. S., Hauryliuk, V., Frank, J. 2013.** Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet (O). *Nature communications*. **4**. 1477.
- Li, X., Yin, J., Li, D., Chen, X., Zang, J., Zhou, X. 2006.** Dietary supplementation with zinc oxide increases IGF-I and IGF-I receptor gene expression in the small intestine of weanling piglets. *The Journal of nutrition*. **136** (7). 1786-1791.
- Liaw, S.-J., Lai, H.-C., Wang, W.-B. 2004.** Modulation of swarming and virulence by fatty acids through the RsbA protein in *Proteus mirabilis*. *Infection and immunity*. **72** (12). 6836-6845.
- Lim, J. Y., Yoon, J. W., Hovde, C. J. 2010.** A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *Journal of microbiology and biotechnology*. **20** (1). 5.
- Lim, K. S., Huh, C. S., Baek, Y. J. 1993.** Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*. **76** (8). 2168-2174.
- Lima, E. B. C., Sousa, C. N. S., Meneses, L. N., Ximenes, N. C., Santos, M. A., Vasconcelos, G. S., Lima, N. B. C., Patrocínio, M. C. A., Macedo, D., Vasconcelos, S. M. M. 2015.** *Cocos nucifera* (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **48** (11). 953-964.
- Lindström, M., Heikinheimo, A., Lahti, P., Korkeala, H. 2011.** Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food microbiology*. **28** (2). 192-198.
- Liu, G., Wei, Y., Wang, Z., Wu, D., Zhou, A., Liu, G. 2008.** Effects of herbal extract supplementation on growth performance and insulin-like growth factor (IGF)-I system in finishing pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences*. **17** (4). 538-547.
- Lodemann, U., Hübener, K., Jansen, N., Martens, H. 2006.** Effects of *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 as probiotic supplement on intestinal transport and barrier function of piglets. *Archives of animal nutrition*. **60** (1). 35-48.

- Loung, F., Silalahi, J., Suryanto, D. 2014.** Antibacterial activity of enzymatic hydrolyzed of virgin coconut oil and palm kernel oil against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi* and *Escherichia coli*. *International Journal of PharmTech Research*. **6 (2)**. 628-633.
- Mägi, E., Jarvis, T., Miller, I. 2006.** Effects of different plant products against pig mange mites. *Acta Veterinaria Brno*. **75 (2)**. 283-287.
- Magnoli, A. P., Tallone, L., Rosa, C. A., Dalcero, A. M., Chiacchiera, S. M., Sanchez, R. M. T. 2008.** Commercial bentonites as detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin. *Applied Clay Science*. **40 (1)**. 63-71.
- Mahony, D., Li, A. 1978.** Comparative study of ten bacteriocins of *Clostridium perfringens*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **14 (6)**. 886-892.
- Mainil, J. 2013.** *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary immunology and immunopathology*. **152 (1)**. 2-12.
- Makovitzki, A., Avrahami, D., Shai, Y. 2006.** Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103 (43)**. 15997-16002.
- Mambrim, M. C. T., Barrera-Arellano, D. 1997.** Characterization of palm tree fruit oils from Brazilian Amazonia region. *Grasas Y Aceites*. **48 (3)**. 154-158.
- Mancini, A., Imperlini, E., Nigro, E., Montagnese, C., Daniele, A., Orrù, S., Buono, P. 2015.** Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. *Molecules*. **20 (9)**. 17339-17361.
- Manzanilla, E., Perez, J., Martin, M., Kamel, C., Baucells, F., Gasa, J. 2004.** Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*. **82 (11)**. 3210-3218.
- Marina, A., Man, Y. C., Nazimah, S., Amin, I. 2009.** Chemical properties of virgin coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **86 (4)**. 301-307.

- Marinho, M., Lordelo, M., Cunha, L., Freire, J. 2007.** Microbial activity in the gut of piglets: I. Effect of prebiotic and probiotic supplementation. *Livestock science*. **108** (1). 236-239.
- Marounek, M., Freire, J., Castro-Solla, L., Pinheiro, V., Mourão, J., Maertens, L. 2007.** Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: a review. *World rabbit science*. **15** (3). 127-140.
- Marounek, M., Skřivanová, E., Rada, V. 2003.** Susceptibility of *Escherichia coli* to C2-C18 fatty acids. *Folia Microbiologica*. **48** (6). 731-735.
- Marten, B., Pfeuffer, M., Schrezenmeir, J. 2006.** Medium-chain triglycerides. *International Dairy Journal*. **16** (11). 1374-1382.
- Martin, T. G., Smyth, J. A. 2009.** Prevalence of netB among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States. *Veterinary microbiology*. **136** (1). 202-205.
- Matulka, R., Noguchi, O., Nosaka, N. 2006.** Safety evaluation of a medium-and long-chain triacylglycerol oil produced from medium-chain triacylglycerols and edible vegetable oil. *Food and chemical toxicology*. **44** (9). 1530-1538.
- Maxwell, F. J., Duncan, S. H., Hold, G., Stewart, C. S. 2004.** Isolation, growth on prebiotics and probiotic potential of novel bifidobacteria from pigs. *Anaerobe*. **10** (1). 33-39.
- Mazel, D., Davies, J. 1999.** Antibiotic resistance in microbes. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **56** (9-10). 742-754.
- Mba, O. I., Dumont, M.-J., Ngadi, M. 2015.** Palm oil: processing, characterization and utilization in the food industry—a review. *Food Bioscience*. **10**. 26-41.
- McEwen, S. A., Fedorka-Cray, P. J. 2002.** Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical Infectious Diseases*. **34** (3). 93-106.
- McGaw, L., Jäger, A., Van Staden, J. 2002.** Isolation of antibacterial fatty acids from *Schotia brachypetala*. *Fitoterapia*. **73** (5). 431-433.

