

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Antimikrobiální účinky čajových nálevů a extraktů proti  
*Arcobacter* spp.

Bc. Michaela Šturmová

Diplomová práce

2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Šturmová**  
Osobní číslo: **C16624**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Antimikrobiální účinky čajových nálevů a extraktů proti *Arcobacter* spp.**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši vztahující se k zadanému tématu. V úvodu práce se věnujte shrnutí základních informací o bakteriálním rodu *Arcobacter*.
2. Zpracujte literární rešerši o antimikrobiálních účincích přírodních sloučenin a základních informacích o různých typech čajů.

Experimentální část:

1. Z vybraných vzorků čajů připravte čajové nálevy a ethanolové extrakty. Následně kulti-vačně otestujte přežívání vybraných kmenů arkobakterů v čajových nálevech. Srovnejte také antioxidační kapacitu testovaných vzorků.
2. Otestujte připravené čajové extrakty diskovou difúzní metodou a mikrodiluční metodou v mikrotitračních destičkách z hlediska jejich antimikrobiálního potenciálu proti bakteriím rodu *Arcobacter*.
3. Získané výsledky vhodným způsobem interpretujte.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 9/2012 Univerzity Pardubice a dále ve znění Dodatku č. 1 ke Směrnicí č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravou".

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. David Šilha, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

**20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce:

**11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura,  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

## Prohlášení

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 20. 4. 2018

.....  
Michaela Šturmová

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala panu Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D. za odborné připomínky, ochotu, čas a vstřícný přístup při vedení mé diplomové práce. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat svým blízkým a rodině za veškerou podporu v průběhu studia.

## **Anotace**

Tato diplomová práce se zabývá antimikrobiálními účinky čajových nálevů a extraktů proti *Arcobacter* spp. Teoretická část popisuje základní informace o bakteriálním rodu *Arcobacter*, jsou zde také uvedeny důležité přírodní antimikrobiální látky, jejich možné využití a samostatnou kapitolu tvoří jednotlivé druhy čajů, jejich rozdělení a základní vlastnosti. Nejdůležitější část je věnována testování antimikrobiálních účinků 7 různých čajových nálevů a extraktů proti *Arcobacter* spp. Testování bylo provedeno s využitím kultivačních postupů pro zjišťování přežívání daných bakterií v čajových nálevech. Dále byla využita disková difúzní metoda pro zjišťování inhibičních účinků čajových extraktů a mikrodiluční metoda pro stanovení minimální inhibiční koncentrace.

## **Klíčová slova**

*Arcobacter*, čaj, čajový extrakt, čajový nálev, antimikrobiální účinky, disková difúzní metoda, mikrodiluční metoda

## **Title**

Antimicrobial effects of tea infusions and extracts against *Arcobacter* spp.

## **Annotation**

This diploma thesis deals with antimicrobial effects of tea infusions and extract against *Arcobacter* spp. The theoretical part explains the basic information about the bacterial genus *Arcobacter*, it also provides important natural antimicrobial agents, their possible use and the tea chapter that describes individual types of tea, distribution and its basic properties. The most important part focuses on testing the antimicrobial effects of 7 different tea infusions and extracts against *Arcobacter* spp. The testing was carried out by using culture methods for detecting the survival of the bacteria in tea infusion. Further, the used disk diffusion method for determining the inhibitory effects of tea extracts and microdilution method for determining the minimum inhibitory concentration was used.

## **Keywords**

*Arcobacter*, tea, tea extract, tea infusion, antimicrobial effects, disk diffusion method, microdilution method

# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ.....	10
SEZNAM TABULEK .....	11
SEZNAM GRAFŮ .....	12
SEZNAM ZKRATEK.....	13
ÚVOD .....	15
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>16</b>
1.1 <i>ARCOBACTER SPP.</i> .....	16
1.1.1 Základní vlastnosti .....	16
1.1.1.1 Kultivační podmínky a růst .....	17
1.1.2 Výskyt arkobakterů .....	17
1.1.3 Přenos arkobakterů a onemocnění .....	18
1.1.4 Rizikové zdroje <i>Arcobacter spp.</i> .....	19
1.1.5 Rezistence a antibiotika .....	19
1.1.6 Identifikace bakterií .....	20
1.2 PŘÍRODNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY .....	20
1.2.1 Historické využití rostlin jako antimikrobiálních látek .....	21
1.2.2 Definice přírodních látek .....	21
1.2.3 Proč využívat antimikrobiální látky? .....	21
1.2.4 Získání a využití antimikrobiálních látek .....	22
1.2.5 Důležité přírodní složky .....	22
1.2.6 Inhibiční účinek na bakterie.....	23
1.3 ČAJE A ČAJOVÉ EXTRAKTY .....	24
1.3.1 <i>Camellia sinensis L.</i> .....	24
1.3.1.1 Stavba čajovníku .....	24
1.3.1.2 Základní druhy čajů a jejich výroba .....	25
1.3.1.3 Složení čajů.....	26
1.3.2 Zelený čaj .....	26
1.3.2.1 Chemické složení .....	26
1.3.2.2 Výroba čaje.....	27
1.3.2.3 Účinek zeleného čaje na bakterie <i>Helicobacter spp.</i> .....	28
1.3.3 Bílý čaj .....	28

1.3.3.1	Základní vlastnosti a výroba .....	28
1.3.4	Žlutý čaj.....	29
1.3.4.1	Základní vlastnosti a výroba .....	29
1.3.5	Oolong .....	29
1.3.5.1	Výroba čaje oolong .....	29
1.3.6	Černý čaj.....	30
1.3.6.1	Chemické složení .....	30
1.3.6.2	Proces výroby .....	30
1.3.6.3	Účinek černého čaje na bakterie <i>C. jejuni</i> a <i>C. coli</i> .....	31
1.3.7	Pu-erh .....	32
1.3.7.1	Základní vlastnosti a výroba .....	32
1.3.7.2	Chemické složení .....	32
1.3.7.3	Účinek čaje Pu-erh na bakterii <i>Escherichia coli</i> .....	32
1.3.8	Rooibos.....	33
1.3.8.1	Základní vlastnosti .....	33
1.3.8.2	Interakce čaje s léčivý .....	33
1.3.9	Antimikrobiální účinky čajů .....	34
1.3.9.1	Metabolismus polyfenolů .....	35
1.3.9.2	Možné mechanismy účinků katechinů .....	35
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>37</b>
2.1	POUŽITÝ MATERIÁL, PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	37
2.1.1	Kultivační média .....	37
2.1.2	Chemikálie.....	38
2.1.3	Pomůcky .....	39
2.1.4	Přístroje .....	39
2.2	VZORKY SYPANÝCH ČAJŮ ZAHRNUTÝCH DO STUDIE .....	40
2.3	POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KMENY .....	42
2.3.1	Uchovávání bakteriálních kmenů.....	42
2.3.2	Příprava bakteriální suspenze .....	42
2.4	PŘÍPRAVA ČAJOVÝCH NÁLEVŮ A PŘEŽÍVÁNÍ <i>ARCOBACTER</i> SPP. V ČAJOVÝCH NÁLEVECH .....	43
2.5	PŘÍPRAVA ČAJOVÝCH EXTRAKTŮ .....	44
2.6	STANOVENÍ CITLIVOSTI ARKOBACTERŮ DISKOVOU DIFÚZNÍ METODOU .....	44
2.7	STANOVENÍ MINIMÁLNÍCH INHIBIČNÍCH KONCENTRACÍ ČAJOVÝCH EXTRAKTŮ .....	45
2.8	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY ČAJOVÝCH NÁLEVŮ .....	47
2.8.1	Vyjádření výsledků .....	47



