

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DISERTAČNÍ PRÁCE

BRNO 2017

LENKA DOSTÁLOVÁ

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



**Vliv vybraných bioaktivních látek na mikroorganismy
kontaminující mléko a mléčné výrobky**
Disertační práce

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

Vypracovala:
Ing. Lenka Dostálová

Brno 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: **Vliv vybraných bioaktivních látek na mikroorganismy kontaminující mléko a mléčné výrobky** vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Brně dne:.....

.....
podpis

Zpracovaná disertační práce byla finančně podpořena z prostředků specifického vysokoškolského výzkumu prostřednictvím projektů IGA AF Mendelovy univerzity v Brně č. TP 9/2013 a IGA TP 10/2014 a projektem NAZV KUS QJ1210302.

PODĚKOVÁNÍ

Velice ráda bych poděkovala svému školiteli Ing. Liboru Kalhotkovi, PhD. nejen za odborné vedení, ale i za jeho ochotu a vstřícný přístup během celého mého doktorského studia. Také bych chtěla poděkovat svým kolegům za jejich pomoc, která pro mne byla velmi důležitá, a to zejména Ing. Jitce Přichystalové, PhD., Ing. Lence Detvanové a Ing. Janě Teplé.

Mé velké díky patří mým rodičům a sestře za pomoc a podporu při studiu.

ABSTRAKT

Cílem disertační práce s názvem Vliv vybraných bioaktivních látek na mikroorganismy kontaminující mléko a mléčné výrobky byla v prvním kroku izolace a identifikace mikroorganismů přítomných v mléce a mléčných výrobcích, následné testování přírodních antimikrobiálních látek ve formě esenciálních olejů z vybraných rostlin metodami *in vitro* (diskovou difúzní metodou a metodou zředování v bujónu) vůči těmto izolátům a čistým sbírkovým kmenům. V dalším kroku byla zjišťována antimikrobiální aktivita esenciálních olejů a vodných výluhů vybraných rostlin vůči mikroflóře přítomné v kozí syrovátce získané při výrobě tvarohu.

Diskovou difúzní metodou byly potvrzeny inhibiční účinky především u esenciálních olejů tymiánu a skořice, které ale nebyly zcela potvrzeny metodou zředování v bujónu, kdy v některých případech naopak došlo k podpoře růstu sledovaných mikroorganismů. Méně významných účinků dosáhly esenciální oleje po přidavku do syrovátky; po ošetření vodnými výluhy docházelo často i k nárůstu některých skupin mikroorganismů oproti kontrolnímu vzorku.

Klíčová slova: antimikrobiální aktivita, esenciální olej, vodný výluh, disková difúzní metoda, metoda zředování v bujónu, konzervace potravin, syrovátka

ANNOTATION

The aim of the dissertation thesis, *The Impact of Bioactive Compounds on Microorganisms Contaminating Milk and Dairy Products*, was to isolate and identify microorganisms contained in milk and dairy products, and to test them for their susceptibility to natural antimicrobial agents (essential oils). Against isolates and defined microorganism, in vitro methods (disc diffusion method and broth dilution method) were used for testing. The next step was an application of essential oils or aqueous extracts directly into goat whey. Subsequently, the impact of bioactive compounds on microflora of whey was observed. Three particular experiments were carried out for each essential oil / aqueous extract. Whey was obtained by the quark production.

Disc diffusion method confirmed significant antimicrobial efficacy of thyme and cinnamon essential oils. These findings were not determined by broth dilution method. Some concentrations of essential oils showed improvement of microbial growth. Inhibitory effects were not mostly observed after the application of bioactive compounds into whey. Counts of microorganisms were often increased after the aqueous extracts were added.

Key words: antimicrobial activity, essential oil, aqueous extract, disc diffusion method, broth dilution method, food preservation, whey

OBSAH

1	ÚVOD.....	13
2	CÍLE PRÁCE	15
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	16
3.1	Charakteristika bioaktivních látek.....	16
3.2	Použití pro prodloužení trvanlivosti potravin	17
3.2.1	Maso.....	18
3.2.2	Zelenina a zeleninové šťávy	19
3.2.3	Ovoce a ovocné šťávy.....	20
3.2.4	Mléko a mléčné výrobky	20
3.3	Jednotlivé bioaktivní sloučeniny.....	22
3.3.1	Flavonoidy	23
3.3.2	Taniny	23
3.3.3	Fytoalexiny	23
3.3.4	Fenolické kyseliny	23
3.3.5	Alkaloidy	24
3.3.6	Terpenoidy	24
3.3.7	Saponiny	24
3.3.8	Defensiny	25
3.3.9	Esenciální oleje	25
3.4	Zdroje antimikrobiálních látek z rostlin.....	25
3.5	Rostliny s antimikrobiálními účinky.....	26
3.5.1	Tymián obecný	26
3.5.2	Dobromysl obecná	27
3.5.3	Rozmarýn lékařský	27
3.5.4	Bazalka pravá.....	27
3.5.5	Levandule úzkolistá	28

3.5.6	Šalvěj lékařská	28
3.5.7	Máta dlouholistá	28
3.5.8	Anýz vonný.....	29
3.5.9	Fenykl obecný.....	29
3.5.10	Hřebíčkovce vonný	29
3.5.11	Skořicovník cejlonský.....	30
3.5.12	Zázvor lékařský.....	30
3.6	Možnosti získávání bioaktivních látek z rostlin.....	30
3.6.1	Konvenční extrakční techniky	31
3.6.1.1	Macerace	31
3.6.1.2	Hydrodestilace.....	32
3.6.1.3	Soxhletova extrakce	32
3.6.2	Nekonvenční extrakční techniky	32
3.6.2.1	Ultrazvukem asistovaná extrakce.....	32
3.6.2.2	Extrakce v pulzním elektrickém poli	33
3.6.2.3	Enzymově asistovaná extrakce	33
3.6.2.4	Mikrovlnná asistovaná extrakce.....	34
3.6.2.5	Infračervená asistovaná extrakce	34
3.6.2.6	Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem	34
3.6.2.7	Nadkritická fluidní extrakce.....	35
3.7	Charakteristika získaných bioaktivních produktů.....	35
3.7.1	Extrakty.....	35
3.7.2	Esenciální oleje	36
3.8	Mechanismus účinku.....	37
3.9	Synergistické/antagonistické působení antimikrobiálních látek	40
3.10	Metody stanovení antimikrobiální aktivity	40
3.10.1	Metody in vitro	40

3.10.1.1	Disková difuzní metoda.....	41
3.10.1.2	Zřed'ovací metody	42
3.10.1.3	Mikroatmosférické metody	43
3.10.1.4	Testování antimikrobiálních vlastností přímo v potravinách	43
3.11	Mikroorganismy kontaminující mléko a mléčné výrobky	45
4	MATERIÁL A METODIKA	50
4.1	Charakteristika materiálu použitého pro testování antimikrobiální aktivity <i>in vitro</i>	50
4.1.1	Esenciální oleje	50
4.1.2	Bakteriální a kvasinkové izoláty.....	50
4.1.3	Biochemické testy EN-COCCUStest, ENTEROtest 24, ENTEROtest 24N, CANDIDA-Screen	56
4.1.4	API test 50 CH.....	56
4.2	Testování antimikrobiální účinnosti <i>in vitro</i>	56
4.2.1	Disková difuzní metoda	57
4.2.2	Metoda zřed'ování v bujónu.....	57
4.3	Testování antimikrobiální účinnosti <i>in vivo</i>	58
4.3.1	Esenciální oleje	59
4.3.2	Vodné extrakty.....	59
4.3.3	Syrovátka	59
4.3.4	Sledování dynamiky vývoje mikrobiální populace v syrovátce s přidavkem účinných látek	60
4.4	Metody statistického zpracování dat	62
4.4.1	Testování antimikrobiální aktivity esenciálních olejů <i>in vitro</i>	62
4.4.1.1	Disková difuzní metoda	62
4.4.1.2	Měření zákalu.....	62
4.4.2	Testování antimikrobiální účinnosti <i>in vivo</i>	63
4.4.2.1	Sledování dynamiky vývoje mikrobiální populace v syrovátce s přidavkem účinných látek	63

5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	64
5.1	Identifikace izolovaných mikroorganismů.....	64
5.1.1	Gramnegativní bakterie.....	64
5.1.2	Enterokoky.....	66
5.1.3	Bakterie mléčného kysání.....	68
5.1.4	Kvasinky.....	69
5.2	Testování antimikrobiální aktivity esenciálních olejů <i>in vitro</i>	71
5.2.1	Disková difuzní metoda.....	71
5.2.1.1	Gramnegativní bakterie.....	71
5.2.1.2	Enterokoky.....	75
5.2.1.3	Bakterie mléčného kysání.....	77
5.2.1.4	Kvasinky.....	79
5.2.2	Metoda zředování v bujónu.....	81
5.2.2.1	Čisté kultury.....	81
5.2.2.2	Enterokoky.....	89
5.2.2.3	Gramnegativní bakterie.....	94
5.2.2.4	Bakterie mléčného kysání.....	100
5.2.2.5	Kvasinky.....	108
5.2.3	Přídavek esenciálních olejů a výluhů z rostlin do syrovátky.....	118
5.2.3.1	Skořicovník cejlonský.....	118
5.2.3.2	Tymián obecný.....	126
5.2.3.3	Levandule úzkolistá.....	132
5.2.3.4	Fenykl obecný.....	137
5.2.3.5	Anýz vonný.....	143
6	ZÁVĚR.....	149
7	SUMMARY.....	152
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	155

9	SEZNAM TABULEK	186
10	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	188
11	SEZNAM ZKRATEK	190
12	PŘÍLOHY	191

1 ÚVOD

Bioaktivním látkám obsaženým v rostlinách je věnována značná pozornost, která je dána obecným zájmem o látky přírodní povahy a jejich použití při možném prodlužování trvanlivosti potravin. V různé míře vykazují antioxidační a antimikrobiální vlastnosti, které mohou zpomalit nebo zabránit znehodnocení potravin. Při přidavku rostlinných extraktů je nutno brát v úvahu jejich senzoričké vlastnosti, které mohou využití rostlinného materiálu výrazně omezit. Charakteristická vůně nebo chuť některých rostlin předem určuje jejich použití pro slanou, nebo sladkou úpravu potravin. Možnosti využití může omezit i vztah mezi intenzitou účinku a aroma – nejnižší již účinná koncentrace bioaktivní látky může být vzhledem k intenzitě aroma již tak vysoká, že potravina je pro spotřebitele ze senzoričkého hlediska nepřijatelná. Dalším aspektem použití přírodních látek v potravinách může být i možný benefit pro lidský organismus, ať již v podobě podpory obranyschopnosti, podpory trávení, podpory funkce orgánů a podobně.

Účinné látky z rostlin by mohly získat poměrně široké využití při ošetření mléčných výrobků, protože právě jejich paleta je velmi pestrá a různorodá z hlediska sladkých či slaných variant. Patrně nejčastěji je zjišťován vliv bioaktivních látek na údržnost a vlastnosti sýrů a jogurtů, a to z kravského, kozího, ovčího nebo buvolího mléka. Sýry jsou častěji ošetřovány čerstvé, a to zejména výtažky tymiánu, rozmarýnu nebo dobromysli, v některých případech ale i například skořicí. U jogurtů již přichází v úvahu spíše rostliny s aroma vhodným pro sladké potraviny, například skořice, levandule nebo anýz. Účinky bioaktivních látek mohou být studovány v různých formách styku s potravinou – přidavkem přímo do hmoty mléčného výrobku, ošetřením jejich povrchu, případně použitím pro povrchovou úpravu vnitřní vrstvy obalu, z níž se postupně uvolňují. Jak již bylo zmíněno, je nutné ve všech případech brát zřetel na senzoričké ovlivnění výrobku, k němuž musí být přihlédnuto při volbě vhodné koncentrace účinné látky.

Antimikrobiální vlastnosti bioaktivních látek jsou testovány nejen vůči mikroorganismům způsobujícím kažení potravin, ale i proti významným lidským patogenům, jako je například *Listeria monocytogenes* nebo *Salmonella*. Některé z bioaktivních látek vykazují účinky i proti bakteriím, které jsou rezistentní k antibiotikům – výhodou přírodních látek je nejednotný mechanismus účinku, který je

dán mimojiné i rozmanitostí obsažených složek. I proto je přírodním antimikrobiálním látkám přisuzován značný potenciál při vývoji nových možností konzervace potravin.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části této disertační práce bylo shrnout poznatky o bioaktivních látkách obsažených v rostlinách a jejich možném využití pro prodloužení údržnosti mléčných výrobků. Tyto poznatky zahrnují jak informace o jednotlivých účinných složkách, mechanismu jejich působení, metodách získávání a možnostech jejich použití v potravinách, tak i o mikroorganismech přítomných v mléce a mléčných výrobcích a jejich citlivosti k působení přírodních antimikrobiálních látek.

Cílem praktické části pak byla nejprve izolace a identifikace vybraných skupin mikroorganismů a testování jejich citlivosti k působení bioaktivních látek ve formě esenciálních olejů metodami *in vitro* a následně i metodou *in vivo*, a to přidavkem esenciálních olejů a vodných výluhů přímo do syrovátky, kde byl sledován vývoj mikroflóry a ovlivnění růstu vybraných skupin mikroorganismů účinnými látkami.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Charakteristika bioaktivních látek

Rostliny produkují kromě primárních metabolitů (uhlovodíky, bílkoviny a tuky) i velké množství rozmanitých nízkomolekulárních látek – sekundárních metabolitů. Ty jsou nejen zdrojem aktivních fytochemikálií, ale hrají také roli při adaptaci rostliny v životním prostředí. (Razzaghi-Abyaneh et Shams-Ghahfarokhi, 2011). Jsou součástí obranného mechanismu rostliny proti infekcím (Tiwari et al., 2011). Mnoho antimikrobiálních sloučenin přítomných v rostlinách může být součástí pre- nebo postinfekčního obranného mechanismu pro boj s infekcemi nebo parazity (Lai et Roy, 2004). Rostliny, které vykazují relativně vysoký stupeň antimikrobiálního působení, mohou být zdrojem vhodných sloučenin inhibujících mikroorganismy kontaminující potraviny (patogeny). Tyto sloučeniny jsou tvořeny i jako odpověď na stres, a to z inaktivních prekurzorů (Sofos et al., 1998), které mohou být aktivovány enzymy – hydrolázami nebo oxidázami, které jsou obvykle přítomné v rostlinných tkáních (Holley et Patel, 2005). V hořčici a křenu jsou glukosinolátové prekurzory přeměněny enzymem myrosinázou na řadu isothiokyanátů včetně allylové formy, která je silným antimikrobiálním činidlem (Tiwari et al., 2011). Celkem bylo objeveno více než 100 000 sekundárních metabolitů produkovaných rostlinami, z nichž jich bylo chemicky identifikováno přibližně 10 000. Z těchto sloučenin jsou nejlépe známy flavonoidy, fenylypropanoidy, kumariny, flavony, fenoly, polyfenoly, fenolické kyseliny, chinony, taniny, alkaloidy, terpenoidy a esenciální těkavé látky (Razzaghi-Abyaneh et Shams-Ghahfarokhi, 2011; Blazekovic et al., 2011; Tajkarimi et al., 2010; Lai et Roy, 2004). Tyto látky jsou schopny zpomalovat nebo zastavovat růst bakterií, kvasinek a plísní (Tiwari et al., 2011). Mohou působit na mikrobiální buňky letálně nebo inhibovat produkci sekundárních metabolitů, například mykotoxinů (Davidson, 2001). Některé funkční látky slouží jako faktory podporující růst probiotik. Například fenolické sloučeniny, antioxidanty a mikronutrienty pouze neaktivují růst, ale také zvyšují počty bakteriálních populací. Některé druhy těchto probiotik jsou schopné metabolizovat fenolické sloučeniny a tyto látky pak slouží jako pohlcovače kyslíku, které by mohly zvýšit růst některých probiotických bakterií (Alberto et al., 2001). Většina bioaktivních látek je získávána v podobě extraktů a esenciálních olejů z rostlin (Valero et al., 2003), ale může se jednat i o produkty samotných mikroorganismů (Acharya et al., 2011).

Rostlinné sekundární metabolity jsou zajímavé jakožto ochucovadla, vonné látky, pesticidy, farmaceutika a antimikrobiální látky (Razzaghi-Abyaneh et Shams-Ghahfarokhi, 2011).

Bylinné extrakty a esenciální oleje jsou používány jako přírodní konzervanty pro prodloužení údržnosti potravin a zachování jejich zdravotní nezávadnosti – snižují počet mikroorganismů nebo jejich životaschopnost (Roby et al., 2013; Ali-Shtayeh et al., 1998; Bagiu et al., 2012; Hammer et al., 1999; Tiwari et al., 2011). Výhodou bylin je, že jsou hojně pěstované, účinné a bezpečné pro konzumaci (Wong et Kitts, 2006). Přírodní antimikrobiální látky mohou být použity samostatně nebo v synergisticky působících kombinacích jako aditiva. Synergisticky působí také v součinnosti s dalšími způsoby ošetření potravin (Tiwari et al., 2011).

Používání antibiotik vedlo ke vzniku a šíření multirezistentních patogenů. Z tohoto důvodu vzrůstá zájem o použití přírodních antimikrobiálních látek. Oproti antibiotikům mají esenciální oleje a bylinné extrakty výhodu v tom, že na bakteriální buňku mohou působit různými mechanismy, díky čemuž je pro bakterii obtížnější vytvořit si na ně rezistenci (Al-Bayati, 2008). Dosud nebyly zjištěny žádné bakteriální druhy rezistentní vůči koření nebo bylinám (Lai et Roy, 2004).

Antimikrobiální aktivita závisí na druhu byliny, koncentraci účinné látky, druhu, koncentraci a případné rezistenci cíleného mikroorganismu, složení substrátu, na podmínkách zpracování a uchovávání potravin a fyzikální struktuře potravin (Mau et al., 2001; Tajkarimi et al., 2010). Antimikrobiální vlastnosti účinných látek mohou být oslabeny navázáním na složky potravin, inaktivací jinými aditivami, nízkou rozpustností nebo nerovnoměrnou distribucí ve hmotě potraviny (Tiwari et al., 2011). Množství účinné sloučeniny v extraktu je závislé na jejím druhu, geografickém původu, použité části rostliny, metodě extrakce nebo sušení, přípravě, obalovém materiálu a uchovávání (Farzaneh et Carvalho, 2015).

3.2 Použití pro prodloužení trvanlivosti potravin

Mechanismus účinku, ani toxikologický a sensorický efekt přírodních antimikrobiálních látek nejsou zcela známy. I přesto vzrůstá zájem o jejich použití pro zajištění zdravotní nezávadnosti potravin (Tajkarimi et al., 2010). Technologie zpracování potravin jako je například chemická konzervace nedokáže eliminovat patogeny jako je *Listeria monocytogenes* nebo zcela oddálit mikrobiální zkázu potraviny. Distribuce rychle

se kazičních potravin v chladu může napomoci, ale nemůže zcela garantovat zdravotní nezávadnost a kvalitu produktu (Burt, 2004; Solórzano-Santos et al., 2012). V potravinách jsou přírodní antimikrobiální látky užívány ze dvou důvodů: pro kontrolu přirozeného kažení potravin (pro konzervaci potravin) a pro předcházení růstu mikroorganismů, včetně patogenních mikroorganismů, tedy pro zajištění zdravotní nezávadnosti potravin (Tajkarimi et al., 2010). Antimikrobiální látky pocházející z rostlinných materiálů jsou obecně považovány za bezpečnější ve srovnání s průmyslovými konzervanty. Přírodní antimikrobiální látky se stávají populárnějšími také kvůli zvyšujícím se obavám konzumentů s ohledem na používání syntetických chemických přípravků a průmyslových antimikrobiálních konzervantů (Marino et al., 2001; Hamedo et Abdelmigid, 2009; Solórzano-Santos et al., 2012). Výhody, které mohou plynout z používání přírodních antimikrobiálních látek, jsou následující: redukce absolutní závislosti na antibiotikách, snížení rozvoje rezistence vůči antibiotikům u patogenních mikroorganismů, kontrola křížové kontaminace, zlepšení technologie konzervace potravin a posílení imunitního systému lidí (Abou-Taleb et Kawai, 2008; Fisher et Phillips, 2008; Tajkarimi et al., 2010).

3.2.1 Maso

Rostlinnými extrakty a esenciálními oleji jsou ošetřovány různé potraviny. Ntzimani et al. (2010) zjišťovali vliv esenciálního oleje rozmarýnu a dobromysli v kombinaci s ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA) na mikroflóru vakuově baleného kuřecího masa. Ismail et al. (2001) sledovali vliv ponoření syrové drůbeže do bylinných dekokcí na redukci kvasinky *Yarrowia lipolytica*. K významnému snížení populace došlo při ošetření dekokcí bazalky, majoránky, šalvěže a tymiánu, naopak dekokce dobromysli a rozmarýnu růst kvasinky významně nepotlačily. Na kuřecích prsních řízcích byl sledován účinek N-karboxymethyl chitosanu a esenciálního oleje dobromysli proti *Listeria monocytogenes* (Khanjari et al., 2013). V obou případech došlo k redukci počtu přítomných mikrobů. Aktivita esenciálního oleje dobromysli byla testována i v baleném skopovém mase proti *Salmonella* Enteritidis, společně s nisinem. Zatímco nisin nebyl samostatně proti *S. Enteritidis* účinný a EO dobromysli pouze slabě, jejich kombinace působila ve vyšší testované koncentraci baktericidně (Govaris et al., 2010). Synergistického efektu dosáhl přídavek chitosanu a rozmarýnového esenciálního oleje do veprových párků (Georgantelis et al., 2007). Nowak et al. (2012) stanovili minimální

inhibiční koncentraci (MIC) esenciálních olejů tymiánu a rozmarýnu proti *Brochothrix thermosphacta* a touto koncentrací ošetřili hovězí maso. V něm však nebyl pozorován žádný antimikrobiální účinek EO. Filety pstruha duhového byly experimentálně konzervovány přidavkem soli a esenciálního oleje dobromysli a baleny ve vakuu. Bylo zjištěno, že tyto faktory působí synergisticky – jejich kombinací bylo dosaženo nejvýraznějšího snížení počtu životaschopných mikroorganismů (Frangos et al., 2010). Synergismus byl prokázán i v případě balení filetů pstruha duhového s esenciálním olejem dobromysli a pohlcovačem kyslíku (Mexis et al., 2009).

3.2.2 Zelenina a zeleninové šťávy

Wan et al. (1998) studovali vliv omývání čerstvého salátu estragolem získaným z bazalky na přežití přirozené mikroflóry. Zjistili, že omývání 0,1% a 1% estragolem bylo porovnatelné s omýváním salátu chlorovým roztokem o koncentraci 125 ppm. Moore-Neibel et al. (2013) ošetřili listy ledového a římského salátu a špenátu kontaminovaného *Salmonella* Enteritidis v lázni s roztoky esenciálního oleje dobromysli. Oproti kontrolnímu vzorku došlo ke snížení počtu *S. Enteritidis* o téměř pět logaritmických řádů. Esenciální olej tymiánu a jeho složky thymol a karvakrol zabraňují na listovém salátu růstu *Shigella flexneri* a *Shigella sonnei* (Bagamboula et al., 2004). Dekontaminací listového salátu pomocí esenciálních olejů se zabývali ve své studii i Siroli et al. (2015). Potlačení růstu kontaminující mikroflóry bylo nejvýraznější v případě esenciálních olejů dobromysli a tymiánu. Alvarez et al. (2015) ošetřovali kombinací esenciálního oleje čajovníku čínského, propolisového extraktu a kyseliny gallové zeleninovou směs na polévku (celer, pór, muškátová dýně) a sledovali vliv na kontaminující mikroflóru. Zjistili, že tyto látky jsou účinné pouze v kombinaci s chladničkovou teplotou (5 °C), kdy mimo jiné výrazně snižují počty koliformních bakterií a působí bakteriostaticky na *E. coli* O157:H7 (). Také Valero et al. (2003) se zabývali antimikrobiálním působením esenciálních olejů. Testovali působení 11 různých esenciálních olejů proti *Bacillus cereus* v pasterované mrkvové šťávě. Nejlepších výsledků dosáhla skořice v kombinaci se skladováním při chladničkové teplotě (<8 °C).

3.2.3 Ovoce a ovocné šťávy

Yang et al. (2014) použili jako antimikrobiální činidlo k posklizňovému ošetření plodů borůvek extrakt z jejich listů. Nejlepších výsledků bylo dosaženo v kombinaci s balením v ochranné atmosféře. Pro prodloužení trvanlivosti jablek, odrůdy Jonagored, byl testován pullulanový film obsahující extrakt z bazalky. Proti mezofilním bakteriím vykázal pouze slabou aktivitu, ale velice dobře účinkoval proti *Rhizopus arrhizus* (Synowiec et al., 2014). Kraśniewska et al. (2014) použili pro ošetření povrchu jablek a pepře pullulanový film obsahující vodný, nebo ethanolový extrakt saturejky. Nejen, že s rostoucí koncentrací extraktu stoupala antimikrobiální aktivita, ale byly zjištěny i menší ztráty hmotnosti během skladování. Výrazně účinnější proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím a proti *Penicillium expansum* byl film obsahující vodný extrakt saturejky. V jablečném džusu byla zkoumána aktivita kombinací složek esenciálních olejů (cinnamaldehyd, perillaldehyd a citral) proti *Zygosaccharomyces bailii*. Nejméně účinná byla kombinace perillaldehydu a citralu, ostatní kombinace byly velmi účinné již při nízkých dávkách (Loeffler et al., 2014). Aznar et al. (2014) testovali antikandidózní aktivitu nisinu, thymolu, karvakrolu a cymenu proti růstu *Candida lusitanae* v živném médiu. Nejsilnější inhibiční účinky byly prokázány u thymolu, který byl následně použit pro konzervaci rajčatového džusu. Z výsledků vyplynulo, že by byl vhodným potenciálním konzervantem.

3.2.4 Mléko a mléčné výrobky

Cava-Roda et al. (2012) testovali antimikrobiální účinnost vanilinu ve směsi s esenciálními oleji hřebíčku a skořice proti *Listeria monocytogenes* a *Escherichia coli* O157:H7 v polotučném a plnotučném mléce. *E. coli* byla k působení těchto látek citlivější než *L. monocytogenes*. Antimikrobiální účinek byl v případě obou bakterií snížen v plnotučném mléce, což je zřejmě způsobeno ochranným působením molekul tuku. V různě tučném (odstředěném, 1%, 2% a plnotučném) UHT mléce byl testován vliv vodného extraktu ibišku súdánského na růst *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. *S. aureus* byl inhibován při nižší koncentraci extraktu, než tomu bylo u *E. coli* (Higginbotham et al., 2014). Synergistické působení bylo pozorováno při ošetření polotučného mléka vysokým hydrostatickým tlakem a přídatkem karvakrolu. Mléko bylo záměrně kontaminováno *L. monocytogenes* a uchovávalo při třech různých

teplotách (1, 8 a 20 °C). Antimikrobiální účinnost stoupala s klesající teplotou (Karatzas et al., 2001). *L. monocytogenes* je citlivá i k působení extraktu chmele.

Ve studii Larsona et al. (1996) bylo prokázáno, že vzhledem ke složitosti potravinové matrice se snižuje aktivita bioaktivních látek oproti aktivitě v živném médiu. Inhibiční účinky se snižovaly se vzrůstající tučností mléka – v plnotučném mléce extrakty účinkovaly až ve vyšších koncentracích než v polotučném a odstředěném mléce. Proti *L. monocytogenes* a *E. coli* v mléce byl zkoumán také vliv fenolického extraktu rozmarýnu. Citlivější byla *L. monocytogenes*, pro inhibici *E. coli* byly potřeba vyšší koncentrace extraktu. U obou bakterií bylo zjištěno, že v mléce je díky interakcím s jeho složkami antimikrobiální účinnost snížena oproti živnému médiu (Klančnik et al., 2011). Vodné extrakty dobromysli, majoránky, šalvěže a lékořice byly testovány proti *Bacillus subtilis* a *E. coli* v mléce a labnehu. Všechny extrakty byly účinnější vůči *B. subtilis*. Nejsilnější antimikrobiální účinky vykázal vodný extrakt dobromysli (Al-Turki et al., 2008). V labnehu bez přídavku soli byl zkoumán vliv přídavku esenciálních olejů kopru a kmínu na přítomnou mikroflóru. Startovací kultury nebyly přítomností esenciálních olejů ovlivněny. Koliformní bakterie, kvasinky a plísňe nebyly po celou dobu skladování (28 dní při 7 °C) detekovány (Zaky et al., 2013). Do měkkého sýru zaočkovaného *L. monocytogenes* byl přidán čerstvý česnek a mletý hřebíček. Po 2 týdnech skladování při různých teplotních režimech nebyl zjištěn žádný inhibiční účinek proti *L. monocytogenes*. Účinky česneku a hřebíčku byly současně testovány i v živném médiu. Hřebíček působil bakteriostaticky, česnek dokonce baktericidně. Tato skutečnost potvrzuje, že antimikrobiální účinky bioaktivních látek jsou ve složité potravinové matici oslabeny (Leuschner et Ielsch, 2003).

V potravinách, které jsou ošetřeny esenciálními oleji, je důležitá přítomnost tuku a jeho množství. Esenciální olej má schopnost se v potravinovém tuku rozptýlovat, čímž klesá jeho aktivita. Se zvyšujícím se obsahem tuku se snižuje antimikrobiální účinnost EO. To bylo potvrzeno ve studii Amatiste et al. (2014) při testování účinnosti esenciálních olejů dobromysli a tymiánu pro potlačení růstu *Staphylococcus aureus*. Zatímco v živném médiu došlo k potlačení jeho růstu, v čerstvém ovčím sýru zůstaly počty *S. aureus* nezměněny. V řeckém jogurtu byl sledován vliv sedmi esenciálních olejů na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Nejvýznamnější inhibiční účinky byly pozorovány u esenciálního oleje kmínu a semínek kopru. Grampozitivní bakterie byly obecně citlivější, zejména *L. monocytogenes*, naopak nejméně byla esenciálními oleji

ovlivněna *E. coli* O157:H7. Startérové kultury (*Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) nebyly ovlivněny přidavkem eseciálních olejů (Mohamed et al., 2013). Při přípravě jogurtu Behrad et al. (2011) použili k jeho ošetření skořici a lékořici. Byl sledován případný dopad na probiotické kultury a in vitro vliv na *Helicobacter pylori*. Během kysání a skladování nebyly probiotické kultury ovlivněny. Naopak *Helicobacter pylori* byl inhibován, zejména v jogurtu s extraktem skořice. Růst probiotických bakterií *Bifidobacterium bifidum* a *Lactobacillus acidophilus* byl sledován v mléce a jogurtu s přidavkem heřmánkového extraktu. Zlepšení růstu a fermentačního procesu bylo pozorováno ve všech vzorcích kromě mléka s přidavkem *Bifidobacterium bifidum* (Marhamatizadeh et al., 2012). Účinky máty dlouholisté na životaschopnost a buněčnou strukturu *Lactobacillus casei* zkoumali Mahmoudi et al. (2013). Heřmánek měl na *L. casei* pozitivní vliv – došlo ke zvýšení životaschopnosti a jeho buněčná struktura nebyla nijak poškozena.

3.3 Jednotlivé bioaktivní sloučeniny

Fytochemikálie přítomné v rostlinách je možné rozdělit podle chemické struktury do čtyř skupin – na polyfenoly, které se dále dělí na flavonoidy (antokyanidiny, flavony, flavonoly, flavonony, flavanoly, isoflavony a taniny), fenolické kyseliny (hydroxycinamáty a hydroxybenzoáty) a ostatní (stilbeny, kumariny a lignany); dále na terpeny (karotenoidy, monoterpeny), organosírné sloučeniny (diallylsulfidy a isothiokyanáty) a ostatní (chinony a biguanidy) jak uvádějí Béliveau et Gingras (2008).

Hlavní část antimikrobiálních látek obsažených v rostlinách tvoří fenolické sloučeniny (Ceylan et Fung, 2004). Dosud bylo identifikováno více než 8000 fenolických struktur. Tyto sloučeniny mohou obsahovat jeden nebo více aromatických kruhů s jednou či více substituovanými hydroxylovými skupinami a funkční deriváty (estery, methylestery, glykosidy atd.). Z fenolických látek se vyskytují nejčastěji fenolické kyseliny, flavonoidy a taniny, méně často pak stilbeny, lignany, chalkony, kumariny a xanthony (Martins et al., 2015). Obsah účinných látek je závislý na části rostliny, ontogenetické fázi a na vnějších faktorech, jako jsou biotický a abiotický stres a klimatické podmínky (Zielińska et Matkowski, 2014).

3.3.1 Flavonoidy

Široce rozšířenou skupinou sekundárních metabolitů jsou flavonoidy. Již bylo identifikováno více než 500 přirozeně se vyskytujících flavonoidů v rostlinách (Harborne et Williams, 2000). Mají mnoho významných funkcí, působí antioxidačně, vychytávají volné radikály, mají protizánětlivé, antialergické, antimikrobiální a protirakovinné účinky (Razzaghi-Abyaneh et Shams-Ghahfarokhi, 2011). Jsou hlavní skupinou látek fenolické povahy, které hrají důležitou roli při pigmentaci rostliny a její ochraně proti UV záření a chorobám. Mezi nejčastěji se vyskytující flavonoidy patří kvercetin, kaempferol, katechiny, proantokyanidy, apigenin a antokyany (Voon et al., 2012).

3.3.2 Taniny

Taniny jsou skupinou polymerických fenolických sloučenin, které jsou v rostlinách hojně rozšířeny. Jsou známy pro své svíravé účinky a jsou syntetizovány kondenzací flavanových derivátů nebo polymerizací chinonových jednotek. Taniny tvoří komplex s mikrobiálními adhesiny, enzymy a transportními proteiny na povrchu buňky, což vede k inaktivaci těchto proteinů a inhibici mikrobiálního růstu. Taniny jsou účinné proti vláknitým houbám, kvasinkám a bakteriím. Mezi rostliny s vyšším obsahem taninů patří *Allium* subsp. (česnek), *Cassia fistula* (kasie obecná), *Etingera elatior* (etlingera vyšší) a *Rumex vesicarius* (šťovík) (Mostafa et al., 2011; Voon et al., 2012).

3.3.3 Fytoalexiny

Fytoalexiny jsou definovány jako antibiotické sloučeniny vznikající v rostlině metabolickými cestami vyvolanými biologicky nebo jako odpověď na chemické či environmentální faktory. Fytoalexiny jsou produkovány především rostlinami z čeledi *Leguminaceae* a *Rosaceae*. Mají isoflavonoidové struktury klasifikované jako isoflavony, isoflavanony a isoflavany (Razzaghi-Abyaneh et Shams-Ghahfarokhi, 2011; Li et al., 2015).

3.3.4 Fenolické kyseliny

U fenolických kyselin byly prokázány například antioxidační, protirakovinné a antimikrobiální účinky. Mezi významné fenolické kyseliny patří kyselina gallová, p-hydroxybenzoová, protokatechová, vanilinová, syringová, skořicová, kumarová,

ferulová nebo kyselina kávová. U těchto kyselin byly zjištěny antimikrobiální účinky (bakteriostatické i baktericidní) proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím a významným patogenům (Heleno et al., 2015; Gyawali et Ibrahim, 2012; Voon et al., 2012).

3.3.5 Alkaloidy

Alkaloidy jsou nízkomolekulární sekundární metabolity s heterocyklickou strukturou obsahující dusík. Vyskytují se v prahových množstvích přibližně ve 20 % všech rostlin s více než 12 000 identifikovanými strukturami. Jsou produkovány i bakteriemi a houbami (Razzaghi-Abyaneh et Shams-Ghahfarokhi, 2011; Voon et al., 2012). Antimikrobiálně působí proti bakteriím i kvasinkám, včetně *Candida* sp. (Martins et al., 2015; Akinyemi et al., 2006).

3.3.6 Terpenoidy

Terpenoidy jsou velkou (více než 30 000 různých sloučenin) a různorodou skupinou rostlinných sekundárních metabolitů s multicyklickou strukturou odvozenou od pětiuhlíkatých isoprenových jednotek. Hlavními skupinami, které jsou přítomny v bylinách a kořeni, jsou monoterpeny a diterpeny. Vykazují významné biologické účinky, včetně antimikrobiálního působení proti širokému spektru patogenů, např. *Candida* sp. (Martins et al., 2015) nebo *L. monocytogenes* (Zielińska et Matkowski, 2014). Jsou hojně využívány díky jejich charakteristickému aroma a jejich důležité roli v tradiční bylinné léčbě jako antimikrobiální látky a antineoplastika (Razzaghi-Abyaneh et Shams-Ghahfarokhi, 2011).

3.3.7 Saponiny

Saponiny jsou skupinou přirozeně se vyskytujících látek v různých rostlinách. Jsou to nízkomolekulární sekundární metabolity poskytující velké množství biologických účinků zodpovědných za ochranu rostliny proti hmyzu, houbám a dalším nebezpečným mikroorganismům. Třemi hlavními skupinami saponinů jsou triterpenoidy, steroidy a steroidní glykoalkaloidy (Razzaghi-Abyaneh et Shams-Ghahfarokhi, 2011; Liu et al., 2015).

3.3.8 Defensiny

Rostlinné defensiny jsou důležitou skupinou kationických peptidů s účinky proti širokému spektru mikroorganismů včetně bakterií, hub a virů. Je známo, že mají inhibiční účinky vůči rakovinným buňkám, klíčovým mikrobiálním enzymům a iontovým kanálům (Razzaghi-Abyaneh et Shams-Ghahfarokhi, 2011; Zhang et al., 2015).

3.3.9 Esenciální oleje

Esenciální oleje jsou sekundární metabolity bohaté na různé sloučeniny, mezi něž patří fenolické sloučeniny, terpeny, terpenoidy, alifatické alkoholy, aldehydy, ketony, kyseliny a isoflavonoidy (Gutierrez et al., 2008; Tajkarimi et al., 2010). Mezi hlavní antimikrobiální látky obsažené v esenciálních olejích koření patří jednoduché a složené sloučeniny fenolu. Chemické analýzy širokého spektra esenciálních olejů odhalily, že jejich hlavními složkami jsou karvakrol, thymol, citral, eugenol a jejich prekurzory (Gyawali et Ibrahim, 2012). Složení esenciálních olejů závisí na době sklizně a fenologické fázi – koncentrace účinných látek se liší v jednotlivých fázích kvetení a rozdílná je i po vysemenění (Suppakul et al., 2003). Antimikrobiální účinnost esenciálních olejů je závislá na mnoha faktorech, jako je chemická struktura jejich složek, stejně jako koncentrace. Jsou zde však i další důležité faktory ovlivňující antimikrobiální účinnost v potravinách. Patří mezi ně shoda spektra antimikrobiální účinnosti s cíleným mikroorganismem, interakce s hmotou potravin a metoda aplikace (Cowan, 1999; Tiwari et al., 2011).

3.4 Zdroje antimikrobiálních látek z rostlin

Přírodní bioaktivní látky jsou získávány z nadzemních částí rostlin, ze semen, plodů, kořenů, oddenků a květů nebo pupenů (Voon et al., 2012, Skandamis et Nychas, 2000; Gutierrez et al., 2008). Mezi nejznámější rostliny, které obsahují účinné látky, patří aloe vera (*Aloe vera* (L) Burm. f.), anýz vonný (*Pimpinella anisum* L.), bazalka pravá (*Ocimum basilicum* L.), bříza (*Betula utilis* L.), cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.), česnek kuchyňský (*Allium sativum* L.), dobromysl obecná (*Origanum vulgare* L.), fenykl obecný (*Foeniculum vulgare* Mill.), heřmánek pravý (*Matricaria recutita* L.), hořčice (*Brassica* L.), hřebíček vonný (*Syzygium aromaticum* L.), kardamom obecný (*Elettaria cardamomum* L.), kmín kořený (*Carum carvi* L.), kmín římský (*Cuminum*

cuminum L.), kopr vonný (*Anethum graveolens* L.), koriandr setý (*Coriandrum sativum* L.), levandule úzkolistá (*Lavandula angustifolia* Mill.), majoránka zahradní (*Origanum majorana* L.), máta (*Mentha* L. sp.), česnek medvědí (*Allium ursinum* L.), meduňka lékařská (*Melissa officinalis* L.), miřík celer (*Apium graveolens* L.), mrkev obecná (*Daucus carota* L.), muškátový oříšek (*Myristica fragrans* Houtt.), nové koření (*Pimenta dioica* (L.) Merr.), olivovník evropský (*Olea europaea* L.), pelyněk estragon (*Artemisia dracunculus* L.), pepř černý (*Piper nigrum* L.), petržel obecná (*Petroselinum crispum* Mill.), rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis* L.), skořicovník cejlonský (*Cinnamomum zeylanicum* J. Presl), skořicovník čínský (*Cinnamomum cassia* (Nees & T. Nees) J. Presl), šalvěj lékařská (*Salvia officinalis* L.), tymián obecný (*Thymus vulgaris* L.), vanilovník plocholistý (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews), vanilovník velkokvětý (*Vanilla pompona* Schiede), vavřík vznešený (*Laurus nobilis* L.) nebo zázvor lékařský (*Zingiber officinale* Roscoe), jak uvádějí Ait-Ouazzou et al., 2012; Ayala-Zavala et al., 2009; Bagiu et al., 2012; Ceylan et Fung, 2004; Dhama et al., 2014; Dhifi et al., 2013; El Bouzidi et al., 2013; Gupta et al., 2013; Gutierrez et al., 2008; Kyung, 2012; Lai et Roy, 2004; Roby et al., 2013; Sadeghi et al., 2012; Tajkarimi et al., 2010; Weerakkody et al., 2010.

3.5 Rostliny s antimikrobiálními účinky

3.5.1 Tymián obecný

Tymián obecný (*Thymus vulgaris* L., č. hluchavkovité) je polokeřovitá vytrvalá rostlina původem z jižní Evropy a Asie (Tepe et al., 2004). Esenciální olej tymiánu je antibakteriálním, antikandidózním a antioxidačním prostředkem. Má široké antibakteriální spektrum proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, má významné inhibiční účinky proti patogenním mikroorganismům rezistentním na antibiotika. Je charakteristický vysokým obsahem monoterpenů, zejména thymolu a jeho izomeru karvakrolu, které jsou doprovázeny množstvím více či méně biologicky aktivních sloučenin včetně eugenolu, p-cymenu, γ -terpinenu, linaloolu, geraniolu a borneolu (El Bouzidi et al., 2013; Nevas et al., 2004; Burt, 2004; Oussalah et al., 2007; Govaris et al., 2011; Dhama et al., 2014; Voon et al., 2012).

3.5.2 Dobromysl obecná

Dobromysl obecná (*Origanum vulgare* L., čeleď hluchavkovité) je vytrvalá bylina z čeledi hluchavkovitých, která byla původně rozšířena v oblasti Středomoří. U dobromysli byly prokázány antimikrobiální, antioxidantní a antigenotoxické účinky a schopnost inhibice enzymů. Její extrakty či esenciální oleje inhibují růst bakterií, kvasinek a plísní, včetně patogenů. Mezi hlavní biologicky aktivní složky přítomné v dobromysli patří karvakrol, thymol, γ -terpinen a p-cymen, v menší míře jsou obsaženy sabinen, karyofylen, α -pinen, iso borneol, terpinolen, β -myrcen, α -thujen nebo methyl karvakrol (Burt, 2004; Oussalah et al., 2007; Govaris et al., 2011; Weerakkody et al., 2010; Ceylan et Fung, 2004; Lai et Roy, 2004; Tajkarimi et al., 2010; Martucci et al., 2015; De Medeiros Barbosa et al., 2016; Sarikurkcü et al., 2015).

3.5.3 Rozmarýn lékařský

Rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis* L., čeleď hluchavkovité) je stálezelený vytrvalý keř z čeledi hluchavkovitých původem ze Středomoří. Je považován za jednu z nejběžněji používaných bylin se silnými antimikrobiálními a antioxidantními účinky, díky nimž je používán pro prodloužení trvanlivosti potravin (Weerakkody et al., 2010). Směrnicí Evropské unie 95/2/EC byl schválen jako přírodní konzervant pro konzervaci masných výrobků (Rocio et al., 2015). Hlavními bioaktivními složkami rozmarýnu jsou α -pinen, bornyl-acetát, kafr, 1,8-cineol, eukalyptol, limonen, karnosol a rosmanol (De Medeiros Barbosa et al., 2016; Burt, 2004; Tajkarimi et al., 2010; Lai et Roy, 2004). V menších množstvích jsou obsaženy například anethol, geraniol, terpinen nebo rozmarýnová či ursolová kyselina (Ceylan et Fung, 2004).

3.5.4 Bazalka pravá

Bazalka pravá (*Ocimum basilicum* L., čeleď hluchavkovité) patří do rodu, jenž zahrnuje přibližně 30 druhů bylin a křovin z tropických a subtropických oblastí Asie, Afriky a střední a jižní Ameriky. Její esenciální oleje jsou využívány již mnoho let v potravinářství, široké použití nachází i v parfumerství a v dentálních a orálních výrobcích (Dhama et al., 2014). Mezi fytochemikálie, které jsou v bazalce obsaženy, patří eugenol a kyselina ursolová, estragol, linalool, alkaloidy a flavonoidy, taniny a uhlovodíky (Lai et Roy, 2004; Tajkarimi et al., 2010). Jejich obsah je závislý na chemotypu bazalky, celkem rozeznáváme 4 chemotypy s mnoha subtypy.

Antimikrobiální aktivita bazalky je dobře prozkoumána a působí proti velkému počtu grampozitivních i gramnegativních bakterií (včetně *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella* Typhimurium, *Vibrio cholerae* a *S. aureus*), kvasinek a plísní (Suppakul et al., 2003; Beatovic et al., 2015; Sharafati-Chaleshtori et al., 2015).

3.5.5 Levandule úzkolistá

Levandule úzkolistá (*Lavandula angustifolia* Mill., čeleď hluchavkovité) patří do rodu aromatických rostlin rozšířených především ve Středomoří (Blazekovic et al., 2011). Jednotlivé druhy se liší svou vytrvalostí, od neopadavého keře až po letničku (Pavela, 2006). Hodně druhů levandule je vysoce aromatických, a to díky přítomnosti esenciálních olejů přítomných ve žlázkách pokrývajících většinu rostliny (Lis-Balchin, 2002). Fytochemickými studii bylo prokázáno obsah triterpenů, kumarinů, kyseliny hydroxyskořicové, karyofylenu, β -felandrenu, eukalyptolu a flavonoidů (Blazekovic et al., 2011; Jianu et al., 2013).

3.5.6 Šalvěj lékařská

Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis* L., čeleď hluchavkovité) je vytrvalá silně aromatická rostlina polokeřovitého vzhledu patřící do čeledi hluchavkovitých. Její antimikrobiální vlastnosti byly potvrzeny proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, kvasinkám i plísním. Hlavními účinnými látkami šalvěje jsou thymol, eugenol, kafr, thujon, aromadendren, borneol a bornyl acetát, které jsou doprovázeny menšími množstvími 1,8-cineolu, limonenu, α -pinenu, β -pinenu, rozmarýnové kyseliny, ursolové kyseliny, terpinenu nebo salviolu (Ceylan et Fung, 2004; Lai et Roy, 2004; Aumeeruddy-Elalfi et al., 2015).

3.5.7 Máta dlouholistá

Máta dlouholistá (*Mentha longifolia* L., čeleď hluchavkovité) je trvalka z čeledi hluchavkovitých rostoucí v teplém a vlhkém podnebí. Rozšířena je především v jižní Africe, Botswaně, Namibii a Zimbabwe. Pro získání bioaktivních látek mohou být použity listy nebo květy (Voon et al., 2012). U extraktů a esenciálních olejů máty dlouholisté byly prokázány silné inhibiční účinky, například proti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Klebsiella pneumoniae*.

V mátě přítomné bioaktivní látky jsou především cis-piperiton epoxid, pulegon, piperiton, isomenthon, karvon, dihydrokarvon, kafr, β -karyofylen a menthon (Tassou et al., 2000; Gulluce et al., 2007).

3.5.8 Anýz vonný

Anýz vonný (*Pimpinella anisum* L.) je jednoletá rostlina z čeledi miříkovitých. Je jedním z hlavních zdrojů přírodních sloučenin se širokým spektrem biologických účinků, jako jsou antimikrobiální, antioxidační, insekticidní, protizánětlivé nebo diuretické vlastnosti. V esenciálním oleji a extraktech byly identifikovány následující bioaktivní sloučeniny: anethol, estragol, eugenol, 1,4-cineol, eukalyptol (1,8-cineol), bornyl acetát, kafr, karvakrol, karvon, limonen, linalool, menthon, myrcen, p-anisaldehyd a p-cymen (Abu-Darwish et al., 2012; Tepe et Tepe, 2015; Dhama et al., 2014; Ceylan et Fung, 2004; Gülçin et al., 2003).

3.5.9 Fenykl obecný

Fenykl obecný (*Foeniculum vulgare* Mill.) je víceletá rostlina z čeledi miříkovitých původně rostoucí v oblasti Indie a Egypta. Běžně je používán jako koření pro zlepšení údržnosti potravin, má významné antioxidační a antimikrobiální účinky. Hlavními aktivními složkami esenciálních olejů a extraktů fenyklu jsou trans-anethol, estragol, fenchon, β -farnesen a limonen, kvercetin, apigenin a kyseliny rozmarýnová, kávová, p-kumarová, chlorogenová a ferulová. Bioaktivní látky obsažené ve fenyklu jsou schopny inhibovat bakterie (grampozitivní i gramnegativní), kvasinky i plísň (Dhama et al., 2014; Roby et al., 2013; Anwar et al., 2009).

3.5.10 Hřebíčkovec vonný

Hřebíčkovec vonný (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) je strom z čeledi myrtovitých a obvykle roste v teplých a vlhkých klimatických podmínkách (např. Indie, Srí Lanka, Indonesie). Jako koření se používají nerozvívané pupeny. U hřebíčku byly prokázány silné antimikrobiální účinky jak proti bakteriím, tak i proti kvasinkám a plísním, včetně patogenů (Voon et al., 2012) Pro své antimikrobiální vlastnosti je testováno jeho použití v masném a pekárenském průmyslu (Dhama et al., 2014). Esenciální olej je často používán jako složka zubních past, osvěžovačů dechu nebo ústních vod. Hlavními účinnými látkami jsou anethol, benzaldehyd, karvon, karyofylen,

chavikol, cinnamaldehyd, eugenol, eugenyl-acetát, furfural a linalool (Burt, 2004; Ceylan et Fung, 2004; Lai et Roy, 2004; Tajkarimi et al., 2010).