- McGrattan, C. J., Sullivan, J. D., Ikawa, M. 1976.** Inhibition of chlorella (chlorophyceae) growth by fatty acids, using the paper disc method 1, 2. *Journal of Phycology*. **12 (1)**. 129-131.
- McLauchlin, J., Rees, C. E. 2009.** Genus *Listeria*. In: Whitman, W. B. (ed). *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*; Volume 3: The *Firmicutes*. Springer. New York. p. 244-257. ISBN: 9780387950419.
- McNaught, A. D. 1997.** Compendium of chemical terminology. Blackwell Science. Oxford. p. 450. ISBN: 9780865426849.
- McWhorter-Murlin, A., Hickman-Brenner, F. 1994.** Identification and serotyping of *Salmonella* and an update of the Kauffmann-White Scheme. *Centers for Disease Control and Prevention*. Atlanta.
- Mitsuhiro, F., Jun-ichi, O. 1994.** Nutritional and physiological characteristics in germ-free chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. **109 (3)**. 547-556.
- Molatová, Z., Skřivanová, E., Baré, J., Houf, K., Bruggeman, G., Marounek, M. 2011.** Effect of coated and non-coated fatty acid supplementation on broiler chickens experimentally infected with *Campylobacter jejuni*. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. **95 (6)**. 701-706.
- Monecke, S., Coombs, G., Shore, A. C., Coleman, D. C., Akpaka, P., Borg, M., Chow, H., Ip, M., Jatzwauk, L., Jonas, D., Kadlec, K., Kearns, A., Laurent, F., O'Brien, F. G., Pearson, J., Ruppelt, A., Schwarz, S., Scicluna, E., Slickers, P., Tan, H. L., Weber, S., Ehricht, R. 2011.** A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PloS one*. **6 (4)**. 17936.
- Mongkolthanaruk, W. 2012.** Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, humans and animals. *J Microbiol Biotechnol*. **22 (12)**. 1597-1604.
- Monk, A., Rees, C., Barrow, P., Hagens, S., Harper, D. 2010.** Bacteriophage applications: where are we now? *Letters in Applied Microbiology*. **51 (4)**. 363-369.

- Moore, P., Evenson, A., Luckey, T., McCoy, E., Elvehjem, C., Hart, E. 1946.** Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. *Journal of Biological Chemistry*. **165**. 437-441.
- Mueller-Harvey, I. 2006.** Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **86 (13)**. 2010-2037.
- Nachamkin, I., Allos, B. M., Ho, T. 1998.** *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. *Clinical microbiology reviews*. **11 (3)**. 555-567.
- Nakonieczna, A., Cooper, C., Gryko, R. 2015.** Bacteriophages and bacteriophage-derived endolysins as potential therapeutics to combat Gram-positive spore forming bacteria. *Journal of applied microbiology*. **119 (3)**. 620-631.
- Namkung, H., Li J. Gong, M., Yu, H., Cottrill, M., de Lange, C. 2004.** Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. *Canadian journal of animal science*. **84 (4)**. 697-704.
- NAS. 2006.** Treating Infectious Diseases in a Microbial World: Report of Two Workshops on Novel Antimicrobial Therapeutics. National Academies Press. Washington. p. 103. ISBN: 9780309100564.
- Nataro, J., Steiner, T. 1995.** Enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. In: Blaser, M. J., Smith, P. D., Ravdin, J. I., Greenberg H. B., Guerrant, R. L. (eds). *Infections of the gastrointestinal tract*. Raven Press Ltd. New York. p. 727-737. ISBN: 0781702267.
- Nataro, J. P., Kaper, J. B. 1998.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. **11 (1)**. 142-201.
- Nataro, J. P., Kaper, J. B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P., Levine, M. M. 1987.** Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *The Pediatric infectious disease journal*. **6 (9)**. 829-831.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., Cox, M. M. 2008.** Lehninger principles of biochemistry. Macmillan. London. p. 1198. ISBN: 9780716771081.