<b>3</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	49
3.1	PŘEŽÍVÁNÍ <i>ARCOBACTER</i> SPP. V ČAJOVÝCH NÁLEVECH.....	49
3.1.1	Zelený čaj – SENCHA MAKATO .....	50
3.1.2	Bílý čaj – CHINA PAI MU TAN .....	51
3.1.3	Žlutý čaj – HUANG DA CHA.....	52
3.1.4	Oolong – OOLONG CHINA SE CHUNG.....	53
3.1.5	Černý čaj – ASSAM TGFOP1 SONIPUR BIO.....	54
3.1.6	Pu-erh – PU ERH STD.....	55
3.1.7	Rooibos – ROOIBOS TEA SUPERGRADE BIO.....	56
3.2	STANOVENÍ CITLIVOSTI <i>ARCOBACTER</i> SPP. DISKOVOU DIFÚZNÍ METODOU .....	57
3.2.1	Zelený čaj – SENCHA MAKATO .....	58
3.2.2	Bílý čaj – CHINA PAI MU TAN .....	60
3.2.3	Žlutý čaj – HUANG DA CHA.....	61
3.2.4	Oolong – OOLONG CHINA SE CHUNG.....	61
3.2.5	Černý čaj – ASSAM TGFOP1 SONIPUR BIO.....	62
3.2.6	Pu-erh – PU ERH STD.....	62
3.2.7	Rooibos – ROOIBOS TEA SUPERGRADE BIO.....	63
3.3	STANOVENÍ MINIMÁLNÍCH INHIBIČNÍCH KONCENTRACÍ ČAJOVÝCH EXTRAKTŮ PROTI <i>ARCOBACTER</i> SPP. ....	64
3.3.1	Zelený čaj – SENCHA MAKATO .....	65
3.3.2	Bílý čaj – CHINA PAI MU TAN .....	67
3.3.3	Žlutý čaj – HUANG DA CHA.....	68
3.3.4	Oolong – OOLONG CHINA SE CHUNG.....	69
3.3.5	Černý čaj – ASSAM TGFOP1 SONIPUR BIO.....	70
3.3.6	Pu-erh – PU ERH STD.....	71
3.3.7	Rooibos – ROOIBOS TEA SUPERGRADE BIO.....	73
3.4	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY ČAJOVÝCH NÁLEVŮ .....	74
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	78
<b>5</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	81
<b>6</b>	<b>PŘÍLOHA</b> .....	90

## SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1:** Zobrazení arkobakterů pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu (A) a transmisního elektronového mikroskopu (B) (převzato z MBio.asm.org) .....17
- Obr. 2:** Květ a listy čajovníku čínského (převzato z Pharmapoint.cz) .....24
- Obr. 3:** Chemická struktura čtyř hlavních katechinů v zeleném čaji (převzato ze Steinmann et al., 2013) .....27
- Obr. 4:** Přehled testovaných vzorků sypaných čajů: **A**-zelený čaj-SENCHA MAKATO; **B**-bílý čaj-CHINA PAI MU TAN; **C**-žlutý čaj-HUANG DA CHA; **D**-oolong-OOLONG CHINA SE CHUNG; **E**-černý čaj-ASSAM TGFOP1 SONIPUR BIO; **F**-Pu-erh-PU ERH STD; **G**-rooibos-ROOIBOS TEA SUPERGRADE BIO (foto autor).....41
- Obr. 5:** Testované čajové nálevy zleva: zelený čaj, bílý čaj, čaj oolong, žlutý čaj, čaj rooibos, Pu-erh čaj a černý čaj (foto autor) .....43
- Obr. 6:** Disková difúzní metoda- kmen: *A. cryaerophilus* UPa 2013/13, disky: vlevo-Pu-erh extrakt; vpravo-extrakt ze zeleného čaje (foto autor) .....45
- Obr. 7:** Mikrotitrační destička s připravenou řadou extraktů z bílého čaje a čaje oolong zaočkováná suspenzí *A. cryaerophilus* CCM 7050 (foto autor).....46
- Obr. 8:** Stanovení MIC extraktu z bílého čaje proti *A. butzleri* UPa 2013/8; výseče reprezentují jednotlivé koncentrace extraktu; PK=pozitivní kontrola, NK=negativní kontrola (foto autor) .....47

## SEZNAM TABULEK

<b>Tab. 1:</b> Nejdůležitější fenotypové znaky pro rozlišení mezi rody <i>Arcobacter</i> , <i>Campylobacter</i> a <i>Helicobacter</i> (převzato a upraveno z Lehner et al., 2005).....	16
<b>Tab. 2:</b> Baktericidní účinek černého a zeleného čaje proti bakteriím <i>C. jejuni</i> a <i>C. coli</i> (převzato a upraveno z Diker et al., 1991).....	31
<b>Tab. 3:</b> Seznam použitých sypaných čajů.....	40
<b>Tab. 4:</b> Stanovení citlivosti arkobakterů diskovou difúzní metodou, (n=6), výsledky vyjádřeny jako průměr ± SD.....	58
<b>Tab. 5:</b> Souhrn MIC čajových extraktů proti <i>Arcobacter</i> spp., (n=2).....	65
<b>Tab. 6:</b> Stanovení minimálních inhibičních koncentrací extraktu ze zeleného čaje proti <i>Arcobacter</i> spp., (n=2).....	66
<b>Tab. 7:</b> Stanovení minimálních inhibičních koncentrací extraktu z bílého čaje proti <i>Arcobacter</i> spp., (n=2).....	67
<b>Tab. 8:</b> Stanovení minimálních inhibičních koncentrací extraktu ze žlutého čaje proti <i>Arcobacter</i> spp., (n=2).....	68
<b>Tab. 9:</b> Stanovení minimálních inhibičních koncentrací extraktu z čaje oolong proti <i>Arcobacter</i> spp., (n=2).....	69
<b>Tab. 10:</b> Stanovení minimálních inhibičních koncentrací extraktu z černého čaje proti <i>Arcobacter</i> spp., (n=2).....	70
<b>Tab. 11:</b> Stanovení minimálních inhibičních koncentrací extraktu z čaje Pu-erh proti <i>Arcobacter</i> spp., (n=2).....	72
<b>Tab. 12:</b> Stanovení minimálních inhibičních koncentrací extraktu z čaje rooibos proti <i>Arcobacter</i> spp., (n=2).....	73
<b>Tab. 13:</b> Stanovení antioxidační kapacity čajových nálevů metodou s DPPH radikálem, (n=3).....	74

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1:</b> Přežívání <i>Arcobacter</i> spp. v nálevu ze zeleného čaje, (n=4) .....	50
<b>Graf 2:</b> Přežívání <i>Arcobacter</i> spp. v nálevu z bílého čaje, (n=4) .....	51
<b>Graf 3:</b> Přežívání <i>Arcobacter</i> spp. v nálevu ze žlutého čaje, (n=4).....	52
<b>Graf 4:</b> Přežívání <i>Arcobacter</i> spp. v nálevu z čaje oolong, (n=4) .....	53
<b>Graf 5:</b> Přežívání <i>Arcobacter</i> spp. v nálevu z černého čaje, (n=4).....	54
<b>Graf 6:</b> Přežívání <i>Arcobacter</i> spp. v nálevu z Pu-erh čaje, (n=4).....	55
<b>Graf 7:</b> Přežívání <i>Arcobacter</i> spp. v nálevu z rooibos čaje, (n=4) .....	56
<b>Graf 8:</b> Kalibrační křivka standardu látky Trolox .....	74

## SEZNAM ZKRATEK

A.	<i>Arcobacter</i>
B.	<i>Bacillus</i>
C.	<i>Campylobacter</i>
E.	<i>Escherichia</i>
H.	<i>Helicobacter</i>
S.	<i>Staphylococcus</i>
St.	<i>Streptococcus</i>
spp.	species (druh)
PCR	polymerázová řetězová reakce
G <sup>+</sup>	grampozitivní bakterie
G <sup>-</sup>	gramnegativní bakterie
-OH	hydroxyskupina
CTC	Crushing-Tearing-Curling (drcení-trhání-rolování)
EGCG	epigalokatechin-3-galát
ECG	epikatechin-3-galát
EGC	epigalokatechin
EC	epikatechin
CFU	colony-forming unit (kolonie tvořící jednotky)
POD	peroxidáza
PPO	polyfenoloxidáza
M-H	Mueller Hinton Agar