3.5.11 Skořicovník cejlonský

Skořicovník cejlonský (*Cinnamomum zeylanicum* J. Presl) je stálezelený strom z čeledi vavřínovitých pocházející ze Srí Lanky a jižní Indie. Ze skořicovníku se využívá sušená vnitřní část kůry. Esenciální oleje a extrakty skořice působí antimikrobiálně proti mikroorganismům kazícím potraviny i proti patogenům, u vodného extraktu byla prokázána inhibice bakteriálního endotoxinu. Aktivními složkami skořice jsou cinnamaldehyd, kumarin, cinnamyl acetát a eugenol (Dhama et al., 2014; Gupta et al., 2013; Nimje et al., 2013; Tajkarimi et al., 2010; Lai et Roy, 2004; Ceylan et Fung, 2004).

3.5.12 Zázvor lékařský

Zázvor lékařský (*Zingiber officinale* Roscoe) je vytrvalá rostlina z čeledi zázvorotvarých. Původně byl pěstován především v Číně a Indii, odkud se dále rozšířil do oblasti Blízkého východu a okolí Středomořího moře. Má mnoho biologických účinků – působí protizánětlivě, analgeticky, antipyreticky, antioxidačně a antimikrobiálně. Účinný je proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, včetně lidských patogenů (Dhama et al., 2014). Zpomaluje růst kvasinek a plísní, způsobuje jejich odbarvení a potlačuje tvorbu spor (Bashir et al., 2015). Fytochemické rozborůy prokázaly obsah alkaloidů, saponinů, flavonoidů, steroidů a taninů (Singletary, 2010; Ali et al., 2008).

3.6 Možnosti získávání bioaktivních látek z rostlin

Bioaktivní sloučeniny mohou být z rostlinných materiálů extrahovány různými extrakčními technikami. Většina těchto technik je založena na extrakční síle použitého rozpouštědla a aplikaci tepla a/nebo míchání. Principem extrakce je odstranění rozpustné pevné částice z pevné směsi použitím vhodného rozpouštědla nebo jejich směsi. Proces extrakce ovlivňuje několik faktorů, například rychlost přechodu rozpouštědla do materiálu, rychlost rozpouštění analytu rozpouštědlem a rychlost přechodu extraktu z nerozpustné hmoty. Pro účinnou extrakci jsou důležité také polarita rozpouštědla, tlak páry a viskozita (Adnan et al., 2014). V případě rostlinných materiálů

je vyžadován adekvátní čas pro difúzi rozpouštědla přes buněčné stěny rostlinných buněk kvůli převedení rozpustných částic do roztoku a pro difúzi extraktu přes povrch buněčné stěny. Před vlastní extrakcí jsou vzorky v závislosti na způsobu extrakce sušeny na vzduchu nebo mrazem a následně drceny, mlety nebo homogenizovány pro zmenšení velikosti částic. Tímto postupem dochází ke zvýšení účinnosti extrakčního procesu a zvýšení výtěžku výsledného extraktu (Voon et al., 2012). Účinnost extrakce dále závisí na volbě vhodného rozpouštědla. Pro jeho volbu je důležitá polarita cílené sloučeniny. Při výběru by měly být brány do úvahy molekulární afinita mezi rozpouštědlem a rozpouštěnou látkou, přenos hmoty, použití pomocného rozpouštědla, bezpečnost pro životní prostředí, toxicita pro člověka a finanční náklady (Nayak et al., 2015). Nejčastěji používanými rozpouštědly jsou methanol a ethanol, dále voda, butanol, ethylacetát, chloroform a n-hexan (Adnan et al., 2014).

Velmi důležité je udržování stability bioaktivních složek výběrem odpovídající a účinné extrakční metody – jednotlivé složky (především fenolické) inklinují k oxidaci a degradaci při vyšších teplotách nebo při prodloužení extrakčního času. Aby se zabránilo degradaci fenolických látek, neměly by být extrakty v rozpouštědle skladovány při pokojové teplotě nebo vystaveny po dlouhou dobu slunečnímu svitu (Azmir et al., 2013).

Pro získání bioaktivních látek z rostlin se používají klasické techniky jako je macerace, hydrodestilace a Soxhletova extrakce (Nayak et al., 2015) a novější nekonvenční techniky, například ultrazvukem asistovaná extrakce, extrakce v pulzním elektrickém poli, enzymově asistovaná extrakce, mikrovlákná asistovaná extrakce, infračervená asistovaná extrakce, vysokotlaká extrakce rozpouštědlem nebo nadkritická fluidní extrakce (Adnan et al., 2014).

3.6.1 Konvenční extrakční techniky

3.6.1.1 Macerace

Macerace se skládá z několika málo kroků. Vzorek je před macerací nadrcen, aby se zvětšila plocha pro styk s rozpouštědlem. Vzorek je macerován vhodným rozpouštědlem a během macerace může být směs promíchávána, čímž se zvýší difuze a odstraní se nasycené rozpouštědlo z povrchu vzorku a je nahrazeno nenasyceným.

Po maceraci je oddělena pevná část od extraktu filtrací (Azmir et al., 2013; Nayak et al., 2015; Voon et al., 2012).

3.6.1.2 Hydrodestilace

Hydrodestilace je tradiční metodou pro získávání bioaktivních látek a esenciálních olejů z rostlin. Není zde použito organického rozpouštědla. Existují tři typy hydrodestilace. Vodní destilace, vodní a parní destilace a přímá parní destilace. Destilovaný materiál je při této metodě v přímém kontaktu s vroucí vodou/parou, což je její základní charakteristický znak. Rostlinný materiál je umístěn v nádrži destilačního přístroje, kde plave na hladině nebo je ponořen pod vodní hladinou, v závislosti na specifických vlastnostech materiálu, případně je přes něj proháněn proud vodní páry. Při vysokých teplotách může docházet ke ztrátě některých termolabilních sloučenin, což limituje použití této metody (Azmir et al., 2013; Pavela et Bárnet, 2011).

3.6.1.3 Soxhletova extrakce

Soxhletova extrakce byla původně určena pro extrakci tuků, na niž ale není omezena. Používá se jako model pro srovnání s novými extrakčními alternativami. Do Soxhletova extraktoru je umístěna extrakční patrona naplněná vzorkem. V baňce, která je zahřívána, je rozpouštědlo. Odpařované rozpouštědlo kondenzuje v chladiči a skapává na patronu se vzorkem a po průchodu patronou je zachytáváno a následně sváděno zpět do baňky. Proces se neustále opakuje, dokud není extrakce hotova (Azmir et al., 2013).

3.6.2 Nekonvenční extrakční techniky

Při konvenční extrakci je nutný dlouhý extrakční čas, vysoce čistá a drahá rozpouštědla a odpařování velkého množství rozpouštědla. Konvenční metody mají nízkou extrakční selektivitu a dochází při nich k tepelnému rozkladu termolabilních sloučenin. Proto jsou vyvíjeny nové extrakční techniky. Mezi nejslibnější patří extrakce s použitím ultrazvuku, enzymů, mikrovln, pulzního elektrického pole, superkritická fluidní extrakce a vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (Azmir et al., 2013).

3.6.2.1 Ultrazvukem asistovaná extrakce

Při ultrazvukové extrakci jsou využívány zvukové vlny o frekvencích nad slyšitelností lidským uchem, obvykle v rozmezí 20-100 kHz. Vlivem ultrazvuku dochází v rostlinách

k narušení buněčných stěn, což umožňuje lepší průnik rozpouštědla do vzorku a snazší uvolnění extrahovaných složek. Extrakční mechanismus zahrnuje dva fyzikální jevy – difuzi přes buněčnou stěnu a vyplachování buněčného obsahu po narušení buněčné stěny. Vzorek je ponořen do rozpouštědla, je aplikována ultrazvuková energie a po ukončení extrakce je extrakt oddělen od tuhého zbytku pomocí filtrace nebo centrifugace a případně zakoncentrován odpařením rozpouštědla (Azmir et al., 2013; Chua, 2013; Nayak et al., 2015; Zhao et al., 2013; Huie, 2002; Rodrigues et al., 2015).

3.6.2.2 Extrakce v pulzním elektrickém poli

Principem této extrakce je porušení struktury buněčné stěny pro zvýšení extrahovatelnosti přítomných látek. Elektrický potenciál prochází přes buněčnou stěnu do buňky a separuje molekuly na základě jejich náboje v buněčné stěně. Po překročení kritické hodnoty transmembránového potenciálu přibližně 1 V vzniká mezi nabitými molekulami odpor, který vytváří póry ve slabých místech buněčné stěny a způsobuje drastické zvýšení propustnosti. Extrakce v pulzním elektrickém poli může zvýšit přenos hmoty porušením struktury buněčné stěny rostlinného materiálu a zlepšit tak extrakci a snížit extrakční čas. Metoda je aplikována pro zlepšení uvolňování vnitrobuněčných složek z rostlinné tkáně pomocí zvýšení propustnosti buněčné stěny. Při ošetření v mírném elektrickém poli (500 a 1000 V/cm) dochází k porušení buněčné stěny pouze s malým vzrůstem teploty, což minimalizuje degradaci termolabilních sloučenin. Tato metoda může být použita i jako předstupeň konvenčních extrakčních technik pro snížení extrakčního úsilí (Azmir et al., 2013).

3.6.2.3 Enzymově asistovaná extrakce

Některé fytochemikálie jsou v rostlinné matrici rozptýleny v buněčné cytoplasmě a některé jsou umístěny v polysacharidovo-ligninové síti pomocí vodíkových nebo hydrofóbních vazeb, které nejsou přístupné rozpouštědlům při běžném extrakčním procesu. Enzymatické ošetření před extrakcí je považováno za účinnou cestu, jak uvolnit vázané sloučeniny a zvýšit výtěžek. Přídavek specifických enzymů, například celulózy, α -amylázy a pektinázy během extrakce zlepšuje výtěžnost narušením buněčných stěn a hydrolýzou strukturních polysacharidů a lipidů. Enzymově asistovaná extrakce probíhá ve dvou variantách – enzymově asistovaná vodná extrakce (EAAE) a enzymově asistované lisování za studena (EACP). Olej extrahovaný pomocí této

metody obsahuje vyšší množství volných mastných kyselin a fosforu oproti tradičnímu oleji extrahovanému hexanem. Enzymově asistovaná extrakce je považována za ohleduplnou k životnímu prostředí a vhodnou pro extrakci bioaktivních sloučenin a olejů, protože jako rozpouštědlo je používána voda namísto organických chemikálií (Azmir et al., 2013; Puri et al., 2012).

3.6.2.4 Mikrovlnná asistovaná extrakce

Účinnost této metody závisí na vlastnostech rozpouštědla, povaze vzorku, na typu extrahovaných látek a dielektrické konstantě materiálu, která je přímo úměrná velikosti absorpce mikrovlnného záření. Vlivem vzrůstající teploty dochází ve vzorku ke zvyšování vnitřního tlaku a rychlejšímu přechodu látek z buněk do rozpouštědla. Je to selektivní technika pro extrahování organických a organokovových sloučenin. Je možné ji použít i pro extrakci termolabilních sloučenin. Mikrovlnnou asistovanou extrakcí bývá dosaženo vyšší výtěžnosti za výrazně kratší dobu než při klasických metodách – doba extrakce se snižuje z několika hodin na několik minut (Azmir et al., 2013; Chua, 2013; Nayak et al., 2015; Zhao et al., 2013; Huie, 2002; Fernández-Agulló et al., 2015; Mustapa et al., 2015).

3.6.2.5 Infračervená asistovaná extrakce

Tato metoda využívá infračervenou energii pro zahřátí rozpouštědla v kontaktu se vzorkem pro oddělení analytu z hmoty vzorku do rozpouštědla. Účinnost metody je podmíněna volbou správné vlnové délky záření ve vztahu k absorpčním charakteristikám vzorku. Co se týče výtěžku, infračervená asistovaná extrakce není tolik účinná jako mikrovlnná asistovaná extrakce, je ale jednodušší a levnější (Chua, 2013).

3.6.2.6 Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem

Principem metody je využití vysokého tlaku pro udržení rozpouštědla v kapalném stavu při vyšších extrakčních teplotách. Tato extrakce vyžaduje malé množství rozpouštědla, protože kombinace vysokého tlaku a teploty zajišťuje rychlejší proces extrakce. Při vyšší teplotě se zvyšuje rozpouštěcí kapacita rozpouštědla vůči extrahovaným složkám, zvyšuje se rychlost difuze vlivem vyšší hodnoty difuzního koeficientu a snižuje se viskozita a povrchové napětí rozpouštědla. Důsledkem je urychlení extrakce, které lze

ještě podpořit přivedením čistého rozpouštědla (Azmir et al., 2013; Chua, 2013; Zhao et al., 2013; Huie, 2002; Plaza et Turner, 2015).

3.6.2.7 Nadkritická fluidní extrakce

Nadkritická fluidní extrakce využívá některých výhodných vlastností tekutin v nadkritickém stavu. Z fyzikálně-chemického hlediska tvoří nadkritická tekutina přechod mezi plynem a kapalinou. Její vlastnosti se mění v závislosti na tlaku a teplotě. Nadkritická tekutina poskytuje vlastnosti plynů (vyšší difúzní koeficient a nízká viskozita) a kapalin (dobré rozpouštěcí vlastnosti společně s vysokou hustotou). Díky těmto vlastnostem je dosahováno extrakce sloučenin v krátkém čase s vysokými výtěžky. Pro extrakci pevného vzorku se běžně používá oxid uhličitý. Oxid uhličitý je nepolární, a proto se pro extrakci polárních látek přidává tzv. modifikátor, což je látka zvyšující polaritu nadkritické tekutiny. Mezi nejběžněji používané modifikátory patří methanol, ethanol, acetonitril, chloroform, toluen nebo voda. Modifikátor může být použit i pro usnadnění difuze z polymerního vzorku. Výhody použití nadkritických tekutin pro extrakci bioaktivních látek jsou následující: nadkritické tekutiny mají vyšší difúzní koeficient a nižší viskozitu a povrchové napětí než tekutina, což vede k lepšímu průniku do hmoty vzorku; opakovaný odtok nadkritické tekutiny vede ke kompletní extrakci; selektivita nadkritické tekutiny je vyšší než v případě tekutého rozpouštědla a jeho rozpouštěcí síla může být vylepřena změnou teploty a/nebo tlaku. Extrakce se provádí při pokojové teplotě, a proto je to metoda vhodná pro extrakci termolabilních sloučenin (Azmir et al., 2013; Huie, 2002; Mustapa et al., 2015; Fornari et al., 2012).

3.7 Charakteristika získaných bioaktivních produktů

3.7.1 Extrakty

Obsah účinných látek (jejich kvantita i kvalita) v extraktu závisí na druhu rostliny, úpravě vzorku před extrakcí, zvolené metodě extrakce a použitém rozpouštědle. Jak již bylo výše zmíněno, mezi nejpoužívanější rozpouštědla se řadí methanol a ethanol. Jejich častější použití je dáno tím, že to jsou rozpouštědla polární povahy, která snadno poškozují buněčnou stěnu rostlin a uvolňují sloučeniny s významnými antimikrobiálními vlastnostmi (Voon et al., 2012; Farzaneh et Carvalho, 2015). Při extrakci ethanolem se jedná o taniny, polyfenoly, polyacetyleny, flavonol, terpenoidy,

steroly a alkaloidy. Mezi sloučeniny získané extrakcí za použití methanolu patří antokyany, terpenoidy, saponiny, taniny, flavony, laktony a polyfenoly. Dalším používaným rozpouštědlem je voda. Ve vodě rozpustné sloučeniny nedosahují tak výrazných antimikrobiálních účinků ve srovnání se sloučeninami extrahovanými organickými rozpouštědly, což vysvětluje omezenou možnost použití anorganických rozpouštědel pro extrakci účinných látek z rostlin. Mezi složky, jež lze extrahovat z rostlin vodou, patří antokyany, škroby, saponiny, polypeptidy a lektiny. Zřídka se ve vodné fázi vyskytují taniny a terpenoidy, lépe jsou ovšem extrahovány pomocí polárních rozpouštědel. Mezi méně používaná organická rozpouštědla patří chloroform, ether, ethylacetát, n-hexan a aceton. Chloroform extrahuje terpenoidy a flavonoidy, ether alkaloidy, terpenoidy, kumariny a mastné kyseliny a aceton flavonoly (Cowan, 1999). Bylo prokázáno, že extrakty získané pomocí těchto rozpouštědel vykazují antimikrobiální vlastnosti a koncentrace extraktů pozitivně koreluje s inhibičními účinky (Adnan et al., 2014).

3.7.2 Esenciální oleje

Je známo téměř 300 esenciálních olejů, které jsou připravovány průmyslově (Razzaghi-Abyaneh et Shams-Ghahfarokhi, 2011; Burt, 2004). Esenciální oleje mohou obsahovat více než 60 individuálních složek. Hlavní složky mohou tvořit až 85 % esenciálního oleje, zatímco ostatní sloučeniny mohou být přítomny pouze ve zlomkovém množství (Burt, 2004). Složky esenciálních olejů můžeme rozdělit do dvou skupin – na fenylypropanoidy a terpenoidy. Druhé zmíněné zahrnují především monoterpeny a seskviterpeny, obvykle přítomné v malých množstvích, a diterpeny s různými skupinami alifatických uhlovodíků, kyselin, alkoholů, aldehydů, acyklických esterů nebo laktonů (Zielińska et Matkowski, 2014; Burt, 2004; Tajkarimi et al., 2010).

Esenciální oleje mohou být izolovány z téměř všech rostlinných částí. Jejich výtěžek závisí na druhu rostliny a orgánu a může dosáhnout více než 2 % (v/w). Jejich obsah se dále se může lišit i v průběhu kvetení rostliny – obecně lze říci, že esenciální oleje získané z rostlin, které byly sklizeny během nebo ihned po kvetení dosahují nejsilnějších antibakteriálních účinků (Zielińska et Matkowski, 2014). Složení esenciálních olejů je ovlivněno charakteristikami rostliny včetně druhu, části, stáří a fáze růstu, klimatickými podmínkami (ročním obdobím), metodami pěstování, časem sklizně, úpravou vzorku před extrakcí a typem extrakce. Metody mletí mohou vyvolat

změny ve složení rostlinné hmoty a mohou tak mít nepříznivý efekt na obsah termolabilních sloučenin jako je linalool, estragol nebo methylester kyseliny skořicové. Bylo zjištěno, že výtěžky jsou vyšší při extrakci superkritickým CO₂ následovaným tekutým CO₂ a vodou. Extrakce superkritickým CO₂ je z hlediska chemického složení esenciálního oleje výhodnější než extrakce tekutým CO₂, výrobní cena s použitím tekutého CO₂ je však nižší. Nejčastěji jsou však esenciální oleje získávány hydrodestilací (Suppakul et al., 2003; Solórzano-Santos et al., 2012).

3.8 Mechanismus účinku

Složky extraktů a esenciálních olejů jsou chemicky různé sloučeniny, a nepůsobí tak jednotným mechanismem. Předpokládá se, že působí na různých buněčných úrovních. Antimikrobiální účinky spočívají zřejmě v porušení buněčné stěny, navázání na proteiny umístěné v cytoplazmatické membráně (například ATP-asa), rozrušení či inaktivaci činnosti vnější membrány gramnegativních bakterií uvolněním lipopolysacharidů, narušení hybné síly protonů, elektronového toku v buňce nebo aktivního transportu, dále v koagulaci buněčného obsahu, zábraně tvorby enzymů, poškození genetického materiálu bakterií nebo v tvorbě hydroperoxidázy mastných kyselin (Farzaneh et Carvalho, 2015; Tajkarimi et al., 2010; Burt, 2004). Antimikrobiální vlastnosti bylin závisí na fytochemickém složení, koncentraci fytochemikálií a jejich synergistickém, nebo naopak antagonistickém účinku (Dhama et al., 2014), na druhu a koncentraci mikroorganismu (Ceylan et Fung, 2004).

Mechanismus antimikrobiálního účinku je ovlivněn chemickou strukturou bioaktivních látek. Inhibiční vlastnosti zesiluje přítomnost aromatického jádra, což je patrné například při srovnání účinnosti borneolu a thujonu s thymolem – thymol, který obsahuje aromatické jádro, vykazuje silnější antimikrobiální účinky (Ceylan et Fung, 2004). Fenolické sloučeniny, které obsahují hydroxylovou skupinu (-OH) jsou vůči mikroorganismům mnohem účinnější ve srovnání s fenolickými sloučeninami s karbonylovou skupinou (=O). Hydroxylová skupina dokáže snáze vázat aktivní části enzymů pozměňující buněčný metabolismus mikroorganismů (Gyawali et Ibrahim, 2012; Ceylan et Fung, 2004; Burt, 2004). Vliv na antimikrobiální účinnost má i umístění a počet hydroxylových skupin ve fenolickém kruhu. Se zvyšujícím se počtem hydroxylových skupin narůstá toxicita pro mikroorganismy (Ceylan et Fung, 2004; Lai et Roy, 2004).

Kromě přítomnosti hydroxylové skupiny ovlivňuje antimikrobiální účinnost poloha fenolického kruhu. Alkylový zbytek navázaný ve fenolickém kruhu zvyšuje antimikrobiální aktivitu sloučeniny. Dle Ceylan et Fung (2004) vykazují o- a p-alkyl substituované fenoly z esenciálních olejů koření silnou antifungální aktivitu proti 5 druhům *Aspergillus*, 4 druhům *Penicillium* a 2 druhům *Fusarium*. Substituovaný fenolický kruh je obsažen ve většině fytochemikálií s antimikrobiálními účinky. Jednou z výjimek je česnek obsahující nearomatické sloučeniny síry (thiosulfináty), které působí antimikrobiálně (Lai et Roy, 2004). Antimikrobiální aktivita isothiokyanátů získaných z česneku a cibule souvisí s inaktivací mimobuněčných enzymů oxidativním rozdělením disulfidických vazeb a formací reaktivních thiokyanátových radikálů, které zprostředkovávají antimikrobiální účinky. Inhibují syntézu lipidů a mikrobiální RNA (Tajkarimi et al., 2010; Ceylan et Fung, 2004). Allicin je tepelně nestálý a je prekurzorem pro mnoho alkylových a alkenových sulfidů, disulfidů, nebo derivátů ajoenu (Lai et Roy, 2004).

Důležitou charakteristikou esenciálních olejů a jejich složek je jejich hydrofobicita, která jim umožňuje štěpení lipidů bakteriální buněčné membrány a mitochondrií; tím dochází k porušení struktury a ke změnám propustnosti, což může vést k nedostatku iontů a dalších složek buněčného obsahu. Přestože jistý nedostatek buněčného obsahu může být buňkou tolerován bez ztráty životaschopnosti, jeho rozsáhlý nedostatek nebo únik kritických molekul a iontů vede k buněčné smrti (Burt, 2004; Solórzano-Santos et al., 2012). Tyto účinky byly pozorovány u terpenů a terpenoidů (Voon et al., 2012; Cowan, 1999). Eugenol, thymol a karvakrol pravděpodobně váží aminy a hydroxylaminové skupiny membránových proteinů bakterií, což vede k lyzi bakteriální buňky (Dhama et al., 2014). Karvakrol, karvon, thymol a trans-cinnamaldehyd snižují obsah vnitrobuněčného ATP a současně zvyšují obsah mimobuněčného ATP, což způsobuje poškození buněčné stěny. Karvakrol také inhibuje syntézu flagelinu, který je nezbytný pro *E. coli* O 157:H7 (Burt, 2004; Ayala-Zavala et al., 2009; Tiwari et al., 2011, Tajkarimi et al., 2010).

Fenoly ovlivňují v nízkých koncentracích enzymovou aktivitu spojenou s produkcí energie a syntézou buněčných organel, ve vysokých koncentracích způsobují denaturaci proteinů. To znamená, že antimikrobiální aktivita fenolů obsažených v esenciálních olejích může být ovlivněna jejich koncentrací. (Davidson, 2001; Sofos et al. 1998). Antimikrobiální aktivita je způsobena schopností fenolů pozměňovat propustnost

buněčné stěny, což způsobuje ztrátu makromolekul (například ribosy nebo sodíku). Narušují také funkce buněčné stěny, například transport elektronů, příjem živin, syntézu bílkovin a nukleových kyselin nebo enzymovou aktivitu a interagují s buněčnými proteiny, a tím dochází k deformaci struktury a funkčnosti (Bajpai et al., 2008; Ceylan et Fung, 2004).

Flavonoidy jsou schopny tvořit komplexy s vnitrobuněčnými rozpustnými proteiny bakteriální buňky (Voon et al., 2012; Lai et Roy, 2004; Farzaneh et Carvalho, 2015). Alkaloidy poškozují buněčnou stěnu a DNA (Martins et al., 2015; Cowan, 1999). Katechiny mohou zvýšit citlivost bakterií rezistentních na antibiotika obnovením citlivosti represorů (Farzaneh et Carvalho, 2015; Ikigai et al., 1993). P-kumarová kyselina je schopna poškodit bakteriální buněčné membrány a navázat se na bakteriální genomovou DNA, tím inhibuje buněčné funkce, což vede ke smrti buňky (Heleno et al., 2015). Antimikrobiální aktivita chinonů vyvolává tvorbu komplexů s aminokyselinovými zbytky, proteiny, s polypeptidy buněčné stěny a membránově vázanými enzymy, což vede k inaktivaci funkce proteinů. Chinony jsou také schopné převést substrát na nedostupný pro mikroorganismy, čímž inhibují jejich růst (Voon et al., 2012; Lai et Roy, 2004). Antimikrobiální aktivita nefenolických látek je ovlivněna typem alkylového substituentu. Například limonen s alkenylovým substituentem (-CH=CH-) má silnější inhibiční účinky ve srovnání s p-cymenem obsahujícím alkylový substituent (-C≡C-). Účinnost bioaktivních látek je ovlivněna i stereochemií, β- a trans-izomery jsou aktivnější ve srovnání s α- a cis-cis izomery (Ceylan et Fung, 2004).

Předchozí studie dokázaly, že grampozitivní bakterie jsou mnohem citlivější k působení antimikrobiálních látek ve srovnání s gramnegativními bakteriemi, což je ovlivněno vnější lipopolysacharidovou membránou, která snižuje rychlost pronikání hydrofobních sloučenin s antimikrobiálními účinky (Smith-Palmer et al. 2001; Burt 2004; Farzaneh et Carvalho, 2015; Tiwari et al., 2011; Ceylan et Fung, 2004). Z toho může být vyvozeno, že fenolické sloučeniny dokáží zvýšit citlivost fosfolipidové dvouvrstvy cytoplazmatické membrány způsobující tak zvýšení její propustnosti, nedostupnost nezbytných intracelulárních látek a poškození bakteriálního enzymového systému (Gyawali et Ibrahim, 2012).

3.9 Synergistické/antagonistické působení antimikrobiálních látek

Jako synergismus se označuje interakce sloučenin, nebo faktorů, kdy dochází ke zvýšení účinků jednotlivých sloučenin nebo faktorů, pokud jsou aplikovány společně. V případě antagonismu se jedná o opačný stav – kombinací sloučenin nebo faktorů je jejich účinnost snížena (Al-Bayati, 2008). Synergismus mezi bioaktivními látkami může usnadnit přenos antimikrobiálních sloučenin do buňky (Cava-Roda et al., 2012; Solórzano-Santos et al., 2012), jak bylo prokázáno například u karvakrolu a p-cymenu (Burt, 2004), pozorován byl však antagonismus při jejich aplikaci proti *B. cereus* společně se solí v rýži (Tajkarimi et al., 2010). Množství antimikrobiálních sloučenin v potravinách nemusí být dostatečné pro projevení jejich účinků, ale pokud jsou kombinovány s vnitřními faktory jako je pH a vnějšími faktory (například teplota), tak mohou vykazovat mikrobistatické, nebo mikrobicidní vlastnosti. Tepelný stres může způsobit poškození buněčné stěny, což umožňuje účinným látkám snazší vstup do buňky. Ty následně poškozují metabolické funkce a interferují s opravnými mechanismy poškozených buněk (Ceylan et Fung, 2004). Účinek bioaktivních látek v potravinách může být posílen i kombinací s vakuovým balením nebo balením v modifikované atmosféře, kdy vzrůstá citlivost mikroorganismů díky snižování obsahu kyslíku v prostředí (Frangos et al., 2010; Mexis et al., 2009). K účinnému ošetření rajčatového džusu bylo použito přídatku esenciálního oleje skořice s následným ošetřením v pulsním elektrickém poli – tím bylo dosaženo redukce mikroorganismů o více než pět logaritmických řádů (Tajkarimi et al., 2010). Antimikrobiální sloučeniny působí synergisticky také v kombinaci s nisinem (Tajkarimi et al., 2010; Govaris et al., 2010).

3.10 Metody stanovení antimikrobiální aktivity

Stanovení antimikrobiální aktivity účinných látek z rostlin může být prováděno pomocí testů *in vitro* – v kultivačním mediu, nebo přímo v potravině.

3.10.1 Metody *in vitro*

Testy antimikrobiální aktivity *in vitro* mohou být klasifikovány jako difuzní, ředící nebo atmosférické. Metody pro testování antimikrobiální aktivity jsou adaptovány vždy pro konkrétní podmínky, protože nebyl vyvinut standardní test pro vyhodnocení antimikrobiální aktivity možných konzervantů proti mikroorganismům spojeným

s potravinami. Výsledky jsou ovlivňovány metodou extrakce účinných látek z rostlinného materiálu, objemem inokula, růstovou fází, použitým živným médiem, pH media a inkubačním časem a teplotou, a proto je porovnání publikovaných dat komplikované (Burt, 2004).

3.10.1.1 Disková difuzní metoda

Testování antimikrobiální aktivity je často prováděno pomocí diskové difúzní metody. Papírový disk je napuštěn esenciálním olejem / extraktem a je položen na zaočkovaný živný agar (Burt, 2004). Účinné látky difundují z disku do agaru, kde vytváří dynamicky se měnící gradient antimikrobiální koncentrace, zatímco testovaný mikroorganismus začíná růst. Růst postupuje směrem ke kritickému množství bioaktivní látky. Okraj inhibiční zóny vzniká v místě, kde koncentrace bioaktivní látky začíná potlačovat růst mikrobiální populace. Na hranici inhibiční zóny je hustota buněk dostatečně vysoká a dochází k rozptýlení antimikrobiální látky v jejich bezprostředním okolí tak, že její koncentrace je udržována pod hranicí inhibice. Tím je umožněn růst mikroorganismu (Kuper et al., 2009; Wilkinson, 2006). Velikost inhibiční zóny je závislá na rychlosti mikrobiálního růstu a rychlosti difuze antimikrobiální sloučeniny do agaru. (Suppakul et al., 2003).

Jedná se především o kvalitativní metodu, kdy testované mikroorganismy můžeme označit jako citlivé, mírně citlivé či odolné neboli rezistentní. Pro kvantitativní analýzu je nutná vysoká úroveň standardizace (Suppakul et al., 2003).

Hlavními výhodami metody jsou její jednoduchost, finanční nenáročnost a flexibilita výběru antimikrobiální látky. Nevýhodou je obtížnost získání hodnoty MIC a časová náročnost při vyhodnocování inhibičních zón. Tento proces mohou zjednodušit komerční analyzátoři inhibičních zón (Kuper et al., 2009).

Při velkém množství vzorků (bioaktivních látek či mikrobiálních izolátů) lze pro kvalitativní účely použít agarový zkumavkový test, kdy je účinná látka v podobě esenciálního oleje nebo extraktu umístěna do řezu v agaru. Pro lepší pozorovatelnost mikrobiálního růstu lze do média přidat trifenyltetrazolium chlorid (TTC), který je redukován na trifenylformazan (TPF), což je doprovázeno barevnou změnou (Kuper et al., 2009; Burt, 2004).

Disková difúzní, agarová zkumavková a agarová zřed'ovací metoda jsou velmi často používány pro zjištění antimikrobiální aktivity esenciálních olejů. Protože esenciální oleje jsou špatně rozpustné ve vodě, jsou používány emulgátory (Tween 20, Tween 80 a Triton) nebo rozpouštědla (např. ethanol) pro zlepšení rozpustnosti hydrofóbních sloučenin v pevných i tekutých médiích. Emulgátory i rozpouštědla však mohou mít přímý vliv na mikroorganismy a na antimikrobiální aktivitu esenciálních olejů. Emulgátory napomáhají prostupu antimikrobiálních látek přes buněčnou stěnu (Suppakul et al., 2003).

3.10.1.2 Zřed'ovací metody

Zřed'ovací metody jsou používány pro stanovení hodnoty MIC – Minimum Inhibitory Concentration, tedy minimální inhibiční koncentrace. Jedná se o nejnižší koncentraci antimikrobiální sloučeniny, která inhibuje růst mikroorganismu po stanovené době kultivace (Suppakul et al., 2003; Mahady et al., 2008). V některých případech je uváděn termín minimální baktericidní, nebo bakteriostatická koncentrace (Burt, 2004). Pro zřed'ovací metody je typické testování dvou či více po sobě následujících koncentrací účinných látek. Tyto metody jsou považovány za referenční a jsou tedy používány pro posouzení správnosti dalších testovacích metod. (Suppakul et al., 2003; Kuper et al., 2009).

Zřed'ovací metody můžeme rozdělit dle použitého živného média na agarovou a bujónové. Při agarové zřed'ovací metodě je účinná látka v definovaných koncentracích přidána přímo do agaru, na nějž je nanášena standardizovaná suspenze testovaného mikroorganismu. Variantou agarové zřed'ovací metody je instrumentální spirálová gradientová metoda, při které je antimikrobiální látka paprskovitě nanášena na agar. Ve středu agaru je koncentrace účinné látky nejvyšší a směrem k okrajům se snižuje. Na agar je následně paprskovitě nanášena i suspenze mikroorganismu. Po inkubaci je MIC vypočtena z délky paprsku, na němž je pozorován růst (Burt, 2004; Kiska, 1998).

Existují dva typy metody zřed'ování v bujónu, které se odlišují objemem použitého média. Při objemech větších než 1 ml se jedná o metodu makrodiluční, pro jejíž provedení se používají zkumavky, a při objemech menších než 1 ml se jedná o mikrodiluční metodu prováděnou v mikrotitračních jamkách. Při použití zřed'ovací metody v bujónu existuje více možností pro zjištění účinnosti bioaktivní látky. Nejpoužívanější je měření optické density (zákalu) nebo zjištění počtu životaschopných

buněk. Výhodou první metody je možnost automatizace. Méně používané je také měření vodivosti. Pro stanovení MIC sloučenin na bázi olejů je pro vizuální hodnocení používán redoxní indikátor resazurin; metoda může být automatizována měřením fluorescence. Výsledky jsou shodné s výsledky získanými měřením optické density a zjištěním počtu životaschopných buněk (Kiska, 1998; Suppakul et al., 2003; Kuper et al., 2009; Mahady et al., 2008). Pro zjištění rychlosti baktericidního efektu, nebo trvání bakteriostatického účinku může být sestrojena křivka přežití, kdy je počet životaschopných buněk zbývajících v živném bujónu po přidání účinné látky vyneseno proti času. Počet životaschopných buněk je opět stanoven nejčastěji měřením optické density (Burt, 2004; Wilkinson, 2006).

3.10.1.3 Mikroatmosférické metody

Mikroatmosférické metody umožňují stanovení antimikrobiální aktivity esenciálních olejů nebo jejich složek v plynné fázi. Účinná látka difunduje směrem k agaru v obrácené Petriho misce nebo vialce. Mikrobiální růst je v případě Petriho misky detekován na základě viditelného růstu. V případě vialky je sledován na základě přítomnosti oxidu uhličitého vyprodukovaného testovaným mikroorganismem (Suppakul et al., 2003).

Poškození bakteriální buňky a ztráta buněčného obsahu může být pozorována pomocí elektronového mikroskopu. V tomto případě je ale nutná šetrná příprava vzorků, aby bylo zajištěno, že poškození buňky bylo způsobeno účinnou látkou, a ne samotnou přípravou vzorku (Burt, 2004).

3.10.1.4 Testování antimikrobiálních vlastností přímo v potravinách

Hledání vhodných rostlinných látek s inhibičními účinky závisí na mnoha faktorech, mezi něž patří druh cíleného mikroorganismu, podmínky zpracování a skladování potravin, intenzita antimikrobiálního účinku, a tedy potřebná koncentrace dané látky, s čímž souvisí i její organoleptické vlastnosti a vhodnost použití do dané potravin (Tajkarimi et al., 2010). Vliv na organoleptické vlastnosti potravin může být zmírněn použitím kombinace různých esenciálních olejů namísto vysoké koncentrace jednoho esenciálního oleje (Tiwari et al., 2011). Bylo zjištěno, že přesto, že některé bioaktivní látky dosahují dobrých antimikrobiálních účinků ve studiích *in vitro*, pro dosažení obdobného účinku v potravinách je potřeba jejich vyšší dávka. Citlivost

mikroorganismů k bioaktivním látkám je v potravinách ovlivněna vnitřními faktory – obsahem vody, bílkovin, tuků, antioxidantů, konzervantů, solí a dalších aditiv a hodnotou pH, i vnějšími faktory, jako je teplota nebo balení v ochranné atmosféře (Burt, 2004; Leuschner et Ielsch, 2003).

Složky potravin mají zřejmě jistý vliv na mikrobiální odolnost vůči účinným látkám. Tento vliv není zcela vysvětlen, jednou z možných příčin je lepší dostupnost živin v potravinách oproti živným médiím, která může umožnit rychlejší opravy poškozených buněk (Gill et al., 2002). Předpokládá se také, že vysoká množství tuku nebo bílkovin v potravinách chrání bakterie před účinky esenciálních olejů. Pokud je esenciální olej rozpuštěn v lipidové fázi potraviny, je ho méně dostupného pro účinek na bakterie ve vodné fázi. Jiné vysvětlení je, že nižší obsah vody v potravinách ve srovnání s laboratorními médii může narušit prostup antimikrobiálního činidla do bakteriální buňky (Burt, 2004). Vyšší obsah vody a/nebo soli působení esenciálních olejů usnadňuje. Stejně tak roste citlivost mikroorganismů s klesajícím pH potraviny, nízkou skladovací teplotou a klesajícím množstvím kyslíku v balení (Skandamis et Nychas, 2000, Tsigarida et al., 2000). Při nízkém pH se zvyšuje hydrofobicita esenciálních olejů, což umožňuje snazší rozpouštění lipidů buněčné stěny mikroorganismů. Antimikrobiální aktivita účinných látek může být ovlivněna i fyzikální strukturou potraviny. Skandamis et Nychas (2000) ve své studii zjistili, že antimikrobiální aktivita esenciálního oleje byla významně snížena v želatinovém gelu oproti bujónu, což je přisuzováno omezené difuzi způsobené právě strukturou gelu.

Pro testování antimikrobiálních účinků bioaktivních látek přímo v potravinách lze zvolit různé způsoby jejich ošetření. Esenciální oleje či extrakty mohou být přidány do surovin v různých fázích výroby potraviny, nebo již do hotového výrobku, pokud to jeho struktura umožňuje (Georgantelis et al., 2007; Evrendilek et Balasubramaniam, 2011; Boroski et al., 2012; Govaris et al., 2010; Cava-Roda et al., 2012, Sadeghi et al., 2012). Hotové výrobky mohou být účinnými látkami ošetřeny povrchově potřením (Mexis et al., 2009; Frangos et al., 2010; Govaris et al., 2011), nebo ponořením do lázně (Khanjari et al., 2013), nebo baleny do obalů s antimikrobiálním agens (Ntzimani et al., 2010; Nowak et al., 2012).

3.11 Mikroorganismy kontaminující mléko a mléčné výrobky

Mléko produkované mléčnými žlázami zdravého zvířete je prvotně sterilní (Fernandes, 2009). Poskytuje kompletní výživu pro rostoucí mláďata, a proto je i velice vhodným médiem pro řadu mikroorganismů. Velké množství snadno dostupných živin (uhlovodíků, bílkovin a tuků) v kombinaci s neutrálním pH podporuje růst a rozvoj mikrobiálního společenství (Marth et Steele, 2001; Samaržija et al., 2007). Mléko může být mikroorganismy kontaminováno již uvnitř vemene. Tato kontaminace je způsobena průnikem mikroorganismů otevřenými strukovými kanálky. V mléce asepticky odebraném přímo z vemene bývají nejčastěji stanovovány streptokoky, stafylokoky, mikrokoky, bakterie mléčného kysání, *Pseudomonas* spp., kvasinky a korynebakterie (Fernandes, 2009).

Hlavním zdrojem mikrobiální kontaminace mléka je vnější povrch vemene, který může být znečištěn různými materiály, včetně půdy, podestýlky, fekálií, zbytky siláží a jiných krmiv. Touto cestou mohou být do mléka zaneseny salmonely, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, psychrotrofní sporující mikroorganismy, *Clostridium* spp. a čeled' *Enterobacteriaceae* (Fernandes, 2009). Toaletou vemene bezprostředně před dojením je snížen celkový počet mikroorganismů a stejně tak i počty koliformních bakterií a *Staphylococcus aureus* (Marth et Steele, 2001; Görner et Valík, 2004).

Mezi běžné zdroje kontaminace mléka ze zařízení patří dojící zařízení, potrubí a chladicí nebo převozní tanky (Greifová et al., 2003; Fernandes, 2009). Díky jejich nedostatečné sanitaci v nich mohou ulpívat zbytky mléka (na povrchu zařízení, v kloubech nebo na gumových těsněních), které zajišťují vhodné prostředí pro mikrobiální růst a tvorbu biofilmu. V těchto zbytcích se bakterie pomnoží a ze znečištěného zařízení se dostávají do mléka (Marth et Steele, 2001). Nečistoty mohou být zdrojem psychrotrofních gramnegativních (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Cronobacter*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Achromobacter* a *Alcaligenes*) a grampozitivních (*Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus* a sporující *Bacillus* a *Clostridium*) mikroorganismů (Fernandes, 2009; Cempírková, 2007; Singh et Sandhya, 2011). Syrové mléko je skladováno při chladničkových teplotách, při nichž jsou psychrotrofní mikroorganismy schopny růstu a produkce termostabilních enzymů. Po tepelném ošetření jsou enzymy stále aktivní a mohou tak rozkládat složky mléka (Barbano et al., 2006). Termostabilní extracelulární proteázy

jsou produkovány *Pseudomonas fragi*, *P. putrefaciens*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *Acinetobacter* subsp., *Flavobacterium* spp., *Aeromonas* spp. a *Serratia marcescens*. Termostabilní lipázy jsou pak produkovány *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. putrefaciens*, *Achromobacter* spp., *Alcaligenes viscolactis*, *Acinetobacter* spp. A *Serratia marcescens*. Z těchto bakterií je ze syrového mléka izolována nejčastěji *Pseudomonas* spp. (často tvoří až 50 % psychrotrofní mikroflóry). Některé rody bakterií izolované z mléka jsou jak psychrotrofní, tak i termorezistentní – některé druhy *Streptococcus* a *Lactobacillus*, dále *Microbacterium*, *Micrococcus* a *Corynebacterium*, nebo sporulující – *Bacillus*, *Clostridium*. Psychrotrofní termorezistentní a sporulující mikroorganismy mohou přežít pasteraci a následně nepříznivě ovlivnit kvalitu mléka a mléčných výrobků. V mléce potom mohou způsobovat vady chuti a vůně a degradaci tuků a bílkovin. Stejně jako syrové mléko může být z nedostatečně čištěného zařízení kontaminováno i pasterované mléko (Marth et Steele, 2001; Samaržija et al., 2012).

S nehygienickou produkcí mléka jsou spojeny koliformní, termorezistentní a sporulující bakterie, kvasinky a plísňe a patogeny způsobující mastitidu (zánět vemene). Koliformní bakterie jsou spolehlivým indikátorem primární nebo sekundární kontaminace mléka (Görner et Valík, 2004; Samaržija et al., 2007). Mastitida je infekční onemocnění, které způsobují *Streptococcus uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, koaguláza-negativní stafylokoky, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium bovis* nebo koliformní bakterie (Singh et Sandhya, 2011; Fernandes, 2009). Mastitida ovlivňuje kvalitu mléka zvyšováním celkového počtu bakterií a somatických buněk v syrovém mléce jejich vylučováním ze zaníceného vemene. U mléčného skotu je poměrně běžným onemocněním a může se vyskytovat v subklinické formě, kdy může být diagnostikována na základě vyšetření na počet somatických buněk. Zvýšené množství somatických buněk má nepříznivý vliv na kvalitu mléka a mléčných výrobků – bylo zjištěno, že mléko s vyšším obsahem somatických buněk podléhá rychleji hydrolýze kaseinu a lipolýze (Marth et Steele, 2001; Olechnowicz et Jaskowski, 2012). Vysoké počty somatických buněk jsou totiž spojeny s vyšším obsahem tepelně stabilních proteáz a lipáz. Pokud je v syrovém mléce malé množství bakterií a v pasterovaném mléce k bakteriálnímu růstu nedochází, způsobují enzymy asociované se somatickými buňkami rozklad tuků a bílkovin a vznikají sensoricky nežádoucí produkty. Při dobré mikrobiologické kvalitě mléka je tedy obsah somatických buněk limitujícím faktorem

pro jeho trvanlivost (Barbano et al., 2006). Nemocnou mléčnou žlázou jsou do mléka vylučovány i patogeny, které sice nejsou schopny růst ve zchlazeném mléku, ale mohou v něm přežít a jejich přítomnost by mohla být zdravotním rizikem. Nemocné krávy mohou mlékem vylučovat i jiné lidské patogeny, například *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogenes* a *Salmonella* subsp. (Oliver et al., 2009).

V syrovém mléce je obsažena řada sloučenin s antimikrobiální aktivitou. Jejich hlavním účelem je ochrana vemene před infekcemi a ochrana mláděte. Svou roli mají ale i při skladování a transportu mléka – zabraňují jeho okamžité zkáze. Patří mezi ně laktoperoxidáza, laktoferin, lysozym a imunoglobuliny (Fernandes, 2009).

V následující tabulce je uveden přehled mikrobiálních patogenů spojených s mlékem a mléčnými výrobky a možná onemocnění jimi způsobená.

Tab. 1 Patogenní mikroorganismy s možným výskytem v mléce a mléčných výrobcích (Marth et Steele, 2001 - upraveno)

Mikroorganismus	Onemocnění
Enterobacteriaceae	
<i>Escherichia coli</i> , včetně kmene O157:H7	Gastroenteritidy, hemolyticko-iremický syndrom
<i>Salmonella</i>	Gastroenteritidy, tyfoidní horečka
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenteritidy
Ostatní gramnegativní bakterie	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Gastroenteritidy
<i>Brucella</i> spp.	Brucelóza
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenteritidy
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gastroenteritidy
Grampozitivní sporující bakterie	
<i>Bacillus cereus</i>	Gastroenteritidy
<i>Bacillus anthracis</i>	Antrax
<i>Clostridium perfringens</i>	Gastroenteritidy
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismus
Grampozitivní koky	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Emetická intoxikace
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Bolest v krku
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Spála/Bolest v krku
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Zánět hltanu
Rozmanité grampozitivní bakterie	
<i>Corynebacterium</i> spp.	Záškrť
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listerióza
<i>Mycobacterium bovis</i>	Tuberkulóza
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberkulóza
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Paratuberkulóza
Plísňe	Mykotoxikózy

Přítomnost a růst mikroorganismů v mléce ovlivňují jeho kvalitu. Chemické složky mléka mohou být degradovány bakteriálním metabolismem a různými bakteriálními enzymy (Samaržija et al., 2012). Produkty rozkladu mohou mít nežádoucí vliv na strukturu, vůni nebo chuť mléka. Laktóza je fermentována bakteriemi mléčného kysání, což má za následek nakyslou chuť mléka a při poklesu pH pod 4,6 (izoelektrický bod) dochází ke srážení mléčných bílkovin. Fermentačním procesem mohou vznikat i těkavé sloučeniny, například octová nebo máselná kyselina, oxid uhličitý nebo různé alkoholy, které ovlivňují vůni a chuť mléka. Mikrobiálním rozkladem bílkovin vznikají hořké

peptidy, může docházet ke srážení mléka, produkci amoniaku a sirovodíku. Lecitinázy hydrolyzují lecitin přítomný v membránách tukových globulí, což vede k agregaci globulí. Lipázy, které rozkládají triacylglyceridy, vytváří mastné kyseliny s krátkými řetězci, které způsobují žluklý pach a žluklou chuť mléka. Fosfolipázy hydrolyzují fosfolipidy přítomné v membránách tukových globulí, čímž se vnitřek globulí stává lépe přístupným pro lipázy. Přítomnost a činnost plísní, kvasinek, koliformních bakterií, *Pseudomonas* spp., *Actinomyces* spp., *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *maltigenes* může způsobovat zatuchlý, ovocný, rybí, zemitý, sladový nebo stájový pach (Marth et Steele, 2001; Singh et Sandhya, 2011; Samaržija et al., 2007).

4 MATERIÁL A METODIKA

Pro posouzení antimikrobiálních vlastností bioaktivních látek obsažených v rostlinách byly použity modely *in vitro* a přidavek rostlinných látek přímo do potraviny. Testovány byly esenciální oleje a vodné výluhy. Pro testy *in vitro* byly zvoleny disková difuzní metoda a metoda zředování v bujónu, kde byly pro stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám použity izoláty z mléka a mléčných výrobků a čisté kultury z České sbírky mikroorganismů sídlící v Brně. Rozvoj přirozené mikroflóry nebo naopak její potlačení bylo sledováno v syrovátce.

4.1 Charakteristika materiálu použitého pro testování antimikrobiální aktivity *in vitro*

4.1.1 Esenciální oleje

Esenciální oleje byly zakoupeny v obchodní síti (Léčivé rostliny, Brno, Královo Pole, Česká republika). Výrobci těchto esenciálních olejů jsou Míča a Harašta (Česká republika) a Manipura (Česká republika). Pro testování antimikrobiální účinnosti byly použity v koncentrované nebo zředěné formě, jako rozpouštědlo byl použit methanol. Použity byly esenciální oleje levandule úzkolisté, tymiánu obecného, šalvěje lékařské, skořicovníku cejlonského, rozmarýnu lékařského, meduňky lékařské a kmínu kořeného.