- Nelson, M. L., Dinardo, A., Hochberg, J., Armelagos, G. J. 2010.** Brief communication: mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350–550 CE. *American journal of physical anthropology*. **143 (1)**. 151-154.
- Ng, L., Sherburne, R., Taylor, D., Stiles, M. 1985.** Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. *Journal of bacteriology*. **164 (1)**. 338-343.
- Nielsen, I. 2002.** Vegetable oils and fats. In: van der Vossen, H. A. M., Umali, B. E., Oyen, L. P. A, Nguyen, X. D. (eds.). *Plant Resources of South-East Asia*. Backhuys Publishers. Pudoc. p. 410. ISBN: 9789057820953.
- Nj, G., Skillman, T. 1969.** Medium-chain triglycerides-physiologic considerations and clinical implications. *New england journal of medicine*. **280 (19)**. 1045.
- Nosaka, N., Maki, H., Suzuki, Y., Haruna, H., Ohara, A., Kasai, M., Tsuji, H., Aoyama, T., Okazaki, M., Igarashi, O., Kondo, K. 2003.** Effects of Margarine Containing Medium-chain Triacylglycerols on Body Fat Reduction in Humans. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. **10 (5)**. 290-298.
- Ljungh, A., Wadström, T. 2006.** Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol*. **7 (2)**. 73-89.
- Nwodo, U. U., Green, E., Okoh, A. I. 2012.** Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International journal of molecular sciences*. **13 (11)**. 14002-14015.
- Oguntibeju, O., Esterhuyse, A., Truter, E. 2010.** Possible role of red palm oil supplementation in reducing oxidative stress in HIV/AIDS and TB patients: A Review. *Journal of medicinal plants research*. **4 (3)**. 188-196.
- Olson, D., Froehlich, F., Christiano, R., Hannibal-Bac, H., Ejsing, C., Walther, T. 2014.** Phosphorylation Control Coordinates Very Long Chain Fatty Acid Synthesis. In: Alberts, B. (eds). *Molecular biology of the cell*. Garland Science. Bethesda. p. 1392. ISBN: 9780815341055.
- Ong, A., Goh, S. 2002.** Palm oil: a healthful and cost-effective dietary component. *Food and nutrition bulletin*. **23 (1)**. 11-22.

- Orhan, İ. E., Özçelik, B., Şener, B. 2011.** Evaluation of antibacterial, antifungal, antiviral, and antioxidant potentials of some edible oils and their fatty acid profiles. *Turkish Journal of Biology*. **35 (2)**. 251-258.
- Osman, K., Elhariri, M. 2013.** Antibiotic resistance of *Clostridium perfringens* isolates from broiler chickens in Egypt. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*. **32 (3)**. 841-850.
- Ou, D., Li, D., Cao, Y., Li, X., Yin, J., Qiao, S., Wu, G. 2007.** Dietary supplementation with zinc oxide decreases expression of the stem cell factor in the small intestine of weanling pigs. *The Journal of nutritional biochemistry*. **18 (12)**. 820-826.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., Isolauri, E. 2002.** Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **82 (1-4)**. 279-289.
- Oyi, A., Onaolapo, J., Obi, R. 2010.** Formulation and antimicrobial studies of coconut (*Cocos nucifera* Linne) oil. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology*. **2 (2)**. 133-137.
- Pan, D., Yu, Z. 2014.** Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut microbes*. **5 (1)**. 108-119.
- Papamandjaris, A. A., MacDougall, D. E., Jones, P. J. 1998.** Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life sciences*. **62 (14)**. 1203-1215.
- Patel, S., Goyal, A. 2012.** The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech*. **2 (2)**. 115-125.
- Pesce, C. 1985.** Oil palms and other oilseeds of the Amazon. *Brittonia*. **38 (2)**. 132
- Peters, J. S., Chin, C.-K. 2003.** Inhibition of photosynthetic electron transport by palmitoleic acid is partially correlated to loss of thylakoid membrane proteins. *Plant Physiology and Biochemistry*. **41 (2)**. 117-124.
- Petit, L., Gibert, M., Popoff, M. R. 1999.** *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends in microbiology*. **7 (3)**. 104-110.
- Phillips, T. D., Lemke, S. L., Grant, P. G. 2002.** Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. In: DeVries, J. W., Trucksess, M.

- W., Jackson, L. S. *Mycotoxins and food safety*. Springer. New York. p. 157-171. ISBN: 9780306467806.
- Pié, S., Awati, A., Vida, S., Falluel, I., Williams, B., Oswald, I. 2007.** Effects of added fermentable carbohydrates in the diet on intestinal proinflammatory cytokine-specific mRNA content in weaning piglets. *Journal of animal science*. **85 (3)**. 673-683.
- Popoff, M. Y., Le Minor, L. E. 2005.** Genus *Salmonella*. In: Garrity, G. M. (ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; The Proteobacteria*. Part B: The *Gammaproteobacteria*. Springer. New York. p. 764-787. ISBN: 9780387280226.
- Purseglove, J. 1972.** Tropical crops: Chapter 1 – Monocotyledons. Longman Group. London. p. 272. ISBN: 9780470205686.
- Rahman, H., Austin, B., Mitchell, W. J., Morris, P. C., Jamieson, D. J., Adams, D. R., Spragg, A. M., Schweizer, M. 2010.** Novel anti-infective compounds from marine bacteria. *Marine drugs*. **8 (3)**. 498-518.
- Rainey, F. A., Hollen, B. J., Small, A. M. 2009.** Genus *Clostridium*. In: Whitman, W. B. (ed). *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology; Volume 3: The Firmicutes*. Springer. New York. p. 738-828. ISBN: 9780387950419.
- Ramirez, M. S., Tolmasky, M. E. 2010.** Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*. **13 (6)**. 151-171.
- Reddy, E. A., Shaw, A. V., Crump, J. A. 2010.** Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*. **10 (6)**. 417-432.
- Rickrode, T. E., Mueller, C. F., Taylor, D. 1986.** Identification and antibiotic activity of fatty acids in dermal secretions of *Plethodon cinereus*. *American Midland Naturalist*. **115 (1)**. 198-200.
- Ringø, E., Bendiksen, H., Gausen, S., Sundsfjord, A., Olsen, R. 1998.** The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Applied Microbiology*. **85 (5)**. 855-864.