BHI	Brain Heart Infusion Broth (bujón z mozkosrdcové infuze)
TSA	Tryptone Soya Agar (trypton sojový agar)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MBC	minimální baktericidní koncentrace
ČOV	čistírna odpadních vod
NPTP	nanočástice čajového prášku Pu-erh

## ÚVOD

*Arcobacter* spp. jsou G<sup>-</sup> bakterie patřící do čeledi *Campylobacteraceae*. Jejich výskyt je poměrně hojný a lze je izolovat z potravin, vody, mléka ale i měkkýšů. V dnešní době existuje již více než 25 druhů arkobakterů a jejich počet se neustále zvyšuje. Se zvyšujícím se počtem druhů rostou i počty alimentárních onemocnění způsobených těmito mikroorganismy, jako jsou například gastroenteritida nebo vodnaté průjemy. V závažných případech onemocnění nastává léčba pomocí antibiotik, avšak u kmenů *Arcobacter* je popsána vysoká rezistence. V dnešní době je kladen důraz na omezování syntetických antimikrobiálních a konzervačních látek za účelem nahrazení přírodními látkami, které jsou bezpečnější a mohou zachovávat vysokou kvalitu potravin. Mezi přírodní antimikrobiální látky lze zařadit katechiny, kofein, flavonoidy a mnoho dalších látek, které se vyskytují v čaji. Použití samotných čajových lístků, nálevů nebo extraktů může sloužit jako slibná alternativa ke komerčně vyráběným antimikrobiálním látkám a udržovat potravinu déle skladovatelnou, kvalitní, bezpečnou a mikrobiálně nezávadnou.

V této práci bylo testováno 7 druhů sypaných čajů – zelený, bílý, žlutý čaj, oolong, černý čaj, Pu-erh a rooibos proti *Arcobacter* spp. U všech čajových nálevů i extraktů byly zjištěny v určité míře inhibiční i antioxidační účinky. Nejvyšší antimikrobiální účinky vykazoval nálev ze zeleného, žlutého a černého čaje. V případě připravených ethanolových extraktů byl černý čaj méně účinný než nálev z tohoto čaje. Za čaje s nejmenším antimikrobiálním účinkem lze považovat Pu-erh a rooibos, protože u těchto čajů byly zjištěny nejmenší zóny inhibice, ale také nejvyšší hodnoty minimální inhibiční koncentrace.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 *Arcobacter* spp.

### 1.1.1 Základní vlastnosti

Bakterie rodu *Arcobacter* patří do čeledi *Campylobacteraceae* a sdílí mnoho společných fyziologických, morfologických a genetických znaků společně s rodem *Campylobacter* a čeledí *Helicobacteraceae*. Charakteristický rys, který odlišuje druhy *Arcobacter* od rodu *Campylobacter*, je schopnost růst při 15 °C (Lehner et al., 2005; Vandamme et al., 1991; Vandamme, 2000). Přehled nejdůležitějších fenotypových znaků pro identifikaci jednotlivých druhů je uveden v Tab. 1.

Arkobaktery jsou gramnegativní tyčinky 0,2-0,9 µm široké a 0,5-3 µm dlouhé zakřivené do tvaru „S“. Tyto bakterie jsou pohyblivé, mají jeden polární bičík, ale nevytvářejí spory (Vandamme et al., 1991; Vandamme, 2000). Přítomnost bičíku lze vidět i na Obr. 1. Tyto bakterie tolerují vysoké koncentrace chloridu sodného a také mají schopnost se přichycovat k různým typům povrchů. Všechny tyto vlastnosti mohou vysvětlit výskyt těchto mikrobu v potravinářských výrobcích (Collado a Figueras, 2011).

Tab. 1: Nejdůležitější fenotypové znaky pro rozlišení mezi rody *Arcobacter*, *Campylobacter* a *Helicobacter* (převzato a upraveno z Lehner et al., 2005)

<b>Charakteristická vlastnost</b>	<b><i>Arcobacter</i></b>	<b><i>Campylobacter</i></b>	<b><i>Helicobacter</i></b>
Aerobní růst při 25 °C	+	–	–
Kataláza	+	+ <sup>a</sup>	+
Oxidáza	+	+	+
Ureáza	–	– <sup>b</sup>	– <sup>c</sup>

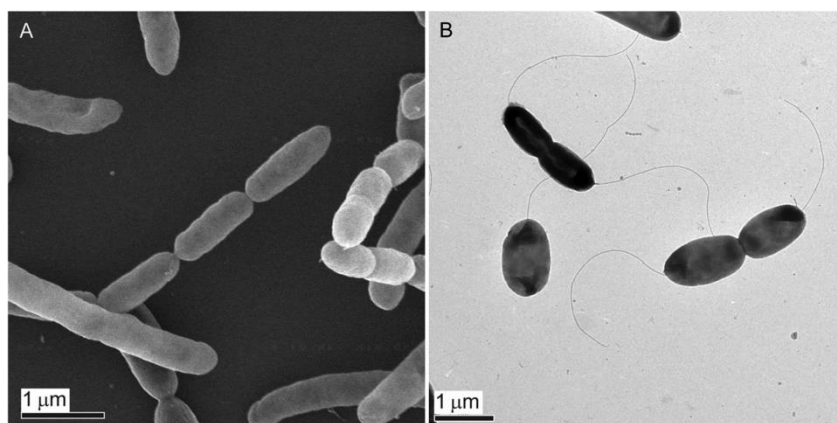
Poznámka:

<sup>a</sup> - *C. consisus* a *C. upsaliensis* vykazují negativní výsledek

<sup>b</sup> - *C. lari* má pozitivní výsledek

<sup>c</sup> - *H. pylori* má pozitivní výsledek





Obr. 1: Zobrazení arkobakterů pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu (A) a transmisního elektronového mikroskopu (B) (převzato z MBio.asm.org)

### 1.1.1.1 Kultivační podmínky a růst

Arkobaktery jsou schopny růst jak za aerobních, tak anaerobních podmínek v širokém teplotním rozmezí (15-42 °C). Optimální růst bakterie ovšem nastává za mikroaerobních podmínek, tj. (3-10 % O<sub>2</sub>) (Vandamme et al., 1991; Vandamme, 2000). K inaktivaci organismu dochází při teplotě nad 55 °C (Ramees et al., 2017). U kmenu *A. butzeri* bylo zjištěno, že může růst v rozmezí 15-37 °C, kdy optimální růst je při 30 °C. Pro primární izolaci je nutné mikroaerofilní prostředí a při teplotě 40 °C již obvykle není pozorován růst této bakterie. *A. butzeri* je schopný odolat až 6 měsíců při teplotě -20 °C a až 24 měsíců při teplotě -70 °C (Ramees et al., 2017; Vandamme et al., 1991). Tento rod v současné době zahrnuje již více než 25 druhů, které byly izolovány jak od lidí a zvířat, tak i z vody a potravin (Ramees et al., 2017).

### 1.1.2 Výskyt arkobakterů

*Arcobacter* spp. jsou považovány za potenciální vodní a potravinové patogeny (Levican et al., 2015) a mohou být izolovány z různých druhů vod, potravin a živočišných zdrojů. Největší procento pozitivních izolací z potravin je získáváno z kuřecího masa, po němž následuje maso vepřové, hovězí a jehněčí. Dále mohou být izolovány i ze syrového mléka, měkkýšů, ryb a zeleniny, avšak jejich výskyt zde není příliš častý (González et al., 2014; Ramees et al., 2017). Podle jisté studie byl výskyt těchto bakterií v potravinách seřazen od nejvyššího po nejnižší: mléčné výrobky, mořské plody, vepřové maso, hovězí, drůbeží, jehněčí, zelenina a králičí maso

(González et al., 2017). *A. butzleri* a *A. cryaerophilus* jsou bakterie, které jsou běžně přítomné v prostorách jatek (Lehner et al., 2005).