4.1.2 Bakteriální a kvasinkové izoláty

Mikroorganismy, na kterých byla testována antimikrobiální účinnost bioaktivních látek z rostlin, byly získány z mikrobiologických analýz kravského nebo kozího mléka, sýrů a syrovátky. Po provedení mikrobiologického rozboru byly vybrané skupiny mikroorganismů (gramnegativní bakterie, enterokoky, bakterie mléčného kysání a kvasinky) izolovány pomocí křížového roztěru. Z Petriho misky byla vždy bakteriologickou kličkou odebrána vhodná kolonie a opakovaným křížovým roztěrem byla přečištěna. Tímto postupem byl získán čistý mikrobiální izolát, který byl následně pomnožen na vhodném živném médiu (Biokar diagnostics, Francie).

Přehled živných půd použitých při izolaci je uveden v Tab. 2 společně s podmínkami kultivace (živná média a podmínky kultivace byly zvoleny na základě norem a doporučení).

Tab. 2 Podmínky kultivace při izolaci mikroorganismů

Skupina mikroorganismů	Živná půda	Podmínky kultivace
Gramnegativní bakterie	VRBL	37 °C / 24 h – ČSN ISO 5541/1
Enterokoky	Compass ENTEROCOCCUS Agar	45 °C / 24 h
Bakterie mléčného kysání	MRS	30 °C / 48 h – ČSN ISO 6610
Kvasinky	Chloramphenicol Glucose Agar	25 °C / 120 h – ČSN ISO 6611

*Výrobce živných bujónů je Biokar diagnostics, Francie

Izoláty byly uchovávány při teplotě 6 °C. Petriho misky byly zabaleny do hliníkové fólie tak, aby bylo zabráněno vysychání vzorků.

V následujících tabulkách (Tab. 3 až Tab. 6) je uveden přehled izolátů s charakteristikou vzorku, ze kterého pocházely.

Tab. 3 Charakteristika vzorků pro izolaci gramnegativních bakterií

Kód vzorku	Druh vzorku	Mléko	Původ	Datum odběru
1J	Mléko	Kravské	ŠZP Žabčice	29.7. 2013
4J	Mléko	Kravské	ŠZP Žabčice	21.5. 2013
7J	Polotvrdý sýr	Kozí	Farma Černuc	21.5. 2013
12J	Kozí brynza	Kozí	Kozí farma Prosetín	21.5. 2013
13J	Farmářský přírodní sýr	Kozí	Marie Palánová, Jezeřany	21.5. 2013
6	Syrovátka	Kozí	Farma Sedlák, Šošůvka	22.7. 2013
8	Syrovátka	Kozí	Farma Sedlák, Šošůvka	22.7. 2013
49	Mléko	Kravské	Farma Kunčice pod Ondřejníkem	2.10. 2012
52	Mléko	kravské	Mlékomat Stará Osada	22.3. 2012
59I	Syrovátka	Kozí	Farma Sedlák, Šošůvka	4.11. 2013
59II	Syrovátka	Kozí	Farma Sedlák, Šošůvka	4.11. 2013
75	Syrovátka	Kozí	Farma Sedlák, Šošůvka	4.5. 2013
76	Syrovátka	Kozí	Farma Sedlák, Šošůvka	4.5. 2013
85	Lahodný sýr	Kravský	Luka a.s.	19.2. 2014
86	Balkánský sýr	Kravský	Luka a.s.	19.2. 2014
87	Čerstvý kozí sýr	Kozí	Eva Eliášová, Sedlejev	16.5. 2014
88	Sýr dohřívaný týdenní	Ovčí	Farma Pejškov, Kročovi	16.5. 2014
89	Kozí balkán	Kozí	Marie Palánová, Jezeřany	16.5. 2014
91	Mléko	Kozí	Farma Račice	15.4. 2014

ŠZP – školní zemědělský podnik

Tab. 4 Charakteristika vzorků pro izolaci enterokoků

Kód vzorku	Druh vzorku	Mléko	Původ	Datum odběru
2J	Mléko	Kravske	ŠZP Žabčice	29.7. 2013
3J	Čerstvý sýr	Ovčí	Ovčí statek Hrdlička, Brníčko	30.7. 2013
5J	Čerstvý sýr	Kozí	Dryšice	21.5. 2013
8J	Čerstvý kozí sýr, sladká varianta	Kozí	Marcela Homolová, Jezeřany - Maršovice	21.5. 2013
9J	Farmářský sýr přírodní	Kozí	Marie Palánová, Jezeřany	21.5. 2013
10J	Gouda	Kravske	Hana Kajwajiová, Korouhev	21.5. 2013
7	Syrovátka	Kozí	Farma Sedlák, Šošůvka	22.7. 2013
9	Syrovátka	Kozí	Farma Sedlák, Šošůvka	22.7. 2013
42	Sýr z lisované sýřeniny	Kravske	Orrero Litovel – Grand Moravia	8.10.2012
48	Mléko	Kozí	Farma Sedlák, Šošůvka	13.10.2010
60I	Syrovátka	Kozí	Farma Sedlák, Šošůvka	4.5. 2013
60II	Syrovátka	Kozí	Farma Sedlák, Šošůvka	4.5. 2013

Vysvětlivky viz Tab. 3

Tab. 5 Charakteristika vzorků pro izolaci bakterií mléčného kysání

Kód vzorku	Druh vzorku	Mléko	Původ	Datum odběru
62	Hrudkový sýr	Ovčí	Farma Východná, Slovensko	21.5. 2013
64	Uzený sýr	Ovčí	Ekológia pod Kriváňom, Poľnohospodárske družstvo Važec, Slovensko	21.5. 2013
69	Mléko	Kravske	ŠZP Žabčice	19.7. 2013
71	Hrudkový sýr	Ovčí	Lužná, Slovensko	21.5. 2013
74	Bionitě	Ovčí	Salaš Pružina, Slovensko	21.5. 2013

Vysvětlivky viz Tab. 3

Tab. 6 Charakteristika vzorků pro izolaci kvasinek

Kód vzorku	Druh vzorku	Mléko	Původ	Datum odběru
1MF	Mléko	Kravské	ŠZP Žabčice	16.7. 2013
2MF	Mléko	Kravské	Farma Hrušová, Vysoké Mýto	24.7. 2013
3MF	Mléko	Kozí	Farma Sedlák, Šošůvka	16.7. 2013
14MF	Mléko	Kozí	Farma Račice	24.7. 2013
6MFA	Mléko pasterované	Kravské	Farma Valašská Bystřice	24.7. 2013
6MFB	Mléko pasterované	Kravské	Farma Valašská Bystřice	24.7. 2013
10MFA	Mléko	Kravské	ZD Senice	7.5. 2013
10MFB	Mléko	Kravské	ZD Senice	7.5. 2013
15MFA	Mléko	Ovčí	Ovčí farma Hrdlička, Brníčko	24.7. 2013
1MK	Selské mléko plnotučné pasterované	Kravské	Farma Radonice	25.10. 2013
1S	Balkánský sýr	Kravské	Ústav technologie potravin, MENDELU	25.10. 2013
102	Syrovátkový sýr	Kozí	Ústav technologie potravin, MENDELU	12.8. 2014
103I	Syrovátkový sýr	Kozí	Ústav technologie potravin, MENDELU	12.8.2014
105I	Syrovátka	Kozí	Farma Sedlák, Šošůvka	1.9. 2014
105II	Syrovátka	Kozí	Farma Sedlák, Šošůvka	1.9. 2014
106II	Syrovátka	Kozí	Farma Sedlák, Šošůvka	1.9. 2014

ŠZP – školní zemědělský podnik, ZD – zemědělské družstvo

Izolované mikroorganismy byly identifikovány pomocí biochemických testů. Mezi použité identifikační kity patřily EN-COCCUStest (Erba Lachema, Česká republika)

pro identifikaci bakterií rodu *Enterococcus*, ENTEROtest 24 (Erba Lachema, ČR) a ENTEROtest 24N (Erba Lachema, ČR) pro identifikaci gramnegativních bakterií, CANDIDA-Screen (Erba Lachema, ČR) pro identifikaci kvasinek a API test 50 CH (bioMérieux, Francie) pro identifikaci bakterií mléčného kysání.

4.1.3 Biochemické testy EN-COCCUStest, ENTEROtest 24, ENTEROtest 24N, CANDIDA-Screen

Z čisté 24 hodinové kultury (pro kvasinky 24-48 h) byla ve fyziologickém roztoku připravena mikrobiální suspenze o denzitě 1 (gramnegativní bakterie), 2 (rod *Enterococcus*), nebo 3 stupně (kvasinky) McFarlandovy zákalové stupnice. Suspenze byla naočkována v množství 100 µl do všech jamek mikrotitrační destičky identifikačního kitu a vybrané jamky byly zakápnuty sterilním parafinovým olejem (dle požadavků jednotlivých testů). Inokulované destičky byly uloženy do polyethylenového sáčku tak, aby nedocházelo k jejich vysychání a umístěny do termostatu, kde byly inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 25 °C (kvasinky) a 37 °C (gramnegativní bakterie a enterokoky). Po inkubaci byly odečteny barevné reakce dle šablony, zaznamenány do protokolu jako pozitivní, nebo negativní a vyhodnoceny pomocí softwaru TNW 7.0 (MikroLa Test, Erba Lachema, Česká republika). Softwarem bylo určeno, o jaký druh bakterie nebo kvasinky se jedná.

4.1.4 API test 50 CH

Z čisté 24 hodinové kultury bakterií mléčného kysání byla v médiu API 50 CHL připravena suspenze o denzitě 2 stupně McFarlandovy zákalové stupnice, která byla napipetována do jamek stripů. Po naočkování byly jamky zakápnuty sterilním parafinovým olejem. Stripy byly umístěny do vlhčené destičky, aby nedocházelo k vysychání testu. Připravený test byl inkubován v termostatu při teplotě 30 °C. Interpretace výsledků proběhla po 48 hodinách. Negativní reakce, případně intenzita pozitivní reakce (intenzita změny zbarvení) byla vyjádřena procentuálně, zaznamenána do protokolu a druh bakterie byl určen pomocí kódové knihy.

4.2 Testování antimikrobiální účinnosti *in vitro*

Na vybraných druzích bakterií a kvasinek byla testována antimikrobiální aktivita esenciálních olejů diskovou difuzní metodou a metodou zředování v bujónu. Zvolené

koncentrace účinných látek pro testování byly odvozeny na základě literárních zdrojů (Oussalah et al., 2007; Nimje et al., 2013; Gupta et al., 2013; Hammer et al., 1999; Grigore et al., 2012; Bubonja-Sonje et al., 2011; Diao et al., 2014; Elgayyar et al., 2001; Abdellatif et al., 2014; Nascimento et al., 2000; Albayrak et al., 2012; Anwar et al., 2009; Gülçin et al., 2003).

4.2.1 Disková difuzní metoda

Z čisté 24 hodinové kultury bakterií nebo kvasinek byla ve fyziologickém roztoku připravena suspenze o denzitě 1 McF. Na Petriho misky s příslušným živným médiem bylo naočkováno 100 µl mikrobiální suspenze, která byla po povrchu agaru rozetřena sterilní skleněnou tyčinkou. Sterilní papírové disky o průměru 9 mm (Fisher Scientific, Česká republika) byly napuštěny 30 µl esenciálního oleje a po třech poklady na zaočkované živné médium. Esenciální olej byl použit v koncentraci 1 a 10 %. Společně s izoláty byly vždy testovány i příslušné čisté kmeny z České sbírky mikroorganismů. Pro každou kombinaci příslušného mikroorganismu a esenciálního oleje byla vždy připravena dvě opakování. V rámci pokusu byly vždy připraveny i kontroly, a to pro kontrolu růstu mikroorganismu (Petriho miska zaočkovaná mikrobiální suspenzí bez disků), kontrolu sterility esenciálního oleje (P. miska bez inokula, pouze s pokladenými disky napuštěnými účinnou látkou), v případě ředěných esenciálních olejů pro kontrolu inhibice bakterie nebo kvasinky rozpouštědlem (P. miska s inokulem a disky napuštěnými methanolem) a pro kontrolu sterility živného média (bez mikroorganismů i účinných látek). Po kultivaci byly odečteny inhibiční zóny, které byly zaznamenány, vyhodnoceny a získaná data byla podrobena statistické analýze. Podmínky kultivace jsou shodné s podmínkami kultivace uplatněnými při izolaci mikroorganismů – viz Tab. 2.

4.2.2 Metoda zředování v bujónu

Z čisté 24 hodinové kultury bakterií či kvasinek byla ve fyziologickém roztoku připravena suspenze o denzitě 1 McF. Do zkumavek s 5 ml příslušného živného bujónu (viz Tab. 7) bylo napipetováno 500 µl mikrobiální suspenze a dle požadované koncentrace odpovídající množství esenciálního oleje (výsledná koncentrace esenciálního oleje v živném bujónu – 1 a 10 %). Společně s izoláty byly vždy testovány i příslušné čisté kmeny z České sbírky mikroorganismů. Všechny varianty pokusu byly

provedeny ve dvou opakováních. Stejně jako v případě diskové difuzní metody byly připraveny i kontrolní vzorky pro kontrolu růstu, kontrolu sterility použitého antimikrobiálního činidla, v případě zředěného esenciálního oleje pak pro kontrolu citlivosti bakterie nebo kvasinky na rozpouštědlo a pro kontrolu sterility bujónu. U takto připravených vzorků probíhalo měření absorbance při vlnové délce 550 nm během kultivace při teplotě odpovídající druhu mikroorganismu (viz Tab. 7). Každý vzorek byl z důvodu opakovatelnosti měřen třikrát. Měřením absorbance byla zjišťována intenzita zákalu živného média, tzn. intenzita mikrobiálního růstu. První měření proběhlo v nulté hodině, tedy ihned po založení pokusu, další měření následovala po 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 24 hodinách, kdy byl pokus ukončen. Měření probíhalo na přístroji NanoPhotometer™ Pearl (Implen, Německo). Hodnoty absorbance byly zaznamenány a vyhodnoceny. U dat byla zjištěna směrodatná odchylka a společně s mediánem naměřených hodnot zanesena do tabulek. Získaná data byla statisticky zpracována.

Tab. 7 Kultivační podmínky bakterií a kvasinek použitých pro metodu zředování v bujónu

Skupina testovaných mikroorganismů	Živné médium*	Kultivační teplota
Gramnegativní bakterie	TSB (Trypto-casein Soy Broth)	37 °C
Enterokoky	TSB	45 °C
Kvasinky	TSB	25 °C
Bakterie mléčného kysání	MRS Broth	30 °C

*Výrobce živných bujónů je Biokar diagnostics, Francie

4.3 Testování antimikrobiální účinnosti *in vivo*

Po testech *in vitro* následovalo stanovení antimikrobiálních vlastností esenciálních olejů a vodných výluhů přímo v potravinové matici – v syrovátce. Použité koncentrace účinných látek byly zvoleny na základě literárních zdrojů (Hammer et al., 1999; Gutierrez et al., 2009; de Carvalho et al., 2015; Shori et Baba, 2012; Moritz et al., 2012; Selim, 2011; Tiwari et al., 2009), vyhodnocení antimikrobiální účinnosti při dvou předešlých metodách a bylo zde přihlédnuto i k případné sensorické přijatelnosti.

4.3.1 Esenciální oleje

Esenciální oleje byly zakoupeny v obchodní síti (Léčivé rostliny, Brno, Královo Pole, Česká republika). Výrobci těchto esenciálních olejů jsou Míča a Harašta (Česká republika) a Manipura (Česká republika). Pro testování antimikrobiální účinnosti byly použity esenciální oleje tymiánu obecného, levandule úzkolisté, skořicovníku cejlonského, anýzu vonného a fenyklu obecného v koncentrované formě.

4.3.2 Vodné extrakty

Vodné extrakty byly připravovány z čerstvého nebo sušeného rostlinného materiálu. Přehled testovaných bylin společně s použitou částí rostliny a poměrem zvoleným k maceraci je uveden v Tab. 8.

Vodné extrakty byly připraveny navážením byliny, zalitím destilovanou vodou o teplotě 95 °C a luhováním ve vodní lázni při 90 °C po dobu jedné hodiny. Následně byla směs zfiltrována přes sterilní kvalitativní filtrační papír (Whatman No. 1, Spojené království). Po přípravě byly extrakty ihned použity.

Tab. 8 Přehled bylin použitých k přípravě výluhů

Rostlina	Stav	Použitá část	Hmotnostní poměr rostlina : voda
Tymián obecný	Čerstvý	Nať	1 : 7,5
Levandule úzkolistá	Čerstvý	Nať	1 : 10
Anýz vonný	Sušený	Plod	1 : 10
Fenykl obecný	Sušený	Plod	1 : 5
Skořicovník cejlonský	Sušený	Kůra	1 : 10

4.3.3 Syrovátka

Pro sledování antimikrobiální účinnosti bioaktivních látek přímo v potravině byla zvolena kozí syrovátka získaná při výrobě tvarohu. Syrovátka byla dodána z Farmy dojných a kašmírských koz (Šošůvka, Česká republika). Jedná se o konvenční chov bílé krátkosrsté kozy (*Capra aegagrus hircus*), stádo čítá 131 koz s průměrným denním nádojem 325 litrů. Letní krmná dávka (1.6.-30.10.) sestává z pastvy a přísunu vody

ad libitum, dále ze sena, senáže a jadrného krmiva v množství 0,5, 1,5 a 0,7 kg / koza a den. Zimní krmná dávka sestává ze senáže, sena a jadrného krmiva v množství 4, 1 a 0,7 kg/koza a den a voda byla dodána ad libitum.

4.3.4 Sledování dynamiky vývoje mikrobiální populace v syrovátce s přidavkem účinných látek

Syrovátka byla odměřena do sterilních vzorkovnic a k ní bylo napipetováno příslušné množství esenciálního oleje nebo vodného výluhu příslušné rostliny. Přehled použitého množství esenciálních olejů a extraktů je uveden v Tab. 9.

Tab. 9 Množství esenciálních olejů a vodných výluhů přidávaných do syrovátky

Esenciální olej	Objem pipetovaný do 100 ml syrovátky [μl]
Tymián obecný	600
Levandule úzkolistá	1000
Skořicovník cejlonský	50
Anýz vonný	25
Fenykl obecný	100
Vodný výluh	Objem pipetovaný do 100 ml syrovátky [μl]
Tymián obecný	
Levandule úzkolistá	
Anýz vonný	5 000
Fenykl obecný	
Skořicovník cejlonský	

Vzorky syrovátky s přidavkem testovaných látek byly připraveny ve třech opakováních a společně s kontrolními vzorky (syrovátka bez přidavku účinných látek, čisté vodné výluhy) byly uchovávány v ledničce při teplotě 6 °C po dobu 4 týdnů, během nichž byl ve vzorcích sledován vývoj přirozené mikroflóry.

Sledované skupiny mikroorganismů společně s podmínkami kultivace jsou uvedeny v Tab. 10. Pro stanovení termorezistentních mikroorganismů byla část vzorku odebrána a pasterována ve vodní lázni o teplotě 85 °C po dobu 10 minut.

Tab. 10 Podmínky kultivace sledovaných mikroorganismů

Skupina MO	Živná půda*	Podmínky kultivace
Koliformní bakterie	VRBL	37 °C / 24 h – ČSN ISO 5541/1
Enterokoky	Compass Enterococcus Agar	45 °C / 24 h
TMR aerobní	PCA with skimmed milk	30 °C / 48 h
TMR anaerobní	PCA with skimmed milk	30 °C / 48 h za anaerobních podmínek
Bakterie mléčného kysání	MRS	30 °C / 72 h – ČSN ISO 6610
Celkový počet mikroorganismů	PCA with skimmed milk	30 °C / 72 h – ČSN ISO 6611
Kvasinky/plísňe	Chloramphenicol Glucose Agar	25 °C / 120 h – ČSN ISO 6611
Psychrotrofní mikroorganismy	PCA with skimmed milk	6 °C / 240 h – ČSN ISO 6730

*Výrobce živných půd je Biokar diagnostics, Francie

TMR – termorezistentní mikroorganismy

Po kultivaci byly kolonie vyrostlé na Petriho miskách odečteny a převedeny na kolonie tvořící jednotky v 1 ml vzorku (KTJ/ml), tato hodnota byla zlogaritmována a graficky byl vyhodnocen vliv účinných látek na přirozenou mikroflóru syrovátky. Mikrobiologický rozbor probíhal vždy v 2. den pokusu (tzn. 1 den po jeho založení), dále 9., 16. a 23. den pokusu. Celý pokus byl během laktačního období pro každou bylinu třikrát zopakován. Získaná data byla statisticky zpracována.

4.4 Metody statistického zpracování dat

4.4.1 Testování antimikrobiální aktivity esenciálních olejů *in vitro*

4.4.1.1 Disková difuzní metoda

Průkaznost inhibičního účinku esenciálních olejů a vodných výluhů byla zjištěna pomocí jednovýběrového t-testu nebo jednovýběrového znaménkového testu. Jejich volba byla podmíněna normalitou dat, která byla ověřena Shapiro-Wilkovým testem. Míra inhibičního účinku byla posouzena na základě průměrných hodnot inhibičních zón. Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí jednovýběrového t-testu či neparametrického testu v závislosti na normalitě rozložení dat, a to porovnáním se stanovenou konstantou 9 mm – průměr papírového disku.

Zda se statisticky průkazně lišila citlivost jednotlivých mikroorganismů k účinným rostlinným látkám, bylo zjištěno analýzou rozptylu. V závislosti na splnění předpokladu normálního rozložení dat byla použita parametrická analýza rozptylu (ANOVA) nebo neparametrická obdoba Kruskal-Wallisova ANOVA.

Průkazně statistický rozdíl v antimikrobiálním působení jednotlivých koncentrací účinných látek byl zjišťován parametrickým t-testem pro závislé výběry, nebo neparametrickým znaménkovým testem pro závislé výběry, kdy výběr testu závisel opět na splnění předpokladu normality dat.

Byl zjišťován i rozdíl v citlivosti jednotlivých skupin mikroorganismů, a to pomocí testů mnohonásobného porovnávání. Tyto testy byly použity i pro srovnání účinnosti jednotlivých esenciálních olejů a vodných výluhů.

4.4.1.2 Měření zákalu

Zda byl inhibiční účinek esenciálních olejů průkazný, bylo zjištěno párovým t-testem, nebo párovým znaménkovým testem, kde byly porovnávány střední hodnoty vzorku s přidavkem esenciálního oleje s kontrolním vzorkem (bez EO). Test byl zvolen dle normality dat, která byla ověřena Shapiro-Wilkovým testem.

Zda existuje statisticky průkazný rozdíl v účincích esenciálních olejů v závislosti na jejich koncentraci, bylo zjištěno znaménkovým testem. Pomocí korelačního koeficientu byla měřena závislost účinku EO na čase. Protože data nebyla normálně rozložena, byl použit neparametrický Spearmanův korelační koeficient. Pomocí testu Kruskal-

Wallisova ANOVA bylo zjištěno, zda se liší účinek v závislosti na koncentraci esenciálního oleje. Kruskal-Wallisova ANOVA byla použita také pro zjištění rozdílů v citlivosti jednotlivých mikroorganismů.

4.4.2 Testování antimikrobiální účinnosti *in vivo*

4.4.2.1 Sledování dynamiky vývoje mikrobiální populace v syrovátce s přidavkem účinných látek

Míra ovlivnění růstu sledovaných mikroorganismů byla zjištěna pomocí t-testu po ověření normality dat. Došlo k porovnání střední hodnoty stanoveného množství mikroorganismů v kontrolním vzorku a vzorku s přidavkem esenciálního oleje nebo vodného výluhu. Na základě t-testů bylo zjištěno, zda se vzorky v nárůstu mikroorganismů významně odlišují.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Identifikace izolovaných mikroorganismů

Z mléka a mléčných výrobků byly izolovány bakterie a kvasinky. Seznam analyzovaných vzorků mléka a ml. výrobků je uveden v Tab. 3 až Tab. 6. Jednalo se o kravské, kozí a ovčí mléko a výrobky z nich. Pomocí biochemických testů byly izolované bakterie a kvasinky identifikovány na úrovni druhu, případně kmene. V následujících tabulkách (Tab. 11 až Tab. 14) jsou identifikované mikroorganismy uvedeny společně s přiřazeným kódem (viz Tab. 3 až Tab. 6).

5.1.1 Gramnegativní bakterie

Celkem bylo identifikováno 19 gramnegativních bakterií, které pocházely z kravského a kozího mléka, kravských, kozích a ovčích sýrů a kozí syrovátky. Nejčastěji identifikovanými rody byla *Klebsiella* (celkem 6 izolátů), *Aeromonas* (3 izoláty) a *Escherichia* (3 izoláty). Až na jednu výjimku (vzorek č. 49) pocházely bakterie rodu *Klebsiella* ze sýrů (jak kravských, tak kozích a ovčích), rod *Aeromonas* byl izolován z kozího mléka a kozích sýrů a *Escherichia* z kravského mléka a kozí syrovátky.

Tab. 11 Výsledky identifikace izolovaných mikroorganismů z mléka a mléčných výrobků – gramnegativní bakterie

Kód vzorku	Mikrobiální druh
1J	<i>Escherichia hermanii</i>
4J	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
7J	<i>Klebsiella oxytoca</i>
12J	<i>Klebsiella oxytoca</i>
13J	<i>Hafnia alvei</i>
6	<i>Escherichia hermanii</i>
8	<i>Providencia rustigianii</i>
49	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>
52	<i>Escherichia coli</i>
59I	<i>Hafnia alvei</i>
59II	<i>Raoultella terrigena</i>
75	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>
76	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>
85	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>
86	<i>Klebsiella oxytoca</i>
87	<i>Enterobacter cobei</i>
88	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>
89	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>
91	<i>Enterobacter cloacae</i>

Masiello et al. (2016) ve své studii uvádí jako nejčastěji izolované rody gramnegativních bakterií z pasterovaného kravského mléka rody *Enterobacter* (42 %), *Hafnia* (13 %), *Citrobacter* (12 %), *Serratia* (10 %) a *Raoultella* (9 %). Chye et al. (2004) provedli analýzu 930 vzorků syrového kravského mléka, z nichž 90 % vzorků bylo kontaminováno koliformními bakteriemi, 65 % bylo pozitivních na přítomnost *E. coli* a 33,5 % na *E. coli* O157:H7. Mezi nejčastěji se vyskytující kontaminanty syrového kravského mléka patřily dle Ercolini et al. (2009) společně s *Pseudomonas* bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* jako *Hafnia alvei*, *Serratia marcescens*

a *Citrobacter freundii*. Ve vzorcích kozího mléka byla identifikována *E. coli* O157:H7 s celkovou incidencí 0,75 % (D'Amico et al., 2008). Dle Foschino et al. (2002) souvisí přítomnost *E. coli* ve vzorcích syrového kozího mléka s regionem, ve kterém je zvíře chováno, a její obsah koreluje s obsahem celkového počtu mikroorganismů. Brooks et al. (2012) zjistili přítomnost koliformních bakterií v 5 vzorcích kravských sýrů z celkových 60. Ve dvou případech byla izolována a identifikována *E. coli*. Coton et al. (2012) identifikovali v kravském mléce a kravských polotvrdých sýrech a sýrech zrajících pod mazem více než 30 zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*. Mezi druhy, které byly izolovány z mléka, patřily *Enterobacter amnigenus* a *Pantoea agglomerans*, ze sýrů zrajících pod mazem *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Raoultella planticola*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens* a ze sýrů polotvrdých *Klebsiella terrigena*, *Proteus vulgaris*, *Serratia proteomaculans*.

5.1.2 Enterokoky

Z mléka a mléčných výrobků bylo získáno celkem 12 izolátů rodu *Enterococcus* (viz Tab. 12). Identifikovány byly čtyři druhy – *E. durans*, *E. faecium*, *E. solitarius* a *E. sulfureus*. Nejpočetnějším z nich byl *E. faecium* (celkem 6 izolátů), vyskytoval se v kozím mléce, kozích a ovčích sýrech a v kozí syrovátce. Ve čtyřech vzorcích (v kozích a kravských sýrech a kozí syrovátce) byl identifikován *E. solitarius*.

Tab. 12 Výsledky identifikace izolovaných mikroorganismů z mléka a mléčných výrobků – enterokoky

Kód vzorku	Mikrobiální druh
2J	<i>Enterococcus durans</i>
3J	<i>Enterococcus faecium</i>
5J	<i>Enterococcus faecium</i>
8J	<i>Enterococcus durans</i>
9J	<i>Enterococcus solitarius</i>
10J	<i>Enterococcus solitarius</i>
7	<i>Enterococcus faecium</i>
9	<i>Enterococcus faecium</i>
42	<i>Enterococcus solitarius</i>
48	<i>Enterococcus faecium</i>
60I	<i>Enterococcus sulfureus</i>
60II	<i>Enterococcus solitarius</i>

Martín-Platero et al. (2009) izolovali celkem 48 druhů rodu *Enterococcus* z měkkého kozího sýru (Cueva de la Magahá) a 36 druhů rodu *Enterococcus* ze dvou tvrdých kozích sýrů (Quesaila Arochena cheese, Torta Arochena). V měkkém sýru byly nejčastěji přítomny *E. faecalis*, *E. devriesei*, *E. avium* a *E. malodoratus*; v tvrdých sýrech se nejhojněji vyskytovaly *E. devriesei*, *E. malodoratus* a *E. faecalis*. V kozích sýrech zrajících pod mazem byly identifikovány *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae* a *E. gallinarum* (Suzzi et al., 2000). V kozím mléce byly enterokoky stanoveny v 63,6 % vzorků, a to *E. faecalis* a *E. faecium* (Cortes et al., 2006). V syrovém kravském mléce byla prokázána přítomnost enterokoků u 96 % z celkem 211 vzorků. Převážně se jednalo o *E. faecalis*, dále pak o *E. faecium*, *E. hirae* a *E. durans*. Po pasteraci byl naopak převažujícím druhem *E. durans* (McAuley et al., 2015). V sýru s plísní v těstě vyrobeném ze syrového kravského mléka identifikovali Ladero et al. (2010) *E. durans*, *E. faecalis* a *E. faecium*. Dle Morandi et al. (2006) patří tyto tři druhy k nejpočetněji zastoupeným druhům ve výrobcích z kravského mléka. V ovčích sýrech byly identifikovány *E. faecalis*, který tvořil celkem 81,8 % ze všech

izolátů, *E. faecium*, *E. hirae* a *E. avium*, které byly přítomny ve výrazně menším množství (Nieto-Arribas et al., 2011). Serio et al. (2010) izolovali z ovčího sýru *E. faecalis* a *E. durans*.

5.1.3 Bakterie mléčného kysání

Všechny izoláty bakterií mléčného kysání byly identifikovány jako laktobacily, ve třech případech na úrovni kmene (viz Tab. 13). V kravském mléce byl přítomen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, ostatní izoláty pocházely z ovčích sýrů.

Tab. 13 Výsledky identifikace mikroorganismů izolovaných z mléka a mléčných výrobků – bakterie mléčného kysání

Kód vzorku	Mikrobiální druh / kmen
62	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
64	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
69	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>
71	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
74	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>

Ve vzorcích syrového kravského mléka byly ve studii Franciosi et al. (2009) identifikovány jako nejčastěji se vyskytující bakterie rodu *Lactococcus*, dále pak v menších množstvích *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Pediococcus*. V syrovém kravském mléce odebraném v různých regionech Ruska byly identifikovány převážně *Lactobacillus helveticus* a *Lactobacillus plantarum*, které celkem tvořily 39,9 % všech izolátů. Co se týče rozdílnosti v zastoupení jednotlivých identifikovaných druhů, v případě *L. helveticus*, *L. plantarum* a *L. acidophilus* nebyly zjištěny významné rozdíly; naopak množství *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. sakei* a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se v závislosti na geografickém původu vzorku významně lišila (Yu et al., 2015). Ve studii Ricciardi et al. (2015) byla většina izolátů získaných z kravských sýrů identifikována jako *L. paracasei*, *L. fermentum* a *L. rhamnosus*. Ladero et al. (2010) identifikovali v sýru s plísní v těstě vyrobeném z kravského mléka *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. gasseri*, *L. ruminis*, *L. buchneri*, *L. plantarum*, *L. casei*; dále pak *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *cremoris*. Ve vzorcích syrového

kozího mléka byly, dle studie Tormo et al. (2015), dominantními kmeny rodu *Lactococcus*, konkrétně *L. lactis* subsp. *cremoris* a *L. lactis* subsp. *lactis* s procentickým zastoupením 74 ku 26 %. Převahu *L. lactis* subsp. *cremoris* autoři vztahují ke geografickému původu. Kihal et Guessas (2004) identifikovali v syrovém kozím mléce celkem 206 izolátů, z nichž 91 náleželo k rodu *Lactobacillus* a zbylé k rodům *Lactococcus* a *Streptococcus*. V rámci laktokoků byl dominantní *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. K identifikovaným laktobacilům patřily *L. curvatus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. paracasei* a *L. acidophilus*. Tserovska et al. (2002) izolovala z kozího mléka a sýru *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus* a *L. plantarum*.

5.1.4 Kvasinky

Izoláty kvasinek pocházely ze vzorků kravského a kozího mléka, kravských a kozích sýrů a kozí syrovátky. Nejčastěji izolovaným druhem byla *Candida lipolytica* (celkem 6 izolátů), dále pak *C. guilliermondii* (4 izoláty) a *C. kefir* (3 izoláty). *C. lipolytica* byla izolována z kravského a ovčího mléka a kozí syrovátky, *C. guilliermondii* z kravského balkánského sýru, kozího syrovátkového sýru a kravského a kozího mléka a *C. kefir* z kravského mléka.

Tab. 14 Výsledky identifikace mikroorganismů izolovaných z mléka a mléčných výrobků – kvasinky

Kód vzorku	Mikrobiální druh
1MF	<i>Candida kefyr</i>
2MF	<i>Candida albicans</i>
3MF	<i>Candida albicans</i>
14MF	<i>Candida guilliermondii</i>
6MFA	<i>Candida guilliermondii</i>
6MFB	<i>Candida lipolytica</i>
10MFA	<i>Candida kefyr</i>
10MFB	<i>Candida kefyr</i>
15MFA	<i>Candida lipolytica</i>
1MK	<i>Candida lipolytica</i>
1S	<i>Candida guilliermondii</i>
102	<i>Candida guilliermondii</i>
103I	<i>Geotrichum</i> sp.
105I	<i>Candida lipolytica</i>
105II	<i>Candida lipolytica</i>
106II	<i>Candida lipolytica</i>

Kosse et al. (1997) provedli analýzu jogurtů s cílem identifikace kontaminujících druhů kvasinek. Prokázali přítomnost *Candida parapsilosis*, *C. glabrata*, *Clavispora lusitaniae*, *Debaryomyces hansenii*, *Dekkera bruxellensis*, *Pichia anomala*, *P. membranaefaciens*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomycopsis capsularis*. Ve zrajících sýrech vyrobených ze syrového kravského mléka identifikovali Atanassova et al. (2016) celkem 68 izolátů, a to *Yarrowia lipolytica* (21 izolátů), *Kluyveromyces lactis* (18), *Debaryomyces hansenii* (11), *Pichia guilliermondii* (11), *Pichia fermentans* (4) a *Saccharomyces cerevisiae* (3). Dle Callon et al. (2006) byly nejčastěji se vyskytujícími kvasinkami v sýrech ze syrového kravského mléka *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida zeylanoides* a *Debaryomyces hansenii*. S menší četností byly ze

sýrů izolovány *Candida parapsilosis*, *C. silvae*, *C. intermedia*, *C. rugosa*, *Saccharomyces unisporus* a *Pichia guilliermondii*. V kravských sýrech s plísní na povrchu byly přítomny *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *Saturnispora mendoncae* a *Clavispora lusitaniae* (Ceugniez et al., 2015); Viljoen et al. (2003) v sýrech typu Camembert identifikovali *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Torulaspora delbrueckii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. minuta* a různé druhy rodu *Candida* se sezónní závislostí (v zimním období bylo identifikováno 20 různých druhů kvasinek, zatímco v letním období 7 druhů). Corbo et al. (2001) provedli analýzu různých druhů syrových mlék, v mléce kozím a kravském identifikovali nejčastěji *Trichosporon cutaneum* (v 15,24 % případů), *Candida catenulata* (10,48 %) a *Yarrowia lipolytica* (8,57 %). Identifikací kvasinek v různých mléčných výrobcích se zabývali Lopandic et al. (2006), celkem izolovali 513 izolátů, mezi nimiž byly nejčastěji zastoupeny *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica* a *Candida zeylanoides*; většina izolátů pocházela z hrudkového sýru. Výskyt kvasinek v kozím mléce sledovali Fadda et al. (2010); provedli analýzy vzorků syrového kozího mléka z 62 farem z různých oblastí Sardínie a jako nejčastěji se vyskytující druh kvasinky určili *Candida zeylanoides*.

5.2 Testování antimikrobiální aktivity esenciálních olejů *in vitro*

5.2.1 Disková difuzní metoda

Diskovou difuzní metodou byla testována citlivost gramnegativních bakterií, enterokoků, bakterií mléčného kysání a kvasinek vůči inhibičním účinkům esenciálních olejů levandule úzkolisté, tymiánu obecného, šalvěje lékařské, skořicovníku cejlonského, rozmarýnu lékařského, meduňky lékařské a kmínu kořeného. Esenciální oleje v koncentraci 1 a 10 % byly testovány na mikroorganismech izolovaných z mléka a mléčných výrobků a na čistých sbírkových kulturách mikroorganismů pocházejících z České sbírky mikroorganismů (CCM) sídlící v Brně.

5.2.1.1 Gramnegativní bakterie

Citlivost izolátů gramnegativních bakterií byla testována společně se sbírkovým kmenem *Escherichia coli* CCM 7929. Průměrné hodnoty inhibičních zón jsou uvedeny v Tab. 15., výsledky statistických analýz v přílohách 1 až 5. Z uvedených hodnot

a statistického zhodnocení vyplývá, že proti vybraným bakteriím byla účinná většina esenciálních olejů. Jediným esenciálním olejem, který neměl statisticky prokazatelné inhibiční účinky, byl EO šalvěže v 1% koncentraci.

Tab. 15 Průměrné rozměry inhibičních zón aplikovaných esenciálních olejů v mm u gramnegativních bakterií

Testovaný MO	MetOH	Koncentrace [%]									
		Tymián		Levandule		Šalvěj		Skořice		Kmín	
		1	10	1	10	1	10	1	10	1	10
<i>Escherichia coli</i> CCM 7929	9,00	11,33	12,17	9,00	9,33	9,33	10,00	13,83	17,33	9,33	11,20
<i>Escherichia coli</i> (52)	9,17	10,17	12,50	10,00	10,00	10,00	10,67	12,17	27,00	10,20	10,83
<i>Escherichia hermannii</i> (1J)	9,17	11,00	19,83	9,50	10,83	9,00	9,83	11,33	13,50	9,50	10,17
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (49)	10,17	12,50	13,33	9,67	10,00	10,67	10,67	12,67	13,67	11,17	11,33
<i>Klebsiella oxytoca</i> (7J)	10,17	12,17	18,83	9,83	11,67	9,00	9,67	10,50	11,67	9,33	9,50
<i>Klebsiella oxytoca</i> (12J)	9,50	15,33	26,17	10,17	10,67	9,17	9,33	11,67	12,50	10,17	10,33
<i>Hafnia alvei</i> (13J)	9,33	11,83	19,17	9,17	10,50	9,00	9,00	9,83	10,00	9,00	9,17

Vysvětlivky: MO – mikroorganismus, MetOH - methanol

Míra antimikrobiálních vlastností esenciálních olejů je patrná z jejich průměrného inhibičního účinku. Nejvyšší úroveň antibakteriální aktivity vykázaly EO tymiánu a skořice v obou koncentracích. V případě tymiánu, skořice a levandule existovaly dle statistických analýz rozdíly v účinnosti mezi jednotlivými koncentracemi. U EO kmínu a skořice byly rozdíly pozorovány také, ale nebyly vyhodnoceny jako statisticky prokazatelné. Inhibiční účinky na bakterie byly prokázány i v případě methanolu, oproti esenciálním olejům byly ale výrazně menší.

K účinkům EO tymiánu byla nejcitlivější *Klebsiella oxytoca* izolovaná z polotvrdého sýru (7J) a naopak nejméně jím byly inhibovány *E. coli* CCM 7929 a *E. coli* izolovaná z kravského mléka (52). El Bouzidi et al. (2013) testovali účinky esenciálních olejů různých druhů tymiánu – volně rostoucích a pěstovaných (*Thymus broussonetti* Boiss., *T. maroccanus* Ball., *T. satureioides* Coss.), a to diskovou difuzní metodou v množství 10 µl/disk (o průměru 6 mm) mimo jiné na gramnegativní mikroorganismy, mezi které patřily *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* CCMM B4, *Enterobacter cloacae* a *Salmonella* sp. Inhibiční zóny u *E. coli* ATCC 25922 i CCMM B4 se pohybovaly od 19,00 po 30,67 mm. Při porovnání zkoušených množství esenciálních olejů vyplývá, že v této práci testovaná *E. hermannii* s rozměrem inhibiční zóny 19,83 mm při použití 10% EO je výrazně citlivější.

Rusenova et Parvanov (2009) použili ve své studii esenciální olej tymiánu pro inhibici gramnegativních bakterií, například *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Enteritidis a *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Z výsledků je patrné, že právě EO tymiánu patřil mezi účinnější. Při použitém množství 10 µl/disk (o průměru 6 mm) velmi významně potlačil růst *K. pneumoniae*; zjištěný rozměr inhibiční zóny činil 43,3 mm. Znatelně inhiboval také *E. coli* (39,3 mm) a *S. Enteritidis* (38 mm); *E. aerogenes* byl vůči jeho působení oproti dříve zmíněným bakteriím odolnější – inhibiční zóna dosáhla pouze 22 mm. Také ve studii Soković et al. (2010) patřil tymián mezi rostliny s vyšším antibakteriálním účinkem. V koncentraci 1 µg/disk (o průměru 4 mm) potlačil EO tymiánu nejlépe ze zkoušených bakterií *S. Enteritidis*, kdy inhibiční zóna dosáhla 24 mm, dále shodně *E. coli* a *Enterobacter cloacae* (22 mm), *S. Typhimurium* (20 mm) a jako nejodolnější se projevila *Pseudomonas aeruginosa* s rozměrem inhibiční zóny 16 mm. Účinnost EO tymiánu proti *E. coli* byla prokázána také Lixandru et al. (2010); v tomto případě inhibiční zóna u *E. coli* ATCC 25922 dosáhla 9 mm a u *E. coli* ATCC 35218 pouze 6 mm při průměru disku 3 mm.

Ruiz-Navajas et al. (2012) potvrdili antibakteriální aktivitu proti *Aeromonas hydrophila* – při použití 9mm disků napuštěných 40 µl esenciálních olejů tymiánu došlo k vytvoření inhibičních zón o průměrech 20,5 mm v případě *Thymus moroderi* Pau ex Martínez a 45,5 mm u EO *Thymus piperella* L. EO skořice nejlépe inhiboval růst izolátu *E. coli* a pouze mírně ovlivnil růst *Hafnia alvei* izolované z přírodního kozího sýru.

Esenciální olej skořicovníku čínského a jeho antibakteriální účinky zkoumali Rusenova et Parvanov (2009) a také jejich studií byly tyto vlastnosti prokázány, neboť došlo k poměrně výraznému potlačení růstu *E. coli* ATCC 25922, kdy průměr inhibiční zóny činil 35 mm, v menší míře byl inhibován i růst *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (26,7 mm). Celkově byl v této studii účinek EO skořice posouzen jako mírnější oproti EO tymiánu. Valizadeh et al. (2015) potvrdili antibakteriální účinky esenciálního oleje skořicovníku cejlonského ve vzestupné koncentraci (50, 100 a 200 µl/ml) vůči *E. coli* ATCC 43894, kdy došlo k vytvoření inhibičních zón o průměrech 14, 15 a 18 mm (rozměr disku 6mm, obsah EO 30 µl). Kolistatické vlastnosti EO skořicovníku byly prokázány také ve studii Nimje et al. (2013), v níž byly porovnávány účinky skořicovníku čínského a cejlonského. Bylo zjištěno, že skořicovník cejlonský při vyšších použitých koncentracích potlačil růst *E. coli* ve větší míře než skořicovník čínský, ovšem v nejnižší použité koncentraci (0,625 %) byl účinnější EO skořicovníku čínského.

Esenciální oleje levandule, šalvěže a kmínu potlačovaly růst námi zkoušených bakterií v menší míře a v několika případech nebyl jejich růst nijak ovlivněn (viz Tab. 15). Například esenciální olej kmínu kořenného ovlivnil růst sbírkového kmene *E. coli* CCM 7929 a získaného izolátu pouze mírně, lepších výsledků bylo dosaženo v 10% koncentraci; ve studii Lixandru et al. (2010) byly jeho účinky průkaznější – testován byl na sbírkových kmenech *E. coli* ATCC 25922 a ATCC 35218 a v obou případech dosáhly inhibiční zóny 8 mm při použití disku o průměru 3 mm. Zde byl však použit esenciální olej koncentrovaný.

Statistickou analýzou získaných výsledků bylo zjištěno, že v citlivosti jednotlivých gramnegativních bakterií vůči esenciálním olejům rozdíl neexistuje. Celkově nejcitlivější byla *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* a naopak nejméně *Hafnia alvei*.

5.2.1.2 Enterokoky

Výsledné průměrné inhibiční zóny v mm zvolených koncentrací esenciálních olejů testovaných na izolátech bakterií rodu *Enterococcus* jsou uvedeny v Tab. 16, výsledky statistických analýz v přílohách 6 až 13. Enterokoky byly obecně k působení esenciálních olejů citlivější než gramnegativní bakterie, což souhlasí s výsledky mnoha studií (Dorman et Deans, 2000; Erdoğan et al., 2013; Gyawali et Ibrahim, 2012; Sartoratto et al., 2004; Chao et al., 2000; López et al., 2005). Významněji byl jejich růst ovlivněn také samotným methanolem. Jak EO, tak i methanol byly statistickou analýzou vyhodnoceny jako prokazatelně účinné.

Tab. 16 Průměrné rozměry inhibičních zón aplikovaných esenciálních olejů v mm u enterokoků

Testovaný MO	MetOH	Koncentrace [%]									
		Tymián		Levandule		Šalvěj		Skořice		Kmín	
		1	10	1	10	1	10	1	10	1	10
<i>E. faecalis</i> CCM 4224	11,50	15,67	17,33	12,33	15,17	14,00	19,33	11,67	11,83	10,17	11,00
<i>E. faecium</i> (48)	10,83	13,83	16,17	11,67	13,83	10,00	13,67	10,33	11,67	10,00	10,67
<i>E. faecium</i> 3J	10,67	11,17	12,83	9,83	11,50	10,00	11,67	10,00	11,17	10,00	10,33
<i>E. faecium</i> 5J	11,17	13,33	14,83	11,33	15,50	10,33	13,83	13,17	18,00	12,83	14,00
<i>E. durans</i> 8 J	11,17	16,17	17,00	13,83	16,00	12,50	13,83	15,33	17,83	10,50	11,67
<i>E. solitarius</i> 9J	10,67	10,5	14,67	12,17	16,00	9,83	12,00	11,17	13,00	9,00	9,50
<i>E. solitarius</i> 10J	10,17	11,67	12,17	16,67	19,17	9,33	10,50	12,33	13,17	10,67	11,33
<i>E. solitarius</i> (42)	11,17	12,67	12,83	11,33	16,17	10,50	14,67	9,83	10,17	9,50	10,67

Vysvětlivky viz Tab. 15

Nejsilnější antimikrobiální účinky vykázaly esenciální oleje levandule, tymiánu, šalvěje a skořice v 10% koncentraci. Statisticky bylo prokázáno, že inhibiční vlastnosti 1% EO se od 10% EO významně odlišovaly. EO levandule poměrně významně potlačil růst *E. faecalis* CCM 4224, *E. durans* a *E. solitarius* (9J, 10J a 42) – izoláty pocházející z kozího přírodního sýru, dále z goudy a sýru lisovaného ze sýřeniny (vyrobených

z kravského mléka). Inhibiční zóny nebyly vytvořeny pouze v případě *E. solitarius* 9J při použití 1% EO kmínu. EO kmínu se v tomto případě celkově projevil jako nejslabší antimikrobiální činidlo.

Enterococcus faecalis ATCC 29212 byl dle López et al. (2005) nejúčinněji inhibován esenciálním olejem hřebíčku a skořicovníku cejlonského. Při použití disků o průměru 5 mm, které byly napuštěny 3 μ l koncentrovaného esenciálního oleje, bylo dosaženo inhibičních zón o průměru 15 mm. Hanamanthagouda et al. (2010) použili při testování stejný kmen *E. faecalis* jako v předchozí studii (ATCC 29212); koncentrací esenciálního oleje levandule (*Lavandula bipinnata* (Roth) Kuntze) 300 μ g/ μ l na disk o průměru 6 mm byla vytvořena inhibiční zóna o průměru 10 mm. V této studii nepatřil *E. faecalis* k nejcitlivějším mikroorganismům, EO vykázal účinnější potlačení růstu v případě *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus* sp. a *Aspergillus niger*. Lević et al. (2011) testovali účinnost různých koncentrací EO dvou druhů tymiánu (*T. serpyllum*, *T. vulgaris*) při použití disků o průměru 6 mm, které byly napuštěny 10 μ l EO o různých koncentracích. Citlivost *E. faecalis* ATCC 14506 se zvyšovala se stoupající koncentrací esenciálních olejů, ke koncentraci 2 μ l/ml byl tento kmen odolný v případě obou uvedených EO, při koncentraci 3,9 μ l/ml nebyl potlačen pouze esenciálním olejem *T. serpyllum*. Inhibiční zóny o shodném průměru byly vytvořeny při použité koncentraci 7,8 μ l/ml. Nejvyššího účinku bylo dosaženo koncentrací EO 500 μ l/ml, kdy došlo k vytvoření inhibičních zón o průměru 21,0 mm (*T. serpyllum*) a 28,7 mm (*T. vulgaris*). *E. faecalis* je dle Sonbolia et al. (2006) citlivý i k účinkům EO šalvěže. V této studii byly testovány antimikrobiální účinky tří druhů šalvěže – *Salvia mirzayanii*, *S. santolinifolia* a *S. hydrangea*. Při napuštění 6mm disku 30 μ l koncentrovaného esenciálního oleje došlo k vytvoření inhibičních zón o průměru 14 mm (*S. mirzayanii*) a 10 mm (*S. santolinifolia* a *S. hydrangea*).