- Roberts, T., Shah, A., Graham, J., McQueen, I. 1987.** The Miller Fischer syndrome following campylobacter enteritis: a report of two cases. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. **50 (11)**. 1557.
- Robertson, G. T., Bonventre, E. J., Doyle, T. B., Du, Q., Duncan, L., Morris, T. W., Roche, E. D., Yan, D., Lynch, A. S. 2008.** In vitro evaluation of CBR-2092, a novel rifamycin-quinolone hybrid antibiotic: studies of the mode of action in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **52 (7)**. 2313-2323.
- Rogosa, M., Franklin, J., Perry, K. 1961.** Correlation of the vitamin requirements with cultural and biochemical characters of *Lactobacillus spp.* *Journal of general microbiology*. **25 (3)**. 473-482.
- Roselli, M., Finamore, A., Britti, M. S., Bosi, P., Oswald, I., Mengheri, E. 2005.** Alternatives to in-feed antibiotics in pigs: Evaluation of probiotics, zinc or organic acids as protective agents for the intestinal mucosa. A comparison of in vitro and in vivo results. *Animal Research*. **54 (3)**. 203-218.
- Roth, F., Windisch, W., Kirchgessner, M. 1998.** Effect of potassium diformate (Formi (TM) LHS) on nitrogen metabolism and nutrient digestibility in piglets at graded dietary lysine supply. *Agribiological research*. **51 (2)**. 167-175.
- Roth, R., Kirchgessner, M. 1998.** Organic acids as feed additives for young pigs: Nutritional and gastrointestinal effects. *Journal of Animal and Feed Sciences*. **7**. 25-33.
- Russo, M., Galletti, G. C., Bocchini, P., Carnacini, A. 1998.** Essential Oil Chemical Composition of Wild Populations of Italian Oregano Spice (*Origanum vulgare ssp. hirtum* (Link) Ietswaart): A Preliminary Evaluation of Their Use in Chemotaxonomy by Cluster Analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **46 (9)**. 3741-3746.
- Rustan, A. C., Drevon, C. A. 2005.** Fatty acids: structures and properties [online]. Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons, Ltd. [cit. 2016-03-16]. Dostupné z <https://www.uio.no/studier/emner/matnat/farmasi/FRM2041/v06/undervisningsmateriale/fatty_acids.pdf>.

- Ruzin, A., Novick, R. P. 2000.** Equivalence of lauric acid and glycerol monolaurate as inhibitors of signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. **182 (9)**. 2668-2671.
- Sachs, M., Von Eichel, J., Asskali, F. 2002.** Wound management with coconut oil in Indonesian folk medicine. *Der Chirurg; Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizen*. **73 (4)**. 387-392.
- Sado-Kamdem, S. L., Vannini, L., Guerzoni, M. E. 2009.** Effect of α -linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *International journal of food microbiology*. **129 (3)**. 288-294.
- Sakurai, J., Nagahama, M., Oda, M., Tsuge, H., Kobayashi, K. 2009.** Clostridium *perfringens* iota-toxin: structure and function. *Toxins*. **1 (2)**. 208-228.
- Sambanthamurthi, R., Sundram, K., Tan, Y.-A. 2000.** Chemistry and biochemistry of palm oil. *Progress in lipid research*. **39 (6)**. 507-558.
- Sandanayaka, V. P., Prashad, A. S. 2002.** Resistance to β -lactam antibiotics: structure and mechanism based design of β -lactamase inhibitors. *Current medicinal chemistry*. **9 (12)**. 1145-1165.
- Saraiva, S. A., Cabral, E. C., Eberlin, M. N., Catharino, R. R. 2009.** Amazonian vegetable oils and fats: fast typification and quality control via triacylglycerol (TAG) profiles from dry matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry fingerprinting. *Journal of agricultural and food chemistry*. **57 (10)**. 4030-4034.
- Sasidharan, S., Nilawaty, R., Xavier, R., Latha, L. Y., Amala, R. 2010.** Wound healing potential of *Elaeis guineensis* Jacq leaves in an infected albino rat model. *Molecules*. **15 (5)**. 3186-3199.
- Scaletsky, I., Silva, M., Trabulsi, L. R. 1984.** Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infection and immunity*. **45 (2)**. 534-536.

- Scheutz, F., Strockbine, N. A. 2005.** Genus *Escherichia*. In: Garrity, G. M. (ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; The Proteobacteria. Part B: The Gammaproteobacteria*. Springer. New York. p. 638-655. ISBN: 9780387280226.
- Schleifer, K.-H., Bell, J. A. 2009.** Genus *Staphylococcus*. In: Whitman, W. B. (ed). *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology; Volume 3: The Firmicutes*. Springer. New York. p. 392-421. ISBN: 9780387950419.
- Schönfeld, P., Wojtczak, L. 2008.** Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. **45 (3)**. 231-241.
- Schwartzman, J. D., Reller, L. B., Wang, W.-L. L. 1977.** Susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from human infections to twenty antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **11 (4)**. 695-697.
- Scotland, S., Willshaw, G., Cheasty, T., Rowe, B., Hassall, J. 1994.** Association of enteroaggregative *Escherichia coli* with travellers' diarrhoea. *Journal of Infection*. **29 (1)**. 115-116.
- Sen, C. K., Khanna, S., Roy, S. 2007.** Tocotrienols in health and disease: the other half of the natural vitamin E family. *Molecular aspects of medicine*. **28 (5)**. 692-728.
- Sengupta, A., Ghosh, M., Bhattacharyya, D. 2015.** In vitro antioxidant assay of medium chain fatty acid rich rice bran oil in comparison to native rice bran oil. *Journal of food science and technology*. **52 (8)**. 5188-5195.
- Shah, M., Bishburg, E., Baran, D. A., Chan, T. 2009.** Epidemiology and outcomes of clostridial bacteremia at a tertiary-care institution. *The Scientific World Journal*. **9**. 144-148.
- Shanley, P. 2011.** Fruit trees and useful plants in Amazonian life [online]. Food and Agricultural Organisation. Rome. [cit. 2016-02-05]. Dostupné z <<http://www.fao.org/docrep/015/i2360e/i2360e.pdf>>.
- Shaw, M. K., Marr, A. G., Ingraham, J. L. 1971.** Determination of the minimal temperature for growth of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. **105 (2)**. 683-684.