Dle nedávné studie se zjistilo, že měkkýši mohou být důležitým rezervoárem těchto bakterií, a tedy i potenciálním zdrojem nákazy. Ve vodě se přítomnost této bakterie zvyšuje s úrovní fekálního znečištění (Levican et al., 2015). Avšak bylo zjištěno, že úpravou vody, především chlorací, dochází k účinnému odstranění arkobakterů (Collado a Figueras, 2011). Přítomnost této bakterie byla potvrzena úspěšnou izolací i z předem připravené zeleniny určené ke konzumaci. Zelenina může být kontaminována zavlažovací vodou nebo přímo odtokem vody infikované od zvířat (González et al., 2017).

### 1.1.3 Přenos arkobakterů a onemocnění

Některé druhy rodu *Arcobacter* mohou způsobovat u lidí gastroenteritidu, bakteriemii, břišní křeče a vodnaté průjmy, u zvířat potraty, mastitidu a také průjmy (Levican et al., 2015; Hsu a Lee, 2015). Jejich přítomností v krvi u lidí s cirhózou a gangrenózní apendicitidou se navíc onemocnění komplikuje. Druhy arkobakterů, především *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*, jsou nejčastěji spojovány s klinickým onemocněním a existuje spojení těchto bakterií také se vznikem septikémie (Ramees et al., 2017; González et al., 2014). Existuje studie, která pomocí molekulárních metod prozkoumala výskyt bakterií *Campylobacter*, *Helicobacter* a *Arcobacter* u 322 vzorků stolice od pacientů (s HIV nebo bez HIV) v Jižní Africe. Bylo zjištěno, že *A. butzleri* je třetí nejvíce převládající druh (6,2 %) po *H. pylori* (50,6 %) a *C. jejuni* (10,2 %). Navíc arkobaktery byly také nalezeny u pacientů, u kterých byla prokázána onemocnění, jako jsou např. diabetes mellitus I. a II. typu, rakovina a chronické selhání ledvin, hyperurikémie či alkoholismus (Collado a Figueras, 2011).

Patogenní mechanismy zoonotických přenosů arkobakterů v potravinách a ve vodě jsou do značné míry neznámé (Ho et al., 2006). Avšak při studiu virulence těchto mikroorganismů, může být užitečné použití dat z dostupných genomů. Data získaná ze studie popisují, že kmeny *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii* izolované z potravin mají předpokládané virulentní geny. Bylo zjištěno, že jako zdroj patogenních *A. butzleri* mohou být škeble, u kterých byl nalezen vysoký podíl genů virulence a významně vyšší detekce genů *hecA* a *hecB*. Z těchto důvodů by škeble mohly představovat nebezpečí pro lidské zdraví, zejména vzhledem k tomu,

že se obvykle konzumují syrové nebo málo tepelně upravené, což zvyšuje riziko infekce (Girbau et al., 2015).

#### **1.1.4 Rizikové zdroje *Arcobacter* spp.**

Jako hlavní rizikový faktor vzniku průjmového onemocnění je pitná voda. Různé studie popsaly detekci *Arcobacter* spp. v podzemní vodě, povrchové vodě, v kanalizaci i v aktivovaném kalu. Buňky arkobakterů se mohou snadno přichytit k různým povrchům vodovodního potrubí, jako je nerezová ocel, měď a plast. Jejich extracelulární vlákna byla pozorována na povrchu z nerezavějící oceli, zejména po 72 hodinách kultivace (Lehner et al., 2005).

Počty onemocnění způsobených těmito organismy se v posledních letech zvyšují, což představuje problém pro bezpečnost potravin (González et al., 2017). Hlavní pozornost je v současnosti věnována syrovým masným výrobkům a nepasterizovaným mléčným výrobkům, které mohou představovat riziko přenosu arkobakterů na člověka. Nejdůležitějším postupem je však prevence, tedy zajištění opatření zaměřených na snížení až vymýcení těchto patogenů z potravinového řetězce. Je nezbytné především snížit kontaminaci během jatečného opracování těla a následné zachování hygieny při výrobě masných výrobků. Navíc by měla být podporována preventivní opatření, jako je zavedení kodexů správné výrobní praxe a pravidelné mikrobiologické monitorování jatečně upravených těl zvířat (Lehner et al., 2005).

#### **1.1.5 Rezistence a antibiotika**

Rezistence k antibiotikům je pozorována u kmenů *Arcobacter* na vysoké úrovni (Ho et al., 2006). Většina případů enteritid a bakteriemií způsobených arkobaktery však nevyžaduje antimikrobiální léčbu, stejně jako tomu je u rodu *Campylobacter*. V závažných případech, ale nastupuje antibiotická léčba, ve kterých se jako účinné antibiotikum pro léčbu infekcí nasazují fluorochinolony nebo tetracykliny. Mezi nevyhovující antibiotika můžeme zařadit např. kyselinu nalidixovou a ciprofloxacin, jelikož arkobaktery jsou proti nim často rezistentní. Dnes již je popsáno, že infekce způsobené *Arcobacter* spp. vyžadují odlišnou léčbu než infekce způsobené běžnějšími druhy bakterií rodu *Campylobacter*. Z toho důvodu je důležité provést testy na odlišení těchto rodů, aby v každém případě byla poskytnuta nejvhodnější léčba (Collado a Figueras, 2011).

### 1.1.6 Identifikace bakterií

Identifikace arkobakterů pomocí biochemických testů je velmi obtížná, za metodu tzv. „zlatého standardu“ se považuje pouze izolace, ať už za použití membránových filtrů nebo izolace na selektivních médiích. Pro účinnou rychlou detekci a diferenciaci rodu a druhu se v současné době využívají molekulární metody, především využití polymerázové řetězové reakce. Využívají se zejména metody multiplex PCR, které jsou zaměřené na genově a druhově specifické sekvence spolu s dalšími pokročilými diagnostikami (Ramees et al., 2017). Metoda PCR je zaměřena především na sekvenci genů 16S a 23S rRNA. Jako další metodu lze použít pulzní gelovou elektroforézu (PFGE), která se používá pro genotypizaci *Arcobacter* spp. (Lehner et al., 2005).

## 1.2 Přírodní antimikrobiální látky

Spotřebitelé stále více vyžadují kvalitní a bezpečné potraviny. Vzhledem k nárůstu počtu nálezů způsobených patogenními mikroorganismy v potravinách, dochází ke zvýšeným obavám o bezpečnost potravin. Spotřebitelé jsou znepokojeni zejména z používání chemických umělých antimikrobiálních látek a konzervačních látek, které inhibují růst patogenů (Bor et al., 2016; Tajkarimi et al., 2010). Požadavek spotřebitelů na zachování výživy a kvality potravin vede ke zvýšené potřebě využití alternativních metod konzervace k inaktivaci patogenních mikroorganismů a enzymů z potravin. V důsledku toho přicházejí nové metody použití přírodních konzervačních látek (Bor et al., 2016).

Mezi hlavní přínosy léčivých přípravků pocházejících z rostlin patří především to, že jsou relativně bezpečné ve srovnání se syntetickými alternativy. Také ale poskytují terapeutické výhody a cenově dostupnější léčbu. Ačkoli většina klinicky používaných antibiotik je produkována půdními mikroorganismy nebo houbami, vyšší rostliny mohou být také zdrojem antibiotik. Jako příklady lze uvést např. bakteriostatické a antifungicidní vlastnosti lišejníků, antibiotický účinek allinu v česneku (*Allium sativum*) nebo antimikrobiální působení berberinů ve vodilce kanadské (*Hydrastis canadensis*) (Iwu et al., 1999).