Co se týče celkové citlivosti jednotlivých izolátů enterokoků k EO, nejvýrazněji byl potlačován růst *E. durans* izolovaný z čerstvého kozího sýru, dále *E. faecium* původem z kozího mléka a *E. faecalis* CCM 4224. Naopak nejméně inhibován byl *E. faecium* izolovaný z čerstvého ovčího sýru. Mezi zmíněnými *E. durans* a *E. faecium* byl v citlivosti k esenciálním olejům nalezen statisticky průkazný rozdíl.

5.2.1.3 Bakterie mléčného kysání

Další skupinou mikroorganismů, které byly použity pro testování antimikrobiálního působení esenciálních olejů byly izoláty bakterií mléčného kysání. Průměrné rozměry inhibičních zón v mm jsou uvedeny v Tab. 17. Růst bakterií mléčného kysání byl v některých případech velmi silně inhibován. Statisticky prokazatelný účinek vůči těmto bakteriím vykazovaly esenciální oleje tymiánu a skořice v obou koncentracích a EO kmínu v 10% koncentraci (viz přílohy 14 až 20).

Tab. 17 Průměrné rozměry inhibičních zón aplikovaných esenciálních olejů v mm u bakterií mléčného kysání

Testovaný MO	MetOH	Koncentrace [%]							
		Tymián		Šalvěj		Skořice		Kmín	
		1	10	1	10	1	10	1	10
<i>L. rhamnosus</i> CCM 1828	9,83	12,50	22,67	11,83	10,83	11,00	45,00	10,67	10,67
<i>L. delbruecki</i> subsp. <i>delbruecki</i> (69)	9,00	9,00	26,17	9,00	9,00	24,17	65,00	9,00	11,00
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> (62)	10,67	14,83	20,33	9,67	10,67	36,83	67,00	9,00	10,5
<i>L. acidophilus</i> (64)	9,00	9,67	21,67	9,00	9,00	31,67	65,00	9,00	10,83
<i>L. rhamnosus</i> (74)	9,17	18,67	17,00	9,33	9,83	12,17	52,00	9,33	9,83
<i>L. delbruecki</i> subsp. <i>lactis</i> (71)	12,17	16,00	33,33	11,50	12,00	15,67	50,33	10,83	10,67

Vysvětlivky viz Tab. 15

U skořice a tymiánu byl také prokázán statisticky významný rozdíl v účinnosti jednotlivých koncentrací. Nejvýraznější antimikrobiální účinky byly pozorovány u EO skořice, při jehož působení dosáhly průměry inhibičních zón až 67,00 mm. Nejcitlivější byl k působení EO skořice *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, který byl silně inhibován oběma použitými koncentracemi. Tymián byl účinný vůči všem testovaným bakteriím, s výjimkou *L. delbruecki* subsp. *delbrueckii* při koncentraci EO 1 % - zde nebyl pozorován viditelný antibakteriální účinek.

Inhibiční účinky esenciálních olejů skořice a tymiánu jsou prokázány vůči *Lactobacillus bulgaricus*, *L. plantarum*, *Leuconostoc cremoris* a *Streptococcus*

thermophilus (Ceylan et Fung, 2004). EO šalvěže a kmínu potlačovaly růst testovaných izolátů pouze v omezené míře, v několika případech byl jejich účinek nulový. Shodně Ceylan et Fung (2004) uvádí, že esenciální olej šalvěže není účinný proti *L. plantarum* a *L. cremoris*; ovšem inhibuje růst *L. bulgaricus*. Růst většiny laktobacilů nebyl téměř ovlivněn ani použitým rozpouštědlem. Ze statistického pohledu neměl methanol prokazatelné účinky na žádnou bakterii mléčného kysání. Cetin et al. (2013) pomocí diskové difuzní metody potvrdili antimikrobiální účinky esenciálního oleje tymiánu proti probiotickým bakteriím (*Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. reuteri* a *Streptococcus thermophilus*). Růst některých testovaných mikroorganismů byl značně potlačen, a to zejména *L. bulgaricus*, v jehož případě došlo k vytvoření inhibiční zóny o průměru 39,75 mm (při impregnaci 6mm disku 10 μ l neředěného esenciálního oleje). Poměrně citlivé byly i *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* a *Lactobacillus reuteri* s průměrem inhibičních zón 34, 32 resp. 32 mm. Nejméně byl potlačen růst *Lactobacillus acidophilus*, u něhož dosáhl průměr inhibiční zóny pouze 18,75 mm; inhibiční zóna u *L. plantarum* činila 25,75 mm. Naopak ve studii Ruiz-Navajaz et al. (2012) při testování citlivosti *Leuconostoc carnosum* diskovou difuzní metodou nebyl inhibiční účinek koncentrovaných esenciálních olejů tymiánu (*Thymus moroderi*, *Thymus piperella*) prokázán.

Co se týče citlivosti jednotlivých bakterií, nebyl mezi nimi zjištěn statisticky významný rozdíl, nejcitlivější byl *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* izolovaný z ovčího hrudkového sýru, dále byl významněji ovlivněn růst *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1828 a naopak nejméně potlačovaly esenciální oleje růst *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* izolovaného z kravského mléka.

5.2.1.4 Kvasinky

Kvasinky byly k antimikrobiálnímu působení použitých esenciálních olejů poměrně odolné. Statisticky prokazatelně účinnými EO s inhibičními vlastnostmi proti kvasinkám byly rozmarýn v obou koncentracích (výjimku tvořila pouze *Candida tropicalis* CCM 8223 u 1% koncentrace), meduňka a tymián v koncentraci 10 %. Prokazatelný účinek byl zjištěn i v případě methanolu (viz přílohy 21 až 27).

Tab. 18 Průměrné rozměry inhibičních zón aplikovaných esenciálních olejů v mm u kvasinek

Testovaný MO	MetOH	Koncentrace [%]					
		Tymián		Rozmarýn		Meduňka	
		1	10	1	10	1	10
<i>Candida tropicalis</i> CCM 8223	9,00	9,00	10,83	9,00	10,67	9,00	9,67
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCM 8191	9,67	11,00	32,33	10,33	10	11,17	11,67
<i>Candida kefyr</i> 1MF	10,33	11,50	18,50	10,50	10,33	9,00	11,67
<i>Candida kefyr</i> 10MFA	9,50	9,00	10,50	10,50	10,50	9,00	10,33
<i>Candida guilliermondii</i> 1S	10,17	9,00	11,33	9,67	11,00	9,00	11,67
<i>Candida guilliermondii</i> 6MFA	10,83	9,00	10,67	9,33	9,83	9,00	9,00
<i>Candida lipolytica</i> 15MFA	11,50	9,00	11,50	10,50	10,67	9,00	10,50
<i>Candida lipolytica</i> 1MK	10,00	9,00	11,33	9,83	11,67	9,00	9,83

Vysvětlivky viz Tab. 15

EO tymiánu, který byl v koncentraci 10 % účinný vůči všem kvasinkám, působil v nižší koncentraci pouze proti *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8191 a *C. kefyr* izolované z kravského mléka (1MF). Podobně i meduňkový esenciální olej byl v koncentraci 1 % účinný pouze proti *S. cerevisiae* CCM 8191. S výjimkou *Candida guilliermondii*, jejíž růst nebyl esenciálním olejem meduňky ovlivněn, byly kvasinky tímto EO alespoň mírně inhibovány. V citlivosti jednotlivých kvasinek k esenciálním olejům nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Celkově nejcitlivější byly *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8191 a *Candida kefyr* izolovaná z kravského

mléka. Naopak nejméně byl ovlivněn růst *Candida guilliermondii* izolované z kravského mléka.

Rusenova et Parvanov (2009) testovali esenciální oleje mimo jiné proti *Candida albicans*; EO tymiánu zde patřil k účinnějším – průměr inhibiční zóny dosáhl 35,3 mm (při použití 6mm disku napuštěného 10 µl koncentrovaného EO). El Bouzidi et al. (2013) použili EO volně rostoucího a šlechtěného tymiánu (*Thymus broussonetti*, *T. maroccanus*, *T. satureioides*) k potlačení růstu kvasinek (*C. albicans* CCMM L₅, *C. krusei* CCMM L₁₀, *C. glabrata* CCMM L₇ a *C. parapsilosis* CCMM L₁₈) - množství 10 µl neředěného EO/disk (o průměru 6 mm). K působení esenciálních olejů byla v případě *Thymus broussonetti* a *T. maroccanus* nejcitlivější *C. parapsilosis*, průměry inhibičních zón se pohybovaly od 50 do 53,33 mm, byla však nejodolnější k účinkům *T. satureioides*, s průměrem inhibiční zóny 36,33 mm. Stejně tak i ostatní druhy rodu *Candida* byly esenciálním olejem *T. satureioides* inhibovány mírněji než EO z ostatních druhů tymiánu. Nejodolnější ze zkoušených kvasinek byla *C. krusei*, s nejmenším rozměrem inhibiční zóny u *T. satureioides* 41,00 mm a největším u *T. maroccanus* 50,83 mm.

Antifungální účinky EO tymiánu potvrzují ve své studii již Conner et Beuchat (1984), kteří zařazují tymián společně s novým kořením, skořicí, hřebíčkem, cibulí a dobromyslí mezi rostliny s nejvýznamnějšími inhibičními účinky proti 13 testovaným druhům kvasinek kazících potraviny. Esenciální olej meduňky byl proti testovaným kvasinkám (*Candida albicans* IPA 200 a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226) ve studii Abdellatif et al. (2014) výrazně účinnější ve srovnání s inhibicí bakteriálních druhů. Zatímco v případě bakterií došlo k vytvoření inhibiční zóny o největším průměru 21 mm (*Klebsiella pneumoniae* CIP 8291), u *C. albicans* to bylo již 36 mm a v případě *S. cerevisiae* 38 mm (disk o průměru 6 mm napuštěný 35 µl neředěného EO). Dle López et al. (2005) je *C. albicans* citlivá i vůči EO rozmarýnu; v této studii došlo k vytvoření inhibiční zóny o průměru 14 mm (3 µl EO, disk o průměru 5 mm). Poměrně dobré antifungální účinky prokázal esenciální olej rozmarýnu ve studii Şerban et al. (2011) proti *C. albicans* ATCC 10231; po impregnaci disku o průměru 6 mm 5 µl EO došlo k vytvoření inhibiční zóny o velikosti 15 mm. Rozmarýn v tomto případě patřil mezi zkoušenými esenciálními oleji k účinnějším. Účinný byl také proti *Candida albicans* ATCC 48274, *Rhodotorula glutinis* ATCC 16740, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2365, *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 60232 a *Yarrowia lipolytica* ATCC 16617 ve

studii Sacchetti et al. (2005), kteří využili diskovou difuzní metodu pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Nejcitlivější k působení EO rozmarýnu byla *S. cerevisiae* – její růst byl potlačen již při 0,06 mg/ml; pro ostatní zkoušené kvasinky byly stanoveny tyto MIC: *C. albicans* 0,09 mg/ml, *R. glutinis* 0,12 mg/ml, *Y. lipolytica* 0,12 mg/ml a *S. pombe* 0,18 mg/ml. V porovnání s EO tymiánu byly antifungální účinky EO rozmarýnu mírnější; v případě tymiánu byly hodnoty MIC pro *C. albicans*, *R. glutinis* a *S. cerevisiae* 0,06 mg/ml, pro *Schizosaccharomyces pombe* a *Yarrowia lipolytica* 0,03 mg/ml.

Pokud srovnáme citlivost jednotlivých skupin mikroorganismů k esenciálním olejům, statisticky byly vyhodnoceny jako nejméně citlivé kvasinky, dále gramnegativní bakterie, bakterie mléčného kysání a k nejsilnější inhibici růstu docházelo v případě enterokoků.

5.2.2 Metoda zředování v bujónu

Sbírkové mikroorganismy (Česká sbírka mikroorganismů, Brno) a izoláty z mléka a mléčných výrobků byly podrobeny také testování antimikrobiální aktivity esenciálních olejů metodou zředování v bujónu. Ze sbírkových mikroorganismů se jednalo o *Escherichia coli* CCM 7929, *Enterococcus faecalis* 4224, *Lactobacillus rhamnosus* CCCM 1828, *Bacillus cereus* CCM 2010 a *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8191. Výsledky měření, tj. vývoj intenzity zákalu – čili rozvoj nebo naopak potlačení mikrobiálního růstu, jsou shrnuty v tabulkách (Tab. 19 až Tab. 44), které jsou z důvodu objemu dat umístěny vždy za příslušnou kapitolou. Esenciální oleje byly testovány v koncentraci 1 a 10 %. Esenciální oleje pocházely z následujících druhů rostlin: tymián obecný, levandule úzkolistá, šalvěj lékařská, skořicovník cejlonský, kmín kořený, rozmarýn lékařský a meduňka lékařská.

5.2.2.1 Čisté kultury

Statistickou analýzou byl porovnán vývoj mikroorganismů v kontrolním vzorku (bez přídavku esenciálního oleje) a vzorku s přídavkem EO ve dvou různých koncentracích (viz Tab. 19 až Tab. 23). Při sledování růstu mikroorganismů nebo naopak jejich inhibice bylo v případě EO testovaných na čistých mikrobiálních kulturách zjištěno, že se statisticky prokazatelný účinek projevil pouze ve vzorku s EO šalvěje

v koncentraci 10 % a skořice v koncentraci 1 a 10 %. Výsledky statistických analýz jsou uvedeny v přílohách 32 až 39).

V některých případech byly účinné i jiné esenciální oleje – například EO tymiánu v obou koncentracích částečně potlačil růst *E. coli* CCM 7929 a *Enterococcus faecalis* CCM 4224, ale naopak významně podpořil růst *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1828 a *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8191. U zbylých esenciálních olejů k takto výrazné podpoře růstu, jako u tymiánu, nedocházelo.

Celkově nejlépe potlačila růst sledovaných mikroorganismů skořice, u níž byl i statisticky prokázán rozdíl v účinnosti oproti ostatním esenciálním olejům. Dále byl statisticky porovnán účinek EO v závislosti na jejich koncentraci – rozdíl se projevil v případě šalvěže, která inhibovala růst mikroorganismů lépe v koncentraci 10 %. Vzhledem k tomu, že antibakteriální účinnost byla zkoumána v určitém časovém rozmezí, bylo také statisticky testováno, zda se mění účinek esenciálních olejů v čase. Změna účinku se nepotvrdila pouze u skořice, u ostatních EO s časem jejich účinnost klesala. Méně působily testované esenciální oleje obecně na *Bacillus cereus* CCM 2010 a *S. cerevisiae* – ty byly inhibovány pouze mírně, nebo byl v některých případech jejich růst i podpořen. Zbylé mikroorganismy byly k EO citlivější, například *L. rhamnosus* CCM 1828 byl inhibován většinou esenciálních olejů s výjimkou tymiánu, jak již bylo zmíněno výše.

Ve studii Rusenova et Parvanov (2009) klesala citlivost sbírkových kmenů mikroorganismů k různým EO, mezi nimiž byly testovány i EO tymiánu, skořice a šalvěže, v řadě *Bacillus licheniformis*, *E. coli*, *Candida albicans* a *E. faecalis*. *Bacillus subtilis* a *E. coli* jsou dle Soković et al. (2010) citlivé k esenciálním olejům tymiánu, levandule a šalvěže – *B. subtilis* patřil mezi nejcitlivější testované bakterie. Nejsilnější antibakteriální účinky byly prokázány u tymiánu, kde se minimální inhibiční koncentrace (MIC, tedy minimální koncentrace, při níž mikroorganismus již nevykazuje viditelný růst) pohybovala mezi 0,25 a 1,5 µg/ml; naopak EO šalvěže inhiboval růst zkoušených bakterií až při vyšších koncentracích, a to od 5 do 10 µg/ml. Silné antibakteriální účinky tymiánu potvrzují i Cetin et al. (2013) proti bakteriím rodu *Lactobacillus* (u nichž se pohybovaly hodnoty MIC mezi 7,8 až 250 µg/ml) a Hammer et al. (1999), kteří testovali účinnost esenciálních olejů vůči vybraným mikroorganismům, mezi něž patřily i *C. albicans*, *E. faecalis* a *E. coli*. Tyto tři mikroorganismy byly shodně nejcitlivější k působení EO tymiánu, následovaly EO

šalvěje a levandule. Citlivost *E. faecalis* byla potvrzena i vůči EO skořicovníku cejlonského (Gupta et al., 2013).

Tab. 19 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Escherichia coli* CCM 7929

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]										Kontrola růstu
	Tymián		Levandule		Šalvěj		Skořice		Kmín		
	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10	
0	0,0047	0,0000	0,0080	0,0000	0,0080	0,0000	0,0020	0,0000	0,0085	0,0000	0,0000
SMODCH	0,0013	0,0000	0,0054	0,0000	0,0019	0,0000	0,0009	0,0000	0,0053	0,0000	0,0000
2	0,0054	0,0000	0,0045	0,0000	0,0030	0,0085	0,0045	0,0000	0,0005	0,0245	0,0000
SMODCH	0,0024	0,0000	0,0021	0,0000	0,0039	0,0053	0,0032	0,0026	0,0005	0,0034	0,0000
4	0,0089	0,0075	0,0175	0,0020	0,0305	0,0085	0,0065	0,0030	0,0240	0,0070	0,0055
SMODCH	0,0011	0,0023	0,0065	0,0007	0,0031	0,0046	0,0070	0,0057	0,0014	0,0013	0,0027
6	0,0119	0,0102	0,0150	0,0560	0,0285	0,0080	0,0235	0,0030	0,0245	0,0115	0,0075
SMODCH	0,0015	0,0033	0,0100	0,0197	0,0149	0,0031	0,0205	0,0030	0,0030	0,0154	0,0025
8	0,0335	0,0280	0,0115	0,0130	0,0225	0,0400	0,0000	0,0010	0,0325	0,0285	0,0430
SMODCH	0,0089	0,0117	0,0062	0,0114	0,0222	0,0075	0,0000	0,0013	0,0037	0,0136	0,0062
24	0,0530	0,0250	0,0445	0,0165	0,1130	0,0530	0,0060	0,0170	0,0765	0,0095	0,0955
SMODCH	0,0036	0,0076	0,0280	0,0062	0,0643	0,0206	0,0065	0,0297	0,0196	0,0115	0,0422
48	0,0510	0,0155	0,0520	0,0335	0,0985	0,0640	0,0620	0,0000	0,1160	0,0375	0,2215
SMODCH	0,0112	0,0015	0,0022	0,0091	0,0248	0,0023	0,0300	0,0000	0,0023	0,0267	0,0280

Vysvětlivky: SMODCH – směrodatná odchylka měření

Tab. 20 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Enterococcus faecalis* CCM 4224

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]										Kontrola růstu
	Tymián		Levandule		Šalvěj		Skořice		Kmín		
	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10	
0	0,0055	0,0000	0,0015	0,0200	0,0080	0,0015	0,0020	0,0000	0,0055	0,0000	0,0000
SMODCH	0,0016	0,0000	0,0005	0,0130	0,0094	0,0021	0,0086	0,0000	0,0028	0,0000	0,0000
2	0,0058	0,0000	0,0060	0,0195	0,0090	0,0010	0,0000	0,0000	0,0240	0,0000	0,0000
SMODCH	0,0006	0,0000	0,0026	0,0106	0,0127	0,0037	0,0000	0,0294	0,0156	0,0000	0,0000
4	0,0104	0,0055	0,0150	0,0085	0,0240	0,0040	0,0000	0,0035	0,0280	0,0005	0,0070
SMODCH	0,0018	0,0014	0,0068	0,0083	0,0041	0,0027	0,0000	0,0047	0,0113	0,0025	0,0048
6	0,0113	0,0091	0,0105	0,0005	0,0385	0,0040	0,0050	0,0000	0,0145	0,0355	0,0070
SMODCH	0,0013	0,0025	0,0040	0,0046	0,0256	0,0010	0,0020	0,0022	0,0069	0,0293	0,0038
8	0,0066	0,0030	0,0000	0,0085	0,0365	0,0080	0,0000	0,0135	0,0190	0,0225	0,0515
SMODCH	0,0024	0,0019	0,0009	0,0119	0,0273	0,0025	0,0000	0,0196	0,0143	0,0148	0,0066
24	0,0121	0,0084	0,0430	0,0200	0,1205	0,0695	0,0000	0,0425	0,1680	0,1410	0,1210
SMODCH	0,0042	0,0021	0,0095	0,0089	0,0218	0,0066	0,0000	0,0334	0,0048	0,0145	0,0445
48	0,0083	0,0178	0,0935	0,0290	0,1115	0,1010	0,0225	0,0000	0,1435	0,0780	0,1645
SMODCH	0,0018	0,0027	0,0237	0,0358	0,0284	0,0071	0,0139	0,0000	0,0215	0,0130	0,0294

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 21 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1828

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]										Kontrola růstu
	Tymián		Levandule		Šalvěj		Skořice		Kmín		
	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10	
0	0,0210	0,0450	0,0000	0,0125	0,0165	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005
SMODCH	0,0333	0,0137	0,0000	0,0177	0,0165	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0017	0,0029
2	0,1220	0,2670	0,0185	0,0000	0,0000	0,0025	0,0000	0,0005	0,0020	0,0010	0,0100
SMODCH	0,0740	0,1018	0,0137	0,0052	0,0000	0,0129	0,0000	0,0008	0,0023	0,0007	0,0097
4	0,2395	0,4605	0,0735	0,0135	0,0000	0,0895	0,0000	0,0070	0,0160	0,0010	0,0225
SMODCH	0,0679	0,1354	0,0186	0,0077	0,0000	0,0129	0,0000	0,0042	0,0097	0,0061	0,0162
6	0,3420	0,2880	0,0940	0,0000	0,0210	0,0130	0,0030	0,0060	0,0030	0,0210	0,0340
SMODCH	0,1441	0,0536	0,0270	0,0121	0,0103	0,0042	0,0019	0,0067	0,0839	0,0152	0,0295
8	0,5695	0,8515	0,0925	0,0780	0,0020	0,0075	0,0090	0,0130	0,0105	0,0325	0,0600
SMODCH	0,1322	0,1399	0,0115	0,0133	0,0032	0,0116	0,0312	0,0150	0,0059	0,0059	0,0277
24	0,7275	0,9020	0,0675	0,0500	0,2685	0,0235	0,0805	0,0060	0,1015	0,5600	0,1070
SMODCH	0,1754	0,1054	0,0193	0,0461	0,1109	0,0228	0,0070	0,0197	0,0396	0,1154	0,0115
48	0,5530	0,4245	0,0905	0,0380	0,6790	0,5570	0,0930	0,0000	0,2630	0,4410	0,6300
SMODCH	0,1874	0,0575	0,0295	0,0147	0,1213	0,0495	0,0077	0,0000	0,0905	0,1924	0,0878

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 22 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Bacillus cereus* CCM 2010

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]										Kontrola růstu
	Tymián		Levandule		Šalvěj		Skořice		Kmín		
	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10	
0	0,0350	0,0240	0,0060	0,0000	0,0090	0,0050	0,0140	0,0000	0,0085	0,0090	0,0055
SMODCH	0,0229	0,0276	0,0088	0,0130	0,0040	0,0053	0,0202	0,0000	0,0043	0,0117	0,0055
2	0,0210	0,0000	0,0000	0,0000	0,0040	0,0000	0,0100	0,0000	0,0055	0,0005	0,0125
SMODCH	0,0067	0,0004	0,0004	0,0056	0,0026	0,0000	0,0084	0,0000	0,0023	0,0116	0,0053
4	0,0510	0,0420	0,0000	0,0080	0,0170	0,0020	0,0095	0,0000	0,0205	0,0240	0,0045
SMODCH	0,0307	0,0239	0,0017	0,0098	0,0109	0,0017	0,0021	0,0000	0,0040	0,0237	0,0011
6	0,0620	0,0530	0,0105	0,0210	0,0490	0,0115	0,0025	0,0165	0,0365	0,0100	0,0230
SMODCH	0,0120	0,0376	0,0163	0,0215	0,0282	0,0219	0,0035	0,0037	0,0091	0,0193	0,0238
8	0,0530	0,0830	0,0000	0,0395	0,0575	0,0335	0,0000	0,0180	0,0230	0,0370	0,0575
SMODCH	0,0239	0,0342	0,0000	0,0260	0,0172	0,0098	0,0000	0,0187	0,0134	0,0140	0,0075
24	0,1385	0,0370	0,0000	0,0300	0,1345	0,1085	0,0245	0,0000	0,0890	0,0310	0,1745
SMODCH	0,0297	0,0156	0,0000	0,0041	0,0240	0,0175	0,0315	0,0000	0,0379	0,0310	0,0667
48	0,0735	0,0770	0,0055	0,0235	0,1470	0,1120	0,0040	0,0000	0,1190	0,0650	0,1145
SMODCH	0,0369	0,0138	0,0078	0,0142	0,0253	0,0161	0,0103	0,0000	0,0082	0,0304	0,0054

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 23 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8191

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]										Kontrola růstu
	Tymián		Levandule		Šalvěj		Skořice		Kmín		
	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10	
0	0,0065	0,0000	0,0055	0,0000	0,0000	0,0265	0,0040	0,0000	0,0090	0,0000	0,0115
SMODCH	0,0060	0,0000	0,0073	0,0000	0,0328	0,0000	0,0016	0,0000	0,0076	0,0000	0,0037
2	0,0105	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0075	0,0065	0,0000	0,0085	0,0000	0,0125
SMODCH	0,0094	0,0000	0,0039	0,0000	0,0021	0,0033	0,0027	0,0000	0,0027	0,0000	0,0027
4	0,0265	0,0400	0,0015	0,0065	0,0045	0,0275	0,0095	0,0000	0,0295	0,0080	0,0030
SMODCH	0,0060	0,0105	0,0100	0,0036	0,0049	0,0019	0,0069	0,0000	0,0033	0,0036	0,0029
6	0,0845	0,0385	0,0250	0,0100	0,0370	0,0195	0,0105	0,0125	0,0080	0,0055	0,0060
SMODCH	0,0330	0,0250	0,0075	0,0121	0,0123	0,0045	0,0074	0,0153	0,0129	0,0029	0,0026
8	0,0640	0,0550	0,0120	0,0415	0,0105	0,0045	0,0000	0,0075	0,0030	0,0020	0,0115
SMODCH	0,0241	0,0084	0,0126	0,0235	0,0025	0,0143	0,0000	0,0076	0,0007	0,0009	0,0262
24	0,0590	0,0885	0,0560	0,0000	0,0165	0,0580	0,0000	0,0000	0,0450	0,0530	0,1135
SMODCH	0,0122	0,0245	0,0306	0,0217	0,0613	0,0299	0,0000	0,0043	0,0247	0,0039	0,0054
48	0,0625	0,1000	0,0350	0,0135	0,0705	0,1100	0,0045	0,0000	0,1410	0,0540	0,1115
SMODCH	0,0167	0,0104	0,0026	0,0096	0,0204	0,0101	0,0012	0,0000	0,0214	0,0139	0,0107

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

5.2.2.2 Enterokoky

Citlivost enterokoků izolovaných ze syrovátky (vzorky 9, 60I a 60II) byla testována vůči EO tymiánu, levandule a skořice, a to v koncentracích 1 % a 10 %; průměrné hodnoty absorbance jsou uvedeny v Tab. 24 až Tab. 26. Jako statisticky prokazatelně účinné se projevily EO levandule v obou koncentracích a skořice v koncentraci 1 %. Nejúčinnějším EO se dle statistických analýz jeví levandule v koncentraci 1 % (viz přílohy 40 až 44). U všech EO byly prokázány rozdíly v účinnosti jednotlivých koncentrací. Po přidání vyšší koncentrace esenciálních olejů k izolátům docházelo však v některých případech až k podpoření jejich růstu, což bylo patrné zejména při použití EO tymiánu v koncentraci 10 %. Tyto účinky byly však pozorovány pouze do čtvrté hodiny měření – poté většinou následoval mírný pokles růstu enterokoků a na konci pozorování byly již naměřené hodnoty zákalu nižší ve srovnání s kontrolním vzorkem bez přídavku esenciálního oleje. Uvedené změny v působení 10% EO tymiánu byly potvrzeny i statisticky – jeho účinek v čase stoupal. K působení zkoušených esenciálních olejů byl nejcitlivější *Enterococcus sulfureus* a nejméně byl potlačen růst *E. solitarius*. U enterokoků nebyl zjištěn statisticky prokazatelný rozdíl v jejich citlivosti k EO. *E. sulfureus* byl poměrně významně inhibován EO levandule v koncentraci 1 % a EO skořice v koncentraci 10 %.

Cosentino et al. (1999) porovnávali účinnost EO různých druhů tymiánu (*Thymus capitatus* Hoff. et Link. a *Thymus herba-barona*^{a,b} Lois. sklizeného ve dvou odlišných regionech – ^aseverní a ^bstřední Sardínie) vůči *E. faecalis* ATCC 29212. Koncentrace, při níž již došlo k potlačení bakteriálního růstu, byla 900 µg/ml pro *T. capitatus* a *T. herba-barona*^a a 450 µg/ml pro *T. herba-barona*^b. EO tymiánu je dle Rusenova et Parvanov (2009) schopen potlačit růst *E. faecalis* ATCC 29212 již při koncentraci 1 %, v případě skořice již v koncentraci 0,015 %. Mayaud et al. (2016) uvádí, že izoláty enterokoků byly inhibovány při koncentraci EO skořice 0,16 %, EO tymiánu o koncentraci 0,94 % a v případě levandule až při 2,91 %. EO skořice (*Cinnamomum osmophloeum* Kaneh) dosáhl ve studii Chang et al. (2001) MIC vůči *E. faecalis* při 250 µg/ml. Nikolić et al. (2014) testovali antibakteriální účinky EO rostlin z čeledi hluchavkovitých, mimo jinými i levandule úzkolisté, a to proti *E. faecalis* IBR E001. EO levandule nepatřil mezi nejúčinnější, jeho MIC byla stanovena na 608,33 µg/ml, MBC (minimální baktericidní koncentrace) potom na 1166,67 µg/ml. EO levandule (*Lavandula bipinnata* (Roth) Kuntze) byl schopen potlačit růst sbírkového kmene *E. faecalis* ATCC 29212 při

MIC \leq 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Mezi ostatními testovanými bakteriemi (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus* sp.) se tento kmen řadil mezi odolnější, většina byla inhibována koncentrací EO 0,5-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Hanamanthagouda, 2010).

Tab. 24 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Enterococcus faecium* (7)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]						Kontrola růstu
	Tymián		Levandule		Skořice		
	1	10	1	10	1	10	
0	0,0235	0,0735	0,0125	0,0225	0,0160	0,0265	0,0075
SMODCH	0,0418	0,0265	0,0079	0,0087	0,0049	0,0050	0,0083
2	0,0595	0,1825	0,0125	0,0680	0,0840	0,0455	0,0090
SMODCH	0,0144	0,0380	0,0132	0,0393	0,0057	0,0136	0,025
4	0,0705	0,1315	0,0245	0,0615	0,1580	0,0455	0,1090
SMODCH	0,0314	0,0229	0,0088	0,0194	0,0433	0,0101	0,1033
6	0,0605	0,0790	0,0140	0,0240	0,0320	0,0255	0,0585
SMODCH	0,0143	0,0054	0,0215	0,0099	0,0089	0,0027	0,0093
8	0,0440	0,0610	0,0170	0,0210	0,0380	0,0210	0,1290
SMODCH	0,0048	0,0120	0,0140	0,0062	0,0078	0,0023	0,0054
24	0,0600	0,1140	0,0170	0,0225	0,0560	0,0305	0,3190
SMODCH	0,0162	0,0349	0,0065	0,0136	0,0152	0,0042	0,0422

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 25 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Enterococcus sulfureus* (60I)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]						Kontrola růstu
	Tymián		Levandule		Skořice		
	1	10	1	10	1	10	
0	0,0340	0,0840	0,0220	0,0250	0,0085	0,0235	0,0285
SMODCH	0,0172	0,0076	0,0127	0,0038	0,0024	0,0040	0,0264
2	0,0860	0,1895	0,0180	0,0365	0,0755	0,0285	0,0055
SMODCH	0,0175	0,0422	0,0138	0,0228	0,0125	0,0067	0,0043
4	0,0820	0,1505	0,0350	0,0705	0,0680	0,0425	0,0545
SMODCH	0,0282	0,0205	0,0054	0,0056	0,0079	0,0062	0,0145
6	0,0530	0,1190	0,0145	0,0410	0,0215	0,0265	0,0720
SMODCH	0,0296	0,0138	0,0146	0,0071	0,0288	0,0018	0,0094
8	0,0425	0,0470	0,0200	0,0405	0,0305	0,0205	0,1645
SMODCH	0,0062	0,0083	0,0050	0,0071	0,0046	0,0016	0,0150
24	0,0385	0,0785	0,0140	0,0205	0,0345	0,0260	0,2380

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 26 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Enterococcus solitarius* (60II)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]						Kontrola růstu
	Tymián		Levandule		Skořice		
	1	10	1	10	1	10	
0	0,0263	0,0154	0,0090	0,0110	0,0005	0,0036	0,0315
SMODCH	0,0263	0,0154	0,0090	0,0110	0,0005	0,0036	0,0315
2	0,0070	0,0011	0,0137	0,0281	0,0020	0,0111	0,0029
SMODCH	0,0070	0,0011	0,0137	0,0281	0,0020	0,0111	0,0029
4	0,0163	0,0163	0,0015	0,0018	0,0167	0,0104	0,0513
SMODCH	0,0163	0,0163	0,0015	0,0018	0,0167	0,0104	0,0513
6	0,0158	0,0050	0,0017	0,0075	0,0180	0,0027	0,0221
SMODCH	0,0158	0,0050	0,0017	0,0075	0,0180	0,0027	0,0221
8	0,0211	0,0103	0,0073	0,0007	0,0017	0,0008	0,0233
SMODCH	0,0211	0,0103	0,0073	0,0007	0,0017	0,0008	0,0233
24	0,0091	0,0103	0,0128	0,0145	0,0074	0,0037	0,0327
SMODCH	0,0091	0,0103	0,0128	0,0145	0,0074	0,0037	0,0327

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

5.2.2.3 Gramnegativní bakterie

V rámci gramnegativních bakterií byly testovány 4 izoláty z kozí syrovátky identifikované jako *Escherichia hermanii* (6), *Hafnia alvei* (59I), *Aeromonas hydrophila* (75) a *Raoultella terrigena* (59II). K nejvýraznější, statisticky prokazatelné, inhibici jejich růstu docházelo po přidavku 1% EO levandule a 10% EO skořice (viz Tab. 27 až Tab. 30). Potlačení růstu ostatními esenciálními oleji bylo méně výrazné. V této testované skupině bakterií v podstatě nedocházelo ani k podpoře jejich růstu. Mezi různými použitými koncentracemi byl v jejich účinku shledán statistickou analýzou rozdíl, a to u všech esenciálních olejů. U 10% EO tymiánu docházelo v průběhu sledování ke slábnutí antimikrobiálního účinku, u ostatních esenciálních olejů takovýto trend statisticky prokázán nebyl – buďto se jejich účinek mírně zvyšoval (ovšem ne v takové míře, aby byl výsledek statisticky průkazný), nebo byl po dobu měření téměř neměnný. Nejúčinněji byla esenciálními oleji inhibována *Aeromonas hydrophila* – nejlépe na ni působily EO skořice a levandule. Naopak nejodolnější k antimikrobiálním účinkům EO byla *Raoultella terrigena*, která byla nejvýrazněji inhibována oběma koncentracemi EO skořice a 1% EO levandule; EO tymiánu v obou koncentracích dokázal potlačit její růst jen velmi málo. Rozdíl v citlivosti jednotlivých bakterií vůči esenciálním olejům však nebyl statisticky průkazný. Statistické vyhodnocení výsledků měření je uvedeno v přílohách 45 až 50.

Metodou zředování v bujónu stanovili El Bouzidi et al. (2013) minimální inhibiční koncentraci pro *E. coli* ATCC 25922 a *E. coli* CCM B4 a izolát *Enterobacter cloacae* po přidavku esenciálních olejů volně rostoucích a pěstovaných druhů rodu *Thymus* (*Thymus maroccanus*, *Thymus broussonetii* a *Thymus satureioides*). Po 24 hodinách kultivace byl růst testovaných bakterií potlačen shodně již při koncentraci EO 0,46 mg/ml – a to v případě EO volně rostoucího *T. maroccanus*, pěstovaná varianta inhibovala růst až při koncentraci 0,96 mg/ml. Nejodolnější k působení těchto druhů tymiánu byl *E. cloacae* – jeho rezistence byla vyšší u pěstované formy *T. broussonetii* (MIC 1,82 mg/ml) a u obou forem *T. satureioides* (MIC volně rostoucího tymiánu 1,78 mg/ml, MIC pěstovaného 3,60 mg/ml).

Účinky EO tymiánu obecného byly stanoveny pomocí mikrodiluční metody i ve studii Soković et al. (2010) společně s EO levandule úzkolisté, a to vůči *E. coli* O157:H7 a *Enterobacter cloacae*. Zde byla zjišťována nejen MIC, ale také MBC – minimální baktericidní koncentrace. Výrazné antibakteriální účinky vykázal tymián

s hodnotami pro MIC, resp. MBC 1,0 µg/ml, resp. 1,5 µg/ml shodně pro *E. coli* i *E. cloaceae*. EO levandule měl již účinky o poznání mírnější, hodnoty MIC i MBC u něj dosáhly pro *E. coli* shodně 6,0 µg/ml a pro *E. cloaceae* 6,0 µg/ml, resp. 7,0 µg/ml. Antibakteriální účinky esenciálního oleje levandule proti *E. coli* byly testovány i Varona et al. (2013), kdy byl sledován vliv 11 po sobě následujících koncentrací esenciálního oleje na růst bakterie. Významného antibakteriálního účinku dosahovala již koncentrace 0,007 mg/ml, kdy se jednalo o téměř 60% potlačení. Plné inhibice bylo dosaženo až při nejvyšší použité koncentraci – 7,117 mg/ml.

Antimikrobiální účinky esenciálních olejů tymiánu, skořice a levandule testovali Mayaud et al. (2016) mimo jiné proti skupině enterobakterií, mezi které patřily *E. coli*, *E. cloaceae*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella* sp. a *Aeromonas hydrophila*. Celkově nejlepších inhibičních účinků dosáhl esenciální olej skořice, jehož MIC byly pro testované bakterie následující: *E. coli* 0,07 %, *E. cloaceae* 0,1 %, *H. alvei* 0,08 %, *Klebsiella* sp. 0,1 %, *A. hydrophila* 0,03 %. Účinně růst zkoumaných bakterií potlačoval také EO tymiánu, hodnoty MIC jsou pro *E. coli* 0,38 %, *E. cloaceae* 0,39 %, *H. alvei* 0,31 %, *Klebsiella* sp. 0,47 % a *A. hydrophila* 0,14 %. Esenciální olej levandule už působil ve zkoušených koncentracích pouze na některé z bakterií, a to na *E. coli*, *E. cloaceae* a *A. hydrophila*, u nichž se MIC pohybovala v hodnotách 6,88 %, 10 %, resp. 0,94 %; u *H. alvei* a *Klebsiella* sp. nebyla použita 10% koncentrace dostatečná pro potlačení jejich růstu. Jak je z uvedených hodnot patrné, mezi citlivější bakterie se řadily *E. coli*, *H. alvei* a *A. hydrophila*.

Tab. 27 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Escherichia hermannii* (6)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]						Kontrola růstu
	Tymián		Levandule		Skořice		
	1	10	1	10	1	10	
0	0,0250	0,0250	0,0285	0,0290	0,0090	0,0205	0,0005
SMODCH	0,0123	0,0117	0,0074	0,0095	0,0045	0,0034	0,0005
2	0,0640	0,0150	0,0230	0,0695	0,0495	0,0390	0,0445
SMODCH	0,0071	0,0017	0,0013	0,0104	0,0179	0,0063	0,0386
4	0,1025	0,0555	0,0380	0,1095	0,0550	0,0305	0,0740
SMODCH	0,0269	0,0271	0,0019	0,0207	0,0114	0,0018	0,0251
6	0,0725	0,0740	0,0125	0,0635	0,0190	0,0285	0,1065
SMODCH	0,0117	0,0022	0,0028	0,0331	0,0131	0,0018	0,0335
8	0,0715	0,0795	0,0550	0,0630	0,0390	0,0240	0,1610
SMODCH	0,0123	0,0125	0,0345	0,0326	0,0166	0,0023	0,0108
24	0,0375	0,0790	0,0130	0,0280	0,0295	0,0245	0,2520
SMODCH	0,0199	0,0116	0,0055	0,0043	0,0021	0,0044	0,0117

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 28 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (75)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]						Kontrola růstu
	Tymián		Levandule		Skořice		
	1	10	1	10	1	10	
0	0,0515	0,0270	0,0170	0,0240	0,0050	0,0170	0,0010
SMODCH	0,0424	0,0243	0,0087	0,0090	0,0013	0,0058	0,0007
2	0,0690	0,0540	0,0215	0,0570	0,0345	0,0305	0,0080
SMODCH	0,0138	0,0035	0,0035	0,0059	0,0082	0,0044	0,0204
4	0,0570	0,0460	0,0350	0,0710	0,0530	0,0305	0,0530
SMODCH	0,0171	0,0159	0,0045	0,0023	0,0137	0,0054	0,0029
6	0,0580	0,0680	0,0180	0,0600	0,0140	0,0280	0,0940
SMODCH	0,0084	0,0069	0,0041	0,0133	0,0030	0,0014	0,0115
8	0,0835	0,1265	0,0195	0,0200	0,0265	0,0185	0,1400
SMODCH	0,0086	0,0497	0,0043	0,0105	0,0345	0,0047	0,0041
24	0,0430	0,0545	0,0130	0,0315	0,0235	0,0225	0,2240
SMODCH	0,0123	0,0025	0,0074	0,0067	0,0023	0,0059	0,0475

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 29 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Hafnia alvei* (59I)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]						Kontrola růstu
	Tymián		Levandule		Skořice		
	1	10	1	10	1	10	
0	0,0365	0,0235	0,0190	0,0140	0,0120	0,0175	0,0010
SMODCH	0,0083	0,0072	0,0334	0,0023	0,0023	0,0021	0,0007
2	0,0550	0,0290	0,0185	0,0685	0,0620	0,0235	0,0080
SMODCH	0,0201	0,0175	0,0447	0,0043	0,0297	0,0037	0,0204
4	0,0645	0,0560	0,0480	0,0685	0,0835	0,0275	0,0530
SMODCH	0,0164	0,0073	0,0117	0,0088	0,0425	0,0031	0,0029
6	0,0715	0,0875	0,0185	0,0445	0,0140	0,0275	0,0940
SMODCH	0,0473	0,0190	0,0123	0,0145	0,0196	0,0022	0,0115
8	0,0565	0,0680	0,0220	0,0255	0,0205	0,0190	0,1400
SMODCH	0,0027	0,0133	0,0033	0,0179	0,0117	0,0038	0,0041
24	0,0415	0,0880	0,0330	0,0380	0,0305	0,0255	0,2240
SMODCH	0,0068	0,0196	0,0081	0,0095	0,0084	0,0011	0,0475

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 30 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Raoultella terrigena* (59II)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]						Kontrola růstu
	Tymián		Levandule		Skořice		
	1	10	1	10	1	10	
0	0,0440	0,0580	0,0235	0,0335	0,0320	0,0340	0,0045
SMODCH	0,0071	0,0394	0,0126	0,0209	0,0080	0,0216	0,0264
2	0,1120	0,0726	0,0365	0,0705	0,0280	0,0190	0,0205
SMODCH	0,0050	0,0245	0,0049	0,0115	0,0029	0,0049	0,0279
4	0,1220	0,1200	0,0430	0,0765	0,0430	0,0235	0,1005
SMODCH	0,0091	0,0083	0,0216	0,0029	0,0086	0,0024	0,0295
6	0,0545	0,1010	0,0175	0,0370	0,0150	0,0225	0,2400
SMODCH	0,0035	0,0072	0,0008	0,0039	0,0127	0,0011	0,0122
8	0,0670	0,0770	0,0250	0,0370	0,0135	0,0125	0,2315
SMODCH	0,0136	0,0095	0,0080	0,0017	0,0031	0,0016	0,0148
24	0,0565	0,0565	0,1150	0,0355	0,0285	0,0275	0,1690
SMODCH	0,0094	0,0172	0,0058	0,0008	0,0068	0,0029	0,0459

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

5.2.2.4 Bakterie mléčného kysání

Pro posouzení antimikrobiálních účinků vůči této skupině bakterií byly použity *Lactobacillus. paracasei* subsp. *paracasei* (62), *L. acidophilus* (64), *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (69), *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (71), *L. rhamnosus* (74), *L. rhamnosus* CCM 1828. Bakterie mléčného kysání nebyly významně potlačeny žádným zkoušeným esenciálním olejem (viz Tab. 31 až Tab. 36). V případě použití nižších koncentrací EO se pohybovaly naměřené hodnoty zákalu na stejné hladině jako u kontrolních vzorků. Po přidavku esenciálních olejů v koncentraci 10 % byl růst bakterií naopak podpořen, a to zejména v případě esenciálního oleje tymiánu, kde ihned po přidavku došlo k pomnožení bakterií; jejich růst pokračoval až do čtvrté či šesté hodiny pozorování a následně docházelo ke snižování hodnot zákalu čili k poklesu růstu. I přes tento pokles však byly u kontrolního vzorku naměřeny hodnoty nižší – antimikrobiální účinek u nich tedy nebyl pozorován ani s postupujícím časem. Statistickou analýzou bylo prokázáno, že existuje významný rozdíl mezi oběma použitými koncentracemi u všech esenciálních olejů, a že přidavek esenciálních olejů v koncentraci 10 % podpořil růst všech pozorovaných bakterií mléčného kysání (viz přílohy 51 až 58).

Pro stanovení antimikrobiální aktivity esenciálního oleje tymiánu (*Thymus sipyleus* subsp. *rosulans*) vůči skupině bakterií mléčného kysání použili Cetin et al. (2013) vzestupnou řadu koncentrací v rozmezí od 7,8 do 500 µg/ml. Ze stanovených hodnot MIC vyplývá, že nejcitlivější z testovaných bakterií je *Lactobacillus reuteri*, který byl inhibován již nejnižší použitou koncentrací. Naopak až nejvyšší koncentrace esenciálního oleje, tedy 500 µg/ml, potlačila růst *Bifidobacterium bifidum* a *Lactobacillus plantarum*. Ostatní zkoušené bakterie byly inhibovány při těchto koncentracích: *L. bulgaricus* – 62,5 µg/ml, *L. acidophilus* – 250 µg/ml, *Streptococcus thermophilus* – 250 µg/ml.

Esenciální oleje levandule úzkolisté a šalvěže levandulolisté byly zkoušeny proti *L. acidophilus* a *Streptococcus salivarius*. Pomocí mikrodiluční metody byly opět stanoveny hodnoty MIC. Růst *L. acidophilus* byl více potlačen esenciálním olejem šalvěže, u něhož pro inhibici bakteriálního růstu postačovala koncentrace 306,67 µg/ml, u levandule 1116,67 µg/ml. Naopak v případě *S. salivarius* byl účinnější EO levandule, který působil inhibičně již při koncentraci 160 µg/ml, EO šalvěže při 293,33 µg/ml

(Nikolić et al., 2014). *Lactobacillus sakei* byl inhibován esenciálními oleji skořice čínské a tymiánu obecného, a to v koncentracích 500, resp. 4000 ppm, z čehož je patrné, že k působení tymiánu byl v porovnání s EO skořice poměrně odolný (Turgis et al., 2012). Účinky esenciálního oleje skořice potvrzují ve své studii i Miller et al. (2014) proti *L. acidophilus*. Naopak Kivanç et al. (1991) uvádí, že esenciální olej kmínu v koncentracích 0,5 %, 1 % a 2 % podpořil růst i produkci kyseliny mléčné u *L. plantarum* a *Leuconostoc mesenteroides*. Avšak při vyšších použitých koncentracích (300 a 600 ppm) již došlo k inhibici *L. plantarum*. Ve studii byl testován také esenciální olej dobromysli, který ve všech použitých koncentracích růst obou druhů bakterií potlačil.

Gunn (2013) ve své studii hodnotila účinky esenciálních olejů skořice a tymiánu proti skupině bakterií mléčného kysání – *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, *P. damnosus* ATCC 11308, *Leuconostoc citrovorum* ATCC 23065, *L. mesenteroides* ATCC 8293, *Lactobacillus buchneri* ATCC 9460, *L. brevis* ATCC 367, *L. fermentum* ATCC 8289, *L. fructivorans* ATCC 8288 a *L. plantarum* ATCC 4008. Pro stanovení hodnot MIC byla použita metoda zředování v agaru. Celkově byl účinnější EO skořice – pro potlačení růstu většiny sledovaných mikroorganismů postačila nižší koncentrace než v případě EO tymiánu. Hodnoty MIC pro výše zmíněné bakterie jsou tyto (v pořadí EO skořice, EO tymiánu): *P. acidilactici* – 0,2 a 0,2 %, *P. damnosus* – 0,05 a 2 %, *L. plantarum* – 0,1 a 0,2 %, *L. buchneri* – 0,05 a 2 %, *L. fermentum* – 0,1 a 0,1 %, *L. brevis* – 0,1 a 0,2 %, *L. fructivorans* – 0,05 a 0,1 %, *L. mesenteroides* – 0,2 a 0,1 %, *L. citrovorum* – 0,1 a 0,1 %.