- Sheu, C. W., Freese, E. 1972.** Effects of fatty acids on growth and envelope proteins of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*. **111** (2). 516-524.
- Sheu, C., Salomon, D., Simmons, J., Sreevalsan, T., Freese, E. 1975.** Inhibitory effects of lipophilic acids and related compounds on bacteria and mammalian cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **7** (3). 349-363.
- Shibasaki, I., Kato, N. 2010.** In Combined effects on antibacterial activity of fatty acids and their esters against gram-negative bacteria. In: Kabara, J. J. (ed). *The pharmacological effects of lipids*. The American Oil Chemist's Society. Champaign. p. 15-24. ISBN: 9353152841.
- Shim, S., Verstegen, M., Kim, I., Kwon, O., Verdonk, J. 2005.** Effects of feeding antibiotic-free creep feed supplemented with oligofructose, probiotics or synbiotics to suckling piglets increases the preweaning weight gain and composition of intestinal microbiota. *Archives of animal nutrition*. **59** (6). 419-427.
- Shin, D., Park, J., Yoon, K., Shin, J., Kim, S. 2003.** *Clostridium perfringens* septicemia with thrombophlebitis of the portal vein. *Journal of Infection*. **46** (4). 253-255.
- Singh, Y. N. 1986.** Traditional medicine in Fiji: some herbal folk cures used by Fiji Indians. *Journal of Ethnopharmacology*. **15** (1). 57-88.
- Singla, R. K., Jaiswal, N., Bhat, V., Jagani, H. 2011.** Antioxidant and antimicrobial activities of *Cocos nucifera* Linn. (*Arecaceae*) endocarp extracts. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1** (4). 354-361.
- Skřivanová, E., Hovorková, P., Čermák, L., Marounek, M. 2015.** Potential use of caprylic acid in broiler chickens: Effect on *Salmonella enteritidis*. *Foodborne pathogens and disease*. **12** (1). 62-67.
- Skřivanová, E., Marounek, M., Benda, V., Březina, P. 2006.** Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Veterinarni Medicina*. **51** (3). 81.
- Skřivanová, E., Marounek, M., Dlouha, G., Kaňka, J. 2005.** Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C2–C18 fatty acids. *Letters in applied microbiology*. **41** (1). 77-81.

- Skřivanová, E., Savka, O., Marounek, M. 2004.** In vitro effect of C2–C18 fatty acids on salmonellas. *Folia microbiologica*. **49 (2)**. 199-202.
- Sloan, R. 2012.** Notice of a claim for exemption based on a GRAS determination of MCT when added directly to human food [online]. *U. S. Food and Drug Administration*. College Park. [cit. 2016-03-16]. Dostupné z <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=172.515>
- Smibert, R. M. 1978.** The genus *Campylobacter*. *Annual Reviews in Microbiology*. **32 (1)**. 673-709.
- Smibert, R. 1974.** Genus *Campylobacter*. In: Buchanan, R., Gibbon, N. (eds). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams Co. Baltimore. p. 207-212. ISBN: 9780683006032.
- Smibert, R. 1970.** Cell wall composition in the classification of *Vibrio fetus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **20 (4)**. 407-412.
- Smith, L. D. 1975.** Inhibition of *Clostridium botulinum* by strains of *Clostridium perfringens* isolated from soil. *Applied microbiology*. **30 (2)**. 319-323.
- Soler, M. P., Vitali, A. d. A., Muto, E. F. 2007.** Tecnologia de quebra do coco babaçu (*Orbignya speciosa*). *Ciência e tecnologia de alimentos*. **27 (4)**. 717-722.
- Songer, J. G. 1996.** Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical microbiology reviews*. **9 (2)**. 216.
- Soto, S. M. 2013.** Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*. **4 (3)**. 223-229.
- Sousa, C. 2006.** The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. **12 (3)**. 363-373.
- Sprong, R. C., Hulstein, M. F., Van der Meer, R. 2001.** Bactericidal activities of milk lipids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45 (4)**. 1298-1301.