### **1.2.1 Historické využití rostlin jako antimikrobiálních látek**

V minulosti byly rostliny využity jako zdroj inspirace pro vznik nových léčebných přípravků. Díky tomu měly tyto přípravky významný podíl na zlepšení úrovně lidského zdraví a pohody. Jejich úloha ve vývoji nových léčiv spočívala v tom, že se mohly stát základem pro vývoj nových léků nebo je bylo možné využít ve fytomedicině k léčbě onemocnění. Také vyšší rostliny významně přispěly k rozšíření možností terapie nádorových onemocnění. Mezi časté příklady patří antileukemické alkaloidy, vinblastin a vinkristin. Například dobře známý benzylochinolinový alkaloid papaverin má silný inhibiční účinek na replikaci několika virů, např. virů způsobujících onemocnění spalničky a HIV (Iwu et al., 1999).

### **1.2.2 Definice přírodních látek**

Přírodní antimikrobiální látky hrají důležitou roli v kontrole potravin tím, že zabraňují mikrobiální kontaminaci patogenními mikroorganismy. Tímto prodlužují také dobu skladovatelnosti. Výhodou také je, že dokáží snížit rezistence k antibiotikům u patogenních bakterií a zlepšit imunitní systém (Bor et al., 2016).

### **1.2.3 Proč využívat antimikrobiální látky?**

Používání přírodních antimikrobiálních látek v potravinářství získává v dnešní době velkou pozornost jak spotřebitelů, tak výrobců. Jedním z důvodů je především nesprávné použití a zacházení s antibiotiky, což vede k dramatickému vzestupu skupin mikroorganismů, včetně potravinových patogenů, které jsou odolné vůči antibiotikům. U alimentárních patogenů navíc dochází k nárůstu tolerance jak na technologie zpracovávání potravin, tak i na jejich uchovávání (Gyawali a Ibrahim, 2014).

Dalším důvodem jsou možné negativní dopady syntetických konzervačních látek na zdraví člověka. Tyto důvody vyvolaly zájem mezi vědeckými pracovníky o vývoj a používání přírodních látek v potravinách jako slibné alternativy ke stávajícím syntetickým konzervačním látkám (Gyawali a Ibrahim, 2014; Wallace, 2004). To způsobilo, že potravinářský průmysl neustále hledá alternativní konzervační látky, které mohou zvýšit bezpečnost a kvalitu potravin. Sloučeniny odvozené z přírodních zdrojů mají potenciál být použity pro bezpečnost potravin díky svým

antimikrobiální vlastnostem proti širokému spektru potravinových patogenů (Gyawali a Ibrahim, 2014). Avšak metody a mechanismy účinku přírodních antimikrobiálních látek, stejně jako toxikologické a senzorické efekty, nejsou zcela popsány. I přes to, že mechanismus účinku přírodních antimikrobiálních látek není obsáhleji pochopen, dochází ke stále větším snahám vyvíjet nové efektivní metody k pochopení mechanismu antimikrobiálních účinků. Tyto metody se primárně opírají o jejich využití ke zvýšení bezpečnosti potravin (Tajkarimi et al., 2010).

#### **1.2.4 Získání a využití antimikrobiálních látek**

Přírodní antimikrobiální látky mohou být získány z různých zdrojů, včetně rostlin, živočichů, bakterií, řas a hub. Většina dostupných studií týkajících se antimikrobiálních látek získaných z rostlin zahrnuje pouze antimikrobiální nebo antioxidační aktivitu bylin, koření a jejich sloučenin. Rostlinné oleje a výtažky byly od starověku používány k aromatizaci potravin, v tradiční medicíně a jako konzervační látky. Kromě toho, že se používají při výrobě potravin, ve kterých dodávají chuť a barvu, byliny a koření mají také antioxidační, antimikrobiální, nutriční a farmaceutické vlastnosti (Gyawali a Ibrahim, 2014; Lai a Roy, 2004; Savoia, 2012; Shan et al., 2007). První vědecká studie o konzervačních účincích koření byla provedena v 80. letech 19. století a popsala antimikrobiální účinek skořicového oleje na spory bakterie *Bacillus anthracis* (Tajkarimi et al., 2010).

Antimikrobiální látky rostlinného původu se získávají různými metodami z aromatických a těkavých látek z květů, pupenů, semen, listů, větví, kůry, bylin, dřeva, ovoce i kořenů rostlin (Tajkarimi et al., 2010). Silnější antimikrobiální efekty a bezpečnější přístup ke kontrole alimentárních patogenů by mohlo zvýšit použití výtažků z rostlinných zdrojů v kombinaci s vnějšími nerostnými zdroji (Shan et al., 2007; Tiwari et al., 2009).

#### **1.2.5 Důležité přírodní složky**

Antimikrobiální účinnost rostlinných extraktů může být způsobena přítomností fenolických sloučenin nebo přítomností hydrofobních složek v éterických olejích (Gyawali a Ibrahim, 2014). Hlavní skupiny sloučenin, které jsou odpovědné za antimikrobiální aktivitu rostlin, jsou především fenoly, fenolové kyseliny, chinony, saponiny, flavonoidy, taniny, kumariny,

terpenoidy a alkaloidy. Změny struktury a chemického složení těchto sloučenin vedou k rozdílům v jejich antimikrobiálním účinku (Gyawali a Ibrahim, 2014; Lai a Roy, 2004; Savoia, 2012). Fenolické sloučeniny mají velké strukturní variace a jsou jedním z nejrozmanitějších skupin sekundárních metabolitů (Gyawali a Ibrahim, 2014).

### 1.2.6 Inhibiční účinek na bakterie

Předpokládá se, že inhibiční účinek fenolických sloučenin je způsoben hydroxylovými skupinami (-OH), protože tyto skupiny jsou schopny interagovat s buněčnou membránou bakterií a způsobí tak únik buněčných elementů. Dále bylo například zjištěno, že antioxidační vlastnosti jsou způsobeny přítomností volných (-OH) skupin ve fenolických sloučeninách. Tato vlastnost inhibuje tvorbu reaktivních kyslíků a odstraňuje volné radikály, čímž snižuje redoxní potenciál růstového média. Díky snížení redoxního potenciálu dochází k omezenému růstu nežádoucích mikroorganismů. Antimikrobiální účinnost jednotlivých látek obsahujících skupinu (-OH) je také závislá na pozici této skupiny v molekule, ve které se hydroxylová skupina nachází. Vysoká antimikrobiální účinnost fenolických sloučenin závisí i na velikosti přidané alkylové nebo alkenylové skupiny. Vyšší antimikrobiální aktivitu vůči bakteriím též vykazují látky s větším počtem dvojných vazeb ve své molekule, než látky s pouze jednou dvojnou vazbou (Gyawali a Ibrahim, 2014).

Za méně citlivé na antimikrobiální látky lze považovat  $G^-$  bakterie vzhledem k přítomnosti lipopolysacharidové vnější membrány, která omezuje difúzi hydrofobních sloučenin. U těchto bakterií bylo zjištěno, že jsou obvykle odolnější vůči antimikrobiálním látkám původem z rostlin. Avšak s jistotou se nedá říci, že  $G^+$  bakterie jsou vždy citlivější na antimikrobiální látky (Tajkarimi et al., 2010).

## 1.3 Čaje a čajové extrakty

### 1.3.1 *Camellia sinensis* L.

*Camellia sinensis* neboli čajovník čínský je původem z jihovýchodní Asie, ale pěstuje se po celém světě od Číny až po Keňu. V těchto oblastech patří mezi jednu z nejdůležitějších zemědělských plodin. Mezi největší lídry ve výrobě čaje v současné době patří Čína a nachází se zde více jak 200 různých kultivarů čajů (Chen et al., 2007). Z jednoho stejného druhu rostliny *C. sinensis* L. se vyrábí jak zelený, černý čaj, tak oolong. Jednotlivé druhy čajů se liší svým vzhledem, chemickým složením, organoleptickými vlastnostmi a příchutí způsobenou jejich příslušným fermentačním procesem (Sharangi, 2009).