Tab. 31 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (62)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]								Kontrola růstu
	Tymián		Skořice		Šalvěj		Kmín		
	1	10	1	10	1	10	1	10	
2	0,0425	0,6470	0,0360	0,1660	0,0725	0,2180	0,0555	0,5610	0,0120
SMODCH	0,0082	0,0305	0,0184	0,0435	0,0062	0,0359	0,0180	0,0605	0,0066
4	0,0520	1,4050	0,0210	0,6435	0,0540	0,3700	0,0220	0,5475	0,0265
SMODCH	0,0212	0,0606	0,0151	0,0365	0,0242	0,0721	0,0081	0,0987	0,0048
6	0,0515	1,2375	0,0815	0,7230	0,0515	0,4980	0,0300	0,5405	0,0145
SMODCH	0,0070	0,0452	0,0109	0,0622	0,0167	0,0543	0,0064	0,0828	0,0090
8	0,0595	1,1175	0,1185	0,8560	0,0565	0,3890	0,0385	0,8215	0,0470
SMODCH	0,0217	0,1038	0,0180	0,0688	0,0180	0,0779	0,0181	0,0281	0,0072
24	0,0800	0,7865	0,1470	1,1925	0,0570	0,4340	0,0200	0,9005	0,4310
SMODCH	0,0128	0,0259	0,0054	0,0956	0,0014	0,0076	0,0019	0,0466	0,0654

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 32 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorpance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Lactobacillus acidophilus* (64)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]								Kontrola růstu
	Tymián		Skořice		Šalvěj		Kmín		
	1	10	1	10	1	10	1	10	
2	0,0485	0,2785	0,0350	0,1875	0,0680	0,2905	0,0275	0,3770	0,0025
SMODCH	0,0132	0,0949	0,0207	0,0056	0,0044	0,0128	0,0018	0,0721	0,0069
4	0,0700	0,5635	0,0450	0,4470	0,0680	0,1815	0,0255	0,4545	0,0215
SMODCH	0,0214	0,1177	0,0113	0,0432	0,0200	0,0607	0,0107	0,1171	0,0051
6	0,0765	1,1265	0,0735	0,4500	0,0475	0,3220	0,0595	0,6495	0,0395
SMODCH	0,0135	0,0334	0,0247	0,0399	0,0060	0,0117	0,0078	0,0542	0,0156
8	0,0860	1,0855	0,1150	0,4620	0,0720	0,5390	0,0275	0,5845	0,0425
SMODCH	0,0142	0,0437	0,0162	0,0818	0,0121	0,0392	0,0063	0,1069	0,0039
24	0,0895	0,6995	0,1495	1,4885	0,0560	0,3830	0,0260	0,8460	0,0710
SMODCH	0,0063	0,0466	0,0031	0,0194	0,0094	0,0585	0,0073	0,0631	0,0022

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 33 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (69)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]								Kontrola růstu
	Tymián		Skořice		Šalvěj		Kmín		
	1	10	1	10	1	10	1	10	
2	0,0675	0,5805	0,0165	0,2255	0,0700	0,3480	0,0215	0,3570	0,0760
SMODCH	0,0116	0,1007	0,0116	0,0502	0,0023	0,0707	0,0070	0,0663	0,0254
4	0,0535	1,2325	0,0395	0,3970	0,0495	0,3355	0,0195	0,4700	0,0535
SMODCH	0,0233	0,1150	0,0096	0,0524	0,0076	0,0410	0,0133	0,1079	0,0177
6	0,0645	1,1370	0,0515	0,5695	0,0605	0,3780	0,0375	0,4555	0,0430
SMODCH	0,0086	0,0323	0,0161	0,0579	0,0049	0,0491	0,0054	0,0678	0,0027
8	0,1110	1,0845	0,0950	0,7860	0,0885	0,4435	0,0490	0,4950	0,0790
SMODCH	0,0127	0,0160	0,0074	0,1081	0,0251	0,0803	0,0187	0,1185	0,0055
24	0,0995	0,7225	0,1800	1,3085	0,0555	0,4815	0,0180	0,5690	0,0970
SMODCH	0,0420	0,0386	0,0113	0,1088	0,0090	0,0892	0,0029	0,0935	0,0163

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 34 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (71)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]								Kontrola růstu
	Tymián		Skořice		Šalvěj		Kmín		
	1	10	1	10	1	10	1	10	
2	0,0840	0,5480	0,0050	0,1635	0,0560	0,5325	0,0400	0,5720	0,0000
SMODCH	0,0163	0,1373	0,0065	0,0623	0,0054	0,0700	0,0098	0,0487	0,0074
4	0,0500	1,0255	0,0365	0,4365	0,0425	0,5605	0,0300	0,4940	0,0460
SMODCH	0,0278	0,0374	0,0079	0,1220	0,0146	0,0915	0,0123	0,0699	0,0144
6	0,0955	1,1725	0,0540	0,6185	0,0665	0,3315	0,0430	0,5175	0,0430
SMODCH	0,0193	0,0154	0,0154	0,1553	0,0090	0,0962	0,0069	0,0590	0,0067
8	0,0890	1,1000	0,1590	0,7830	0,0660	0,4870	0,0270	0,5295	0,0760
SMODCH	0,0315	0,0054	0,0158	0,1126	0,0270	0,1212	0,0060	0,0687	0,0009
24	0,1115	0,7340	0,1340	1,2095	0,0560	0,5315	0,0160	0,8195	0,3825
SMODCH	0,0438	0,0238	0,0114	0,4194	0,0164	0,0864	0,0026	0,0175	0,0549

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 35 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Lactobacillus rhamnosus* (74)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]								Kontrola růstu
	Tymián		Skořice		Šalvěj		Kmín		
	1	10	1	10	1	10	1	10	
2	0,0915	0,6335	0,0350	0,3600	0,0365	0,3520	0,0625	0,5180	0,0000
SMODCH	0,0124	0,0980	0,0228	0,0900	0,0133	0,0385	0,0141	0,1695	0,0108
4	0,0435	1,2790	0,0435	0,4405	0,0800	0,4015	0,0425	0,6620	0,0240
SMODCH	0,0076	0,0743	0,0070	0,2625	0,0111	0,0204	0,0094	0,0427	0,0030
6	0,0945	1,1345	0,0440	0,5980	0,0475	0,2150	0,0525	0,6385	0,0350
SMODCH	0,0079	0,0210	0,0090	0,0609	0,0214	0,0523	0,0089	0,0991	0,0068
8	0,1035	1,0800	0,0510	0,6975	0,0475	0,4405	0,0355	0,9210	0,0635
SMODCH	0,0082	0,0068	0,0051	0,0180	0,0194	0,0382	0,0237	0,1282	0,0122
24	0,1105	0,7295	0,1915	1,5040	0,0210	0,6740	0,0440	0,8570	0,6510
SMODCH	0,0097	0,0302	0,0210	0,1762	0,0142	0,0826	0,0019	0,0641	0,1062

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 36 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1828

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]								Kontrola růstu
	Tymián		Skořice		Šalvěj		Kmín		
	1	10	1	10	1	10	1	10	
2	0,1125	0,6210	0,0090	0,4170	0,0570	0,3530	0,0635	0,4600	0,0180
SMODCH	0,0092	0,1096	0,0169	0,0560	0,0243	0,1335	0,0125	0,0261	0,0084
4	0,0325	1,3100	0,0280	0,4615	0,0485	0,2525	0,0220	0,5760	0,0290
SMODCH	0,0168	0,1101	0,0067	0,0770	0,0272	0,0389	0,0069	0,1500	0,0101
6	0,0950	1,2075	0,0330	0,6360	0,0240	0,2890	0,0405	0,5550	0,0385
SMODCH	0,0089	0,0117	0,0033	0,0550	0,0127	0,0730	0,0075	0,0931	0,0060
8	0,0980	1,0925	0,0725	0,5505	0,0245	0,0000	0,0485	0,6220	0,0365
SMODCH	0,0099	0,0225	0,0186	0,0349	0,0135	0,0429	0,0164	0,0590	0,0022
24	0,1255	0,7570	0,1890	1,5595	0,0180	0,4185	0,0225	0,8680	0,1870
SMODCH	0,0089	0,0201	0,0126	0,1614	0,0050	0,0391	0,0093	0,0647	0,0775

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

5.2.2.5 Kvasinky

Účinnost EO proti kvasinkám byla testována vůči sbírkovému kmeni *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8191 a následujícím izolátům: *Candida kefyr* (1MF), *C. lipolytica* (1MK), *C. kefyr* (10MFA), *C. lipolytica* (15MFA), *C. tropicalis* CCM 8223, *C. guilliermondii* (1S a 6MFA). Při testování citlivosti kvasinek vůči esenciálním olejům byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl v naměřených hodnotách mezi kontrolním vzorkem a vzorkem s přidavkem esenciálních olejů tymiánu v obou koncentracích, tj. 1 a 10 %, a 10% EO meduňky. Ve většině případů byl tento výsledek ovšem zapříčiněn podporou růstu kvasinek, nikoli jejich inhibicí (viz Tab. 37 až Tab. 44). Výjimkou byl 1% EO tymiánu použitý proti *C. kefyr* izolované z kravského mléka (1MF), 10% EO meduňky použitý proti téže kvasince a 1% i 10% EO tymiánu a 10% EO meduňky použitý proti *S. cerevisiae* CCM 8191, kdy došlo k potlačení růstu sbírkového kmene, ovšem až po 6 hodinách inkubace. V této části experimentu nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly v účinnosti jednotlivých koncentrací esenciálních olejů. Ze zkoušených esenciálních olejů nejméně podporoval růst olej rozmarýnový, a to obě jeho koncentrace. Ojedinele růst kvasinek i potlačil. Mezi účinky tymiánového a rozmarýnového EO byl provedeným statistickým hodnocením zjištěn rozdíl, a to u obou použitých koncentrací. Tento rozdíl byl zjištěn také při porovnání účinku EO rozmarýnu a meduňky, s výjimkou dvojice jednoprocenních olejů. V citlivosti kvasinek k účinkům esenciálních olejů rozdíl prokázán nebyl. Výsledky statistických analýz jsou uvedeny v přílohách 59 až 65.

El Bouzidi et al. (2013) testovali účinnost esenciálních olejů různých druhů volně rostoucích a pěstovaných tymiánů i proti několika zástupcům rodu *Candida* – *C. albicans* CCMM L₅, *C. krusei* CCMM L₁₀, *C. glabrata* CCMM L₇ a *C. parapsilosis* CCMM L₁₈. Všechny druhy byly k působení EO stejně citlivé s výjimkou *C. parapsilosis* v kombinaci s EO *Thymus satureioides* – k jeho působení byla značně odolnější než ostatní testované druhy kvasinek; stanovená MIC dosahovala až 1,78, resp. 1,8 mg/ml u volně rostoucí, resp. pěstované formy, oproti 0,89 a 0,90 mg/ml u ostatních druhů. Další použité EO pocházely z *Thymus maroccanus* a *Thymus broussonetii*. K jejich účinkům byly kvasinky již citlivější, potřebné MIC se pohybovaly od 0,45 mg/ml (volně rostoucí *T. broussonetii*) do 0,48 mg/ml (pěstovaný *T. maroccanus*). Rusenova et Parvanov (2009) stanovili jako MIC esenciálního oleje tymiánu (*Thymus vulgaris*) pro izolát *C. albicans* koncentraci 0,5 %.

Budzyńska et al. (2013) použili pro potlačení růstu rodu *Candida* (*C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 90028 a 50 izolátů tohoto rodu) mimo jiné esenciální oleje tymiánu (*T. vulgaris*), rozmarýnu (*R. officinalis*) a meduňky (*M. citrata indica*). Ze zmíněných EO inhiboval kandidy nejlépe EO meduňky; MIC pro sbírkové kmeny *C. albicans* ATCC 10231 a 90028 byla shodně 0,097 %, pro izoláty se MIC pohybovaly od 0,048 % po 1,56 %. Při koncentraci EO meduňky odpovídající MIC sbírkových kmenů došlo k redukci množství *C. albicans* ATCC 90028 o 99 % za 4 hodiny, při koncentraci 2x vyšší za 1 hodinu, u *C. albicans* ATCC 10231 tomu tak bylo za 6, respektive za 2 hodiny. Antifungální vlastnosti meduňky posuzovali i Abdellatif et al. (2014), a to zředovací metodou v agaru. Vzestupnou řadou koncentrací EO od 0,1 po 50 µl/ml testovali citlivost *Candida albicans* IPA 200 a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226. Pro *C. albicans* byla MIC 3 µl/ml, *S. cerevisiae* byla citlivější, účinná byla již koncentrace 2 µl/ml.

Antikandidální účinky EO rozmarýnu z různých oblastí Turecka byly testovány Celiktas et al. (2007). MIC se pohybovala v závislosti na původu rostlin a době sklizně od 2,5 mg/ml až po 10 mg/ml, přičemž byla prokázána sezónnost obsahu účinných látek, a tedy i antifungálního účinku – nejnižší MIC byly zjištěny u rostlin sklizených na jaře. Antifungální účinky rozmarýnového esenciálního oleje se zlepšují v kombinaci s EO hřebíčku (*Syzygium aromaticum*). Při použití samotného EO rozmarýnu byla jeho MIC vůči *C. albicans* ATCC 10231 0,25 %, po přidání EO hřebíčku do směsi se MIC snížila až na 0,062 %. Lepších inhibičních účinků bylo dosaženo, pokud směs esenciálních olejů obsahovala vyšší poměry hřebíčku (Fu et al., 2007).

Tab. 37 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Candida kefyr* (1MF)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]						Kontrola růstu
	Tymián		Rozmarýn		Meduňka		
	1	10	1	10	1	10	
2	0,0370	0,0880	0,0520	0,1150	0,0270	0,0685	0,0590
SMODCH	0,0087	0,0161	0,0086	0,0131	0,0182	0,0233	0,0461
4	0,0465	0,0440	0,0000	0,0490	0,0000	0,0600	0,0825
SMODCH	0,0215	0,0157	0,0004	0,0168	0,0035	0,0195	0,0226
6	0,0445	0,1165	0,0565	0,1100	0,0825	0,1020	0,0190
SMODCH	0,0156	0,0307	0,0230	0,0092	0,0075	0,0314	0,0125
8	0,0405	0,0945	0,0485	0,0405	0,0295	0,0455	0,0790
SMODCH	0,0130	0,0138	0,0035	0,0067	0,0059	0,0075	0,0174
24	0,0330	0,1185	0,1075	0,0565	0,0375	0,0395	0,1490
SMODCH	0,0077	0,0315	0,0088	0,0095	0,0218	0,0132	0,0177

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 38 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8191

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]						Kontrola růstu
	Tymián		Rozmarýn		Meduňka		
	1	10	1	10	1	10	
2	0,0070	0,0875	0,0365	0,0405	0,0205	0,0405	0,0075
SMODCH	0,0314	0,0204	0,0031	0,0302	0,0152	0,0301	0,0176
4	0,0545	0,0685	0,0175	0,0170	0,0000	0,0695	0,0325
SMODCH	0,0170	0,0085	0,0302	0,0209	0,0069	0,0120	0,0176
6	0,1400	0,1345	0,1525	0,0110	0,1295	0,1525	0,0320
SMODCH	0,0091	0,0476	0,0186	0,0047	0,0150	0,0295	0,0128
8	0,0915	0,1135	0,0340	0,0760	0,1575	0,0620	0,1615
SMODCH	0,0283	0,0129	0,0065	0,0314	0,0237	0,0288	0,0900
24	0,0910	0,1005	0,1315	0,0170	0,0720	0,0730	0,1615
SMODCH	0,0243	0,0230	0,0242	0,0055	0,0139	0,0328	0,0131

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 39 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Candida lipolytica* (1MK)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]						Kontrola růstu
	Tymián		Rozmarýn		Meduňka		
	1	10	1	10	1	10	
2	0,0800	0,1550	0,0195	0,0490	0,0435	0,1380	0,0440
SMODCH	0,0089	0,0617	0,0034	0,0425	0,0282	0,1043	0,0597
4	0,1465	0,0960	0,0455	0,0170	0,0000	0,1000	0,0110
SMODCH	0,1677	0,0173	0,0839	0,0041	0,0520	0,0118	0,0037
6	0,1065	0,0485	0,1095	0,0195	0,1205	0,1275	0,0045
SMODCH	0,0200	0,0367	0,0113	0,0087	0,0072	0,0206	0,0029
8	0,0825	0,1005	0,0245	0,0465	0,1170	0,0945	0,0020
SMODCH	0,0096	0,0441	0,0022	0,0082	0,0166	0,0213	0,0026
24	0,0800	0,0945	0,1140	0,0510	0,1310	0,0365	0,1755
SMODCH	0,0248	0,0207	0,0290	0,0135	0,0093	0,0230	0,0089

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 40 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Candida kefyr* (10MFA)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]						Kontrola růstu
	Tymián		Rozmarýn		Meduňka		
	1	10	1	10	1	10	
2	0,0500	0,0795	0,0190	0,0245	0,0895	0,1230	0,0550
SMODCH	0,0142	0,0184	0,0103	0,0180	0,0222	0,0286	0,0301
4	0,0380	0,1050	0,0425	0,0240	0,0000	0,0985	0,0055
SMODCH	0,0460	0,0089	0,0184	0,0076	0,0026	0,0217	0,0018
6	0,1635	0,0270	0,0980	0,0225	0,1375	0,1355	0,0135
SMODCH	0,0244	0,0172	0,0176	0,0072	0,0226	0,0197	0,0134
8	0,0960	0,1985	0,0260	0,0135	0,1085	0,1165	0,0315
SMODCH	0,0102	0,0212	0,0019	0,0142	0,0176	0,0099	0,0228
24	0,0660	0,1215	0,2000	0,0100	0,0795	0,0390	0,1615
SMODCH	0,0078	0,0395	0,0371	0,0040	0,0163	0,0113	0,0035

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 41 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Candida lipolytica* (15MFA)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]						Kontrola růstu
	Tymián		Rozmarýn		Meduňka		
	1	10	1	10	1	10	
2	0,0675	0,0265	0,0005	0,0280	0,0315	0,0565	0,0180
SMODCH	0,0301	0,0167	0,0021	0,0307	0,0129	0,0287	0,0222
4	0,0405	0,0985	0,0005	0,0295	0,0310	0,0620	0,0010
SMODCH	0,0050	0,0327	0,0021	0,0045	0,0055	0,0091	0,0017
6	0,1725	0,0620	0,0720	0,0000	0,1440	0,1105	0,0030
SMODCH	0,0113	0,0155	0,0058	0,0004	0,0145	0,0209	0,0150
8	0,1675	0,1680	0,0260	0,0470	0,1350	0,1350	0,0000
SMODCH	0,0332	0,0264	0,0024	0,0528	0,0302	0,0170	0,0056
24	0,1175	0,0525	0,0340	0,0075	0,0315	0,0635	0,0125
SMODCH	0,0272	0,0199	0,0072	0,0038	0,0256	0,0053	0,0136

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 42 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Candida tropicalis* CCM 8223

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]						Kontrola růstu
	Tymián		Rozmarýn		Meduňka		
	1	10	1	10	1	10	
2	0,0760	0,0870	0,0070	0,0290	0,0385	0,0425	0,0030
SMODCH	0,0013	0,0291	0,0061	0,1284	0,0041	0,0280	0,0090
4	0,1015	0,1010	0,0355	0,0365	0,0320	0,0700	0,0050
SMODCH	0,0728	0,0196	0,0300	0,0089	0,0067	0,0157	0,0019
6	0,2125	0,0760	0,0695	0,0075	0,1185	0,1400	0,0065
SMODCH	0,0205	0,0298	0,0033	0,0069	0,0148	0,0188	0,0153
8	0,1435	0,1345	0,0285	0,0210	0,1550	0,1010	0,0185
SMODCH	0,0409	0,0390	0,0097	0,0030	0,0267	0,0153	0,0064
24	0,0925	0,0410	0,0950	0,0660	0,1030	0,0680	0,1585
SMODCH	0,0461	0,0100	0,0276	0,0249	0,0108	0,0072	0,0092

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 43 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Candida guilliermondii* (1S)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]						Kontrola růstu
	Tymián		Rozmarýn		Meduňka		
	1	10	1	10	1	10	
2	0,0985	0,1135	0,0500	0,0870	0,0405	0,1090	0,0930
SMODCH	0,0108	0,0374	0,0450	0,0957	0,0034	0,0767	0,0837
4	0,0700	0,1060	0,0060	0,0360	0,0310	0,0885	0,0050
SMODCH	0,0300	0,0201	0,0209	0,0090	0,0148	0,0093	0,0073
6	0,1525	0,0870	0,0505	0,0195	0,1440	0,1105	0,0000
SMODCH	0,0256	0,0146	0,0038	0,0076	0,0616	0,0263	0,0000
8	0,1505	0,0770	0,0105	0,0370	0,0500	0,0885	0,0040
SMODCH	0,0818	0,0204	0,0142	0,0065	0,0186	0,0137	0,0049
24	0,1305	0,0880	0,0750	0,0280	0,1160	0,0520	0,1800
SMODCH	0,0569	0,0303	0,0205	0,0175	0,0143	0,0073	0,0156

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

Tab. 44 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u *Candida guilliermondii* (6MFA)

Čas měření [h]	Druh a koncentrace esenciálního oleje [%]						Kontrola růstu
	Tymián		Rozmarýn		Meduňka		
	1	10	1	10	1	10	
2	0,0775	0,1215	0,1215	0,2075	0,0485	0,1100	0,1475
SMODCH	0,0133	0,0266	0,1513	0,1360	0,0752	0,1319	0,0369
4	0,0255	0,0910	0,0000	0,0195	0,0335	0,0770	0,0010
SMODCH	0,1398	0,0204	0,0000	0,0090	0,0527	0,0102	0,0110
6	0,1745	0,0610	0,0415	0,0205	0,2285	0,1060	0,0000
SMODCH	0,0651	0,0196	0,0121	0,0051	0,2433	0,0094	0,0000
8	0,1110	0,0735	0,0125	0,0020	0,0595	0,1085	0,0015
SMODCH	0,0367	0,0106	0,0034	0,0037	0,0201	0,0362	0,0049
24	0,1235	0,0690	0,0565	0,0000	0,0960	0,0460	0,0470
SMODCH	0,1127	0,0285	0,0822	0,0065	0,0268	0,0074	0,0346

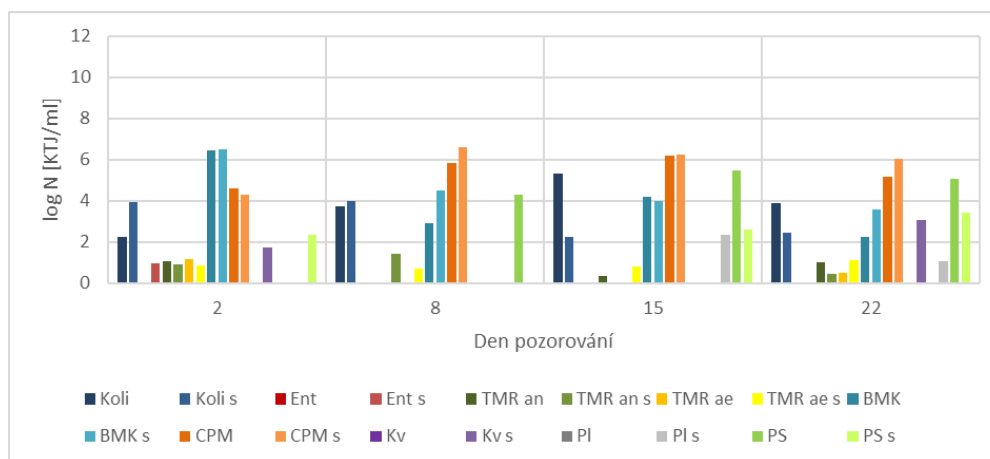
Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v Tab. 19

5.2.3 Přídavek esenciálních olejů a výluhů z rostlin do syrovátky

Ve třetí fázi sledování antimikrobiálního působení účinných látek z rostlin byly tyto přidávány ve formě esenciálních olejů (první varianta se třemi dílčími experimenty) a vodných výluhů (druhá varianta se třemi dílčími experimenty) přímo do syrovátky, v níž byla následně sledována dynamika vývoje mikrobiálního společenstva. Mezi rostliny, u kterých byly sledovány antimikrobiální účinky obsahových látek, patřily skořicovník cejlonský, tymián obecný, levandule úzkolistá, fenýkl obecný a anýz vonný. Ve vzorcích syrovátky byly sledovány následující skupiny mikroorganismů: koliformní bakterie, enterokoky, termorezistentní aerobní mikroorganismy, termorezistentní anaerobní mikroorganismy, bakterie mléčného kysání, celkový počet mikroorganismů, kvasinky, plísně a psychrotrofní mikroorganismy.

5.2.3.1 *Skořicovník cejlonský*

Během prvního experimentu (viz Obr. 1) byl po přidavku esenciálního oleje skořice pozorován statisticky průkazný rozdíl pouze v počtech psychrotrofních mikroorganismů (viz příloha 69). Nedošlo u nich však k inhibici, ale naopak se jejich množství oproti kontrolnímu vzorku (čistě syrovátce) zvýšilo. K jejich nejvýraznějšímu nárůstu došlo během druhého týdne pozorování.



Obr. 1 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO skořice do syrovátky, I. experiment

Vysvětlivky:

Koli – koliformní bakterie; syrovátka s přidavkem EO

Ent – enterokoky; syrovátka s přidavkem EO

TMR an – termorezistentní mikroorganismy anaerobní; syrovátka s přidavkem EO

TMR ae – termorezistentní mikroorganismy aerobní; syrovátka s přidavkem EO

BMK – bakterie mléčného kysání; syrovátka s přidavkem EO

CPM – celkový počet mikroorganismů; syrovátka s přidavkem EO

Kv – kvasinky; syrovátka s přidavkem EO

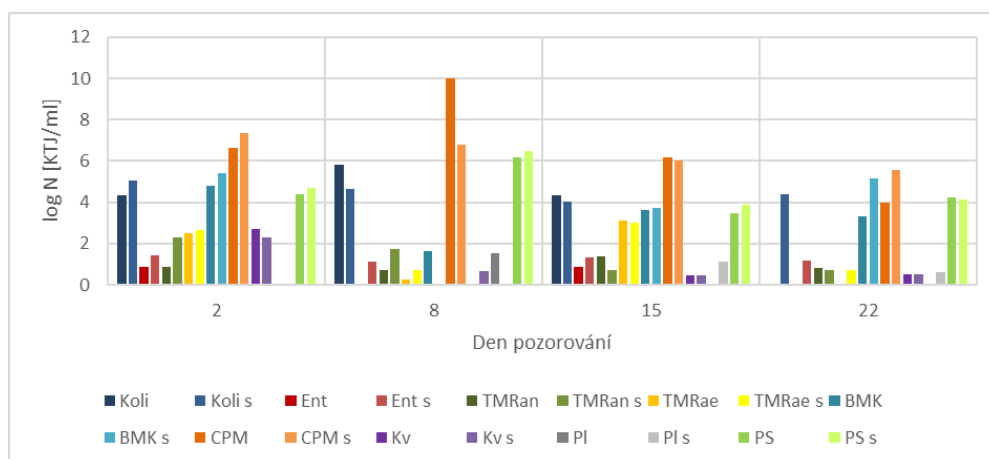
PI – plísně; syrovátka s přidavkem EO

PS – psychrotrofní mikroorganismy; syrovátka s přidavkem EO

Zkratka skupiny mikroorganismů s písmenem „s“ – sledovaná skupina mikroorganismů v kontrolním vzorku syrovátky

Potlačení růstu bylo zaznamenáno u celkového počtu mikroorganismů (CPM) a bakterií mléčného kysání (BMK), a to téměř po celou dobu pozorování. Rozdíl oproti kontrolnímu vzorku však nebyl statisticky průkazný.

Během druhého experimentu inhiboval EO skořice prokazatelně růst enterokoků (Ent) – po celé čtyři týdny se jejich počty pohybovaly až o polovinu logaritmického řádu níže než v kontrolním vzorku; viz Obr. 2, příloha 70.

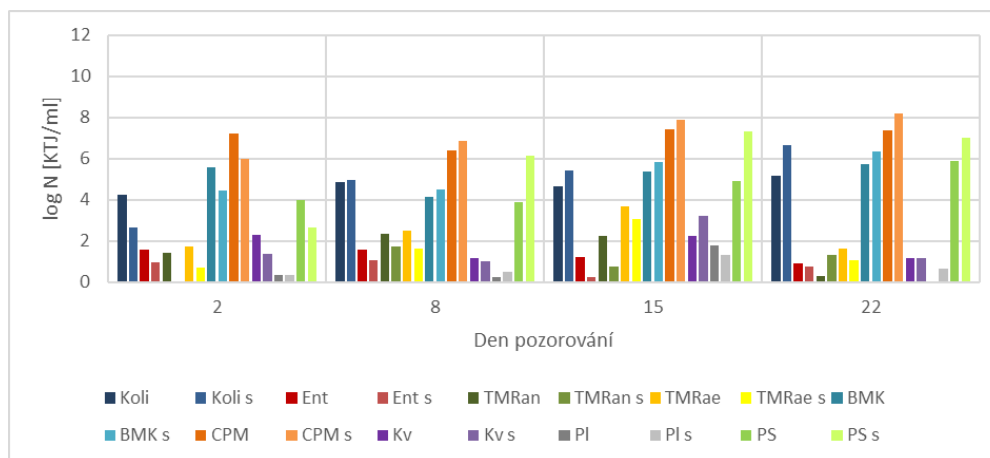


Obr. 2 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO skořice do syrovátky, II. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 1

Kromě enterokoků byl potlačen i růst termorezistentních anaerobních mikroorganismů (TMRan), BMK a PS, tyto rozdíly již ale nebyly statisticky průkazné a jednalo se spíše o krátkodobou inhibici.

Při třetím experimentu nebyl prokázán statistický rozdíl u žádné skupiny mikroorganismů (viz Obr. 3, příloha 71). Ke snížení počtu došlo u koliformních bakterií (Koli), BMK, CPM a PS.

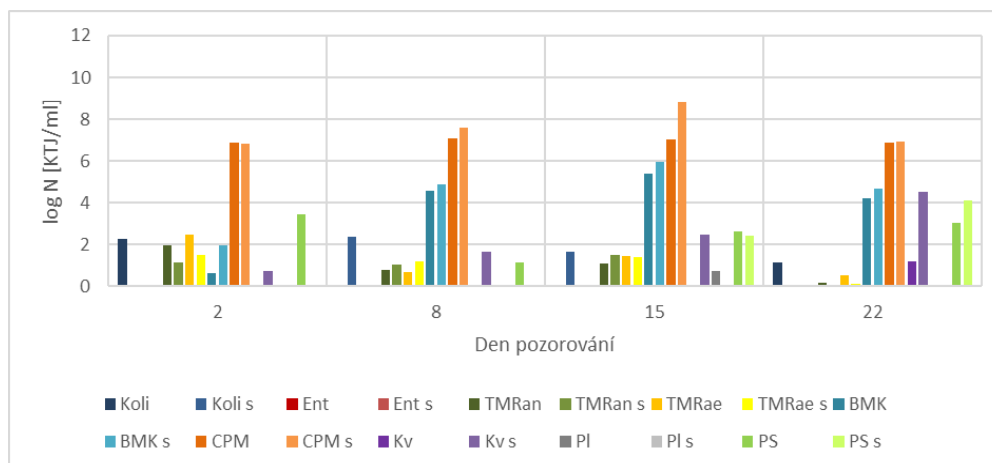


Obr. 3 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO skořice do syrovátky, III. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 1

U psychrotrofních mikroorganismů byl rozdíl mezi vzorky nejpatrnější, zvýšené množství bylo pozorováno pouze v prvním týdnu a následně kleslo až o dva logaritmičké řády pod úroveň kontrolního vzorku. U ostatních skupin mikroorganismů došlo naopak k jejich nárůstu.

Při druhé variantě pokusu, tedy ošetření syrovátky vodným výluhem skořice, došlo při prvním experimentu ke statisticky průkaznému zvýšení počtu koliformních bakterií (viz Obr. 4, příloha 93). Zvýšení bylo patrné především během prvního týdne měření. Rozdíl mezi vzorkem s obsahem výluhu a kontrolním vzorkem byl přibližně 2,2 logaritmičké řády.



Obr. 4 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu skořice do syrovátky, I. experiment

Vysvětlivky:

Koli – kolidformní bakterie; syrovátka s přidavkem vodného výluhu

Ent – enterokoky; syrovátka s přidavkem vodného výluhu

TMR an – termorezistentní mikroorganismy anaerobní; syrovátka s přidavkem vodného výluhu

TMR ae – termorezistentní mikroorganismy aerobní; syrovátka s přidavkem vodného výluhu

BMK – bakterie mléčného kysání; syrovátka s přidavkem vodného výluhu

CPM – celkový počet mikroorganismů; syrovátka s přidavkem vodného výluhu

Kv – kvasinky; syrovátka s přidavkem vodného výluhu

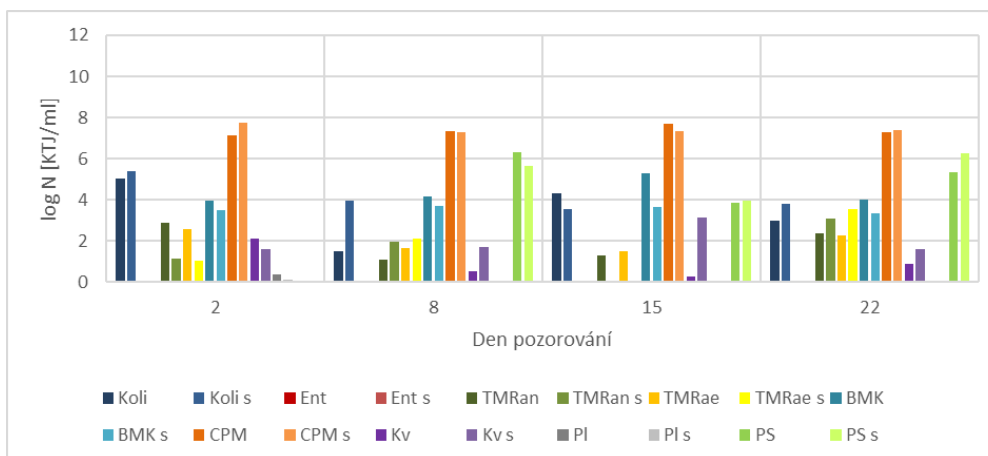
PI – plísňe; syrovátka s přidavkem vodného výluhu

PS – psychrotrofní mikroorganismy; syrovátka s přidavkem vodného výluhu

Zkratka skupiny mikroorganismů s písmenem „s“ – sledovaná skupina mikroorganismů v kontrolním vzorku syrovátky

K významnější inhibici došlo u bakterií mléčného kysání, kvasinek a celkového počtu mikroorganismů. Tyto změny v mikrobiálním růstu již ale nebyly statisticky průkazné. Celkový počet mikroorganismů ve vzorku s obsahem skořicového výluhu byl po celou dobu pozorování poměrně konstantní na rozdíl od kontrolního vzorku, u nějž došlo ve třetím týdnu k jejich výraznějšímu nárůstu. Počet bakterií mléčného kysání byl ve vzorku ošetřeném výluhem po celé čtyři týdny nejméně o 3 desetiny logaritmického řádu nižší než v kontrolním vzorku, u kvasinek o 1,7 až 3,3 logaritmického řádu.

Při druhém experimentu sledování antimikrobiálních účinků skořicového výluhu nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly v počtech mikroorganismů mezi vzorkem s obsahem výluhu a kontrolním vzorkem; viz Obr. 5, příloha 94.

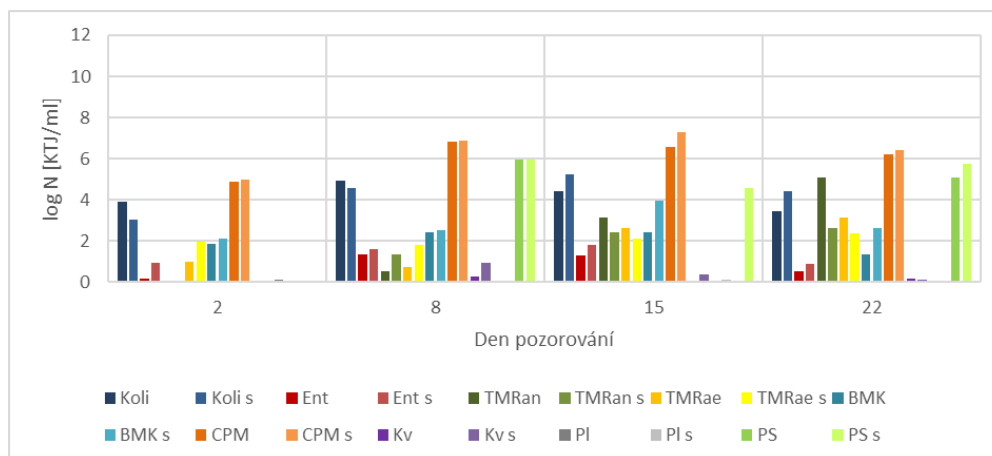


Obr. 5 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu skořice do syrovátky, II. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 4

S výjimkou bakterií mléčného kysání a plísní však došlo alespoň k mírnému potlačení růstu mikroorganismů. Nejvýraznější bylo snížení počtu kvasinek a koliformních bakterií. Růst kvasinek byl potlačen od druhého do čtvrtého týdne pozorování a oproti kontrolnímu vzorku byl snížen až o 2,8 logaritmického řádu. Počet koliformních bakterií byl sice také poměrně výrazně snížen, ale pouze krátkodobě – ve druhém týdnu bylo jejich množství téměř o 2,5 logaritmického řádu nižší ve vzorku s obsahem výluhu, ale ve třetím týdnu došlo k jejich nárůstu, čímž bylo dosaženo vyššího počtu než v kontrolním vzorku. Ostatní sledované mikroorganismy byly výluhem potlačeny pouze mírně a krátkodobě.

Ve třetím experimentu opět nedošlo ošetřením syrovátky vodným výluhem skořice ke statisticky prokazatelnému ovlivnění růstu sledovaných mikroorganismů (viz příloha 95). I přesto byly některé skupiny mikroorganismů inhibovány během celé doby pozorování (viz Obr. 6). Jedná se o CPM, BMK, enterokoky a psychrotrofní mikroorganismy.



Obr. 6 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu skořice do syrovátky, III. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 4

Počty koliformních bakterií a aerobních i anaerobních termorezistentních mikroorganismů byly nejprve oproti kontrolnímu vzorku nižší, ale mezi druhým a třetím týdnem došlo shodně k nárůstu a zvýšení jejich množství vůči kontrole. Částečně inhibován byl také růst kvasinek, a to během druhého a třetího týdne.

Řada studií referuje o působení esenciálních olejů nebo výluhů z rostlin proti různým mikroorganismům v mléce či mléčných výrobcích. Cava-Roda et al. (2012) testovali antibakteriální vlastnosti vanilinu a jeho směsi s esenciálními oleji hřebíčku a skořice proti *Listeria monocytogenes* Scott A a *Escherichia coli* O157:H7. Pokus byl proveden nejen v živném bujónu, ale také v polotučném mléce inkubovaném 7 až 14 dní při 7 °C. Kombinace vanilinu a esenciálního oleje skořice vykazovala synergistický efekt a v některých kombinacích příslušných koncentrací a doby inkubace byly zaznamenány vůči populaci *L. monocytogenes* a *E. coli* baktericidní účinky. Ve své předchozí studii Cava-Roda et al. (2007) uvádí, že při kultivaci výše zmíněných bakterií v polotučném mléce byly při různých podmínkách (7 °C po dobu 14 dní nebo 35 °C po dobu 24 hodin) zjištěny hodnoty MIC 500 ppm. Se zvyšující se koncentrací stoupal i inhibiční účinek EO a MBC byla dosažena při 3 000 ppm.

Ve vzorcích plnotučného a odstředěného mléka byl zjišťován vliv obsahu mléčného tuku na antimikrobiální účinky skořice. V mléce s vyšším obsahem tuku byly účinky EO sníženy. Možný synergistický efekt ošetření pomocí technologie pulzního elektrického pole a přidavku esenciálního oleje skořice vůči *Salmonella* Typhimurium

byl zkoumán v odstředěném mléce. Tyto dva zásahy byly testovány v různých vzájemných poměrech, přičemž bylo zjištěno jejich synergistické působení. Nejvyššího synergistického efektu bylo dosaženo při 10 kV/cm a koncentraci EO 5 % a nejvýraznější inaktivace bakterie při 30 kV/cm a koncentraci EO 5 % (Pina-Pérez et al., 2012).

Schopnost esenciálního oleje skořice potlačit růst *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve vzorcích mléka zaznamenali ve své studii Cui et al. (2016). Výsledky prokázaly významné inhibiční účinky EO – proti kontrolním skupinám vzorků bylo během 48 hodin sníženo množství *S. aureus* o 95,3-97,7 %. Koncentrace EO, která byla potřebná k inihbici *S. aureus* ve vzorcích mléka je vyšší než MIC v živném bujónu, což je zřejmě způsobeno snadno přístupnými živinami v mléce a ochranným působením tuku.

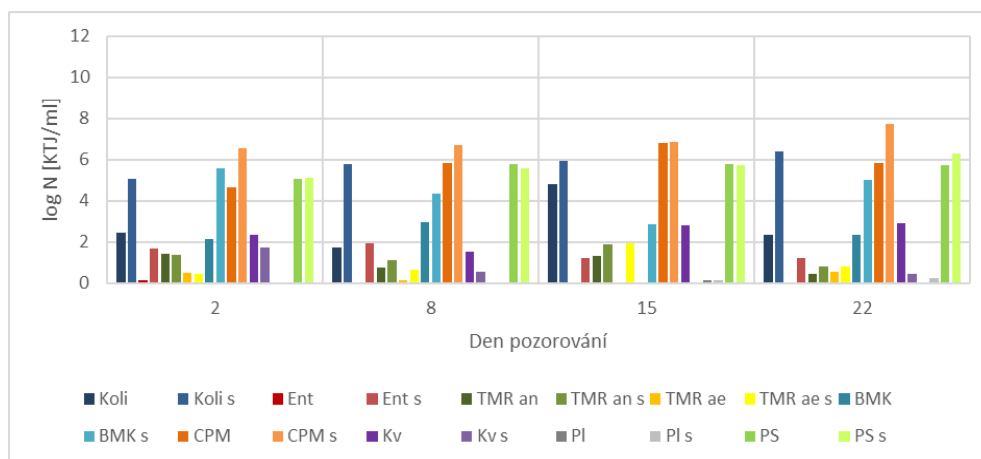
Moritz et al. (2012) zjistili inhibiční účinky EO skořice u *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 a termofilní jogurtové kultury, které byly zaočkovány do obnoveného odstředěného mléka s přidavkem 10 % cukru. Během experimentu nebyl zaznamenán růst bakterií, a to ani při nejnižší použité koncentraci, z čehož vyplývá, že MBC byla nižší než 0,025 %. Naproti tomu, jak uvádějí Guler et Seker (2009), přidavek esenciálního oleje skořice nevykázal inhibiční účinky proti *Bacillus cereus* v mléce skladovaném při 4 °C, ovšem významně snížil jeho počty při 25 °C. Se zvyšující se koncentrací EO (od 0,5 % do 1 %) se zvyšoval úměrně i antibakteriální vliv skořice, avšak pouze na začátku pozorování, s postupujícím časem se její účinek zmenšoval. Rovněž Pina-Pérez et al. (2009) testovali antimikrobiální působení EO a zjistili, že z testovaných esenciálních olejů dosáhl EO skořice nejlepších inhibičních účinků. Míchaný nápoj obsahující mléko a vejce byl záměrně inokulován *B. cereus*. Přidaný skořicový EO pak inhiboval jeho růst v průběhu skladování nápoje při 10 °C po dobu 15 dnů. V následující studii testovali Pina-Pérez et al. (2013) opět účinnost esenciálních olejů vůči *B. cereus*, v tomto případě již v různých koncentracích (1, 2,5 a 5 %). EO skořice se opět projevil jako silné antibakteriální činidlo s nejsilnějšími účinky v 5% koncentraci během skladování při 5 °C.

Také vodné výluhy skořice vykazují určité antimikrobiální účinky. U vodného výluhu skořice v koncentraci 10 % došlo v živném médiu k významné inhibici *Staphylococcus aureus* izolovaného z kravského mléka, ale v mléce tentýž efekt již pozorován nebyl. Antibakteriální vliv nebyl prokázán ani po přidavku výluhu do jogurtu

v koncentraci 0,3 % – během třídenního pozorování nedošlo k ovlivnění růstu *S. aureus*, jeho počty byly ve vzorku s přidavkem výluhu shodné se vzorkem kontrolním. Nulové účinky vodného výluhu skořice v mléce a jogurtu jsou přisuzovány pufrací kapacitě mléka, která neutralizuje kyselost výluhu, který tak pozbývá svých inhibičních účinků (Hammad, 2016). Shan et al. (2011) uvádí, že extrakt skořice byl účinný proti *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a *Salmonella enterica* při skladování za pokojové teploty. Choi et al. (2016) testovali antimikrobiální aktivitu methanolového a ethanolového extraktu skořice společně s účinky *Lactobacillus sakei* ALI033 v jogurtu skladovaném při 4 °C po dobu 28 dnů. Extrakty skořice a *L. sakei* potlačili během skladování růst mikroorganismů; v kontrolním vzorku dosahoval celkový počet mikroorganismů 4×10^9 KTJ/ml, ve vzorcích s obsahem extraktů skořice a *L. sakei* byl jejich obsah snížen shodně na úroveň 1×10^8 KTJ/ml. Vliv vodného výluhu skořice na bakterie mléčného kysání (*Lactobacillus* subsp. a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) v jogurtu zkoumali Shori et al. (2012). Sledování počtu mikroorganismů probíhalo po dobu 21 dnů, během nichž došlo pouze k mírnému ovlivnění růstu zmíněných bakterií – v obou případech k podpoře jejich růstu.

5.2.3.2 *Tymián obecný*

Dalším z testovaných esenciálních olejů byl esenciální olej tymiánu. V rámci první varianty během prvního experimentu statisticky průkazně snížil oproti kontrolnímu vzorku počty koliformních bakterií, enterokoků a bakterií mléčného kysání (viz Obr. 7, příloha 78). Nejvýrazněji byly potlačeny koliformní bakterie (kromě třetího týdne), rozdíl mezi kontrolním vzorkem a vzorkem s obsahem esenciálního oleje činil až čtyři logaritmické řády.

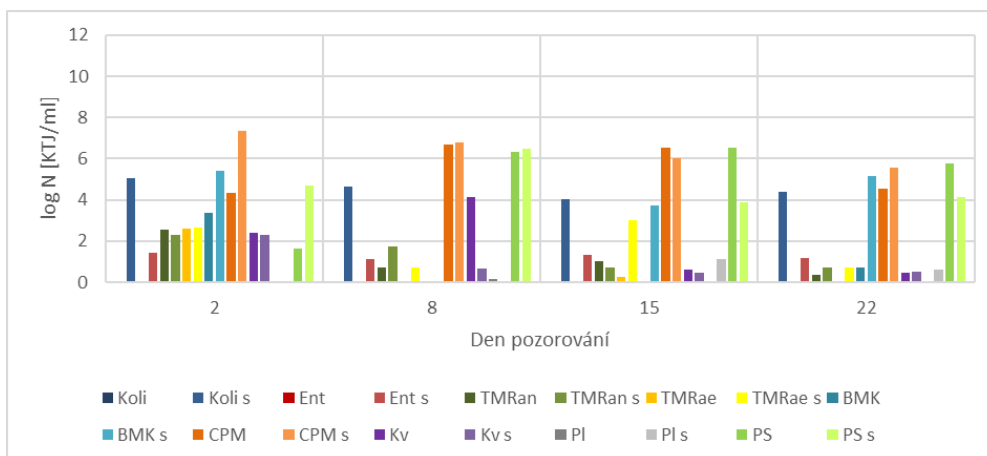


Obr. 7 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO tymiánu do syrovátky, I. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 1

U kvasinek byl naopak pomocí statistických analýz zjištěn průkazný nárůst jejich počtu. U ostatních sledovaných skupin mikroorganismů došlo k mírnému, již ne statisticky významnému, snížení jejich počtu.

Během druhého experimentu nebyl zjištěn mezi kontrolním vzorkem a vzorkem syrovátky s přidavkem EO u žádné skupiny mikroorganismů statisticky průkazný rozdíl (viz Obr. 8, příloha 79).

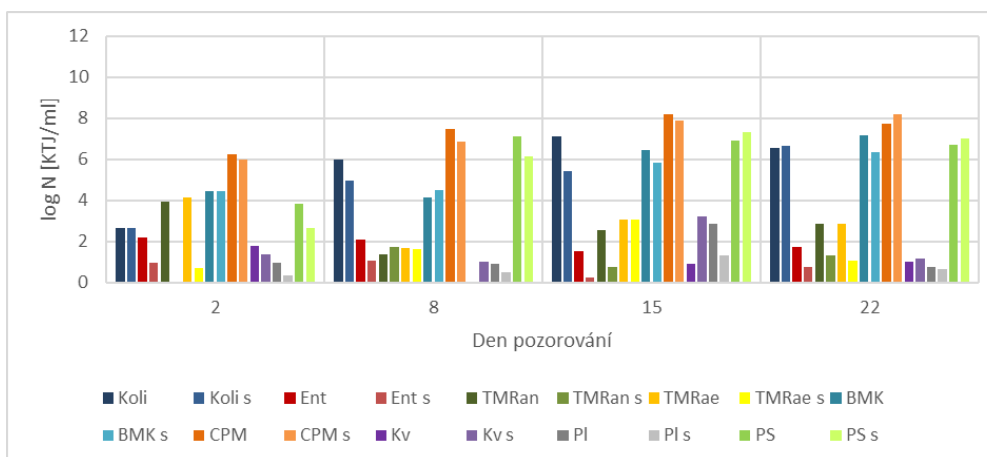


Obr. 8 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO tymiánu do syrovátky, II. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 1

Významně však bylo sníženo množství koliformních bakterií, a to v průběhu celého pozorování. Byl zaznamenán také rozdíl v počtech enterokoků, a to kolem jednoho logaritmičeského řádu; méně jich bylo přítomno v syrovátce ošetřené esenciálním olejem. S výjimkou kvasinek a psychrotrofních mikroorganismů došlo vlivem aplikovaného EO k mírnému potlačení růstu i u ostatních skupin mikroorganismů.

Při třetím experimentu byl zaznamenán statisticky prokazatelný nárůst enterokoků, u dalších skupin nebyly rozdíly mezi vzorky tak výrazné (viz Obr. 9, příloha 80).

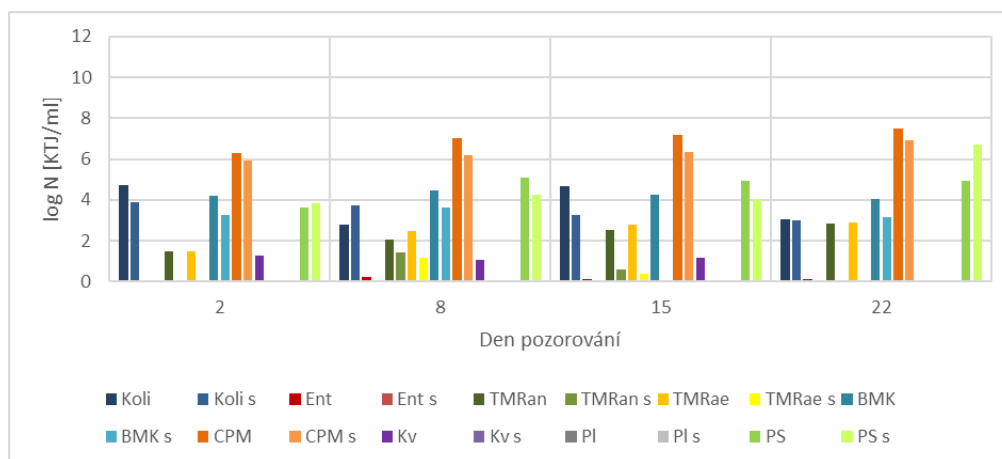


Obr. 9 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO tymiánu do syrovátky, III. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 1

S výjimkou kvasinek došlo u všech sledovaných skupin mikroorganismů během pozorování převážně ke zvýšení jejich počtu.