- Starr, M. P., Reynolds, D. M. 1951.** Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin. *American Journal of Public Health and the Nations Health*. **41 (11)**. 1375-1380.
- Stiles, B. G., Barth, G., Barth, H., Popoff, M. R. 2013.** *Clostridium perfringens* epsilon toxin: a malevolent molecule for animals and man? *Toxins*. **5 ()**. 2138-2160.
- Stoker, H. S. 2012.** General, organic, and biological chemistry. Channel Center Street. Boston. p. 649. ISBN: 978128585391.
- Sun, C. Q., O'Connor, C. J., Roberton, A. M. 2003.** Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. **36 (1-2)**. 9-17.
- Sundram, K., Sambanthamurthi, R., Tan, Y.-A. 2003.** Palm fruit chemistry and nutrition. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. **12 (3)**. 355-362.
- Sussman, M. 1997.** *Escherichia coli*: mechanisms of virulence. Cambridge University Press. Cambridge. p. 546. ISBN: 9780521453615.
- Švec, P., Devriese, L. 2009.** Genus *Enterococcus*. In: Whitman, W. B. (ed). *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*; Volume 3: The *Firmicutes*. Springer. New York. p. 594-607. ISBN: 9780387950419.
- Swann, M. M. 1969.** Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine: Report Presented to Parliament by the Secretary of State for Social Services. HM Stationery Office. London. p. 83.
- Tabarelli, W., Bonatti, H., Cejna, M., Hartmann, G., Stelzmueller, I., Wenzl, E. 2009.** *Clostridium perfringens* liver abscess after pancreatic resection. *Surgical infections*. **10 (2)**. 159-162.
- Tang, M., Laarveld, B., Van Kessel, A., Hamilton, D., Estrada, A., Patience, J. 1999.** Effect of segregated early weaning on postweaning small intestinal development in pigs. *Journal of animal science*. **77 (12)**. 3191-3200.
- Tatara, M. R., Sliwa, E., Dudek, K., Gawron, A., Piersiak, T., Dobrowolski, P., Mosiewicz, J., Siwicki, A., Studzinski, T. 2008.** Aged garlic extract and allicin

improve performance and gastrointestinal tract development of piglets reared in artificial sow. *Ann Agric Environ Med.* **15** (15). 63-69.

- Taylor, D. E. 1992.** Genetics of *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annual Reviews in Microbiology.* **46** (1). 35-62.
- Tenover, F., Williams, S., Gordon, K., Nolan, C., Plorde, J. 1985.** Survey of plasmids and resistance factors in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* **27** (1). 37-41.
- Thieu, N. Q., Ogle, B., Pettersson, H. 2008.** Efficacy of bentonite clay in ameliorating aflatoxicosis in piglets fed aflatoxin contaminated diets. *Tropical animal health and production.* **40** (8). 649-656.
- Thormar, H., Hilmansson, H., Bergsson, G. 2006.** Stable concentrated emulsions of the 1-monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food-borne bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp.*, and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology.* **72** (1). 522-526.
- Titball, R. W., Naylor, C. E., Basak, A. K. 1999.** The *Clostridium perfringens* α -toxin. *Anaerobe.* **5** (2). 51-64.
- Tuohy, K., Rouzaud, G., Bruck, W., Gibson, G. 2005.** Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics-assessment of efficacy. *Current pharmaceutical design.* **11** (1). 75-90.
- Tweten, R. K. 2001.** *Clostridium perfringens* beta toxin and *Clostridium septicum* alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis. *Veterinary microbiology.* **82** (1). 1-9.
- Ubgogu, O., Onyeagba, R., Chigbu, O. 2006.** Lauric acid content and inhibitory effect of palm kernel oil on two bacterial isolates and *Candida albicans*. *African Journal of Biotechnology.* **5** (11).
- Urioste, D., Castro, M., Biaggio, F. C., Castro, H. F. d. 2008.** Synthesis of chromatographic standards and establishment of a method for the quantification of the fatty ester composition of biodiesel from babassu oil. *Química Nova.* **31** (2). 407-412.

- Valenzuela, A., Morgado, N. 1999.** Trans fatty acid isomers in human health and in the food industry. *Biological research*. **32 (4)**. 273-287.
- Vallee, B. L., Falchuk, K. H. 1993.** The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological reviews*. **73 (1)**. 79-118.
- Van Immerseel, F., Rood, J. I., Moore, R. J., Titball, R. W. 2009.** Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends in microbiology*. **17 (1)**. 32-36.
- Vandamme, P., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., On, S. L. 2005.** Genus *Campylobacter*. In: Brenner, D. (ed). 2005. *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology; The Proteobacteria*. Part C: The *Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Springer. New York. p. 1147-1160. ISBN: 9780387241456.
- Vandenesch, F., Eykyn, S. J., Bes, M., Meugnier, H., Fleurette, J., Etienne, J. 1995.** Identification and ribotypes of *Staphylococcus caprae* isolates isolated as human pathogens and from goat milk. *Journal of clinical microbiology*. **33 (4)**. 888-892.
- Vankerckhoven, V., Huys, G., Vancanneyt, M., Snauwaert, C., Swings, J., Klare, I., Witte, W., Van Autgaerden, T., Chapelle, S., Lammens, C., Goossens, H. 2008.** Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Applied and environmental microbiology*. **74 (14)**. 4247-4255.
- Vargas, M., Gascon, J., Gallardo, F., Anta, M., Vila, J. 1998.** Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains detected by PCR in patients with travelers' diarrhea. *Clinical microbiology and infection*. **4 (12)**. 682-688.
- Vervaeke, I., Decuypere, J., Dierick, N., Henderickx, H. 1979.** Quantitative Evaluation of the Energy Metabolism Influenced by Virginiamycin and Spiramycin used as Growth Promoters in Pig Nutrition. *Journal of Animal Science*. **49 (3)**. 846-856.
- Vondruskova, H., Slamova, R., Trckova, M., Zraly, Z., Pavlik, I. 2010.** Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. *Vet Med*. **55 (5)**. 199-224.