Čaj lze považovat za nejstarší nealkoholický nápoj na světě, který obsahuje kofein. Prvními konzumenty čajů byli Číňané, kteří ho využívali jako léčivý nápoj, později jako klasický nápoj a dnes je využíván již 5 000 let (Eden, 1958). Čaj získal privilegované místo a popularitu mezi všemi skupinami lidí a není nadsázkou říci, že je to všestranný nápoj (Arora et al., 2009).



Obr. 2: Květ a listy čajovníku čínského (převzato z Pharmapoint.cz)

#### 1.3.1.1 Stavba čajovníku

Čajovník je stálezelená, cizosprašná rostlina a trvalka, která roste ve svém přirozeném prostředí až do výšky 15 m. Uměle pěstovaný čajovník dosahuje do výšky 60-100 cm a na sklizeň se udržují malé listy. Květy jsou bílé barvy a rostou po jednom, či ve dvojicích. Plody jsou zelené barvy s dvěma až třemi semeny, která vznikají po 5 až 6 letech od výsadby (Wight, 1962).



Listy čajovníku jsou většinou tmavě zelené, střídavé, oválné s pilovitými hranami o rozměrech 4-15 cm na délku a 2-5 cm na šířku. K výrobě čaje se sbírají několikrát do roka nezralé světle zelené listy, již uzralé mají tmavě zelenou barvu. Obvykle se pro zpracování ručně sbírá vrchní pupen a první dva až tři listy pod ním. Různé stáří listů, které se liší chemickým složením, slouží k produkci různých druhů čajů o odlišných kvalitách (Wight, 1962; Burda, 2013). Květ a listy čajovníku jsou zobrazeny na Obr. 2.

### 1.3.1.2 Základní druhy čajů a jejich výroba

Mezi dvě hlavní odrůdy *C. sinensis* patří: *sinensis* (větší listy, dlouhý stonek) a *assamica* (menší listy, stonek keřového typu) (Yamamoto, 1997). Čínské čaje jsou rozděleny do šesti kategorií na základě jejich výrobního procesu – zelený čaj, bílý čaj, žlutý čaj, oolong čaj, černý čaj a Pu-erh čaj. Zelený čaj patří mezi nefermentované čaje. Bílý čaj, oolong a černý čaj jsou fermentovány oxidačními enzymy, jako jsou polyfenoloxidáza a peroxidáza nacházející se v listech. Bílý čaj se získává lehkou fermentací, oolong čaj je polofermentovaný a černý čaj je plně fermentovaný. Žlutý čaj a Pu-erh jsou fermentovány mikroorganismy, což je následováno lehkou fermentací a fermentací oxidačními enzymy v listech. Z hlediska stupně fermentace jsou čaje definovány jako – zelený čaj < bílý čaj nebo žlutý čaj < oolong < černý čaj nebo Pu-erh (Hashimoto et al., 2007).

Černý čaj zahrnuje přibližně 76-78 % všech čajů vyrobených a spotřebovaných na světě, který se z 80 % konzumuje v USA ve formě ledového čaje. Zelený čaj, který je konzumován především v Číně, Koreji, Japonsku a Maroku představuje 20-22 % čajové výroby. Výroba a konzumace čaje oolong tvoří méně než 2 % a je oblíbený především v Číně a Taiwanu (Wu a Wei, 2002; Zuo et al., 2002; Ilyasova et al., 2003).

Během fermentace čerstvých čajových listů jsou některé katechiny oxidovány nebo kondenzovány na větší polyfenolové molekuly (dimery nebo polymery), jako jsou theaflaviny (3-6 %) a thearubiginy (12-18 %). Tyto vzniklé polymery jsou zodpovědné za hořkou chuť a tmavou barvu u černého čaje (Almajano et al., 2008).

Prvním krokem při zpracování všech druhů čajů, ať už se jedná o oxidační nebo neoxidační zpracování, se čajové lístky svinují, aby došlo k vytlačení šťávy na povrch listů, a suší se v horkém vzduchu, aby došlo ke snížení vlhkosti. Takto zpracované lístky se poté postupně

prosévají přes různá síta, aby se roztrídily podle velikosti. Největší lístky se vybírají do nejlepších čajů, čaje nižší třídy obsahují menší úlomky (Mitscher a Dolby, 2006).

### **1.3.1.3 Složení čajů**

Listy čajovníku obsahují přibližně 2 000 různých fytochemikálií jako jsou např. různé fenolické sloučeniny, methylxanthiny, proteiny, volné aminokyseliny, kyselinu L-askorbovou a další organické kyseliny, těkavé sloučeniny, lipidy, karotenoidy, chlorofyly, minerály a v neposlední řadě i stopové prvky (Hacioglu et al., 2017).

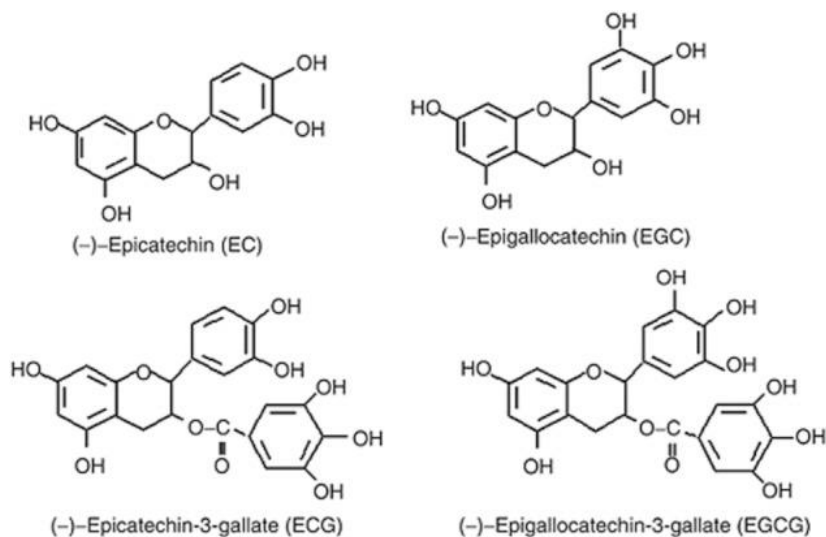
## **1.3.2 Zelený čaj**

### **1.3.2.1 Chemické složení**

Čajové lístky jsou zdrojem polyfenolů, především katechinů. Tyto látky jsou biologicky účinné, rostlinného původu a nepatří mezi živiny. Katechiny patří mezi deriváty flavanu a ve skupině flavonoidů se vyznačují nejvyšším stupněm oxidace heterocyklického kruhu a dobrou rozpustností ve vodě. V čajových listech se objevují převážně ve formě esterů kyseliny galové (Gramza et al., 2005).

Velmi vlivné účinky zeleného čaje jsou připisovány jeho polyfenolovým sloučeninám, převážně katechinům, které tvoří až 30 % suché hmotnosti zelených čajových lístků. Polyfenoly jsou přítomné ve vyšších množstvích v zeleném čaji ve srovnání s čajem černým nebo oolong, kvůli rozdílné posklizňové technologii (Graham, 1983; Perumalla a Hettiarachchy, 2011). V zeleném čaji je nejhojnějším katechinem EGCG, což představuje přibližně 59 % z celkového množství katechinů. Dalšími jsou EGC, které tvoří přibližně 19 %, ECG 13,6 % a EC 6,4 %. Množství katechinů může být ovlivněno typem čaje, listy, které jsou sklizeny, zpracováním, zeměpisnou polohou, podmínkami pěstování a v neposlední řadě i samotnou přípravou čaje (Reygaert, 2014). Hlavní katechiny v zeleném čaji jsou zobrazeny na Obr. 3.

Podmínka biologické dostupnosti je významná pro zdravotní prospěšnost zeleného čaje. Dostatečné množství dané látky musí být přítomno v místě infekce, aby byla taková látka užitečná v boji proti mikroorganismům. Biologická dostupnost je nejčastěji hodnocena měřením hodnot v plazmě, moči nebo tkáních po požití čaje; obvykle odebráním vzorků v pravidelných časových intervalech. Byly prováděny různé studie za použití různých dávek katechinů a ukázaly, že biologická dostupnost katechinů je přímo úměrná množství katechinů spotřebovaných (Reygaert, 2014).