Po ošetření syrovátky vodným výluhem tymiánu byly při prvním experimentu statisticky prokázány rozdíly v zastoupení aerobních termorezistentních mikroorganismů, bakterií mléčného kysání a celkového počtu mikroorganismů (viz Obr. 10, příloha 90).

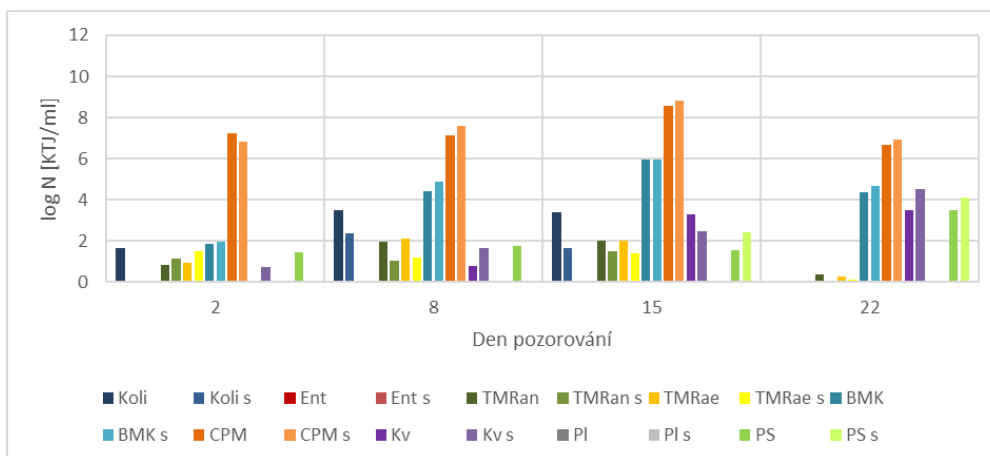


Obr. 10 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu tymiánu do syrovátky, I. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 4

Ve všech těchto případech šlo však o navýšení jejich množství oproti kontrolnímu vzorku. Nejvýraznější nárůst byl pozorován u termorezistentních aerobních mikroorganismů (TMRae), a to ve čtvrtém týdnu až o téměř 3 logaritmicke řády. Po celou dobu pozorování byly zvýšené také počty kvasinek, termorezistentních anaerobních mikroorganismů a enterokoků; v těchto případech již ale nebyly rozdíly mezi vzorky statisticky průkazné. Inhibovány byly částečně koliformní bakterie a psychrotrofní mikroorganismy. Šlo však pouze o inhibici krátkodobou.

Při druhém experimentu nebyl po přidavku výluhu tymiánu do syrovátky pozorován žádný statisticky prokazatelný vliv na růst mikroorganismů (viz Obr. 11, příloha 91). U většiny sledovaných skupin došlo ke zvýšení jejich množství, a to alespoň krátkodobě v rámci jednoho nebo dvou týdnů.

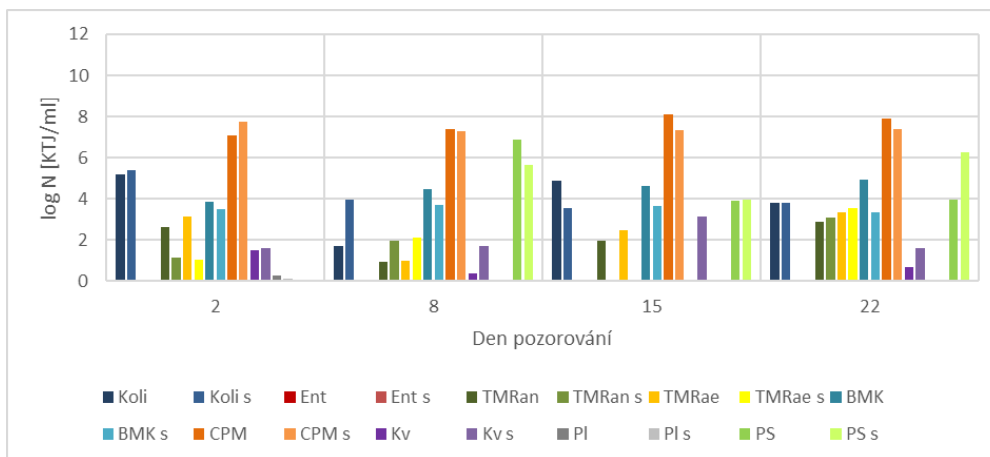


Obr. 11 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu tymiánu do syrovátky, II. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 4

Pouze velice mírně byl potlačen růst bakterií mléčného kysání a celkového počtu mikroorganismů – jednalo se o snížení jejich počtu přibližně o polovinu logaritmického řádu.

Ve třetím experimentu byly po přidavku vodného výluhu tymiánu zjištěny statistickou analýzou dva významné rozdíly v zastoupení mikroorganismů (viz Obr. 12, příloha 92).



Obr. 12 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu tymiánu do syrovátky, III. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 4

Jednalo se o trvalé zvýšení počtu bakterií mléčného kysání, které bylo nejvýraznější ve čtvrtém týdnu experimentu, kdy rozdíl dosahoval přibližně 1,5 logaritmického řádu; a naopak prokazatelně nižší byl v syrovátce s obsahem výluhu počet kvasinek. Růst kvasinek byl částečně potlačován po celou dobu pozorování. Největšího rozdílu bylo dosaženo ve třetím týdnu, a to více než 3 logaritmických řádů. U ostatních sledovaných skupin mikroorganismů došlo po přidavku výluhu spíše ke zvýšení jejich množství, i když přechodnému.

O účincích esenciálního oleje tymiánu na mikroorganismy referují mnohé studie. Gutierrez et al. (2009) sledovali antimikrobiální účinky esenciálního oleje tymiánu vůči *Listeria monocytogenes* a *Pseudomonas fluorescens* ve směsi sušeného odstředěného mléka s živným médiem. Hodnoty MIC dosáhly ve vzorku na bázi mléka až desetinásobných hodnot ve srovnání s kontrolním vzorkem (zaočkované živné médium). K působení EO byla citlivější *L. monocytogenes*, zjištěná hodnota MIC byla 3000 ppm, u *P. fluorescens* dosáhla 20 000 ppm.

Vliv na celkový počet mikroorganismů ve velbloudím mléce ošetřeném přidavkem esenciálního oleje tymiánu v koncentraci 0,03, 0,06 a 0,09 ml/l sledovali Maaroufi et al. (2015). Během pětidenního skladování při teplotě 4 °C došlo k významnému čtyřnásobnému snížení CPM oproti kontrolnímu vzorku. Selim (2011) zjišťoval antibakteriální vliv esenciálního oleje tymiánu na vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE) a *Escherichia coli* O157:H7 v sýru feta po dobu skladování 14 dní při teplotě 7 °C. EO tymiánu byl použit v koncentraci 0,5 a 1 %. VRE i *E. coli* byly tymiánem výrazně inhibovány po celou dobu pozorování, v případě přidavku 1% EO tymiánu došlo shodně po 7 dnech k eliminaci VRE i *E. coli*. Při posledním stanovení bakterií byl rozdíl mezi kontrolním vzorkem a vzorkem s EO až 10⁸ KTJ/g.

Podobně i Govaris et al. (2011) sledovali vývoj populace *E. coli* O157:H7 a *Listeria monocytogenes* v sýru feta během 36 dní po ošetření sýru EO tymiánu a skladování při 4 °C v modifikované atmosféře s obsahem dusíku (50 %) a oxidu uhličitého (50 %). Jak ve vzorku ošetřeném EO, tak i ve vzorku kontrolním se počty bakterií postupně snižovaly, ve vzorcích s obsahem EO ustal jejich růst shodně o 10 dní dříve (u *E. coli* ve 24. dnu, u *L. monocytogenes* ve 20. dnu). V sýru feta byl také testován vliv esenciálního oleje tymiánu na *Staphylococcus aureus*. Po 168 hodinách došlo k redukci množství *S. aureus* o 2 a 4 logaritmické řády při koncentraci EO 0,1 a 0,2 % (Bonyadian et Moshtaghi, 2007).

Antibakteriální účinky tymiánu byly potvrzeny i v labnehu, který byl ošetřen třemi různými koncentracemi EO (0,2, 0,5 a 1 ppm). Jako účinná se ukázala být již koncentrace 0,2 ppm, kdy došlo k silnému potlačení růstu kvasinek, plísní, koliformních a sporulujících bakterií. Naopak celkový počet mikroorganismů a množství *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* v ošetřeném labnehu během skladování (po dobu 21 dní při 5 °C) vzrostlo (Otaibi et al., 2008).

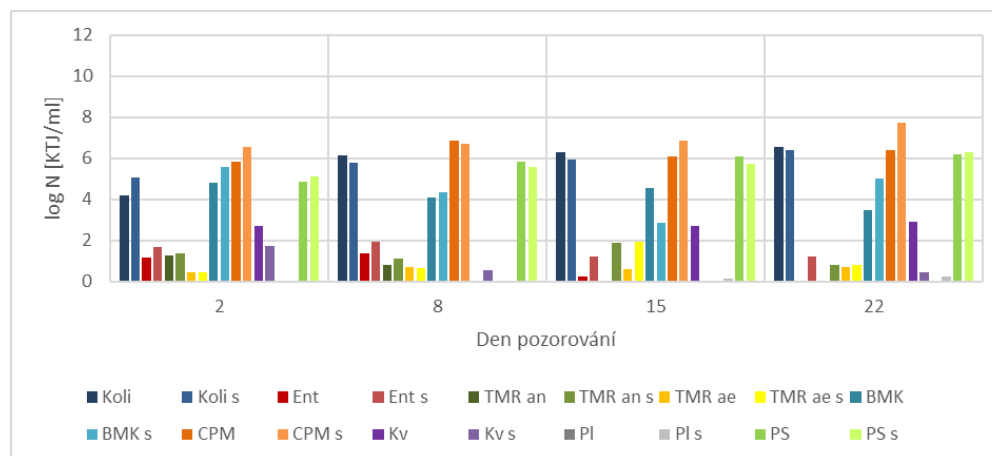
Posouzení možnosti prodloužit trvanlivost čerstvého sýru Fior di Latte přidavkem esenciálního oleje tymiánu je uvedeno ve studii Gammariello et al. (2008). Kontrolní vzorky a vzorky ošetřené EO byly skladovány 6 dní při teplotě 10 °C. Antimikrobiální účinky byly zjišťovány vůči *Pseudomonas* sp., koliformním bakteriím, bakteriím mléčného kysání a kvasinkám. Nejlépe byl EO schopen potlačit růst *Pseudomonas* sp. a pouze mírně inhiboval koliformní bakterie; proti bakteriím mléčného kysání a kvasinkám žádný účinek pozorován nebyl.

Esenciální olej a vodný extrakt tymiánu testovali Librán et al. (2013) proti *E. coli* CECT 4201 a *Clostridium tyrobutyricum* CETC 4011, a to v obnoveném odstředěném sušeném mléce. Esenciální olej byl použit v koncentraci 0,02-200 µl/ml, vodný extrakt v koncentraci 20-1000 µl/ml. Schopnost potlačit růst *E. coli* vykázal pouze esenciální olej tymiánu, u vodného extraktu vliv na růst bakterie prokázán nebyl. Růst *C. perfringens* nebyl schopen inhibovat ani vodný extrakt, ani esenciální olej. Nikjooy et Hashemi (2015) použili vodný extrakt tymiánu pro sledování jeho vlivu na *Lactobacillus casei* v jogurtu během skladování po dobu 21 dnů při teplotě 4 °C. V průběhu sledování došlo k významnému nárůstu *L. casei*, a to do 14. dne pozorování a dále následoval mírný pokles množství stanovované bakterie.

Hailemariam et Emire (2013) prokázali antimikrobiální účinnost ethanolového extraktu tymiánu, který použili pro ošetření másla, a to v koncentraci 0,1 a 0,2 %. Po třech týdnech skladování při 4 °C bylo zjištěno, že obě koncentrace extraktu statisticky průkazně potlačily růst aerobních mikroorganismů, přičemž při použití vyšší koncentrace byla jejich inhibice významnější.

5.2.3.3 *Levandule úzkolistá*

Při první variantě pokusu, tedy sledování antimikrobiálních účinků esenciálního oleje levandule na mikroorganismy přítomné v syrovátce bylo v prvním experimentu zjištěno, že přidavek tohoto EO statisticky průkazně ovlivnil růst kvasinek (viz příloha 75); došlo zde ovšem k jejich významnému nárůstu oproti kontrolnímu vzorku (viz Obr. 13).

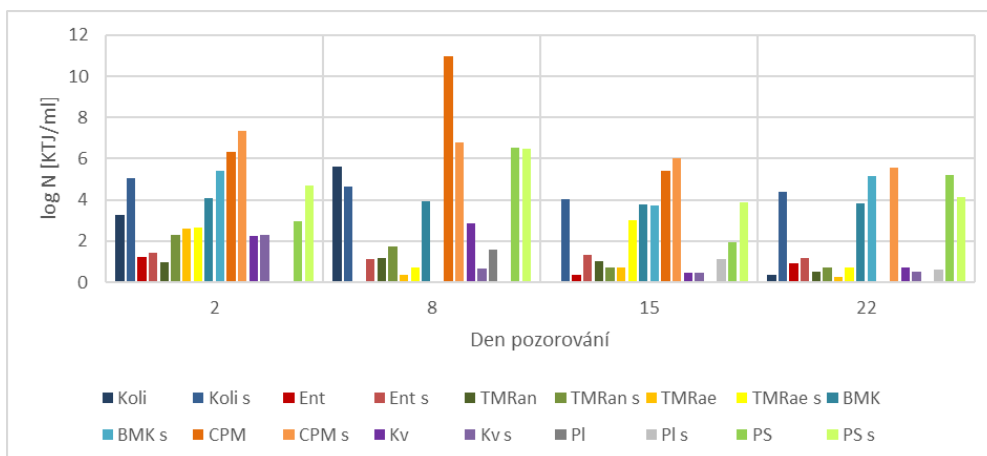


Obr. 13 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO levandule do syrovátky, I. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 1

Vyšších počtů dosáhly v ošetřené syrovátce také psychrotrofní mikroorganismy, ale v tomto případě byl jejich nárůst velmi mírný. U ostatních sledovaných skupin mikroorganismů bylo zaznamenáno snížení jejich počtu.

Při druhém experimentu již rozdíl v počtech sledovaných mikroorganismů statisticky zjištěn nebyl (viz Obr. 14, příloha 76).

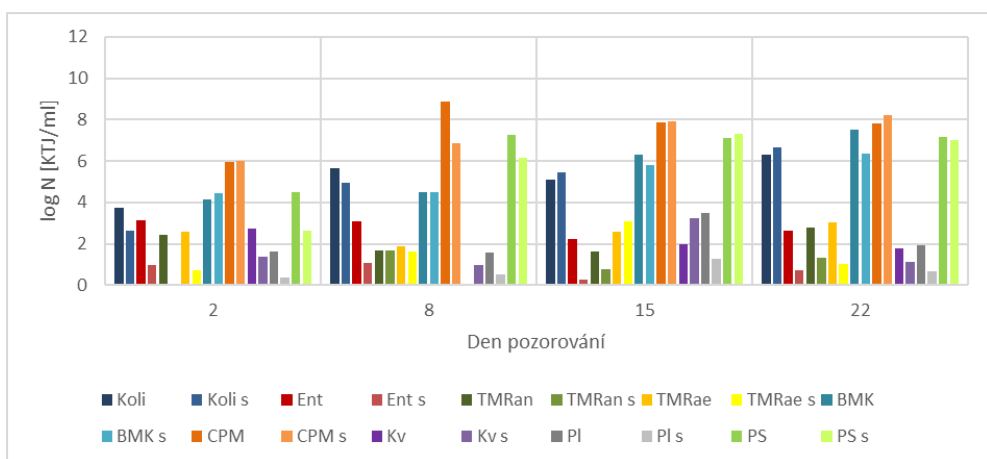


Obr. 14 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO levandule do syrovátky, II. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 1

Během 4 týdnů výrazně kolísalo množství celkového počtu mikroorganismů; k jejich nápadnému nárůstu došlo ve druhém týdnu, poté jejich počty klesaly, a ve čtvrtém týdnu nebyly detekovány. Naproti tomu v kontrolním vzorku se jejich množství postupně snižovalo. Mírně vzrostlo množství kvasinek ve vzorku s přidavkem esenciálního oleje, u ostatních sledovaných skupin bylo množství mikroorganismů přidavkem EO sníženo.

Během třetího experimentu došlo ke statisticky průkaznému ovlivnění růstu u enterokoků a plísni (viz Obr. 15, příloha 77).

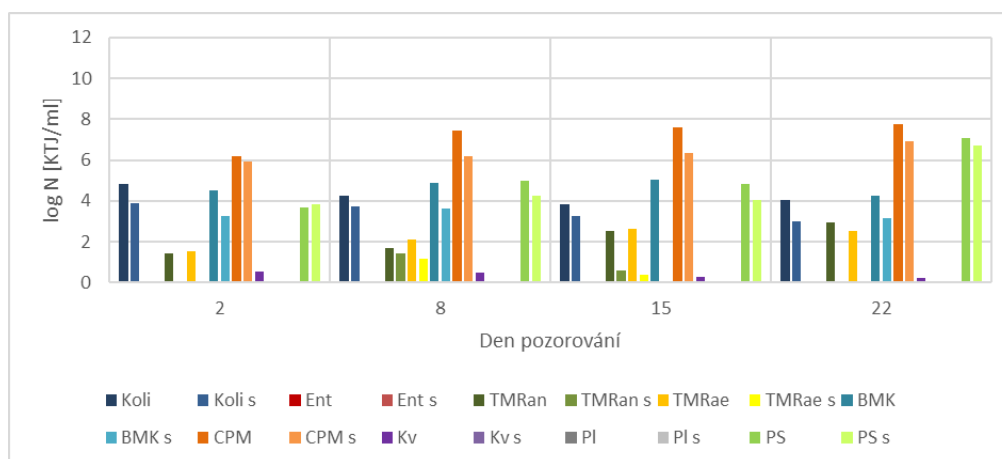


Obr. 15 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO levandule do syrovátky, III. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 1

V obou případech byly jejich počty vyšší ve vzorku s obsahem esenciálního oleje. K navýšení počtu, ne však již statisticky průkaznému, došlo i u ostatních sledovaných skupin mikroorganismů.

Při prvním experimentu ošetření syrovátky vodným výluhem levandule došlo k výraznému a statisticky průkaznému zvýšení počtu u téměř všech sledovaných skupin mikroorganismů – koliformních bakterií, bakterií mléčného kysání, aerobních i anaerobních termorezistentních mikroorganismů a celkového počtu mikroorganismů (viz Obr. 16, příloha 87).

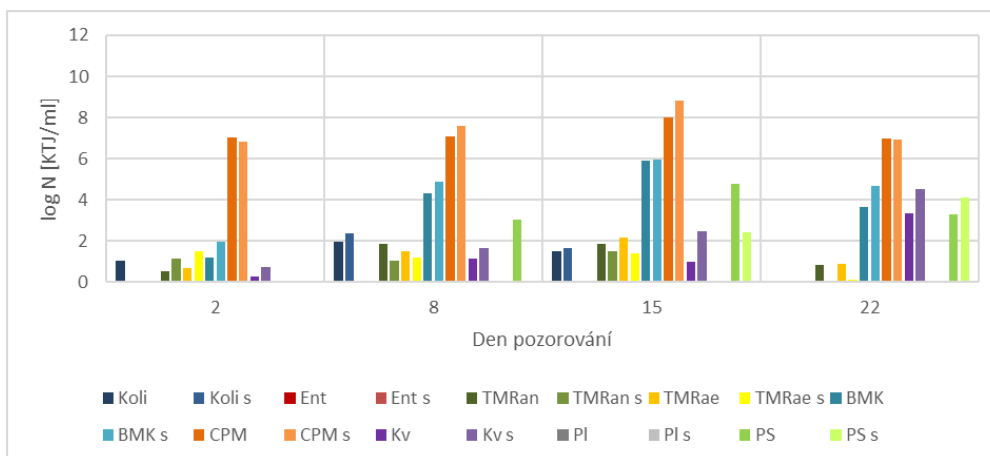


Obr. 16 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu levandule do syrovátky, I. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 4

Z výše uvedených skupin mikroorganismů byl zaznamenán nejvýraznější nárůst v případě BMK (o více než 5 logaritických řádů) a obou skupin termorezistentních mikroorganismů (o více než 2,5 logaritického řádu). Růst počtu mikroorganismů byl zaznamenán i u psychrotrofních mikroorganismů, ale zde se jednalo o mírnější, statisticky neprůkazné změny. Růst enterokoků a plísní nebyl ve vzorcích detekován.

Během druhého experimentu bylo po přidavku levandulového výluhu zjištěno částečné potlačení růstu CPM, bakterií mléčného kysání a kvasinek, které bylo u všech zmíněných skupin v podstatě trvalé, nebylo však statisticky průkazné (viz Obr. 17, příloha 88).

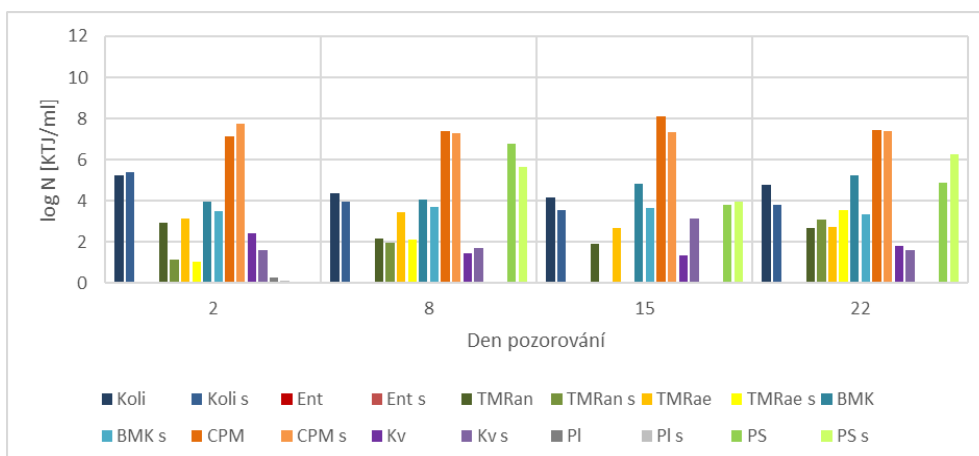


Obr. 17 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu levandule do syrovátky, II. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 4

U dalších skupin mikroorganismů došlo k mírnému, statisticky neprůkaznému, zvýšení počtu. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán u psychrotrofních mikroorganismů, a to až o 3 logaritmické řády.

Při třetím experimentu byl zaznamenán statisticky prokazatelný rozdíl při stanovení bakterií mléčného kysání – oproti kontrolnímu vzorku došlo k jejich nárůstu v průběhu celých čtyř týdnů (viz Obr. 18, příloha 89).



Obr. 18 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu levandule do syrovátky, III. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 4

K výraznému navýšení množství došlo také u aerobních i anaerobních termorezistentních mikroorganismů, ale rozdíl oproti kontrolnímu vzorku již nebyl statisticky průkazný, stejně jako u ostatních sledovaných skupin mikroorganismů. K významnější inhibici a snížení počtu mikroorganismů došlo pouze u kvasinek, a to ve druhém a třetím týdnu pozorování (o více než 1,5 logaritmického řádu).

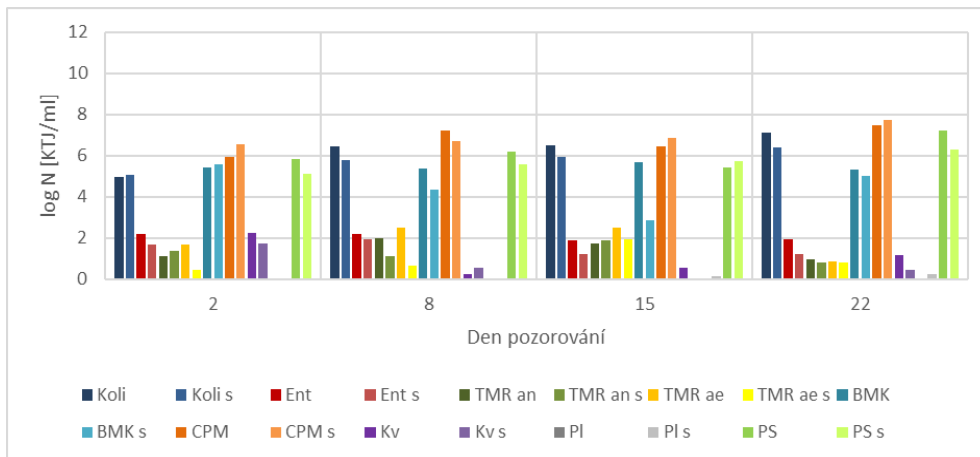
Také levandule byla předmětem zkoumání v řadě studií. Librán et al. (2013) testovali v obnoveném odtučněném mléce antibakteriální účinnost vodných extraktů a esenciálních olejů dvou druhů levandule (*Lavandula angustifolia* Mill. a *L. hybrida* Reverchon) vůči *Clostridium tyrobutyricum* a *E. coli*. Pomocí rostoucích stupnic koncentrací (pro esenciální oleje 0,2 až 200 $\mu\text{l/ml}$, pro vodné extrakty 20 až 1000 $\mu\text{l/ml}$) zjistili, že ze zkoumaných esenciálních olejů byly pouze EO levandule (obou druhů) schopny inhibovat růst jak *E. coli*, tak i *C. tyrobutyricum* (v případě *E. coli* byla potřeba vyšší koncentrace). *C. tyrobutyricum* bylo inhibováno i vodným extraktem *L. angustifolia* Mill., avšak až při výrazně vyšší koncentraci než při použití esenciálního oleje.

Antimikrobiální účinky esenciálního oleje *L. angustifolia* Mill. byly posouzeny také při ošetření podmáslí (Momtaz et al., 2011 in Ali Sahari et Asgari, 2013). Při různých koncentracích EO (0,2, 0,25 a 0,15 %) byl sledován vývoj *Staphylococcus aureus*, *E. coli* a koliformních bakterií, kvasinek a plísní, a to během šedesáti dnů skladování. Při porovnání s kontrolním vzorkem bylo zjištěno, že přídavek EO úspěšně potlačil růst všech sledovaných skupin mikroorganismů.

Ghalem et Zaoui (2013) sledovali mikrobiologickou kvalitu tradičního alžírského mléčného výrobku, který je získán zakysáním pasterované a homogenizované směsi pasterovaného mléka, sušeného mléka a cukru a následným zahřátím na 45 °C s výdrží 2 až 3 hodiny. Před konečným záhřevem byl ke směsi přidán esenciální olej levandule (*Lavandula* sp.) v různých koncentracích (0,14, 0,21, 0,29 a 0,39 g/l). Ve druhém, sedmém a dvacátém dnu skladování byl sledován vývoj počtu koliformních bakterií, *S. aureus*, *Salmonella* sp., kvasinek a plísní. Autoři studie uvádí, že EO levandule v koncentraci 0,29 a 0,39 g/l úspěšně potlačil růst všech sledovaných mikroorganismů; v nižších koncentracích nedošlo k inhibici pouze u koliformních bakterií.

5.2.3.4 Fenykl obecný

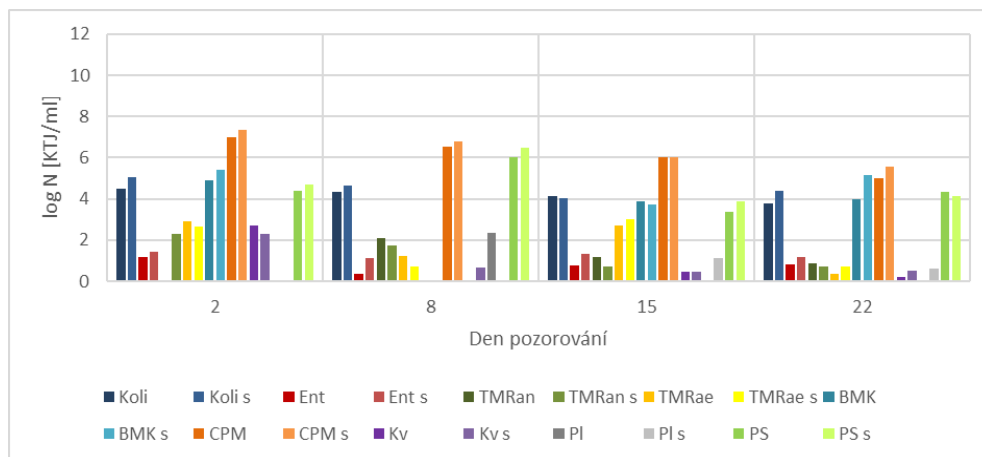
Ve vzorku syrovátky došlo po prvním experimentu ošetření esenciálním olejem fenyklu ke statisticky průkaznému zvýšení počtu enterokoků a také u dalších sledovaných skupin mikroorganismů byl oproti kontrolnímu vzorku zaznamenán jejich nárůst, který však nebyl tak výrazný a statisticky průkazný (viz Obr. 19, příloha 72). Velmi mírný pokles růstu byl pozorován pouze u CPM.



Obr. 19 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO fenyklu do syrovátky, I. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 1

Při druhém experimentu byl taktéž zaznamenán statisticky významný rozdíl v počtech enterokoků ve vzorku kontrolním a ošetřeném esenciálním olejem fenyklu (viz Obr. 20, příloha 73). V tomto případě však došlo k potlačení jejich růstu během celého pozorování.

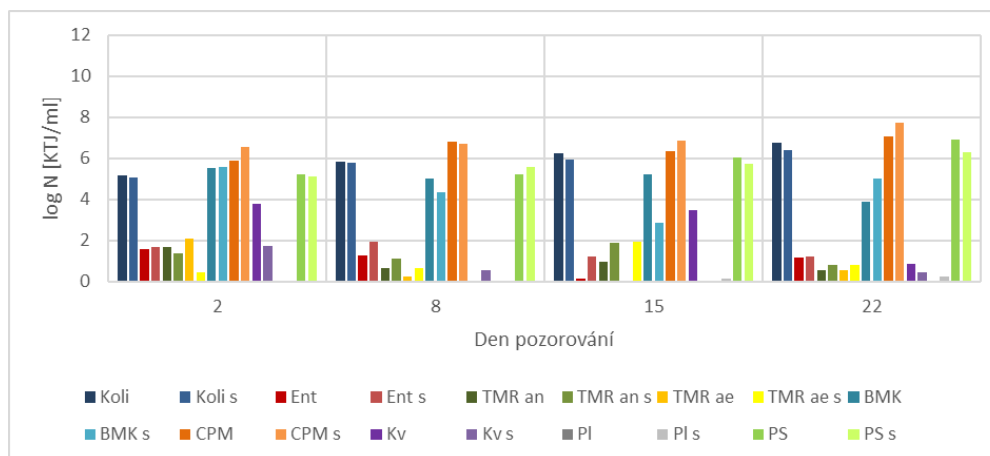


Obr. 20 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO fenyklu do syrovátky, II. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 1

Podobně, pouze méně výrazně, byl snížen celkový počet mikroorganismů, kromě třetího týdne i koliformní bakterie a psychrotrofní mikroorganismy, jejichž počet se zvýšil až ve čtvrtém týdnu. O více než jeden logaritmický řád byl snížen počet bakterií mléčného kysání, avšak pouze ve čtvrtém týdnu. Zvýšeno bylo oproti kontrolnímu vzorku množství plísní, a to ve druhém týdnu, kde byl jejich počet navýšen o více než 2 logaritmické řády; při analýze ve třetím týdnu již jejich počet klesl pod úroveň plísní v kontrolním vzorku (rozdíl více než jednoho logaritmického řádu).

Během třetího experimentu již statistickou analýzou nebyly zjištěny významné rozdíly oproti kontrolnímu vzorku (viz Obr. 21, příloha 74).

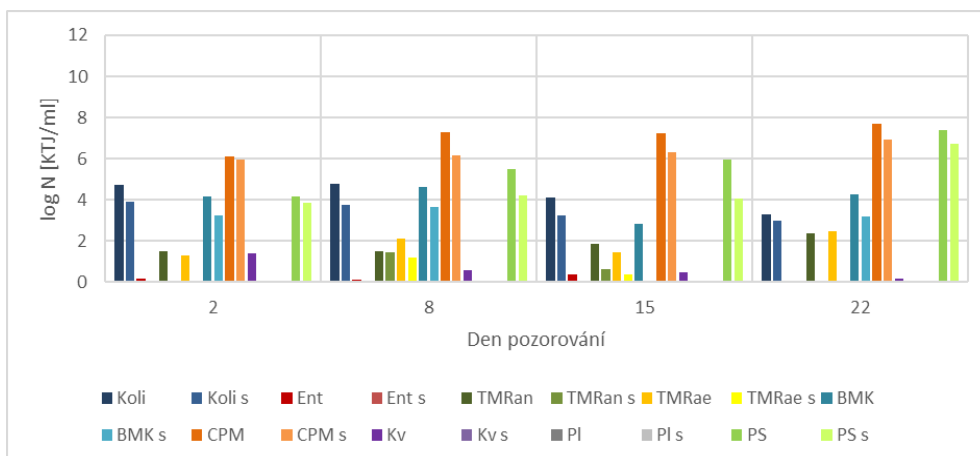


Obr. 21 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO fenyklu do syrovátky, III. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 1

V průběhu skladování došlo během druhého a třetího týdne k navýšení počtu bakterií mléčného kysání, v prvním a třetím týdnu k nárůstu kvasinek a mírnému zvýšení počtu koliformních bakterií a psychrotrofních mikroorganismů. Naopak byly poměrně významně sníženy počty enterokoků, které byly inhibovány během celé doby skladování, inhibovány byly dlouhodoběji i termorezistentní mikroorganismy, plísně a celkový počet mikroorganismů.

V prvním experimentu po přidavku vodného výluhu fenyklu nebylo statisticky zaznamenáno ovlivnění růstu mikroorganismů (viz Obr. 22, příloha 84). U všech sledovaných skupin (s výjimkou plísni, které nebyly ani v jednom ze vzorků zjištěny) došlo k trvalému zvýšení počtu mikroorganismů ve vzorku s přidavkem výluhu oproti kontrolnímu vzorku.

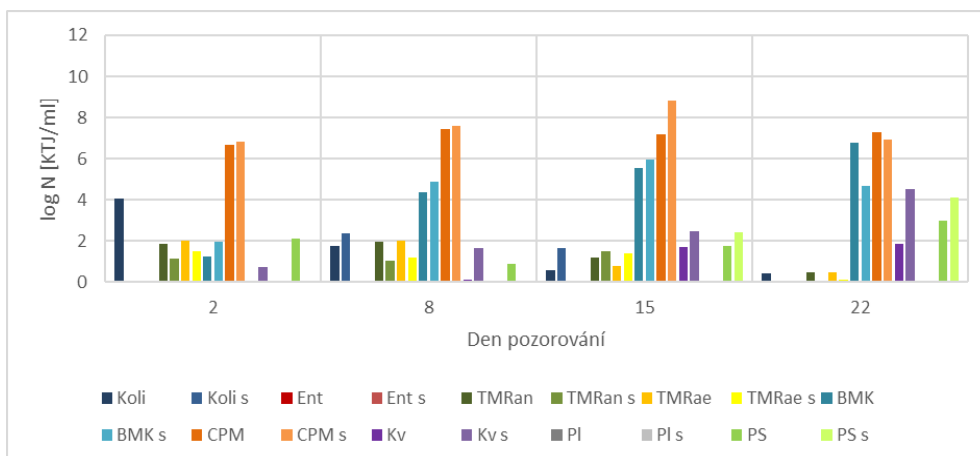


Obr. 22 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu fenyklu do syrovátky, I. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 4

Rozdíly v zastoupení jednotlivých skupin mikroorganismů mezi vzorky byly v některých případech pouze mírné, avšak například u bakterií mléčného kysání dosáhl rozdíl v třetím týdnu 2,8 logaritmickeho řádu. Významněji se lišily i počty termorezistentních (aerobních i anaerobních) a psychrotrofních mikroorganismů.

Po přidavku vodného výluhu při druhém experimentu opět nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl mezi syrovátkou s přidavkem výluhu a kontrolním vzorkem (viz Obr. 23, příloha 85). K trvalému snížení počtu mikroorganismů došlo pouze v případě kvasinek.

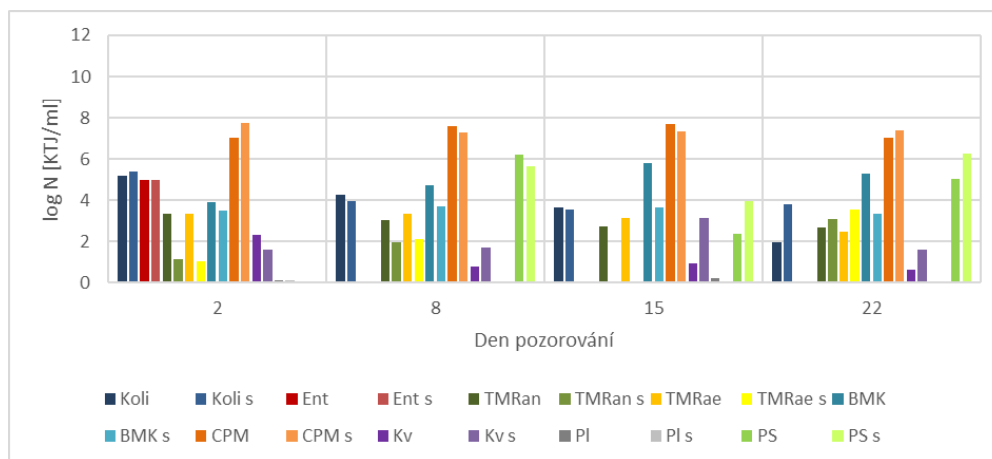


Obr. 23 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu fenyklu do syrovátky, II. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 4

Po dobu tří týdnů byl částečně potlačen také růst bakterií mléčného kysání, ve čtvrtém týdnu bylo ale jejich množství v syrovátce s přidavkem výluhu již o více než dva logaritmické řády vyšší než v kontrolním vzorku. U ostatních sledovaných skupin mikroorganismů došlo během pokusu ke střídavému nárůstu a částečnému potlačení.

Při třetím experimentu bylo po ošetření syrovátky výluhem fenyklu zjištěno statisticky průkazné navýšení počtu anaerobních termorezistentních mikroorganismů a bakterií mléčného kysání (viz Obr. 24, příloha 86).



Obr. 24 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu fenyklu do syrovátky, III. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 4

V případě bakterií mléčného kysání byl nárůst oproti kontrolnímu vzorku pozorován po celé čtyři týdny; množství anaerobních termorezistentních mikroorganismů bylo do třetího týdne vyšší až o 2,7 logaritmického řádu, avšak ve čtvrtém týdnu došlo k jejich významnému nárůstu v kontrolním vzorku. Díky tomuto navýšení byl přesažen počet TMRan ve vzorku s výluhem. K obdobné situaci došlo u termorezistentních aerobních mikroorganismů, zde však již změny v růstu nebyly statisticky průkazné, stejně jako u ostatních sledovaných skupin mikroorganismů. K významnějšímu potlačení růstu, i když pouze částečnému, došlo u psychrotrofních mikroorganismů, koliformních bakterií a zejména u kvasinek – jejich množství bylo přidavkem výluhu sníženo během druhého až čtvrtého týdne, a to až o více než dva logaritmické řády.

Caleja et al. (2015) sledovali kvalitu sýru cottage po přidavku vodného extraktu fenyklu v množství 0,35 mg/ml, a to v průběhu 14 dnů při teplotě skladování 4 °C. Přímou v sýru však sledovali pouze vliv fenyklu na barvu a nutriční vlastnosti a také jeho

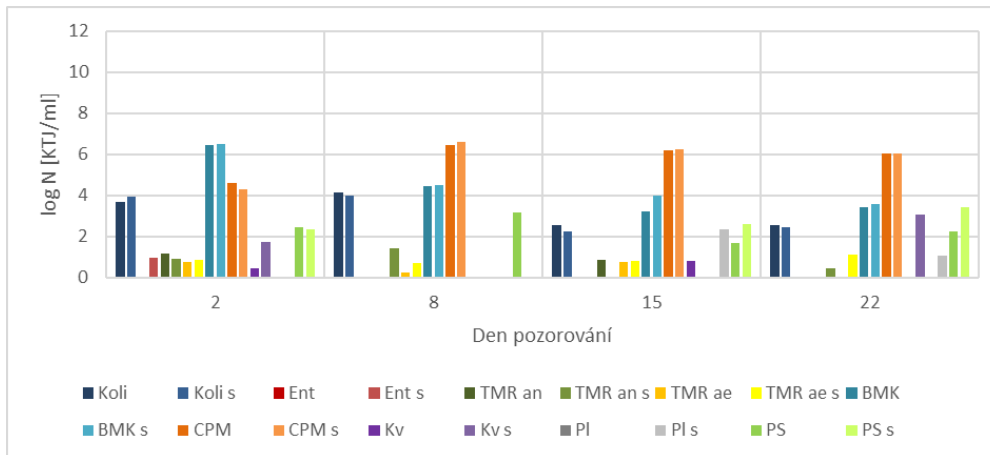
antioxidační účinky. Mikrobiologické analýzy byly provedeny in vitro zjištěním MIC, a to vůči *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus*, *Listeria monocytogenes*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma viridae*. Antimikrobiální vlastnosti fenyklu byly prokázány vůči všem testovaným mikroorganismům; jako nejcitlivější se k jeho působení jevíly *S. Typhimurium* a *B. cereus*, naopak nejméně byly inhibovány *Aspergillus* sp. a *Penicillium* sp.

Ayana et El Deen (2011) zjišťovali vliv esenciálního oleje fenyklu na vlastnosti sýru Labneh. Esenciální olej byl přidán do kozího mléka před jeho zaočkováním, a to v množství 1 ml/l. Vzorky sýru byly následně uchovávány při teplotě 6-8 °C po dobu 30 dnů, během níž byly opakovaně analyzovány. Sledován byl celkový počet mikroorganismů, sporulující mikroorganismy, koliformní bakterie, psychrotrofní mikroorganismy, kvasinky, plísňe, *Staphylococcus* sp., *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* a *Streptococcus thermophilus*. Pozitivně byly přidavkem účinných látek fenyklu ovlivněny *B. bifidum*, *L. acidophilus* a *S. thermophilus*, jejichž počet byl ve vzorku s obsahem EO oproti kontrolnímu vzorku během celé doby skladování vyšší. Naopak mírně snížen byl celkový počet mikroorganismů a potlačen byl také růst kvasinek a plísni. Vliv EO na sporulující mikroorganismy nebyl prokázán, ostatní skupiny mikroorganismů nebyly během skladování ve vzorcích detekovány.

Přídavkem fenyklového medu v různých koncentracích (5, 10 a 15 %) do buvolího bio jogurtu se zabývali Bakr et al. (2015). Vzorky jogurtu byly uchovávány po dobu 14 dnů při teplotě 6 °C. Během skladování byly provedeny mikrobiologické analýzy, při kterých byl stanoven celkový počet mikroorganismů, množství *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, kvasinek a plísni. U všech uvedených mikroorganismů došlo během skladování k postupnému nárůstu, což se znatelněji projevilo u nižších koncentrací; pouze při koncentraci fenyklového medu 15 % bylo množství mikroorganismů oproti kontrolnímu vzorku sníženo.

5.2.3.5 Anýz vonný

V prvním experimentu nebyl po přidavku EO anýzu u sledovaných skupin mikroorganismů zjištěn statisticky průkazný rozdíl v jejich počtech (viz příloha 66). U některých skupin došlo k mírnému nárůstu, a to například u koliformních bakterií nebo celkového počtu mikroorganismů (viz Obr. 25).

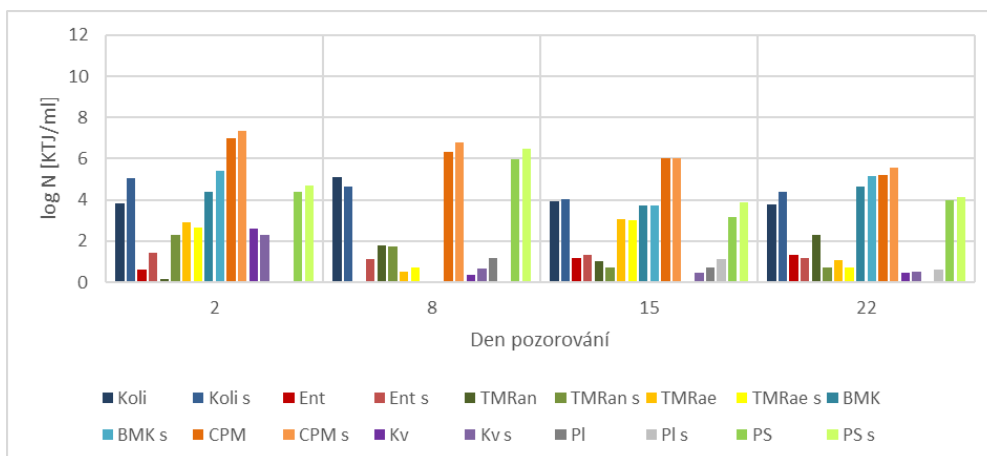


Obr. 25 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO anýzu do syrovátky, I. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 1

Ani v jednom z případů nebylo množství zmíněných mikroorganismů zvýšené po celou dobu pozorování. Částečně (během třetího a čtvrtého týdne) bylo zaznamenáno snížení množství psychrotrofních mikroorganismů.

Při druhém experimentu – ošetření syrovátky EO anýzu taktéž nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly v rozvoji mikroorganismů (viz Obr. 26, příloha 67).

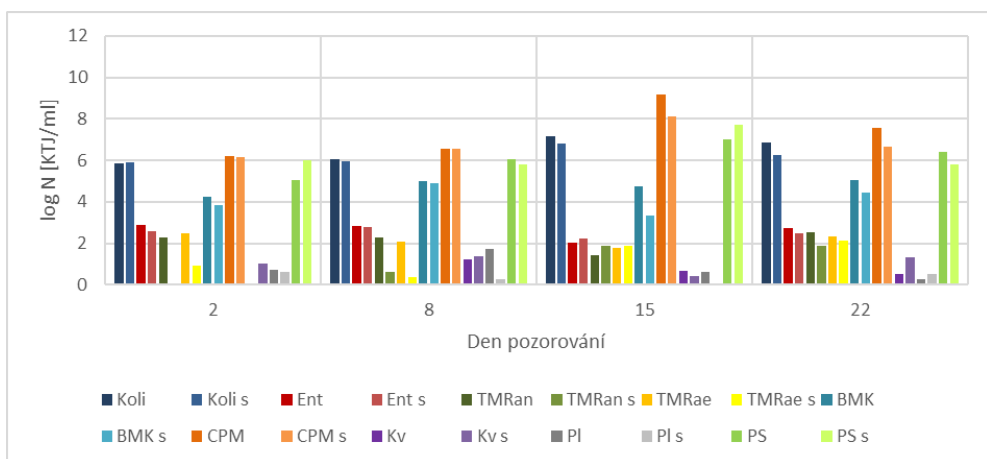


Obr. 26 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO anýzu do syrovátky, II. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 1

S výjimkou kvasinek a TMRan byly však v průměru alespoň mírně potlačeny všechny sledované skupiny mikroorganismů. Nejvíce patrné bylo snížení počtu bakterií mléčného kysání a celkového počtu mikroorganismů.

Ani při třetím experimentu nebyl po přidavku esenciálního oleje anýzu pomocí statistické analýzy prokázán významný rozdíl v počtech sledovaných skupin mikroorganismů (viz příloha 68).

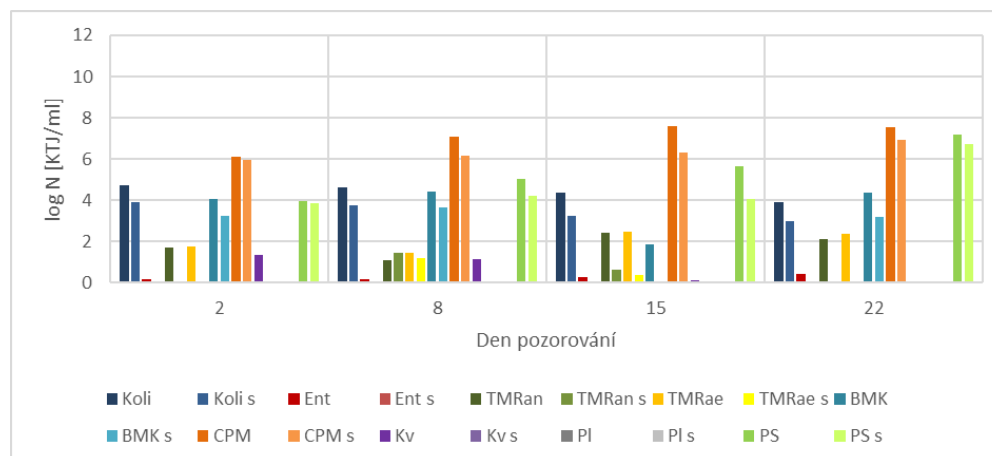


Obr. 27 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO anýzu do syrovátky, III. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 1

Potlačen byl pouze růst kvasinek a psychrotrofních mikroorganismů, ostatní mikroorganismy byly v průběhu pozorování naopak ve většině případů v růstu podpořeny.

Po přidavku vodného výluhu anýzu v prvním experimentu byly statistickou analýzou zjištěny rozdíly v počtech několika sledovaných skupin mikroorganismů, a to u koliformních bakterií, aerobních termorezistentních mikroorganismů a bakterií mléčného kysání (viz Obr. 28, příloha 81).