- Walsh, C. T., Sandstead, H. H., Prasad, A. S., Newberne, P. M., Fraker, P. J. 1994.**
Zinc: health effects and research priorities for the 1990s. *Environmental health perspectives*. **102 (2)**. 5.
- Wang, J. H., Wang, X. X., Li, J. T., Chen, Y. Q., Yang, W. J., Zhang, L. Y. 2015.**
Effects of Dietary Coconut Oil as a Medium-chain Fatty Acid Source on Performance, Carcass Composition and Serum Lipids in Male Broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. **28 (2)**. 223-230.
- Wang, J., Chen, L., Li, P., Li, X., Zhou, H., Wang, F., Li, D., Yin, Y., Wu, G. 2008.**
Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. *The Journal of nutrition*. **138 (6)**. 1025-1032.
- Weber, H. 2002.** Fatty acid-derived signals in plants. *Trends in plant science*. **7 (5)**. 217-224.
- Wegener, H. C., Aarestrup, F. M., Jensen, L. B., Hammerum, A. M., Bager, F. 1998.**
The association between the use of antimicrobial growth promoters and development of resistance in pathogenic bacteria towards growth promoting and therapeutic antimicrobials. *J Anim Feed Sci*. **7 (7)**. 14.
- Weng, P. L., Ramli, R., Shamsudin, M. N., Cheah, Y.-K., Hamat, R. A. 2013.** High genetic diversity of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* clinical isolates by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing from a hospital in Malaysia. *BioMed research international*. **05/2013**.
- Weniger, B., Rouzier, M., Daguilh, R., Henrys, P., Henrys, J., Anton, R. 1986.**
Traditional medicine in Central Plateau of Haiti. Ethnopharmacologic inventory. *Journal of Ethnopharmacology*. **17 (1)**. 13-30.
- Whitman, W. B. (ed). 2005a.** Bergey's Manual of Systematics Bacteriology; The *Actinobacteria*, Part A. Springer. New York. p. 2083. ISBN: 9780387950433.
- Whitman, W. B. (ed). 2005b.** Bergey's Manual of Systematics Bacteriology; The *Firmicutes*. Springer. New York. p. 1422. ISBN: 9780387950419.

- WHO (2016).** Health topics: Foodborne diseases [online]. *World Health Organisation*. Geneva. [cit. 2016-03-21]. Dostupné z <http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/en/>.
- WHO (2015a).** WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases: Foodborne Diseases Burden Epidemiology Reference Group 2007-2015. *World Health Organisation*. Geneva. ISBN: 978-92-4-156516-5.
- WHO (2015b).** World health statistics 2015 [online]. *World Health Organisation*. Geneva. [cit. 2016-01-27]. p. 161. Dostupné z <http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2015/en/>.
- WHO (2015c).** Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. *World Health Organisation*. Geneva. p. 42. ISBN: 9789241564946.
- WHO (2014).** WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health [online]. In: Glenn, T. (ed). *Antimicrobial resistance—global surveillance report*. Virtual Press Conference. Geneva. [cit. 2016-01-27]. Dostupné z <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>>.
- Wille, J., Kydonieus, A. 2003.** Palmitoleic acid isomer (C16: 1 Δ 6) in human skin sebum is effective against Gram-positive bacteria. *Skin Pharmacology and Physiology*. **16 (3)**. 176-187.
- Williamson, R. 1983.** Resistance of *Clostridium perfringens* to-Lactam Antibiotics Mediated by a Decreased Affinity of a Single Essential Penicillin-binding Protein. *Journal of general microbiology*. **129 (8)**. 2339-2342.
- Wilson, T., Miwa, T., Smith, C. 1960.** *Cuphea llavea* seed oil, a good source of capric acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **37 (12)**. 675-676.
- Wolf, R., Graham, S., Kleiman, R. 1983.** Fatty acid composition of *Cuphea* seed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **60 (1)**. 103-104.
- Won, S.-R., Hong, M.-J., Kim, Y.-M., Li, C. Y., Kim, J.-W., Rhee, H.-I. 2007.** Oleic acid: an efficient inhibitor of glucosyltransferase. *FEBS letters*. **581 (25)**. 4999-5002.