Obr. 3: Chemická struktura čtyř hlavních katechinů v zeleném čaji (převzato ze Steinmann et al., 2013)

### 1.3.2.2 Výroba čaje

U zeleného čaje jsou čerstvě nasbírané čajové lístky ponechány několik hodiny ležet ve stínu. Následuje spaření na páře v pánvích a usušení v pecích, podobně jako u černého čaje. Tímto technologickým postupem dojde k deaktivaci enzymů polyfenoloxidázy. Tyto enzymy nejen zabraňují oxidaci katechinů, ale také zachovávají polyfenoly v jejich monomerní formě. Proces spaření v páře při vysoké teplotě chrání proti enzymatické degradaci vitamínů a zabraňuje také degradaci polyfenolů (Zaveri, 2006; Thoma, 2014).

### 1.3.2.3 Účinek zeleného čaje na bakterie *Helicobacter* spp.

Infekce způsobené těmito bakteriemi jsou jedny z nejběžnějších bakteriálních infekcí u člověka po celém světě. *H. pylori* je klasifikován jako karcinogen skupiny 1 a jedná se tedy o nejdůležitější rizikový faktor pro vznik rakoviny žaludku (Stoicov et al., 2009).

Byly provedeny studie, které prokázaly, že zelený čaj má baktericidní a bakteriostatické účinky *in vitro* na bakterie *H. felis* a *H. pylori*. Ve studiích prováděných *in vivo* bylo zjištěno, že požívání zeleného čaje v době před vznikem infekce zabraňuje zánětu žaludeční sliznice. Terapeutická konzumace čaje až po vzniku infekce snižuje závažnost gastritidy (Stoicov et al., 2009). U bakterie *H. pylori* byly naměřeny průměry jasné zóny inhibice za použití diskové difúzní metody v rozmezí 16-21 mm. Stejně antimikrobiální výsledky vykazoval i čaj černý (Diker a Hascelik, 1994).

### 1.3.3 Bílý čaj

#### 1.3.3.1 Základní vlastnosti a výroba

Bílý čaj patří mezi velmi vzácný a cenný typ čaje pocházejícího z Číny. Název čaje pochází z hedvábného bílého chmýří, které pokrývá nezralé listy a pupeny. Čaj má jemnou sladkou chuť, která se liší od travnaté chuti zeleného čaje (Damiani et al., 2014).

Bílý čaj se vyrábí ve velmi malých množstvích, protože se listy sbírají pouze za svítání během několika dní na jaře, kdy jsou pupeny ještě stále uzavřeny. Tradiční metoda, která se používá při zpracování bílého čaje, je rozložení listů a usušení na slunci, během kterého je struktura listu zachována. Nedochozí tak k porušení vnějším zásahem, a tak se čaj mírně oxiduje (Damiani et al., 2014). Fermentace (oxidace) je katalyzována endogenní polyfenoloxidázou (PPO) a peroxidázou (POD) a tyto enzymy vytvářejí jedinečnou vůni a chuť bílého čaje (Dai et al., 2017). Pokud jde o hladiny katechinů, obecně se bílý čaj významně neliší od zeleného čaje, i když někteří vědci zjistili vyšší střední hodnoty některých katechinů a kyseliny galové v bílém čaji ve srovnání s čajem zeleným (Damiani et al., 2014).

## 1.3.4 Žlutý čaj

### 1.3.4.1 Základní vlastnosti a výroba

Žlutý čaj patří mezi vzácné typy čajů a jeho výroba, která se uskutečňuje jen v Číně, má dlouhou historii (Wang et al., 2013).

Při zpracování žlutého čaje dochází nejprve k částečné fermentaci shromážděných listů. Dále následuje zavadnutí, válcování a usušení. Podle jisté studie bylo zjištěno, že celkový obsah katechinů u zeleného čaje je o 16 % nižší než u čaje žlutého, což je výsledkem chemických změn, ke kterým dochází během fermentačního procesu (Gramza-Michałowska et al., 2016). Žlutý čaj je bohatý na čajové polyfenoly, polysacharidy, vitamíny a aminokyseliny, má účinky v prevenci a v léčbě rakoviny jícnu. Dále bylo zjištěno, že má přínosné účinky na slezinu a žaludek (Wang, et al., 2013).

## 1.3.5 Oolong

### 1.3.5.1 Výroba čaje oolong

Tento druh čaje má vynikající charakteristiku, která kombinuje svěžest zeleného čaje a vůni čaje černého. Oolong čaj spolu s čajem zeleným je konzumován hlavně ve východoasijských zemích, jako je Čína, Japonsko a Tchaj-wan (Chan et al., 2011). Inhibiční účinek čaje oolong byl popsán např. proti bakterii *Staphylococcus aureus*. Bylo zjištěno, že extrakt čaje oolong připravený z čajových lístků sklizených v létě vykazuje nejsilnější inhibiční účinek, následovaný sklizní na jaře, v zimě a na podzim za použití stejného postupu přípravy (Chou et al., 1999).

Důležitým krokem při přípravě čaje oolong čaje je polofermentace. Ta probíhá po sklizení čerstvých mladých ještě zelených výhonků, které jsou ponechány na kusech látky asi 1 hodinu (Haslam, 2003; Burda, 2013). Dalším krokem výroby je sušení čaje při asi 70 °C. Horké listy se následně zabalí do látky a valchují se, čímž dochází ke zhnědnutí listů. List v konečné fázi musí vypadat tak, že okraje jsou černé, zatímco střed je ještě zelený. Posledním krokem výroby je poté ještě jedno zahřívání (Burda, 2013).

## 1.3.6 Černý čaj

### 1.3.6.1 Chemické složení

V černém čaji se nachází celkový obsah katechinů v rozmezí 5-110 mg/g, z čehož jsou theaflaviny přítomny v množství 5-21 mg/g. Mezi převládající katechiny v tomto čaji patří především EGCG a ECG s koncentrací kolem 0,5-67 mg/g. Další uváděné koncentrace katechinů EGC a EC se pohybují okolo 0-10 mg/g. Obecně se tedy dá říci, že jeden šálek černého čaje obsahuje 50-370 mg celkových katechinů a 4-18 mg theaflavinů (Mario, 2010).

V černém i zeleném čaji je také přítomen kofein, kterého se nachází v černém čaji více a jeho obsah lze ovlivnit jak typem čaje, tak i délkou louhování. Po 5 minutách louhování černého čaje dochází k uvolnění 40-100 mg kofeinu, zatímco po 3 minutách louhování jen 20-40 mg. Vedle povzbuzujícího účinku kofeinu na centrální nervový systém (CNS), dokáže stimulovat i vylučování trávicích šťáv. Tato pozitivní vlastnost patří mezi hlavní důvody, proč šálek čaje vypítý po tučném jídle usnadňuje vstřebávání. Také napomáhá metabolismu a zvyšuje schopnost ledvin odstraňovat toxické látky z těla (Chow a Kramerová, 1998).

### 1.3.6.2 Proces výroby

Proces výroby černého čaje zahrnuje sérii kroků zpracování, které se skládají ze zavadnutí, svinování, fermentace, usušení, prosévání a balení (Ozdemir et al., 2017). Během kroku zavadnutí jsou listy rozprostřeny na pletivo, nad kterým proudí horký vzduch. Svinování V ortodoxním zpracování se svinování listů provádí pomocí excentrického válcování pod tlakem. Jinak tomu je v technologii CTC (*Crushing-Tearing-Curling*), ve které je svinování prováděno za současného rozmačkávání, trhání a drcení pomocí dvou válců pohybujících se odlišnou rychlostí a v opačných směrech. Důležité v této fázi je sledovat teplotu procesu, která se vyvíjí v průběhu svinování, protože velké tření a smykové namáhání má vliv na kvalitu čaje. Ortodoxní zpracování čaje je odlišné velmi jedinečnou chutí čaje, ale vysokou prodejní cenu (Mulky a Sharma, 1993; Sharangi et al., 2014).