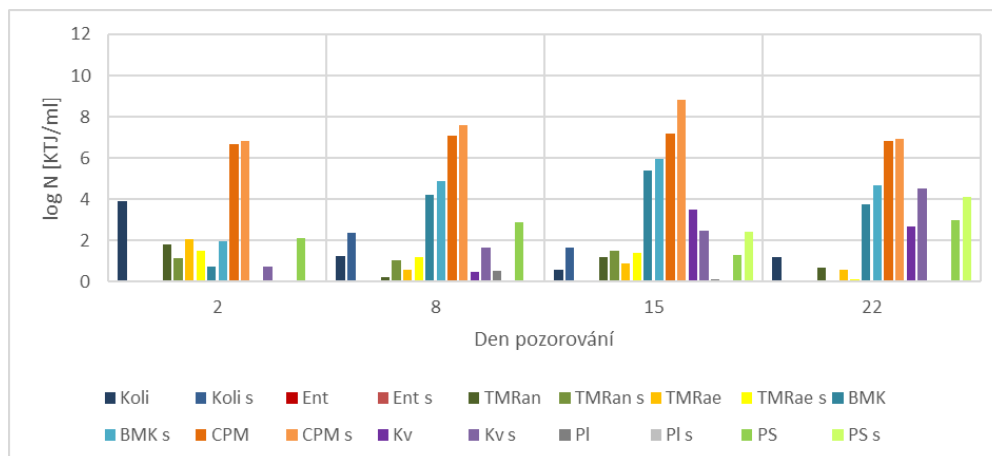
Obr. 28 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu anýzu do syrovátky, I. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 4

U zmíněných skupin mikroorganismů došlo k navýšení jejich množství v syrovátce s přidavkem vodného výluhu oproti kontrolnímu vzorku. U koliformních bakterií a bakterií mléčného kysání se jednalo o poměrně konstantní rozdíly v průběhu celého experimentu, v případě termorezistentních aerobních mikroorganismů byly zaznamenány nejvýraznější rozdíly ve třetím a čtvrtém týdnu – počty se lišily téměř o tři logaritmické řády. U ostatních mikroorganismů byl též pozorován jejich nárůst v syrovátce s přidavkem výluhu, ale nebyl již statisticky průkazný. Poměrně výrazně se zvýšil celkový počet mikroorganismů a množství psychrotrofních mikroorganismů během druhého a třetího týdne, u kvasinek byl nárůst pozorován zejména v prvním a druhém týdnu.

Během druhého experimentu došlo po přidavku vodného výluhu anýzu ke statisticky průkaznému poklesu u celkového počtu mikroorganismů (viz příloha 82). Snížení

množství CPM bylo pozorováno během celých čtyř týdnů, nejvýraznější rozdíl byl pak zaznamenán ve třetím týdnu, kdy činil více než 1,5 logaritmického řádu (viz Obr. 29).

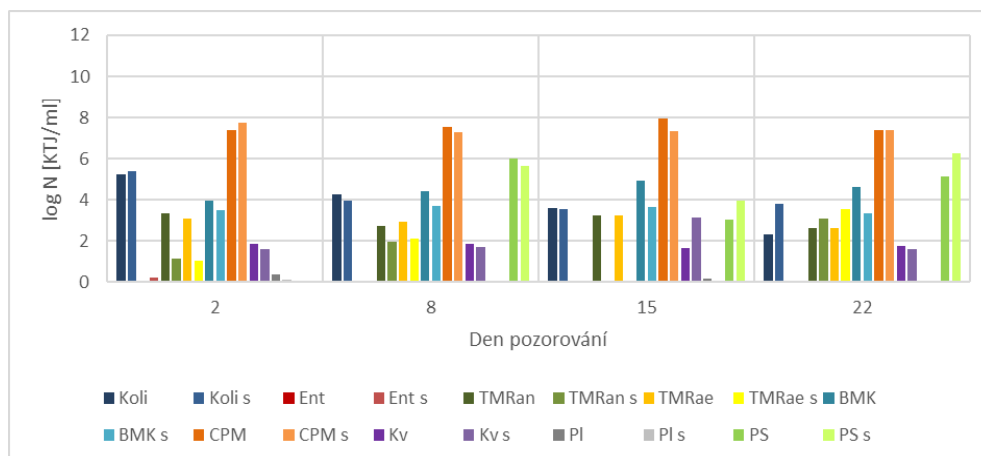


Obr. 29 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu anýzu do syrovátky, II. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 4

Po celou dobu experimentu byl potlačen také růst bakterií mléčného kysání, který však již nebyl prokázán statisticky. U ostatních skupin mikroorganismů docházelo v průběhu experimentu ke krátkodobějšímu snížení nebo naopak zvýšení jejich počtu ve vzorku syrovátky s výluhem oproti kontrolnímu vzorku. Tyto změny v mikrobiálním složení vzorků nebyly statisticky průkazné.

Během třetího experimentu byl ve vzorku s přidavkem vodného výluhu anýzu zaznamenán statisticky průkazný nárůst bakterií mléčného kysání (viz příloha 83). Zvýšení jejich počtu bylo zaznamenáno zejména ve třetím a čtvrtém týdnu.



Obr. 30 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu anýzu do syrovátky, III. experiment

Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny u Obr. 4

U dalších skupin mikroorganismů nebyly změny v počtech sledovaných skupin mikroorganismů v syrovátce s přidavkem výluhu anýzu statisticky průkazné. Významnější rozdíly mezi vzorky byly zaznamenány u aerobních i anaerobních termorezistentních mikroorganismů – vyšších počtů bylo dosaženo ve vzorku s přidavkem výluhu, a to zejména ve třetím týdnu (rozdíl v počtech zde přesáhl 3 logaritmické řády).

Ehsani et al. (2011) ošetřili pomocí esenciálního oleje anýzu íránský bílý sýr a během jeho zrání sledovali vliv různých koncentrací EO na rozvoj populace *Listeria monocytogenes*. Nejvýznamněji potlačila růst *L. monocytogenes* nejvyšší použitá koncentrace (0,2 %). Statisticky prokazatelně inhiboval esenciální olej anýzu v íránském bílém sýru také růst *E. coli*, a to nejlépe v koncentraci 3000 ppm (Ehsani et Mahmoudi, 2012).

V různých koncentracích (0,1 až 1,0 g/l) byl také testován přidavek esenciálního oleje anýzu do jogurtu vyrobeného z buvolího mléka. Jeho mikrobiální kvalita byla sledována po dobu 20 dnů skladování při 4 °C. Ve studii bylo prokázáno, že koncentrace EO 1,0 g/l je účinná při kontrole růstu kontaminujících mikroorganismů (Singh et al., 2011).

Antibakteriální účinnost vodného extraktu a esenciálního oleje anýzu byla testována i vůči růstu a rozvoji *Escherichia coli* a *Clostridium tyrobutyricum* v obnoveném odtučněném mléce. Vodný extrakt i esenciální olej byly použity v různých

koncentracích – vodný extrakt od 20 do 1000 $\mu\text{l/ml}$, EO od 0,2 do 200 $\mu\text{l/ml}$. Inhibiční účinky však v tomto případě nebyly prokázány ani u jedné z použitých koncentrací vodného extraktu či esenciálního oleje (Librán et al., 2013).

6 ZÁVĚR

V experimentální části disertační práce byl sledován vliv přírodních bioaktivních látek z vybraných rostlin na mikroorganismy přítomné v mléce a mléčných výrobcích. Po izolaci a následné identifikaci mikroorganismů byly provedeny testy *in vitro* s esenciálními oleji levandule úzkolisté, tymiánu obecného, šalvěje lékařské, skořicovníku cejlonského, rozmarýnu lékařského, meduňky lékařské a kmínu kořeného; model *in vivo* byl poté použit pro zjištění antimikrobiálních účinků esenciálních olejů a vodných výluhů z tymiánu obecného, levandule úzkolisté, skořicovníku cejlonského, anýzu vonného a fenyklu obecného. Účinnost bioaktivních látek se obecně mezi těmito modely často významně liší, což je zřejmě dáno vnějšími i vnitřními faktory, mezi které může být zařazena dostupnost živin, případně ochranný vliv některých z nich na buňky mikroorganismů i struktura použitého živného média či potraviny. Vliv na účinnost má samozřejmě i použitá forma antimikrobiální látky a její koncentrace.

Z mléka a mléčných výrobků byly izolovány gramnegativní bakterie, enterokoky, bakterie mléčného kysání a kvasinky. Identifikované mikroorganismy představovaly v souladu s literaturou běžnou mikroflóru mléka a mléčných výrobků. V modelu *in vitro* při využití diskové difuzní metody byla proti vybraným izolátům účinná většina použitých esenciálních olejů, nejlepších výsledků bylo ovšem dosaženo po použití EO tymiánu a skořice, kde došlo v případech nejcitlivějších mikroorganismů k vytvoření inhibičních zón o průměru až 33,33 mm (EO tymiánu v koncentraci 10 %, skupina bakterií mléčného kysání) a 67 mm (EO skořice v koncentraci 10 %, taktéž skupina BMK); u ostatních EO významné inhibiční účinky zjištěny nebyly. Skořice vykázala antimikrobiální účinky i po přidavku do živného bujónu při měření intenzity mikrobiálního zákalu, kdy inhibovala růst zkoušených mikroorganismů alespoň v jedné z použitých koncentrací. Významnější vliv na potlačení mikrobiálního růstu byl zjištěn také u EO levandule. Esenciální olej tymiánu vykázal v této části experimentu proti některým mikroorganismům také jisté inhibiční účinky, ale v případě kvasinek a bakterií mléčného kysání naopak jejich růst podpořil (především u BMK). Podpora růstu byla zaznamenána i v případě některých dalších esenciálních olejů, například EO kmínu, šalvěje nebo meduňky.

Po přidání esenciálních olejů přímo do syrovátky bylo zaznamenáno poměrně výrazné snížení účinnosti. Skořice, která *in vitro* inhibovala téměř všechny mikroorganismy, již významněji snížila pouze počty enterokoků v jednom ze tří experimentů a ve dvou experimentech snížila mírně celkové počty mikroorganismů, bakterie mléčného kysání a psychrotrofní mikroorganismy; psychrotrofní mikroorganismy byly ale v růstu v jednom z experimentů i výrazně podpořeny. Vodný výluh dle statistických analýz účinný nebyl, právě naopak v prvním experimentu zvýšil počet koliformních bakterií. Došlo také k mírnému potlačení růstu především u BMK, CPM a kvasinek. V případě přidavku EO tymiánu do syrovátky již nebyla pozorována podpora růstu bakterií mléčného kysání. V prvním experimentu byly významně inhibovány, stejně jako koliformní bakterie a enterokoky (ve třetím experimentu ale již u enterokoků došlo k významnému nárůstu). Prokazatelně se však po přidavku EO tymiánu zvýšilo při prvním experimentu množství kvasinek. K mírnějšímu nárůstu kvasinek došlo také po přidavku výluhu tymiánu a ve dvou experimentech i k významnému navýšení počtu bakterií mléčného kysání. Přesto, že u levandule byly při měření zákalu zaznamenány poměrně výrazné inhibiční účinky, po přidavku EO nebyly prokázány a po ošetření výluhem bylo pozorováno pouze mírné snížení CPM, BMK a kvasinek, u ostatních sledovaných skupin mikroorganismů buď nedošlo k ovlivnění růstu, nebo byl jejich růst levandulí podpořen. Výraznějších antimikrobiálních účinků nebylo v syrovátce dosaženo ani po přidavku esenciálních olejů a výluhů anýzu a fenyklu.

V této práci byly potvrzeny inhibiční účinky některých antimikrobiálních látek přítomných v rostlinách. Mezi jednotlivými metodami byly ovšem zaznamenány často významné rozdíly; především u tymiánu mezi diskovou difúzní metodou a metodou měření zákalu u BMK a kvasinek. Při přidavku antimikrobiálních látek do syrovátky byla ve většině případů ze sensorických důvodů a případně zjištěné intenzity účinnosti zvolena odlišná koncentrace než v modelech *in vitro*. To je zčásti důvod nižší účinnosti těchto látek. Pokud ovšem porovnáme například účinky esenciálního oleje levandule, který byl i v syrovátce použit v koncentraci 1 %, je dobře patrné, že i tak existuje významný rozdíl v jeho účinnosti. Avšak například u esenciálního oleje skořice i přes jeho nízkou koncentraci došlo alespoň k mírné inhibici mikroorganismů, a to i v případě BMK, jejichž růst byl při měření zákalu esenciálním olejem podpořen v koncentraci 10 %. Důvodem nižší účinnosti vodných výluhů je pravděpodobně i použité

rozpouštědlo a technika získání účinných látek. Lepší výtěžnosti a tím i účinnosti by bylo patrně dosaženo jinými metodami. V této práci bylo ovšem cílem zjistit antimikrobiální aktivitu rostlinných výtažků, jenž by mohly být snadno získány drobnými pěstiteli léčivých rostlin a drobnými zpracovateli mléka.

Bioaktivní látky obsažené v rostlinách mají pro budoucí zpracování potravin velký význam. Jejich rozmanitost, různé kvalitativní i kvantitativní zastoupení v jednotlivých rostlinách, možný synergismus i různé mechanismy působení jsou důvodem pro jejich neustálé zkoumání. Mají nejen důležitý potenciál zpomalit či zastavit kažení potravin zamezením růstu nežádoucích mikroorganismů, ale také ochránit zdraví konzumentů inhibicí patogenních mikroorganismů a případně i ovlivnit získávání mikrobiální rezistence. Ve výzkumu antimikrobiálního působení rostlinných látek tak stále zbývá mnoho prostoru pro zjištění, jak nejlépe tyto zdroje využít pro uplatnění nejen v potravinářském průmyslu.

7 SUMMARY

In the experimental part of the dissertation thesis, influence of bioactive compounds isolated from selected plants was tested on microorganisms contained in milk and dairy products. After isolation and identification of microorganisms, *in vitro* tests with lavender, thyme, sage, cinnamon, rosemary, lemon balm and caraway seeds essential oils and *in vivo* tests with lavender, thyme, cinnamon, anise and fennel essential oils and aqueous extracts were carried out to evaluate effects of natural antimicrobial agents. Efficacy differs between *in vitro* and *in vivo* tests, in general. It can be given by inner and outer factors, for example availability of nutrients, protective effect of some food components, or structure of used nutrient medium or food.

Gramnegative bacteria, enterococci, lactic acid bacteria and yeasts were isolated from milk and dairy products. Identified microorganisms represent common microflora of milk and dairy products, according to literature. For *in vitro* assays, disc diffusion method and broth dilution method were used. In the case of disc diffusion method, the most of all essential oils were effective but the best inhibitory activity was observed at thyme and cinnamon essential oils. Diameters of inhibition zones were up to 33.33 mm (thyme essential oil in concentration of 10 % against lactic acid bacteria) and 67 mm (cinnamon essential oil in concentration of 10 % against lactic acid bacteria). Cinnamon essential oil was effective in broth dilution method, as well. It inhibited growth of microorganisms at least in one of the used concentrations. Some antimicrobial effects were observed at thyme essential oil in broth dilution method. However, growth of yeasts and lactic acid bacteria was supported. Stimulating effects were observed also at caraway seed, sage and lemon balm essential oils.

Within *in vivo* assays, the addition of essential oils or aqueous extracts into the whey was used. Three particular experiments were carried out for each essential oil / aqueous extract. After the addition of essential oils into whey, considerable decrease of efficacy was observed. Cinnamon essential oil was able to inhibit enterococci in one of three experiments, and also total plate count, lactic acid bacteria and psychrotrophic microorganisms in two of three experiments. However, growth of psychrotrophic microorganisms was strongly stimulated in one experiment. Cinnamon aqueous extract was not too effective. It inhibited moderately lactic acid bacteria, total plate count and yeasts, but supported growth of coliform bacteria. Thyme essential oil did not support

the growth of lactic acid bacteria, contrary to broth dilution method. In the first experiment, lactic acid bacteria, coliform bacteria and enterococci were significantly inhibited. Growth of enterococci was stimulated in the third experiment. Yeasts were supported in their growth in first experiment. Within thyme aqueous extract addition, yeasts were moderately stimulated and lactic acid bacteria were promoted. Although the lavender essential oil inhibited growth of microorganisms in broth dilution method, antimicrobial effects were not observed after addition of essential oil in whey. Lavender aqueous extract moderately decreased number of total plate count, lactic acid bacteria and yeasts. The rest of the observed microorganisms was not affected or was supported. Essential oils and aqueous extracts of anise and fennel did not show significant antimicrobial effects.

Inhibitory effects of some antimicrobial plant agents were proven in this dissertation thesis. Between used methods, there were observed significant differences. Efficacy of thyme essential oil / aqueous extract differs between disk diffusion method and broth dilution method to suppress lactic acid bacteria and yeasts. Lower concentration of antimicrobial agents was used for whey treatment due to sensory properties and due to ascertained intensity of efficacy. Reduction in aqueous extracts concentration could be the reason for their lower efficacy. It is evident that effects of 1% lavender essential oil are significantly different between *in vitro* and *in vivo* methods. In contrary, cinnamon essential oil moderately inhibited growth of microorganisms at low concentration and it was observed also at lactic acid bacteria, which were stimulated in broth dilution method at its 10 % concentration. Reasons for lower efficacy of aqueous extracts are probably used solvent and technique of active compounds extraction. Greater yield and thereby better efficacy could be reached by different methods of extraction. In this dissertation thesis, the aim was to determine the antimicrobial activity of plant extracts, which could be easily obtained by small growers of medicinal herbs and small milk manufacturers.

Bioactive compounds contained in plants have great importance for the future food processing. Their diversity, various qualitative and quantitative presence in particular plants, synergism and various mechanisms of their action are reasons for their permanent research. They have important role to slow or stop food spoilage and to protect consumer's health by inhibition of pathogenic microorganisms

and influence the possibility of microbial resistance development. A lot of space still remains to ascertain how to utilize these sources, not only in food production.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABDELLATIF F., BOUDJELLA H., ZITOUNI A., HASSANI A., 2014: *Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian Melissa Officinalis L.* Experimental and Clinical Sciences International online journal for advances in science, 13: 772-781. ISSN 1611-2156.

ABOU-TALEB M., KAWAI Y., 2008: *Shelf life of semifried tuna slices coated with essential oil compounds after treatment with anodic electrolyzed NaCl solution.* Journal of Food Protection. 71(4): 770-774. ISSN: 0362-028X.

ABU-DARWISH M. S., AL-RAMAMNEH E. A. M., KYSLYCHENKO V. S., KARPIUK, U. S., 2012: *The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ash – shoubak region – South of Jordan.* Pak. J. Pharm. Sci., 25(1): 239-246. ISSN: 1011-601X.

ACHARYA D., RIOS J. L., RAI M. *Naturally Occurring Biocides in the Food Industry.* In: RAI M., CHIKINDAS M. *Natural antimicrobials in food safety and quality.* Cambridge, MA: CABI, 2011, s. 1-9. ISBN 1845937694.

ADNAN M., BIBI R., MUSSARAT S., TARIQ A., SHINWARI Z., 2014: *Ethnomedicinal and phytochemical review of Pakistani medicinal plants used as antibacterial agents against Escherichia coli.* Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 13(1): 40. DOI: 10.1186/s12941-014-0040-6. ISSN: 1476-0711.

AIT-OUAZZOU A., LORÁN S., ARAKRAK A., LAGLAOUI A., ROTA C., HERRERA A., PAGÁN R., CONCHELLO R., 2012: *Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of Mentha pulegium, Juniperus phoenicea, and Cyperus longus essential oils from Morocco.* Food Research International, 45(1): 313-319. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.09.004. ISSN 09639969.

AKINYEMI, K.O., OLUWA O.K., OMOMIGBEHIN E.O., 2006: *Antimicrobial activity of crude extracts of the three medicinal plants used in South-West Nigerian folk medicine on some food borne bacterial pathogens.* African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 3(4): 13-22. ISSN 01896016.

ALBAYRAK S., AKSOY A., SAGDIC O., ALBAYRAK S., 2012: *Antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of some medicinal herbs consumed as tea and spices in Turkey*. Journal of Food Biochemistry, 36(5): 547-554. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2011.00568.x. ISSN 01458884.

ALBERTO M. R., FARIÁS M. E., MANCA DE NADRA M. C., 2001: *Effect of Gallic Acid and Catechin on Lactobacillus hilgardii 5w Growth and Metabolism of Organic Compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(9): 4359-4363. DOI: 10.1021/jf0101915. ISSN: 1520-5118.

ALI B. H., BLUNDEN G., TANIRA M. O., NEMMAR A., 2008: *Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (Zingiber officinale Roscoe): A review of recent research*. Food and Chemical Toxicology, 46(2): 409-420. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.085. ISSN 02786915.

ALI-SHTAYEH M. S., YAGMOUR R. M. R., FAIDI Y. R., SALEM K., AL-NURI M. A., 1998: *Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area*. Journal of Ethnopharmacology. 60(3): 265-271. ISSN: 0378-8741.

ALVAREZ M. V., PONCE A. G., MAZZUCOTELLI C. A., MOREIRA M. R., 2015: *The impact of biopreservatives and storage temperature in the quality and safety of minimally processed mixed vegetables for soup*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 95(5): 967-971. DOI: 10.1002/jsfa.6770. ISSN 00225142.

AL-TURKI A. I., EL-ZINEY M. G., ABDEL-SALAM A. M., 2008: *Chemical and anti-bacterial characterization of aqueous extracts of oregano, marjoram, sage and licorice and their application in milk and labneh*. Journal of Food, Agriculture and Environment. 6(1): 39-44. ISSN 1459-0263.

AL-BAYATI F. A., 2008: *Synergistic antibacterial activity between Thymus vulgaris and Pimpinella anisum essential oils and methanol extracts*. Journal of Ethnopharmacology. 116(3): 403-406. DOI: 10.1016/j.jep.2007.12.003. ISSN 03788741.

AMATISTE S., SAGRAFOLI D., GIACINTI G., ROSA G., CARFORA V., MARRI N., TAMMARO A., BOVI E., ROSATI R., 2014: *Antimicrobial activity of essential oils against Staphylococcus aureus in fresh sheep cheese*. Italian Journal of Food Safety, 3(3): -. DOI: 10.4081/ijfs.2014.1696. ISSN 2239-7132.

- ANWAR F., ALI M., HUSSAIN A. I., SHAHID M., 2009: *Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (Foeniculum vulgare Mill.) seeds from Pakistan*. Flavour and Fragrance Journal, 24(4): 170-176. DOI: 10.1002/ffj.1929. ISSN 08825734.
- ATANASSOVA, M.R., FERNÁNDEZ-OTERO C., RODRÍGUEZ-ALONSO P., FERNÁNDEZ-NO I. C., GARABAL J. I., CENTENO J. A., 2016: *Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain)*. Food Microbiology, 53: 172-181. DOI: 10.1016/j.fm.2015.09.012. ISSN 07400020.
- AUMEERUDDY-ELALFI Z., GURIB-FAKIM A., MAHOMOODALLY F., 2015: *Antimicrobial, antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of Mauritius*. Industrial Crops and Products, 71: 197-204. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.03.058. ISSN 09266690.
- AYALA-ZAVALA J. F., GONZÁLEZ-AGUILAR G. A., DEL-TORO-SÁNCHEZ L., 2009: *Enhancing Safety and Aroma Appealing of Fresh-Cut Fruits and Vegetables Using the Antimicrobial and Aromatic Power of Essential Oils*. Journal of Food Science, 74(7): 84-91. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01294.x. ISSN 00221147.
- AYANA I. A. A. A., EL DEEN A. A. G., 2011: *Improvement of the properties of goat's milk labneh using some aromatic and vegetable oils*. International Journal of Dairy Science. 6: 112-123. DOI: 10.3923/ijds.2011.112.123. ISSN 1811-9743.
- AZMIR J., ZAIDUL I. S. M., RAHMAN M. M., SHARIF K. M., MOHAMED A., SAHENA F., JAHURUL M. H. A., GHAFOR K., NORULAINI N. A. N., 2013: *Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review*. Journal of Food Engineering. 117(4): 426-436. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014. ISSN 02608774.
- AZNAR A., FERNANDEZ P. S., PERIAGO P. M., PALOP A., 2014: *Antimicrobial activity of nisin, thymol, carvacrol and cymene against growth of Candida lusitanae*. Food Science and Technology International. 21(1): 72-79. DOI: 10.1177/1082013213514593. ISSN 1082-0132.

- BAGAMBOULA C. F., UYTTENDAELE M., DEBEVERE J., 2004: *Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards Shigella sonnei and S. flexneri*. Food Microbiology, 21(1): 33-42, DOI: 10.1016/S0740-0020(03)00046-7. ISSN 07400020.
- BAGIU R. V., VLAICU B., BUTNARIU M., 2012: *Chemical Composition and in Vitro Antifungal Activity Screening of the Allium ursinum L. (Liliaceae)*. International Journal of Molecular Sciences, 13(12): 1426-1436. DOI: 10.3390/ijms13021426. ISSN 1422-0067.
- BAJPAI V. K., RAHMAN A., DUNG N. T., HUH M. K., KANG S. C., 2008: *In vitro Inhibition of Food Spoilage and Foodborne Pathogenic Bacteria by Essential Oil and Leaf Extracts of Magnolia liliflora Desr.* Journal of Food Science, 73(6): 314-320, DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.00841.x. ISSN: 1750-3841.
- BAKR I. A., MOHAMED T. H., TAMMAM A. A., EL – GAZZAR F. E., 2015: *Characteristics of Bioyoghurt Fortified With Fennel Honey*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4(3): 959-970, ISSN 2319-7706.
- BARBANO D. M., MA Y., SANTOS M. V., 2006: *Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life*. Journal of dairy science, 89: 15-19, ISSN 15253198.
- BASHIR S. F., GURUMAYUM S., KAUR S., 2015: *In vitro antimicrobial activity and preliminary phytochemical screening of methanol, chloroform, and hot water extracts of ginger (Zingiber officinale)*. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research., 8(1): 176-180, ISSN 09742441.
- BEATOVIC D., KRSTIC-MILOŠEVIC D., TRIFUNOVIC S., ŠILJEGOVIC J., GLAMOCLIIJA J., RISTIC M., JELACIC S., 2015: *Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of twelve Ocimum basilicum L. cultivars grown in Serbia*. Records of Natural Products, 9(1): 62-75, ISSN 13076167.
- BEHRAD S., YUSOF M. Y., GOH K. L., BABA A. S., 2011: *Manipulation of probiotics fermentation of yogurt by cinnamon and licorice: Effects on yogurt formation and inhibition of helicobacter pylori growth in vitro*. World Academy of Science, Engineering and Technology. 60: 590-594. ISSN: 20103778.
- BÉLIVEAU R., GINGRAS D., *Výživou proti rakovině*. Vyd. 1. Praha: Vyšehrad, 2008, 213 s. ISBN 978-80-7021-907-2.

BLAZEKOVIĆ B., STANIĆ G., PEPELJNJAK S., KNEZEVIĆ S. V., 2011: *In Vitro Antibacterial and Antifungal Activity of Lavandula x intermedia Emeric ex Loisel. 'Budrovka'*. *Molecules*. 16(12): 4241-4253. DOI: 10.3390/molecules16054241. ISSN: 1420-3049

BONYADIAN M., MOSHTAGHI H., 2007: *The Effects of Some Herb's Essential Oils on S. aureus in Feta Cheese*. *Journal of Medicinal Plants*, 1(21): 19-25, ISSN 1684-0240.

BOROSKI M., GIROUX H. J., SABIK H., PETIT H. V., VISENTAINER J. V., MATUMOTO-PINTRO P. T., BRITTEN M., 2012: *Use of oregano extract and oregano essential oil as antioxidants in functional dairy beverage formulations*. *LWT - Food Science and Technology*. 47(1): 167-174. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.12.018. ISSN 00236438.

BROOKS J. C., MARTINEZ B., STRATTON J., BIANCHINI A., KROKSTROM R., HUTKINS R., 2012: *Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens*. *Food Microbiology*. 31(2): 154-158. DOI: 10.1016/j.fm.2012.03.013. ISSN 07400020.

BUBONJA-SONJE M., GIACOMETTI J., ABRAM M., 2011: *Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols*. *Food Chemistry*. 127(4): 1821-1827. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.02.071. ISSN 03088146.

BUDZYŃSKA A., SADOWSKA B., LIPOWCZAN G., MACIĄG A., KALEMBA D., RÓŻALSKA B., 2013: *Activity of Selected Essential Oils against Candida spp. strains. Evaluation of New Aspects of their Specific Pharmacological Properties, with Special Reference to Lemon Balm*. *Advances in Microbiology*. 03(04): 317-325. DOI: 10.4236/aim.2013.34045. ISSN 2165-3402.

BURT S., 2004: *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review*. *International Journal of Food Microbiology*. 94(3): 223-253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022. ISSN: 0168-1605.

- CALEJA C., BARROS L., ANTONIO A. L., CIRIC A., SOKOVIC´ M., OLIVEIRA M. B. P. P., SANTOS-BUELGA C., FERREIRA I. C. F. R., 2015: *Foeniculum vulgare Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese*. Journal of Functional Foods. 12: 428-438. ISSN 1756-4646.
- CALLON C., DELBÈS C., DUTHOIT F., MONTEL M. C., 2006: *Application of SSCP–PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses*. Systematic and Applied Microbiology. 29(2): 172-180. DOI: 10.1016/j.syapm.2005.07.008. ISSN 07232020.
- CAVA-RODA R. M., NOWAK E., TABOADA A., MARIN-INIESTA F., 2007: *Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against Listeria monocytogenes in pasteurized milk*. Journal of Food Protection. 70(12): 2757-2763. ISSN: 0362-028X.
- CAVA-RODA R. M., TABOADA-RODRÍGUEZ A., VALVERDE-FRANCO M. T., MARÍN-INIESTA F., 2012: *Antimicrobial Activity of Vanillin and Mixtures with Cinnamon and Clove Essential Oils in Controlling Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157: H7 in Milk*. Food and Bioprocess Technology. 5(6): 2120-2131. DOI: 10.1007/s11947-010-0484-4. ISSN 1935-5130.
- CELIK TAS, O. Y., KOCABAS E. E. H., BEDIR E., SUKAN F. V., OZEK T, BASER K. H. C., 2007: *Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations*. Food Chemistry. 100(2): 553-559. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.10.011. ISSN 03088146.
- CEMPÍRKOVÁ R., 2007: *Contamination of cow's raw milk by psychrotrophic and mesophilic microflora in relation to selected factors*. Czech Journal of Animal Science. 11(52): 387-393. ISSN 12121819.
- CETIN B., CAKMAKCI S., GURSES M., 2013: *Anti-Probiotic Effects of Essential Oils from Some Turkish Endemic Thyme Species*. Asian Journal of Chemistry. 25(15): 8625-8628. ISSN: 0975-427X.
- CEUGNIEZ A., DRIDER D., JACQUES P., COUCHENEY F., 2015: *Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d'orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits*. Food Microbiology. 52: 177-184. DOI: 10.1016/j.fm.2015.08.001. ISSN 07400020.

- CEYLAN E., FUNG D. Y. C., 2004: *Antimicrobial Activity of Spices*. Journal of rapid methods and automation in microbiology. 12: 1-55. DOI: 10.1111/j.1745-4581.2004.tb00046.x. ISSN: 1745-4581.
- CUI H. Y., ZHOU H., LIN L., ZHAO C. T., ZHANG X. J., XIAO Z. H., LI C.Z., 2016: *Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil and its application in milk*. JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences. 26(2): 532-541. ISSN 1018-7081.
- CONNER D. E., BEUCHAT L. R., 1984: *Effects of Essential Oils from Plants on Growth of Food Spoilage Yeasts*. Journal of Food Science. 49(2): 429-434. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1984.tb12437.x. ISSN 0022-1147.
- CORBO M. R., LANCIOTTI R., ALBENZIO M., SINIGAGLIA M., 2001: *Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region*. International Journal of Food Microbiology. 69(1-2): 147-152. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00585-2. ISSN 01681605.
- CORTES C., DELAFUENTE R., CONTRERAS A., SANCHEZ A., CORRALES J., RUIZSANTAQUITERIA J., ORDEN J., 2006: *Occurrence and preliminary study of antimicrobial resistance of enterococci isolated from dairy goats in Spain*. International Journal of Food Microbiology. 110(1): 100-103. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.033. ISSN 01681605.
- COSENTINO S., TUBEROSO C. I. G., PISANO B., SATTÀ M. L., MASCIA V., ARZEDI E., PALMAS F., 1999: *In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils*. Letters in applied microbiology. 29(2): 130-135. DOI: 10.1046/j.1472-765X.1999.00605.x. ISSN: 1472-765X.
- COTON M., DELBÉS-PAUS C., IRLINGER F., DESMASURES N., LE FLECHE A., STAHL V., MONTEL M. C., COTON E., 2012: *Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses*. Food Microbiology. 29(1): 88-98. DOI: 10.1016/j.fm.2011.08.020. ISSN 07400020.
- COWAN M.M., 1999: *Plant products as antimicrobial agents*. Clinical Microbiology Reviews. 12(4): 564-582. ISSN: 0893-8512.
- D'AMICO D. J., GROVES E., DONNELLY C. W., 2008: *Low Incidence of Foodborne Pathogens of Concern in Raw Milk Utilized for Farmstead Cheese Production*. Journal of Food Protection. 10(8): 1544-1741. ISSN 1573-7438.

DAVIDSON P. M., Chemical preservatives and naturally antimicrobial compounds. In: Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 2nd ed. Herndon: ASM press, Washington 2001, s. 593–628. ISBN 15-558-1208-2.

DE CARVALHO R. J., DE SOUZA G. T., HONÓRIO V. G., DE SOUSA J. P., DA CONCEIÇÃO M. L., MAGANANI M, DE SOUZA E. L., 2015: *Comparative inhibitory effects of Thymus vulgaris L. essential oil against Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models*. Food Microbiology. 52: 59-65. DOI: 10.1016/j.fm.2015.07.003. ISSN 07400020.

DE MEDEIROS BARBOSA I., DA COSTA MEDEIROS J. A., DE OLIVEIRA K. Á. R., GOMES-NETO N. J., TAVARES J. F., MAGNANI M., DE SOUZA E. L., 2016: *Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Salmonella Enteritidis in leafy vegetables*. Food Control. 59: 468-477. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.06.017. ISSN 09567135.

DHAMA K., TIWARI R., CHAKRABORT S., SAMINATHAN M., KUMAR A., KARTHIK K., WANI M. Y., SINGH A. S. V., RAHAL A., 2014: *Evidence Based Antibacterial Potentials of Medicinal Plants and Herbs Countering Bacterial Pathogens Especially in the Era of Emerging Drug Resistance: An Integrated Update*. International Journal of Pharmacology. 10(1): 1-43. DOI: 10.3923/ijp.2014.1.43. ISSN: 1811-7775.

DHIFI W., JELALI N., MNIF W., LITAIEM M., HAMDI N., 2013: *Chemical composition of the essential oil of Mentha spicata L. from Tunisia and its biological activities*. Journal of Food Biochemistry. 37(3): 362-368. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2012.00656.x. ISSN 01458884.

DIAO W.-R., HU Q.-P., ZHANG H., XU J.-G., 2014: *Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (Foeniculum vulgare Mill.)*. Food Control. 35(1): 109-116. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.06.056. ISSN 09567135.

- DORMAN H. J. D., DEANS S. G., 2000: *Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils*. Journal of Applied Microbiology. 88(2): 308-316. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x. ISSN 1364-5072.
- EHSANI A., MAHMOUDI R., 2012: *Phytochemical Properties and Hygienic Effects of Allium ascalonicum and Pimpinella anisum Essential Oils in Iranian White Brined Cheese*. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 15(6): 1013-1020. DOI: 10.1080/0972060X.2012.10662606. ISSN 0972-060x.
- EHSANI A., MAHMOUDI R., ZARE P., HASANY A., 2011: *Biochemical properties and antimicrobial effects of Allium Ascalonicum and Pimpinella Anisum essential oils against Listeria monocytogenes in white brined cheese*. Journal of Food Research. 21(3): 318-328. DOI: 10.1080/0972060X.2012.10662606. ISSN 0972-060X.
- EL BOUZIDI L., JAMALI C. A., BEKKOUCHE K., HASSANI L. H., LEACH D., ABBAD A., 2013: *Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan Thymus species*. Industrial Crops and Products. 43: 450-456. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.07.063. ISSN 09266690.
- ELGAYYAR M. F., DRAUGHON A., GOLDEN D. A., MOUNT J. R., 2001: *Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms*. Journal of Food Protection. 64(7): 1019-1024. ISSN: 0362-028X.
- ERCOLINI D., RUSSO F., FERROCINO I., VILLANI F., 2009: *Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk*. Food Microbiology. 26(2): 228-231. DOI: 10.1016/j.fm.2008.09.005. ISSN 07400020.
- ERDOĞAN E. A. E., EVEREST A., KAPLAN E., 2013: *Antimicrobial activities of aqueous extracts and essential oils of two endemic species from Turkey*. Indian Journal of Traditional Knowledge. 12(2): 221-224. ISSN 0975-1068.
- EVRENDILEK G. A., BALASUBRAMANIAM V. M., 2011: *Inactivation of Listeria monocytogenes and Listeria innocua in yogurt drink applying combination of high pressure processing and mint essential oils*. Food Control. 22(8): 1435-1441. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.03.005. ISSN 09567135.

- FADDA M. E., VIALE S., DEPLANO M., PISANO M. B., COSENTINO S., 2010: *Characterization of yeast population and molecular fingerprinting of Candida zeylanoides isolated from goat's milk collected in Sardinia*. International Journal of Food Microbiology. 136(3): 376-380. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.007. ISSN 01681605.
- FARZANEH V., CARVALHO I. S., 2015: *A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions*. Industrial Crops and Products. 65: 247-258. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.10.057. ISSN: 0926-6690.
- FERNANDES R. *Microbiology handbook*. Cambridge: Leatherhead Pub., and Royal Society of Chemistry, 2009, xiii, 173 p. ISBN 19-052-2462-1.
- FERNÁNDEZ-AGULLÓ A., FREIRE M. S., GONZÁLEZ-ÁLVAREZ J., 2015: *Effect of the extraction technique on the recovery of bioactive compounds from eucalyptus (Eucalyptus globulus) wood industrial wastes*. Industrial Crops and Products. 64: 105-113. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.11.031. ISSN 09266690.
- FISHER K., PHILLIPS C., 2008: *Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?* Trends in Food Science & Technology. 19(3): 156-164. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.11.006. ISSN 09242244.
- FORNARI T., VICENTE, VÁZQUEZ E., GARCÍA-RISCO M. R., REGLERO G., 2012: *Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction*. Journal of Chromatography. 1250: 34-48. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.04.051. ISSN 00219673.
- FOSCHINO R., INVERNIZZI A., BARUCCO R., STRADIOTTO K., 2002: *Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year*. Journal of Dairy Research. 69(02): 213-225. DOI: 10.1017/S0022029902005459. ISSN 0022-0299.
- FRANCIOSI E., SETTANNI L., CAVAZZA A., POZNANSKI E., 2009: *Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk*. International Dairy Journal. 19(1): 3-11. DOI: 10.1016/j.idairyj.2008.07.008. ISSN 09586946.

- FRANGOS L., PYRGOTOU N., GIATRAKOU V., NTZIMANI A., SAVVAIDIS I.N., 2010: *Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets*. Food Microbiology. 27(1): 115-121. DOI: 10.1016/j.fm.2009.09.002. ISSN 07400020.
- FU Y. J., ZU Y. G., CHEN L. Y., SHI X. G., WANG Z., 2007: *Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination*. Phytotherapy Research. 21(10): 989-994. DOI: 10.1002/ptr.2179. ISSN: 1099-1573.
- GAMMARIELLO D., DI GIULIO S., CONTE A., DEL NOBILE M. A., 2008: *Effects of Natural Compounds on Microbial Safety and Sensory Quality of Fior di Latte Cheese, a Typical Italian Cheese*. Journal of Dairy Science. 91(11), 4138-4146. DOI: 10.3168/jds.2008-1146. ISSN 00220302.
- GANN L. D., 2013: *Antimicrobial Activity of Essential Oils and Their Components Against Lactic Acid Bacteria*. Tennessee. Diplomová práce. University of Tennessee.
- GEORGANTELIS D., AMBROSIADIS I., KATIKOU P., BLEKAS G., GEORGAKIS S. A., 2007: *Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C*. Meat Science. 76(1): 172-181. DOI: 10.1016/j.meatsci.2006.10.026. ISSN 03091740.
- GHALEM B. R., ZOUAOUI B., 2013: *Evaluation of the quality of steamed yogurt treated by Lavandula and Chamaemelum species essential oils*. Journal of Medicinal Plants Research. 7(42): 3121-3126. ISSN 1996-0875. DOI: 10.5897/JMPR12.1037. ISSN: 1996-0875.
- GILL A. O., DELAQUIS P., RUSSO P., HOLLEY R. A., 2002: *Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham*. International Journal of Food Microbiology. 73(1): 83-92. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00712-7. ISSN 01681605.
- GOVARIS A., CAILLET S., SERGELIDIS D., CHATZOPOULOU P. S., 2011: *Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157: H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere*. LWT - Food Science and Technology. 44(4): 1240-1244. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.09.022. ISSN: 0023-6438.

GOVARIS A., SOLOMAKOS N., PEXARA A., CHATZOPOULOU P. S., 2010: *The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against Salmonella Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage*. International Journal of Food Microbiology. 137(2-3): 175-180. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.017. ISSN 01681605.

GÖRNER F., VALÍK L., 2004: *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.

GREIFOVÁ, M., GREIF, G., LEŠKOVÁ, E., MÉRIOVÁ, K., 2003: *Enterokoky – ich hodnotenie v mliekarenskej technológii*. Mliekarstvo. 34(2): 42-45. ISSN: 1210-3144.

GRIGORE A., COLCERU-MIHUL S., PARASCHIV I., NITA S., CHRISTOF R., IUKSEL R., ICHIM M., 2012: *Chemical analysis and antimicrobial activity of indigenous medicinal species volatile oils*. Romanian Biotechnological Letters. 17(5): 7620-7627. ISSN: 1222-3891.

GULER, S., SEKER M., 2009: *The effect of cinnamon and guar gum on Bacillus cereus population milk*. Journal of Food Processing and Preservation. 33(3): 415-426. DOI: 10.1111/j.1745-4549.2009.00417.x. ISSN 01458892.

GULLUCE M., SAHIN F., SOKMEN M., OZER H., DAFERERA D., SOKMEN A., POLISSIOU M., ADIGUZEL A., OZKAN H., 2007: *Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. subsp. longifolia*. Food Chemistry. 103(4): 1449-1456. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.10.061. ISSN 03088146.

GUPTA A., DUHAN J., TEWARI S., SANGWAN P., YADAV A., SINGH G., JUNEJA R., SAINI H., 2013: *Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of Syzygium aromaticum, Ocimum sanctum and Cinnamomum zeylanicum plant extracts against Enterococcus faecalis: a preliminary study*. International Endodontic Journal. 46(8): 775-783. DOI: 10.1111/iej.12058. ISSN: 1365-2591.

GUTIERREZ J., BARRY-RYAN C., BOURKE P., 2008: *The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients*. International Journal of Food Microbiology. 124(1): 91-97. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.028. ISSN 01681605.

GUTIERREZ J., BARRY-RYAN C., BOURKE P., 2009: *Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components*. Food microbiology. 26(2): 142-150. DOI: 10.1016/j.fm.2008.10.008. ISSN: 0740-0020.

GÜLÇİN İ., OKTAY M., KIREÇCI E., KÜFREVİOĞLU Ö. İ., 2003: *Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum L.*) seed extracts*. Food Chemistry. 83(3): 371-382. DOI: 10.1016/S0308-8146(03)00098-0. ISSN: 0308-8146.

GYAWALI R., IBRAHIM S. A., 2012: *Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics*. Applied Microbiology and Biotechnology. 95(1): 29-45. DOI: 10.1007/s00253-012-4117-x. ISSN: 0175-7598.

HAILEMARIAM G. A., EMIRE S. A., 2013: *Antioxidant activity and preservative effect of thyme (*Thymus schimperi R.*)*. British Journal of Applied Science & Technology. 3(4): 1311-1326. ISSN: 2231-0843.

HAMEDO H. A., ABDELMIGID H. M., 2009: *Use of Antimicrobial and Genotoxicity Potentiality for Evaluation of Essential Oils as Food Preservatives*. The Open Biotechnology Journal. 3(1): 50-56. DOI: 10.2174/1874070700903010050. ISSN 18740707.

HAMMAD A. M., 2016: *Antimicrobial Effect of Cinnamon and Clove on *Staphylococcus aureus* in Milk and Yogurt*. Alexandria Journal of Veterinary Sciences. 48(1): 1-6. ISSN 1110-2047.

HAMMER K., CARSON C. F., RILEY T. V., 1999: *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts*. Journal of applied microbiology. 86(6): 985-990. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x ISSN: 1365-2672.

- HANAMANTHAGOUDA M. S., KAKKALAMELI S. B., NAIK P. B., NAGELLA P., SEETHARAMAREDDY H. R., MURTHY H. N., 2010: *Essential oils of Lavandula bipinnata and their antimicrobial activities*. Food Chemistry. 118(3): 836-839. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.05.032. ISSN 03088146.
- HARBORNE J. B., WILLIAMS C. A., 2000: *Advances in flavonoid research since 1992*. Phytochemistry. 55(6): 481-504. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)00235-1. ISSN 00319422.
- HELENO S. A., MARTINS A., QUEIROZ M. J. R. P., FERREIRA I. C. F. R., 2015: *Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds*. Food Chemistry. 173: 501-513. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.057. ISSN 03088146.
- HIGGINBOTHAM K. L., BURRIS K. P., ZIVANOVIC S., DAVIDSON P. M., STEWART C. N., 2014: *Antimicrobial Activity of Hibiscus sabdariffa Aqueous Extracts against Escherichia coli O157: H7 and Staphylococcus aureus in a Microbiological Medium and Milk of Various Fat Concentrations*. Journal of Food Protection. 77(2): 262–268. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-13-313. ISSN 0362028x.
- HOLLEY R. A., PATEL A. D., 2005: *Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials*. Food Microbiology. 22(4): 273-292. DOI: 10.1016/j.fm.2004.08.006. ISSN 07400020.
- HUIE C. W., 2002: *A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 373(1-2): 23-30. DOI: 10.1007/s00216-002-1265-3. ISSN 1618-2642.
- CHANG S.-T., CHEN P.-F., CHANG S.-C., 2001: *Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from Cinnamomum osmophloeum*. Journal of ethnopharmacology. 77(1): 123-127. DOI: 10.1016/S0378-8741(01)00273-2. ISSN: 0378-8741.
- CHAO S. C., YOUNG D. G., OBERG C. J., 2000: *Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses*. Journal of Essential Oil Research. 12(5): 639-649. DOI: 10.1080/10412905.2000.9712177. ISSN 1041-2905.

- CHOI Y. J., JIN H. Y., YANG H. S., LEE S. C., HUH C. K., 2016: *Quality and storage characteristics of yogurt containing Lactobacillus sakei ALI033 and cinnamon ethanol extract*. Journal of Animal Science and Technology. 58(1): 16 DOI: 10.1186/s40781-016-0098-0. ISSN 2055-0391.
- CHUA, L. S., 2013: *A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities*. Journal of Ethnopharmacology. 150(3): 805-817. DOI: 10.1016/j.jep.2013.10.036. ISSN 03788741.
- CHYE F.Y., ABDULLAH A., AYOB M. K., 2004: *Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia*. Food Microbiology. 21(5): 535-541. DOI: 10.1016/j.fm.2003.11.007. ISSN 07400020.
- IKIGAI H., NAKAE T., HARA Y., SHIMAMURA T., 1993: *Bactericidal catechins damage the lipid bilayer*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 1.1147(1): 132-136. DOI: 10.1016/0005-2736(93)90323-R. ISSN: 0005-2736.
- ISMAIL S. A. S., DEAK T., ABD EL-RAHMAN H. A., YASSIEN M. A. M., BEUCHAT L. R., 2001: *Effectiveness of immersion treatments with acids, trisodium phosphate, and herb decoctions in reducing populations of Yarrowia lipolytica and naturally occurring aerobic microorganisms on raw chicken*. International Journal of Food Microbiology. 64(1-2): 13-19. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00424-4. ISSN 01681605.
- JIANU C., POP G., GRUIA A., HORHAT F. G., 2013: *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of Lavender (Lavandula angustifolia) and Lavandin (Lavandula x intermedia) Grown in Western Romania*. International Journal of Agriculture & Biology. 15: 772–776. ISSN 1814–9596.
- KARATZAS A. K., KETS E. P. W., SMID E. J., BENNIK M. H. J., 2001: *The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on Listeria monocytogenes Scott A*. Journal of Applied Microbiology. 90(3): 463-469. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01266.x. ISSN 1364-5072.
- KHANJARI A., KARABAGIAS I. K., KONTOMINAS M. G., 2013: *Combined effect of N,O-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control Listeria monocytogenes in raw chicken meat fillets*. LWT – Food Science and Technology. 53(1): 94-99. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.02.012. ISSN 00236438.

KIHAL M., GUESSAS B., 2004: *Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk*. African Journal of Biotechnology. 3(6): 339-342. ISSN 1684-5315

KISKA D. L., 1998: *In vitro testing of antimicrobial agents*. Seminars in Pediatric Infectious Diseases. 9(4): 281-291. DOI: 10.1016/S1045-1870(98)80017-4. ISSN 10451870.

KIVANÇ M., AKGÜL A., DOĞAN A., 1991: *Inhibitory and stimulatory effects of cumin, oregano and their essential oils on growth and acid production of Lactobacillus plantarum and Leuconostoc mesenteroides*. International Journal of Food Microbiology. 13(1): 81-85. DOI: 10.1016/0168-1605(91)90140-K. ISSN 01681605.

KLANČNIK A., PISKERNIK S., MOŽINA S. S., JERŠEK L. B., 2011: *Investigation of some factors affecting the antibacterial activity of rosemary extracts in food models by a food microdilution method*. International Journal of Food Science. 46(2): 413-420. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02504.x. ISSN 09505423.

KOSSE D., SEILER H., AMANN R., LUDWIG W., S. SCHERER, 1997: *Identification of Yoghurt-spoiling Yeasts with 18S rRNA-targeted Oligonucleotide Probes*. Systematic and Applied Microbiology. 20(3): 468-480. DOI: 10.1016/S0723-2020(97)80016-1. ISSN 07232020.

KRAŚNIEWSKA K., GNIEWOSZ M., SYNOWIEC A., PRZYBYŁ J. L., BĄCZEK K., WĘGLARZ Z., 2014: *The use of pullulan coating enriched with plant extracts from *Satureja hortensis* L. to maintain pepper and apple quality and safety*. Postharvest Biology and Technology. 90: 63-72. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2013.12.010. ISSN 09255214.