- Wong, R., Hägg, U., Samaranayake, L., Yuen, M., Seneviratne, C., Kao, R. 2010.** Antimicrobial activity of Chinese medicine herbs against common bacteria in oral biofilm. A pilot study. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. **39** (6). 599-605.
- Wood, A., MacKenzie, G., McGiliveray, N., Brown, L., Devriese, L., Baele, M. 2002.** Isolation of *Enterococcus cecorum* from bone lesions in broiler chickens. *The Veterinary Record*. **150** (1). 27.
- Yamada, M., Takanashi, K., Hamatani, T., Hirayama, A., Akutsu, H., Fukunaga, T., Ogawa, S., Sugawara, K., Shinoda, K., Soga, T., Umezawa, A., Kuji, N., Yoshimura, Y., Tomita, M. 2012.** A medium-chain fatty acid as an alternative energy source in mouse preimplantation development. *Scientific Reports*. **2**. 9.
- Yang, D., Pornpattananangkul, D., Nakatsuji, T., Chan, M., Carson, D., Huang, C.-M., Zhang, L. 2009.** The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against *Propionibacterium acnes*. *Biomaterials*. **30** (30). 6035-6040.
- Yff, B. T., Lindsey, K. L., Taylor, M. B., Erasmus, D. G., Jäger, A. K. 2002.** The pharmacological screening of *Pentania prunelloides* and the isolation of the antibacterial compound palmitic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. **79** (1). 101-107.
- Zalacain, M., Cundliffe, E. 1990.** Methylation of 23S ribosomal RNA due to carB, an antibiotic-resistance determinant from the carbomycin producer, *Streptomyces thermotolerans*. *European Journal of Biochemistry*. **189** (1). 67-72.
- Zanchi, R., Canzi, E., Molteni, L., Scozzoli, M. 2008.** Effect of *Camellia sinensis* L. whole plant extract on piglet intestinal ecosystem. *Annals of microbiology*. **58** (1). 147-152.
- Zheng, C. J., Yoo, J.-S., Lee, T.-G., Cho, H.-Y., Kim, Y.-H., Kim, W.-G. 2005.** Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS letters*. **579** (23). 5157-5162.

Zimmermann, B., Bauer, E., Mosenthin, R. 2001. Pro-and prebiotics in pig nutrition-potential modulators of gut health? *Journal of animal and Feed Sciences*. **10 (1)**. 47-56.

Zullo, J., Anderson, J., Carney, J., de Souza, M., Sperber, W., Tupy, M., Wagener, E. 2007. Antimicrobial compositions, methods and systems. U.S. Patent Application No. 11/704,866.

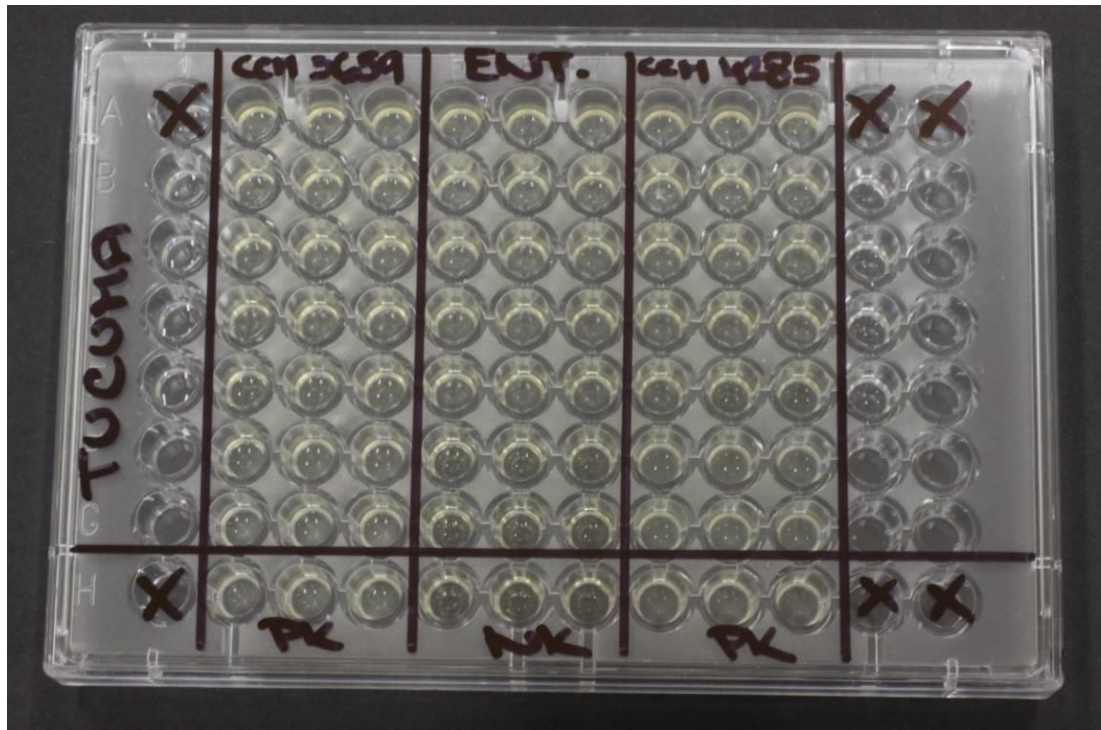
Seznam příloh

Příloha I: Mikrotitrační destička s ředící řadou zásobního roztoku tucuma oleje a bakterií *Enterococcus cecorum* CCM 3659 a CCM 4285 po 24 hodinách inkubace II

Příloha II: Mikrotitrační destička s ředící řadou zásobního roztoku murumuru oleje a bakterií *Enterococcus cecorum* CCM 3659 a CCM 4285 po 24 hodinách inkubace II

Přílohy

Příloha I: Mikrotitrační destička s ředící řadou zásobního roztoku tucuma oleje a bakterií *Enterococcus cecorum* CCM 3659 a CCM 4285 po 24 hodinách inkubace (Foto: Laloučková, 2016)



Příloha II: Mikrotitrační destička s ředící řadou zásobního roztoku muru-muru oleje a bakterií *Enterococcus cecorum* CCM 3659 a CCM 4285 po 24 hodinách inkubace (Foto: Laloučková, 2016)