KUPER K. M., BOLES D. M., MOHR J. F., WANGER A., 2009: *Antimicrobial Susceptibility Testing: A Primer for Clinicians*. Pharmacotherapy. 29(11): 1326–1343. DOI: 10.1592/phco.29.11.1326. ISSN: 1875-9114.

KYUNG K. H., 2012: *Antimicrobial properties of allium species*. Current Opinion in Biotechnology. 23(2): 142-147. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.08.004. ISSN 09581669.

- LADERO V., FERNÁNDEZ M., CUESTA I., ALVAREZ M. A., 2010: *Quantitative detection and identification of tyramine-producing enterococci and lactobacilli in cheese by multiplex qPCR*. Food Microbiology. 27(7): 933-939. DOI: 10.1016/j.fm.2010.05.026. ISSN 07400020.
- LAI, P., ROY J., 2004: *Antimicrobial and Chemopreventive Properties of Herbs and Spices*. Current Medicinal Chemistry. 11(11): 1451-1460. DOI: 10.2174/0929867043365107. ISSN: 1875-533X.
- LARSON A. E., YU R. R. Y., LEE O. A., PRICE S., HAAS G. J., JOHNSON E. A., 1996: *Antimicrobial activity of hop extracts against Listeria monocytogenes in media and in food*. International Journal of Food Microbiology. 33(2-3): 195-207. DOI: 10.1016/0168-1605(96)01155-5. ISSN 01681605.
- LEUSCHNER R. G. K., IELSCH V., 2003: *Antimicrobial effects of garlic, clove and red hot chilli on Listeria monocytogenes in broth model systems and soft cheese*. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 54(2): 127-133. DOI: 10.1080/0963748031000084070. ISSN 0963-7486.
- LEVIĆ J., ČABARKAPA I., TODOROVIĆ G., PAVKOV S., SREDANOVIĆ S., COGHILL-GALONJA T., KOSTADINOVIĆ L., 2011: *In vitro antibacterial activity of essential oils from plant family Lamiaceae*. Romanian Biotechnological Letters. 16(2), 6034-6041. ISSN: 1222-3891.
- LI R., TEE C.-S., JIANG Y.-L., JIANG X.-Y., VENKATESH P. N., SAROJAM R., YE J., 2015: *A terpenoid phytoalexin plays a role in basal defense of Nicotiana benthamiana against Potato virus X*. Scientific Reports. 5: 9682-. DOI: 10.1038/srep09682. ISSN 2045-2322.
- LIBRÁN C. M., MORO A., ZALACAIN A., MOLINA A., CARMONA M., BERRUGA M. I., 2013: *Potential application of aromatic plant extracts to prevent cheese blowing*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 29(7): 1179-1188. DOI: 10.1007/s11274-013-1280-x. ISSN 0959-3993.
- LIS-BALCHIN M. *Lavender the Genus Lavandula*. London: CRC Press, 2002. ISBN 02-032-1652-0.

- LIU Z.-H., YAN H., LIU H. Y., 2015: *Chemical Constituents and Their Bioactivities of Plants of Taccaceae*. Chemistry. 12(2): 221-238. DOI: 10.1002/cbdv.201300353. ISSN 16121872.
- LIXANDRU B. E., DRĂCEA N. O., DRAGOMIRESCU C. C., 2010: *Antimicrobial activity of plant essential oils against bacterial and fungal species involved in food poisoning and/or food decay*. Romanian archives of microbiology and immunology. 69(4), 224-230. ISSN: 1222-3891.
- LOEFFLER M., BEISER S., SURIYARAK S., GIBIS M., WEISS J., 2014: *Antimicrobial Efficacy of Emulsified Essential Oil Components against Weak Acid-Adapted Spoilage Yeasts in Clear and Cloudy Apple Juice*. Journal of Food Protection. 77(8): 1325-1335. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-13-393. ISSN 0362028x.
- LOPANDIC K., ZELGER S., BÁNSZKY L. K., ELISKASES-LECHNER F., PRILLINGER H., 2006: *Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques*. Food Microbiology. 23(4): 341-350. DOI: 10.1016/j.fm.2005.05.001. ISSN 07400020.
- LÓPEZ P., SÁNCHEZ C., BATLLE R., NERÍN C., 2005: *Solid- and Vapor-Phase Antimicrobial Activities of Six Essential Oils: Susceptibility of Selected Foodborne Bacterial and Fungal Strains*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(17): 6939-6946. DOI: 10.1021/jf050709v. ISSN 0021-8561.
- MAHADY G. B., HUANG Y., DOYLE B. J., LOCKLEAR T., 2008: *Natural products as antibacterial agents*. Studies in Natural Products Chemistry. 35: 423-444. DOI: 10.1016/S1572-5995(08)80011-7. ISBN: 978-0-444-63932-5.
- MAHMOUDI R., TAJIK H., EHSANI A., FARSHID A. A., ZARE P., HADIAN M., 2013: *Effects of Mentha longifolia L. essential oil on viability and cellular ultrastructure of Lactobacillus casei during ripening of probiotic Feta cheese*. International Journal of Dairy Technology. 66(1): 77-82. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2012.00867.x. ISSN 1364727x.
- MAAROUFI S. H., REZAEI K., RAFTANIAMIRI Z., MIRZAEI F., 2015: *Evaluating the effects of herbal essences from spearmint and wild thyme on the quality of camel's milk*. International Journal of Food Science & Technology. 50(10): 2168-2174. DOI: 10.1111/ijfs.12855. ISSN 09505423.

- MARHAMATIZADEH M. H., SHAHRIARPOOR M. S., REZAZADEH S., 2012: *Effects of chamomile essence on the growth of probiotic bacteria, Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus acidophilus in milk and yoghurt*. Global Veterinaria. 8(6): 605-611. ISSN 1992-6197.
- MARINO M., BERSANI C., COMI G., 2001: *Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae*. International Journal of Food Microbiology. 67(3): 187-195. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00447-0. ISSN 01681605.
- MARTH E. H., STEELE J. L. *Applied dairy microbiology*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: M. Dekker, c2001, xiii, 744 s. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 110. ISBN 08-247-0536-X.
- MARTINS N., BARROS L., HENRIQUES M., SILVA S., FERREIRA I. C. F. R., 2015: *Activity of phenolic compounds from plant origin against Candida species*. Industrial Crops and Products. 74: 648-670. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.05.067. ISSN 09266690.
- MARTÍN-PLATERO A. M., VALDIVIA E., MAQUEDA M., MARTÍNEZ-BUENO M., 2009: *Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses*. International Journal of Food Microbiology. 132(1): 24-32. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.010. ISSN 01681605.
- MARTUCCI J. F., GENDE L. B., NEIRA L. M., RUSECKAITE R. A., 2015: *Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films*. Industrial Crops and Products. 71: 205-213. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.03.079. ISSN 09266690.
- MASIELLO S. N., MARTIN N. H., TRMČÍČ A., WIEDMANN M.a BOOR K. J., 2016: *Identification and characterization of psychrotolerant coliform bacteria isolated from pasteurized fluid milk*. Journal of Dairy Science. 99(1): 130-140. DOI: 10.3168/jds.2015-9728. ISSN 00220302.
- MAU J.-L., CHEN C. P., HSIEH P.-C., 2001: *Antimicrobial Effect of Extracts from Chinese Chive, Cinnamon, and Corni Fructus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49(1): 183-188. DOI: 10.1021/jf000263c. ISSN 0021-8561.

MAYAUD L., CARRICAJÓ A., ZHIRI A., AUBERT G., 2016: *Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics*. Letters in Applied Microbiology. 47(3): 167-173. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02406.x. ISSN 02668254.

MCAULEY C. M., BRITZ M. L., GOBIUS K. S., CRAVEN H. M., 2015: *Prevalence, seasonality, and growth of enterococci in raw and pasteurized milk in Victoria, Australia*. Journal of Dairy Science. 98(12): 8348-8358. DOI: 10.3168/jds.2015-9335. ISSN 00220302.

MEXIS S. F., CHOULIARA E., KONTOMINAS M. G., 2009: *Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4 °C*. Food Microbiology. 26(6): 598-605. DOI: 10.1016/j.fm.2009.04.002. ISSN 07400020.

MILLER A. B., CATES R. G., LAWRENCE M., SORIA J. A. F., ESPINOZA L. V., MARTINEZ J. V., ARBIZÚ D. A., 2014: *The antibacterial and antifungal activity of essential oils extracted from Guatemalan medicinal plants*. Pharmaceutical Biology. 53(4): 548-554. DOI: 10.3109/13880209.2014.932391. ISSN 1388-0209.

MOHAMED S. H. S., ZAKY W. M., KASSEM J. M., ABBAS H. M., SALEM M. M. E., SAID-AL AHL H. A. H., 2013: *Impact of antimicrobial properties of some essential oils on cheese yoghurt quality*. World Applied Sciences Journal. 27(4): 497-507. DOI: 10.5829/idosi.wasj.2013.27.04.13623. ISSN 1818-4952.

MOMTAZ M. D., SAHARI A., BARZEGAR M., HASHEMI S. S., 2013: *Antimicrobial effect of Lavandula angustifolia on some microbial parameters of buttermilk preservation*. In SAHARI A. M., ASGARI S., 2013: *Effects of Plants Bioactive Compounds on Foods Microbial Spoilage and Lipid Oxidation*. LWT – Food Science and Technology. 1(3), 52- 61. DOI: 10.13189/fst.2013.010303. ISSN: 0023-6438.

MOORE-NEIBEL K., GERBER C., PATEL J., FRIEDMAN M., JARONI D., RAVISHANKAR S., 2013: *Antimicrobial activity of oregano oil against antibiotic-resistant Salmonella enterica on organic leafy greens at varying exposure times and storage temperatures*. Food Microbiology. 34(1): 123-129. DOI: 10.1016/j.fm.2012.12.001. ISSN 07400020.

- MORANDI S., BRASCA M., ANDRIGHETTO C., LOMBARDI A., LODI R., 2006: *Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north-west Italian dairy products*. International Dairy Journal. 16(8), 867-875. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.09.005. ISSN 09586946.
- MORITZ C. M. F, RALL V. L. M., SAEKI M. J., FERNANDES A., 2012: *Inhibitory effect of essential oils against Lactobacillus rhamnosus and starter culture in fermented milk during its shelf-life period*. Brazilian Journal of Microbiology. 43(3): 1147-1156. ISSN 1517-8382.
- MOSTAFA H. A. M., EL-BAKRY A. A., ALAM E. A., 2011: *Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of different plant parts of Rumex vesicarius L. (Polygonaceae)*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 3(2): 109-118. ISSN 09751491.
- MUSTAPA A. N., MARTIN Á., MATO R. B., COCERO M. J., 2015: *Extraction of phytochemicals from the medicinal plant Clinacanthus nutans Lindau by microwave-assisted extraction and supercritical carbon dioxide extraction*. Industrial Crops and Products. 74: 83-94. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.04.035. ISSN 09266690.
- NASCIMENTO G. G. F., LOCATELLI J., FREITAS P. C., SILVA G. L., 2000: *Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria*. Brazilian journal of microbiology. 2000, **31**(4), 247-256. ISSN 1678-4405.
- NAYAK B., DAHMOUNE F., MOUSSI K., REMINI H., DAIRI S., AOUN O., KHODIR M., 2015: *Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from Citrus sinensis peels*. Food Chemistry. 187: 507-516. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.04.081. ISSN 03088146.
- NEVAS M., KORHONEN A. R., LINDSTRÖM M., TURKKI P., KORKEALA H., 2004: *Antibacterial Efficiency of Finnish Spice Essential Oils against Pathogenic and Spoilage Bacteri*. Journal of Food Protection. 67(1): 199-202. ISSN 0362028X.
- NIETO-ARRIBAS P., SESEÑA S., POVEDA J. M., CHICÓN R., CABEZAS L., PALOP L., 2011: *Enterococcus populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects*. Food Microbiology. 28(5): 891-899. DOI: 10.1016/j.fm.2010.12.005. ISSN 07400020.

NIKJOOY S., HASHEMI S. H., 2015: *Study the possibility of producing symbiotic yogurt containing lactobacillus casei and wild thyme extract*. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 8(1): 61-67. ISSN 2227-670X.

NIKOLIĆ M., JOVANOVIĆ K. K., MARKOVIĆ T., MARKOVIĆ D., GLIGORIJEVIĆ N., RADULOVIĆ S., SOKOVIĆ M., 2014: *Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils*. Industrial Crops and Products. 61: 225-232. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.07.011. ISSN 09266690.

NIMJE P. D., GARG H., GUPTA A., SRIVASTAVA N., KATIYAR M., RAMALINGAN C., 2013: *Comparison of antimicrobial activity of Cinnamomum zeylanicum and Cinnamomum cassia on food spoilage bacteria and water borne bacteria*. Der Pharmacia Lettre. 5: 53-59. ISSN 0975-5071.

NOWAK A., KALEMBA D., KRALA L., PIOTROWSKA M., CZYZOWSKA A., 2012: *The effects of thyme (Thymus vulgaris) and rosemary (Rosmarinus officinalis) essential oils on Brochothrix thermosphacta and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere*. Food Microbiology. 32(1): 212-216. DOI: 10.1016/j.fm.2012.05.001. ISSN 07400020.

NTZIMANI A. G., GIATRAKOU V. I., SAVVAIDIS I. N., 2010: *Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4°C: Microbiological and sensory evaluation*. Innovative Food Science. 11(1): 187-196. DOI: 10.1016/j.ifset.2009.09.004. ISSN 14668564.

OLECHNOWICZ J., JÁSKOWSKI J. M., 2012: *Somatic Cells Count in Cows Bulk Tank Milk*. Journal of Veterinary Medical Science. 74(6): 681-686. DOI: 10.1292/jvms.11-0506. ISSN 0916-7250.

OLIVER S. P., BOOR K. J., MURPHY S. C., MURINDA S. E., 2009: *Food Safety Hazards Associated with Consumption of Raw Milk*. Foodborne Pathogens and Disease. 6(7): 793-806. DOI: 10.1089/fpd.2009.0302. ISSN 1535-3141.

OTAIBI M. A., EI DEMERDASH H., 2008: *Improvement of the quality and shelf life of concentrated yoghurt (labneh) by the addition of some essential oils*. African Journal of Microbiology Research. 2(7), 156-161. ISSN 1996-0808.

OUSSALAH M., CAILLET S., SAUCIER L., LACROIX M., 2007: *Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157*. Food Control. 18(5): 414-420. DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.11.009. ISSN: 0956-7135.

PAVELA, R. *Rostlinné insekticidy: hubíme hmyz bez chemie*. Praha: Grada, 2006, 75 s., s. obr. příl. ISBN 80-247-1019-6.

PAVELA R., BÁRNET M. *Alternativní plodina routa vonná (Ruta graveolens L.): pěstování, význam, využití v ochraně rostlin: uplatněná certifikovaná metodika*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2011, 24 s. ISBN 978-80-87011-71-3.

PINA-PÉREZ M. C., SILVA-ANGULO A. B., MUGUERZA-MARQUÍNEZ B., ALIAGA D. R., LÓPEZ A. M., 2009: *Synergistic Effect of High Hydrostatic Pressure and Natural Antimicrobials on Inactivation Kinetics of Bacillus cereus in a Liquid Whole Egg and Skim Milk Mixed Beverage*. Foodborne Pathogens and Disease. 6(6), 649-656. DOI: 10.1089/fpd.2009.0268. ISSN 1535-3141.

PINA-PÉREZ M. C., MARTÍNEZ-LÓPEZ A., RODRIGO D., 2012: *Cinnamon antimicrobial effect against Salmonella typhimurium cells treated by pulsed electric fields (PEF) in pasteurized skim milk beverage*. Food Research International. 48(2): 777-783. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.06.027. ISSN 09639969.

PINA-PÉREZ M. C., RODRIGO D., MARTÍNEZ-LÓPEZ A., 2013: *Antimicrobial Potential of Flavoring Ingredients Against Bacillus cereus in a Milk-Based Beverage*. Foodborne Pathogens and Disease. 10(11): 969-976. DOI: 10.1089/fpd.2013.1560. ISSN 1535-3141.

PLAZA M., TURNER C., 2015: *Pressurized hot water extraction of bioactives*. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 71: 39-54. DOI: 10.1016/j.trac.2015.02.022. ISSN 01659936.

PURI M., SHARMA D., BARROW C. J., 2012: *Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants*. Trends in Biotechnology. 30(1): 37-44. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.06.014. ISSN 01677799.

RAZZAGHI-ABYANEH M., SHAMS-GHAHFAROKHI M. *Natural Inhibitors of Food-borne Fungi from Plants and Microorganisms*. In: RAI M., CHIKINDAS M. *Natural antimicrobials in food safety and quality*. Cambridge, MA: CABI, c2011, s. 182-203. ISBN 1845937694.

RICCIARDI A., GUIDONE A., IANNIELLO R. G., 2015: *A survey of non-starter lactic acid bacteria in traditional cheeses: Culture dependent identification and survival to simulated gastrointestinal transit*. *International Dairy Journal*. 43: 42-50. DOI: 10.1016/j.idairyj.2014.11.006. ISSN 09586946.

ROBY M. H. H., SARHAN M. A., SELIM K. A.-H., KHALEL K. I., 2013: *Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare L.*) and chamomile (*Matricaria chamomilla L.*)*. *Industrial Crops and Products*. 44: 437-445. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.10.012. ISSN 09266690.

ROCÍO T. M., GARRIDO M. D., ESPINOSA M. C., LINARES M. B., 2015: *Effect of different format-solvent rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis*) on frozen chicken nuggets quality*. *Food Chemistry*. 172: 40-46. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.09.018. ISSN 03088146.

RODRIGUES S., FERNANDES F. A. N., DE BRITO E. S., SOUSA A. D., NARAIN N., 2015: *Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jabuticaba peel*. *Industrial Crops and Products*. 69: 400-407. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.02.059. ISSN 09266690.

RUIZ-NAVAJAS Y., VIUDA-MARTOS M., SENDRA E., PEREZ-ALVAREZ J. A., FERNÁNDEZ-LÓPEZ J., 2012: *Chemical characterization and antibacterial activity of *Thymus moroderi* and *Thymus piperella* essential oils, two *Thymus* endemic species from southeast of Spain*. *Food Control*. 27(2), 294-299. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.04.005. ISSN 09567135.

RUSENOVA N., PARVANOV P., 2009: *Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance*. *Trakia Journal of Sciences*. 7(1): 37-43. ISSN 1313-7050.

SACCHETTI G., MAIETTI S., MUZZOLI M., SCAGLIANTI M., MANFREDINI S., RADICE M., BRUNI R., 2005: *Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods*. Food Chemistry. 91(4), 621-632. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.06.031. ISSN 03088146.

SADEGHI E., BASTI A. A., NOORI N., KHANJARI A., PARTOVI R., 2012: *Effect of Cuminum cyminum L. essential oil and Lactobacillus acidophilus (a probiotic) on Staphylococcus aureus during the manufacture, ripening and storage of white brined cheese*. Journal of Food Processing and Preservation. 37(5): 449-455. DOI: 10.1111/j.1745-4549.2011.00664.x. ISSN 01458892.

SAMARŽIJA D., PODOREŠKI M., SIKORA S., SKELIN A., POGAČIĆ T., 2007: *Spoilage microorganisms in milk and dairy products*. Mljekarstvo. 4(57): 251-273. ISSN 0026704X.

SAMARŽIJA D., ZAMBERLIN Š., POGAČIĆ T., 2012: *Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality*. Mljekarstvo. 62: 77-95. ISSN 0026704X.

SARIKURKCU C., ZENGIN G., OSKAY M., UYSAL S., CEYLAN R., AKTUMSEK A., 2015: *Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two Origanum vulgare subspecies (subsp. vulgare and subsp. hirtum) essential oils*. Industrial Crops and Products. 70: 178-184. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.03.030. ISSN 09266690.

SARTORATTO A., MACHADO A. L. M., DELARMELENA C., FIGUEIRA G. M., DUARTE M. C. T., REHDER V. R. G., 2004: *Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil*. Brazilian Journal of Microbiology. 35(4): 275-280. DOI: 10.1590/S1517-83822004000300001. ISSN 1517-8382.

SELIM S., 2011: *Antimicrobial activity of essential oils against Vancomycin-Resistant enterococci (VRE) and Escherichia coli O157: H7 in feta soft cheese and minced beef meat*. Brazilian Journal of Microbiology. 42(1): 187-196. DOI: 10.1590/S1517-83822010005000005. ISSN 1517-8382.

- ȘERBAN E. S., IONESCU M., MATINCA D., MAIER C. S., BOJIȚĂ M. T., 2011: *Screening of the antibacterial and antifungal activity of eight volatile essential oils*. Farmacia. 59(3): 440-446. ISSN: 0014-8237.
- SERIO A., CHAVES-LÓPEZ C., PAPARELLA A., SUZZI G., 2010: *Evaluation of metabolic activities of enterococci isolated from Pecorino Abruzzese cheese*. International Dairy Journal. 20(7): 459-464. DOI: 10.1016/j.idairyj.2010.02.005. ISSN 09586946.
- SHAN B., CAI Y.-Z., BROOKS J. D., CORKE H., 2011: *Potential Application of Spice and Herb Extracts as Natural Preservatives in Cheese*. Journal of Medicinal Food. 14(3): 284-290. DOI: 10.1089/jmf.2010.0009. ISSN 1096-620x.
- SHARAFATI-CHALESHTORI R., ROKNI N., RAFIEIAN-KOPAEI M., DREES F., SALEHI E., 2015: *Antioxidant and antibacterial activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil in beef burger*. Journal of Agricultural Science and Technology. 17(4): 817-826. ISSN 16807073.
- SHORI A. B., BABA A. S., 2012: *Viability of lactic acid bacteria and sensory evaluation in Cinnamomum verum and Allium sativum-bio-yogurts made from camel and cow milk*. Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences. 11(1): 50-55. DOI: 10.1016/j.jaubas.2011.11.001. ISSN 18153852.
- SINGH G., KAPOOR I. P. S., SINGH, P., 2011: *Effect of volatile oil and oleoresin of anise on the shelf life of yogurt**. Journal of Food Processing and Preservation [online]. 35(6): 778-783. DOI: 10.1111/j.1745-4549.2011.00528.x. ISSN 01458892.
- SINGH, R., SANDHYA, 2011: *Microbial contamination in milk*. Food Engineering and Ingredients. 2(36): 25-27. ISSN 14712806.
- SINGLETERY K. G., 2010: *Ginger: An Overview of Health Benefits*. Nutrition Today. 45(4): 171-183. DOI: 10.1097/NT.0b013e3181ed3543. ISSN 0029-666x.
- SIROLI L., PATRIGNANI F., SERRAZANETTI D. I., TAPPI S., ROCCULI P., GARDINI F., LANCIOTTI R., 2015: *Natural antimicrobials to prolong the shelf-life of minimally processed lamb's lettuce*. Postharvest Biology and Technology. 103: 35-44. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2015.02.016. ISSN 09255214.

- SKANDAMIS, P. N., NYCHAS G.-J. E., 2000: *Development and Evaluation of a Model Predicting the Survival of Escherichia coli O157: H7 NCTC 12900 in Homemade Eggplant Salad at Various Temperatures, pHs, and Oregano Essential Oil Concentrations*. Applied and Environmental Microbiology. 66(4): 1646-1653. DOI: 10.1128/AEM.66.4.1646-1653.2000. ISSN 0099-2240.
- SMITH-PALMER A., STEWART J., FYFE L., 2001: *The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese*. Food Microbiology. 18(4): 463-470. DOI: 10.1006/fmic.2001.0415. ISSN: 0740-0020.
- SOFOS J. N., BEUCHAT L. R., DAVIDSON P. M., JOHNSON E. A., 1998: *Naturally Occurring Antimicrobials in Food*. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 28(2): 71-72. DOI: 10.1006/rtph.1998.1246. ISSN: 0273-2300.
- SOKOVIĆ M., GLAMOČLIJA J., MARIN P. D., BRKIĆ D., van GRIENSVEN L. J. L. D., 2010: *Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model*. Molecules. 15(11): 7532-7546. DOI: 10.3390/molecules15117532. ISSN 1420-3049.
- SOLÓRZANO-SANTOS F., MIRANDA-NOVALES M. G., 2012: *Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents*. Current Opinion in Biotechnology. 23(2): 136-141. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.08.005. ISSN: 0958-1669.
- SONBOLIA A., BABAKHANIB B., MEHRABIANC A. R., 2006: *Antimicrobial Activity of Six Constituents of Essential Oil from Salvia*. Zeitschrift für Naturforschung. 61(3-4): 160-164. DOI: 10.1515/znc-2006-3-401. ISSN 0939-5075.
- SUPPAKUL P., MILTZ J., SONNEVELD K., BIGGER S. W., 2003: *Antimicrobial Properties of Basil and Its Possible Application in Food Packaging*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(11): 3197-3207. DOI: 10.1021/jf021038t. ISSN 0021-8561.
- SUZZI G., CARUSO M., GARDINI F., LOMBARDI A., VANNINI L., GUERZONI M. E., ANDRIGHETTO C., LANORTE M. T., 2000: *A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino)*. Journal of Applied Microbiology. 89(2): 267-274. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01120.x. ISSN: 1365-2672.

- SYNOWIEC A., GNIEWOSZ M., KRAŚNIEWSKA K., PRZYBYŁ J. L., BĄCZEK K., WEGLARZ Z., 2014: *Antimicrobial and antioxidant properties of pullulan film containing sweet basil extract and an evaluation of coating effectiveness in the prolongation of the shelf life of apples stored in refrigeration conditions*. Innovative Food Science. 23: 171-181. DOI: 10.1016/j.ifset.2014.03.006. ISSN 14668564.
- TAJKARIMI M. M., IBRAHIM S. A., CLIVER D. O., 2010: *Antimicrobial herb and spice compounds in food*. Food Control. 21(9): 1199-1218. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.02.003. ISSN: 0956-7135.
- TASSOU C., KOUTSOUMANIS K., NYCHAS G.-J. E., 2000: *Inhibition of Salmonella enteritidis and Staphylococcus aureus in nutrient broth by mint essential oil*. Food Research International. 33: 273-280. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00047-8. ISSN: 0963-9969.
- TEPE B., DAFERERA D., SÖKMEN M., POLISSIOU M., SÖKMEN A., 2004: *In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils and Various Extracts of Thymus eigi M. Zohary et P.H. Davis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52(5): 1132-1137. DOI: 10.1021/jf035094l. ISSN 0021-8561.
- TEPE A. S., TEPE B., 2015: *Traditional use, biological activity potential and toxicity of Pimpinella species*. Industrial Crops and Products. 69: 153-166. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.01.069. ISSN 09266690.
- TIWARI B. K., VALDRAMIDIS V. P., BOURKE P., CULLEN P. *Application of Plant-based Antimicrobials in Food Preservation*. In: RAI M., CHIKINDAS M. *Natural antimicrobials in food safety and quality*. Cambridge, MA: CABI, 2011, s. 204-223. ISBN 1845937694.
- TIWARI B. K., VALDRAMIDIS V. P., O' DONNELL C. P., MUTHUKUMARAPPAN K., BOURKE P., CULLEN P. J., 2009: *Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57(14): 5987-6000. DOI: 10.1021/jf900668n. ISSN 0021-8561.

- TORMO H., LEKHAL D. A. H., ROQUES C., 2015: *Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk and effect of farming practices on the dominant species of lactic acid bacteria*. International Journal of Food Microbiology. 210: 9-15. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.002. ISSN 01681605.
- TSEROVSKA L., STEFANOVA S., YORDANOVA T., 2002: *Identification of lactic acid bacteria isolated from katyk, goat's milk and cheese*. Journal of Culture collections. 3: 48-52. ISSN: 1310-8360.
- TSIGARIDA E., SKANDAMIS P., NYCHAS G-J. E., 2000: *Behaviour of Listeria monocytogenes and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C*. Journal of Applied Microbiology. 89(6): 901-909. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01170.x. ISSN 1364-5072.
- TURGIS M., VU K. D., DUPONT C., LACROIX M., 2012: *Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria*. Food Research International. 48(2): 696-702. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.06.016. ISSN 09639969.
- VALERO M., SALMERÓN M. C., 2003: *Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth*. International Journal of Food Microbiology. 85(1-2): 73-81. DOI: 10.1016/S0168-1605(02)00484-1. ISSN 01681605.
- VALIZADEH S., KATIRAEI F., MAHMOUDI R., FAKHERI T., MARDANI K. S., 2015: *Biological Properties of Cinnamomum zeylanicum Essential Oil: Phytochemical Component, Antioxidant and Antimicrobial Activities*. Int. J. Food Nutr. Safety. 6(3): 174-184. ISSN: 1745-4565.
- VARONA S., RODRÍGUEZ ROJO S., MARTÍN A., COCERO M. J., SERRA A. T., CRESPO T., DUARTE C. M. M., 2013: *Antimicrobial activity of lavandin essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria*. Industrial Crops and Products. 42: 243-250. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.05.020. ISSN 09266690.
- VILJOEN B. C., KHOURY A. R., HATTINGH A., 2003: *Seasonal diversity of yeasts associated with white-surface mould-ripened cheeses*. Food Research International. 36(3): 275-283. DOI: 10.1016/S0963-9969(02)00169-2. ISSN 09639969.

- VOON H. C., BHAT R., RUSUL G. R., 2012: *Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 11(1): 34-55. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x. ISSN: 1541-4337.
- WAN J., WILCOCK A., COVENTRY M. J., 1998: *The effect of essential oils of basil on the growth of Aeromonas hydrophila and Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 152–158. ISSN: 1364-5072.
- WEERAKKODY N. S., CAFFIN N., TURNER M. S., DYKES G. A., 2010: *In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria*. *Food Control*. 21(10): 1408-1414. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.04.014. ISSN 09567135.
- WILKINSON J. M. *Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts*. *Modern Phytomedicine*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2006: 157. DOI: 10.1002/9783527609987.ch8. ISBN 9783527609987.
- WONG P., KITTS D., 2006: *Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (Petroselinum crispum) and cilantro (Coriandrum sativum) extracts*. *Food Chemistry*. 97(3): 505-515. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.05.031. ISSN 03088146.
- YANG G., YUE J., GONG X., QIAN B., WANG H., DENG Y., ZHAO Y., 2014: *Blueberry leaf extracts incorporated chitosan coatings for preserving postharvest quality of fresh blueberries*. *Postharvest Biology and Technology*. 92: 46-53. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2014.01.018. ISSN 09255214.
- YU J., WANG H. M., ZHA M. S., 2015: *Molecular identification and quantification of lactic acid bacteria in traditional fermented dairy foods of Russia*. *Journal of Dairy Science*. 98(8), 5143-5154. DOI: 10.3168/jds.2015-9460. ISSN 00220302.
- ZAKY W. M., KASSEM J. M., ABBAS H. M., MOHAMED S. H. S., 2013: *Evaluation of salt-free labneh quality prepared using dill and caraway essential oils*. *Life Science Journal*. 10(4): 3379-3386. DOI: 10.7537/marslsj100413.505. ISSN: 1097-8135.

ZHANG L., YANG D., WANG Q., YUAN Z., WU H., PEI D., CONG M., LI F., JI C., 2015: *A defensin from clam Venerupis philippinarum: Molecular characterization, localization, antibacterial activity, and mechanism of action*. *Developmental & Comparative Immunology*. 51(1): 29-38. DOI: 10.1016/j.dci.2015.02.009. ISSN 0145305x.

ZHAO J., DENG J. W., CHEN Y. W., LI S. P., 2013: *Advanced phytochemical analysis of herbal tea in China*. *Journal of Chromatography*. 1313: 2-23. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.07.039. ISSN 00219673.

ZIELIŃSKA S., MATKOWSKI A., 2014: *Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus Agastache (Lamiaceae)*. *Phytochemistry Reviews*. 13(2): 391-416. DOI: 10.1007/s11101-014-9349-1. ISSN: 1568-7767.

9 SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Patogenní mikroorganismy s možným výskytem v mléce a mléčných výrobcích (Marth et Steele, 2001 - upraveno).....	48
Tab. 2 Podmínky kultivace při izolaci mikroorganismů	51
Tab. 3 Charakteristika vzorků pro izolaci gramnegativních bakterií	52
Tab. 4 Charakteristika vzorků pro izolaci enterokoků	53
Tab. 5 Charakteristika vzorků pro izolaci bakterií mléčného kysání	54
Tab. 6 Charakteristika vzorků pro izolaci kvasinek	55
Tab. 7 Kultivační podmínky bakterií a kvasinek použitých pro metodu zředování v bujónu	58
Tab. 8 Přehled bylin použitých k přípravě výluhů	59
Tab. 9 Množství esenciálních olejů a vodných výluhů přidávaných do syrovátky.....	60
Tab. 10 Podmínky kultivace sledovaných mikroorganismů	61
Tab. 11 Výsledky identifikace izolovaných mikroorganismů z mléka a mléčných výrobků – gramnegativní bakterie.....	65
Tab. 12 Výsledky identifikace izolovaných mikroorganismů z mléka a mléčných výrobků – enterokoky.....	67
Tab. 13 Výsledky identifikace mikroorganismů izolovaných z mléka a mléčných výrobků – bakterie mléčného kysání	68
Tab. 14 Výsledky identifikace mikroorganismů izolovaných z mléka a mléčných výrobků – kvasinky	70
Tab. 15 Průměrné rozměry inhibičních zón aplikovaných esenciálních olejů v mm u gramnegativních bakterií.....	72
Tab. 16 Průměrné rozměry inhibičních zón aplikovaných esenciálních olejů v mm u enterokoků	75
Tab. 17 Průměrné rozměry inhibičních zón aplikovaných esenciálních olejů v mm u bakterií mléčného kysání.....	77
Tab. 18 Průměrné rozměry inhibičních zón aplikovaných esenciálních olejů v mm u kvasinek	79
Tab. 19 Metoda zředování v bujónu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Escherichia coli</i> CCM 7929	84
Tab. 20 Metoda zředování v bujónu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	85

Tab. 21 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1828.....	86
Tab. 22 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010	87
Tab. 23 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCM 8191	88
Tab. 24 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Enterococcus faecium</i> (7).....	91
Tab. 25 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Enterococcus sulfureus</i> (60I).....	92
Tab. 26 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Enterococcus solitarius</i> (60II).....	93
Tab. 27 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Escherichia hermanii</i> (6).....	96
Tab. 28 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> (75).....	97
Tab. 29 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Hafnia alvei</i> (59I).....	98
Tab. 30 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Raoultella terrigena</i> (59II).....	99
Tab. 31 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> (62).....	102
Tab. 32 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Lactobacillus acidophilus</i> (64).....	103
Tab. 33 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> (69).....	104
Tab. 34 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> (71).....	105
Tab. 35 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (74).....	106
Tab. 36 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1828.....	107
Tab. 37 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Candida kefyr</i> (1MF).....	110

Tab. 38 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCM 8191	111
Tab. 39 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Candida lipolytica</i> (1MK)	112
Tab. 40 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Candida kefyr</i> (10MFA)	113
Tab. 41 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Candida lipolytica</i> (15MFA)	114
Tab. 42 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Candida tropicalis</i> CCM 8223	115
Tab. 43 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Candida guilliermondii</i> (1S)	116
Tab. 44 Metoda zředování v bujonu – průměrné hodnoty absorbance pro testované koncentrace esenciálních olejů u <i>Candida guilliermondii</i> (6MFA)	117

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO skořice do syrovátky, I. experiment	118
Obr. 2 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO skořice do syrovátky, II. experiment	119
Obr. 3 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO skořice do syrovátky, III. experiment	120
Obr. 4 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu skořice do syrovátky, I. experiment	121
Obr. 5 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu skořice do syrovátky, II. experiment	122
Obr. 6 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu skořice do syrovátky, III. experiment	123
Obr. 7 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO tymiánu do syrovátky, I. experiment	126
Obr. 8 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO tymiánu do syrovátky, II. experiment	127
Obr. 9 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO tymiánu do syrovátky, III. experiment	127

Obr. 10 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu tymiánu do syrovátky, I. experiment.....	128
Obr. 11 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu tymiánu do syrovátky, II. experiment.....	129
Obr. 12 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu tymiánu do syrovátky, III. experiment.....	129
Obr. 13 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO levandule do syrovátky, I. experiment	132
Obr. 14 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO levandule do syrovátky, II. experiment	133
Obr. 15 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO levandule do syrovátky, III. experiment.....	133
Obr. 16 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu levandule do syrovátky, I. experiment.....	134
Obr. 17 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu levandule do syrovátky, II. experiment.....	135
Obr. 18 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu levandule do syrovátky, III. experiment.....	135
Obr. 19 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO fenyklu do syrovátky, I. experiment	137
Obr. 20 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO fenyklu do syrovátky, II. experiment	138
Obr. 21 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO fenyklu do syrovátky, III. experiment.....	139
Obr. 22 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu fenyklu do syrovátky, I. experiment	140
Obr. 23 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu fenyklu do syrovátky, II. experiment.....	140
Obr. 24 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu fenyklu do syrovátky, III. experiment.....	141
Obr. 25 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO anýzu do syrovátky, I. experiment	143
Obr. 26 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO anýzu do syrovátky, II. experiment	144

Obr. 27 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku EO anýzu do syrovátky, III. experiment.....	144
Obr. 28 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu anýzu do syrovátky, I. experiment	145
Obr. 29 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu anýzu do syrovátky, II. experiment	146
Obr. 30 Graf vývoje počtů mikroorganismů po přidavku výluhu anýzu do syrovátky, III. experiment.....	147

11 SEZNAM ZKRATEK

ATCC	americká sbírka mikroorganismů
ATP	adenosintrifosfát
CCM	česká sbírka mikroorganismů
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EAAE	enzymově asistovaná vodná extrakce
EACP	enzymově asistované lisování za studena
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EO	esenciální olej
KTJ	kolonie tvořící jednotka
MBC	minimální baktericidní koncentrace
McF	MacFarland
MetOH	methanol
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MO	mikroorganismus
SMODCH	směrodatná odchylka
TPF	trifenylformazan
TTC	trifenyltetrazolium chlorid
UHT	vysokoteplotní úprava
VRE	vankomycin-rezistentní enterokoky
Koli	koliformní bakterie
Koli s	koliformní bakterie obsažené v kontrolním vzorku syrovátky
Ent	enterokoky
Ent s	enterokoky obsažené v kontrolním vzorku syrovátky
TMRae	termorezistentní mikroorganismy aerobní

TMRae s	termorezistentní mikroorganismy aerobní obsažené v kontrolním vzorku syrovátky
TMRan	termorezistentní mikroorganismy anaerobní
TMRan s	termorezistentní mikroorganismy anaerobní obsažené v kontrolním vzorku syrovátky
CPM	celkový počet mikroorganismů
CPM s	celkový počet mikroorganismů obsažený v kontrolním vzorku syrovátky
BMK	bakterie mléčného kysání
BMK s	bakterie mléčného kysání obsažené v kontrolním vzorku syrovátky
Kv	kvasinky
Kv s	kvasinky obsažené v kontrolním vzorku syrovátky
Pl	plísňe
Pl s	plísňe obsažené v kontrolním vzorku syrovátky
PS	psychrotrofní mikroorganismy
PS s	psychrotrofní mikroorganismy obsažené v kontrolním vzorku syrovátky

12 PŘÍLOHY

Přílohy práce jsou uvedeny na přiloženém CD.

Příloha 1 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, skořice, šalvěje a kmínu na gramnegativní bakterie – prokázání inhibičního účinku testem průměrů vůči referenční konstantě

Příloha 2 Vliv esenciálních olejů skořice a šalvěje na gramnegativní bakterie – prokázání inhibičního účinku znaménkovým testem

Příloha 3 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, skořice, šalvěje a kmínu na gramnegativní bakterie – porovnání citlivosti mikroorganismů

Příloha 4 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule a kmínu na gramnegativní bakterie – rozdíly v účinnosti různých koncentrací EO; T-test

Příloha 5 Vliv esenciálních olejů šalvěje a skořice na gramnegativní bakterie – rozdíly v účinnosti různých koncentrací; znaménkový test

Příloha 6 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, skořice, šalvěje a kmínu na enterokoky – prokázání inhibičního účinku testem průměrů vůči referenční konstantě

Příloha 7 Vliv esenciálního oleje šalvěje na enterokoky – prokázání inhibičního účinku znaménkovým testem

Příloha 8 Popisná statistika pro účinky esenciálního oleje šalvěje – účinek EO

Příloha 9 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, skořice, šalvěje a kmínu na enterokoky – porovnání citlivosti mikroorganismů

Příloha 10 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, skořice, šalvěže a kmínu na enterokoky – zjištění mikroorganismů s prokazatelně odlišnou citlivostí

Příloha 11 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, skořice a kmínu na enterokoky – rozdíly v účinnosti různých koncentrací EO; T-test

Příloha 12 Vliv esenciálního oleje šalvěže na enterokoky – rozdíly v účinnosti různých koncentrací EO; znaménkový test

Příloha 13 Popisná statistika pro účinky esenciálního oleje šalvěže – účinek EO

Příloha 14 Vliv esenciálních olejů tymiánu, skořice, šalvěže a kmínu na bakterie mléčného kysání – prokázání inhibičního účinku testem průměrů vůči referenční konstantě

Příloha 15 Vliv esenciálního oleje kmínu na bakterie mléčného kysání – prokázání inhibičního účinku znaménkovým testem

Příloha 16 Popisná statistika pro účinky esenciálního oleje kmínu – účinek EO

Příloha 17 Vliv esenciálních olejů tymiánu, skořice, šalvěže a kmínu na bakterie mléčného kysání – porovnání citlivosti mikroorganismů

Příloha 18 Vliv esenciálních olejů tymiánu, skořice a šalvěže na bakterie mléčného kysání – rozdíly v účinnosti různých koncentrací EO; T-test

Příloha 19 Vliv esenciálního oleje kmínu na bakterie mléčného kysání – rozdíly v účinnosti různých koncentrací EO; znaménkový test

Příloha 20 Popisná statistika pro účinky esenciálního oleje kmínu – účinek EO

Příloha 21 Vliv esenciálních olejů rozmarýnu, meduňky a tymiánu na kvasinky – prokázání inhibičního účinku testem průměrů vůči referenční konstantě

Příloha 22 Vliv esenciálních olejů tymiánu a meduňky na kvasinky – prokázání inhibičního účinku znaménkovým testem

Příloha 23 Popisné statistiky pro účinky esenciálního oleje tymiánu a meduňky – účinky EO

Příloha 24 Vliv esenciálních olejů tymiánu, rozmarýnu a meduňky na kvasinky – porovnání citlivosti mikroorganismů

Příloha 25 Vliv esenciálních olejů rozmarýnu na kvasinky – rozdíly v účinnosti různých koncentrací EO; T-test

Příloha 26 Vliv esenciálních olejů tymiánu a meduňky na kvasinky – rozdíly v účinnosti různých koncentrací EO; znaménkový test

Příloha 27 Popisné statistiky pro účinky esenciálních olejů tymiánu a meduňky – účinky EO

Příloha 28 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, skořice, šalvěže, kmínu, rozmarýnu a meduňky na sledované skupiny mikroorganismů – porovnání citlivosti

Příloha 29 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, skořice, šalvěže, kmínu, rozmarýnu a meduňky na sledované skupiny mikroorganismů – zjištění skupin s prokazatelně odlišnou citlivostí

Příloha 30 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, skořice, šalvěže, kmínu, rozmarýnu a meduňky na sledované skupiny mikroorganismů – zjištění rozdílů v účinnosti jednotlivých EO

Příloha 31 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, skořice, šalvěže, kmínu, rozmarýnu a meduňky na skupiny mikroorganismů – zjištění dvojic EO s prokazatelně odlišným účinkem

Příloha 32 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, šalvěže, skořice a kmínu na čisté kultury – prokazatelnost inhibičních účinků

Příloha 33 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, šalvěže, skořice a kmínu na čisté kultury – porovnání účinnosti jednotlivých koncentrací EO

Příloha 34 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, šalvěže, skořice a kmínu na čisté kultury – změna účinku v čase

Příloha 35 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, šalvěže, skořice a kmínu na čisté kultury – rozdíl v účinnosti jednotlivých EO

Příloha 36 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, šalvěže, skořice a kmínu na čisté kultury – stanovení dvojic EO s odlišnými účinky na MO

Příloha 37 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, šalvěže, skořice a kmínu na čisté kultury – míra citlivosti jednotlivých mikroorganismů vůči EO

Příloha 38 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule, šalvěže, skořice a kmínu na čisté kultury – zjištění dvojic s odlišnou citlivostí vůči EO

Příloha 39 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule a skořice na enterokoky – prokazatelnost inhibičních účinků

Příloha 40 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule a skořice na enterokoky – porovnání účinnosti jednotlivých koncentrací EO

Příloha 41 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule a skořice na enterokoky – změna účinku v čase

Příloha 42 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule a skořice na enterokoky – rozdíl v účinnosti jednotlivých EO

Příloha 43 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule a skořice na enterokoky – stanovení dvojic EO s odlišnými účinky na MO

Příloha 44 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule a skořice na enterokoky – míra citlivosti jednotlivých MO vůči EO

Příloha 45 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule a skořice na gramnegativní mikroorganismy – prokazatelnost inhibičních účinků

Příloha 46 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule a skořice na gramnegativní mikroorganismy – porovnání účinnosti jednotlivých koncentrací EO

Příloha 47 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule a skořice na gramnegativní mikroorganismy – změna účinku v čase

Příloha 48 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule a skořice na gramnegativní mikroorganismy – rozdíl v účinnosti jednotlivých EO

Příloha 49 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule a skořice na gramnegativní mikroorganismy – stanovení dvojic EO s odlišnými účinky na MO

Příloha 50 Vliv esenciálních olejů tymiánu, levandule a skořice na gramnegativní mikroorganismy – míra citlivosti jednotlivých MO vůči EO

Příloha 51 Vliv esenciálních olejů tymiánu, skořice, šalvěže a kmínu na BMK – prokazatelnost inhibičních účinků; znaménkový test

Příloha 52 Vliv esenciálního oleje šalvěže na BMK – prokazatelnost inhibičních účinků; T-test

Příloha 53 Vliv esenciálních olejů tymiánu, skořice a kmínu na BMK – porovnání účinnosti jednotlivých koncentrací EO

Příloha 54 Popisná statistika pro tymián, skořici, kmín – účinnost esenciálních olejů tymiánu, skořice a kmínu

Příloha 55 Vliv esenciálních olejů tymiánu, skořice, šalvěže a kmínu na BMK – změna účinku v čase

Příloha 56 Vliv esenciálních olejů tymiánu, skořice, šalvěže a kmínu na BMK – rozdíl v účinnosti jednotlivých EO

Příloha 57 Vliv esenciálních olejů tymiánu, skořice, šalvěže a kmínu na BMK – stanovení dvojic EO s odlišnými účinky na MO

Příloha 58 Vliv esenciálních olejů tymiánu, skořice, šalvěže a kmínu na BMK – míra citlivosti jednotlivých MO vůči EO

Příloha 59 Vliv esenciálních olejů tymiánu, rozmarýnu a meduňky na kvasinky – prokazatelnost inhibičních účinků; znaménkový test

Příloha 60 Vliv esenciálního oleje tymiánu na kvasinky – prokazatelnost inhibičních účinků; T-test

Příloha 61 Vliv esenciálních olejů rozmarýnu a meduňky na kvasinky – porovnání účinnosti jednotlivých koncentrací EO

Příloha 62 Vliv esenciálních olejů tymiánu, rozmarýnu a meduňky na kvasinky – změna účinku v čase

Příloha 63 Vliv esenciálních olejů tymiánu, rozmarýnu a meduňky na kvasinky – rozdíl v účinnosti jednotlivých EO

Příloha 64 Vliv esenciálních olejů tymiánu, rozmarýnu a meduňky na kvasinky – stanovení dvojic EO s odlišnými účinky na MO

Příloha 65 Vliv esenciálních olejů tymiánu, rozmarýnu a meduňky na kvasinky – míra citlivosti jednotlivých MO vůči EO

Příloha 66 Účinnost esenciálního oleje anýzu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; první experiment

Příloha 67 Účinnost esenciálního oleje anýzu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; druhý experiment

Příloha 68 Účinnost esenciálního oleje anýzu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; třetí experiment

Příloha 69 Účinnost esenciálního oleje skořice na MO přítomné v syrovátce; první experiment

- Příloha 70 Účinnost esenciálního oleje skořice na mikroorganismy přítomné v syrovátce; druhý experiment
- Příloha 71 Účinnost esenciálního oleje skořice na mikroorganismy přítomné v syrovátce; třetí experiment
- Příloha 72 Účinnost esenciálního oleje fenyklu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; první experiment
- Příloha 73 Účinnost esenciálního oleje fenyklu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; druhý experiment
- Příloha 74 Účinnost esenciálního oleje fenyklu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; třetí experiment
- Příloha 75 Účinnost esenciálního oleje levandule na mikroorganismy přítomné v syrovátce; první experiment
- Příloha 76 Účinnost esenciálního oleje levandule na mikroorganismy přítomné v syrovátce; druhý experiment
- Příloha 77 Účinnost esenciálního oleje levandule na mikroorganismy přítomné v syrovátce; třetí experiment
- Příloha 78 Účinnost esenciálního oleje tymiánu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; první experiment
- Příloha 79 Účinnost esenciálního oleje tymiánu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; druhý experiment
- Příloha 80 Účinnost esenciálního oleje tymiánu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; třetí experiment
- Příloha 81 Účinnost výluhu anýzu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; první experiment
- Příloha 82 Účinnost výluhu anýzu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; druhý experiment
- Příloha 83 Účinnost výluhu anýzu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; třetí experiment
- Příloha 84 Účinnost výluhu fenyklu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; první experiment
- Příloha 85 Účinnost výluhu fenyklu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; druhý experiment
- Příloha 86 Účinnost výluhu fenyklu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; třetí experiment
- Příloha 87 Účinnost výluhu levandule na mikroorganismy přítomné v syrovátce; první experiment
- Příloha 88 Účinnost výluhu levandule na mikroorganismy přítomné v syrovátce; druhý experiment
- Příloha 89 Účinnost výluhu levandule na mikroorganismy přítomné v syrovátce; třetí experiment
- Příloha 90 Účinnost výluhu tymiánu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; první experiment

Příloha 91 Účinnost výluhu tymiánu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; druhý experiment

Příloha 92 Účinnost výluhu tymiánu na mikroorganismy přítomné v syrovátce; třetí experiment

Příloha 93 Účinnost výluhu skořice na mikroorganismy přítomné v syrovátce; první experiment

Příloha 94 Účinnost výluhu skořice na mikroorganismy přítomné v syrovátce; druhý experiment

Příloha 95 Účinnost výluhu skořice na MO přítomné v syrovátce; třetí experiment