Fermentace neboli oxidace se provádí rozložením čajových listů na podlaze nebo vložením do kontinuálního fermentoru. Proces fermentace je katalyzován endogenními enzymy a probíhá přibližně 3-4 hodiny. Biochemické změny, které vznikly již během zavadnutí listů

pokračují i v této fázi, a to o dost rychleji. Faktory jako kvalita, čerstvost, síla a barva dosáhnou svého optima v různých časech a jsou ovlivněny odlišností od času a teploty (Mulky a Sharma 1993; Thoma, 2014).

Charakteristická barva, kterou pozorujeme u černých čajů, je způsobena částečnou polymerací a oxidací polyfenolů a jejich esterů na theaflaviny a thearubiginy (Sharangi et al., 2014). Po usušení dochází k roztřídění čajových lístků podle velikosti průchodem přes síta s různou velikostí otvorů (Segal, M., 1996). Černý čaj je konzumován především v západních zemích a v jihoasijských zemích, jako je Indie a Srí Lanka (Chan et al., 2011).

### 1.3.6.3 Účinek černého čaje na bakterie *C. jejuni* a *C. coli*

Bakterie rodu *Campylobacter* byly identifikovány jako bakteriální patogeny způsobující lidskou enterokolitidu v mnoha zemích. Onemocnění se projevuje obvykle vodnatými nebo krvavými průjmy a bolestí břicha. Navíc infekce způsobené těmito bakteriemi mohou způsobit závažné onemocnění tzv. Guillain-Barrého syndrom (GBS) vedoucí k akutní neuromuskulární paralýze. V současné době se k léčbě onemocnění způsobených kamylobaktery používají antibiotika (Wang et al., 2014).

Byly učiněny studie, které popisují inhibiční účinek černého čaje na bakterie *C. jejuni* a *C. coli*. V testech bylo zjištěno, že čaj se zaočkovanou bakteriální suspenzí již po 4 hodinách expozice vykazoval baktericidní účinky na obě bakterie. Podobné výsledky vykazoval i zelený čaj, který měl také inhibiční účinky na *C. jejuni* a *C. coli* po 4 hodinách expozice. Baktericidní efekt proti bakteriím je uveden v Tab. 2. Dále byla také provedena disková difúzní metoda a zjištěny průměrné zóny inhibice v rozmezí 20-22 mm srovnatelné u obou čajů (Diker et al., 1991).

Tab. 2: Baktericidní účinek černého a zeleného čaje proti bakteriím *C. jejuni* a *C. coli* (převzato a upraveno z Diker et al., 1991)

<b>Počet životaschopných buněk [CFU/ml]</b>				
Expozice	<b><i>C. jejuni</i></b>		<b><i>C. coli</i></b>	
	Černý čaj	Zelený čaj	Černý čaj	Zelený čaj
0 hod.	$5,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$
1 hod.	$2,4 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
2 hod.	$6,6 \times 10^4$	$5,7 \times 10^4$	$5,2 \times 10^4$	$3,8 \times 10^4$
3 hod.	$3,1 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$	$2,9 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$
4 hod.	0	0	0	0

## 1.3.7 Pu-erh

### 1.3.7.1 Základní vlastnosti a výroba

Pu-erh čaj se vyrábí převážně v provincii Yunnan v Číně a je zde hojně konzumován. Stejně jako černý čaj, Pu-erh se připravuje dlouhotrvající úplnou fermentací. Celý proces fermentace je usnadňován mikroorganismy, jako je např. *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Rhizopus chinensis* nebo *Saccharomyces* (Wu et al., 2007; Zhao et al., 2010). U tohoto čaje se předpokládá, že čím delší je doba uchování, tím lepší je jeho kvalita. Mezi funkční vlastnost čaje, která byla zjištěna v jisté studii, lze považovat snižování hladiny plazmového cholesterolu a triglyceridu v plazmě při testech provedených na potkanech (Wu et al., 2007).

### 1.3.7.2 Chemické složení

V nedávné studii byly u čaje Pu-erh identifikovány statiny, což jsou inhibitory reduktázy hydroxymethylglutaryl-koenzymu A, které zabraňují kardiovaskulárním chorobám a snižují relativní riziko závažných koronárních příhod (Chen et al., 2009).

Za inhibiční účinek polyfenolů vodného extraktu Pu-erh čaje lze považovat interakci a adsorpci na proteiny mikrobiálního povrchu. Ze všech katechinů je v Pu-erh čaji přítomen pouze EC, ostatní (EGC, ECG a EGCG) zde přítomny nejsou. Za hlavní složky Pu-erh čaje lze tedy považovat kofein a EC. Byly provedeny studie, ve kterých kofein a EC vykazovaly inhibiční účinek proti  $G^-$  bakteriím. U experimentu, ve kterém byl testován vodný extrakt čaje Pu-erh však nebyl vykazován žádný účinek proti této bakterii, i když čaj obsahoval jak kofein, tak i EC (Wu et al., 2007).

### 1.3.7.3 Účinek čaje Pu-erh na bakterii *Escherichia coli*

Tento enteropatogen může být zodpovědný za krvavé průjmy (hemoragická kolitida) a za vznik hemolyticko-uremického syndromu (Bruins et al., 2006). Patogenní kmeny těchto bakterií jsou považovány za nejčastější příčinu vzniku zánětu močových cest (Noormandi a Dabaghzadeh, 2015).



S čajem Pu-erh byl proveden výzkum, přičemž čaj byl použit jako surový materiál pro přípravu nanomateriálů a jako antimikrobiální činidlo. Byly stanoveny nejprve antibakteriální účinky Pu-erh čaje na  $G^-$  bakterii za použití Pu-erh čajového prášku o rozdílných velikostech (PTP) a Pu-erh čajového zbytkového prachu. Výsledky ukázaly, že lepší antimikrobiální aktivitu vykazovaly menší částice Pu-erh čajového prášku (PTP) než ty větší, avšak nejlepší antimikrobiální aktivitu vykazovaly nanočástice Pu-erh čajového prášku (NPTP). Pu-erh čaj v nanovláknových membránách způsobil poškození buněčné membrány *E. coli* a došlo tak k úniku  $K^+$  iontů a enzymů z buněk. Navíc poškození buněčné stěny vedlo k úniku fluorescenčních proteinů z bakterií exprimovaných zeleným fluorescenčním proteinem. Tento výzkum může poskytnout slibné použití nových antibakteriálních materiálů (Su et al., 2012).

### **1.3.8 Rooibos**

#### **1.3.8.1 Základní vlastnosti**

Tento druh čaje patří mezi nejčastěji konzumované a komerčně významné bylinné čaje pocházející z Jižní Afriky. Čaj rooibos je požíván nejen pro jeho požitek z chuti a vůně, ale i pro jeho léčivé vlastnosti. U tohoto čaje není doposud přesně prozkoumána jeho antimikrobiální aktivita, ale existují některé studie, které potvrzují inhibiční účinky rooibosu proti určitým mikroorganismům, jako jsou např. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans* či *Candida albicans* (Hübsch et al., 2014). Antioxidační a antimikrobiální vlastnosti čaje nelze přiřadit katechinům, protože rooibos žádné neobsahuje. Obsahuje ale různé další sloučeniny, jako jsou např. aspalathin, isoorientin, orientin a rutin, které k těmto kladným vlastnostem čaje mohou přispět (Almajano et al., 2008).

#### **1.3.8.2 Interakce čaje s léčivý**

U čaje rooibos byla zjištěna v kombinaci s farmaceutickými léčivý a antibiotiky významná interakce. Nejsilnější synergické interakce byly zjištěny v kombinaci s penicilinem G proti  $G^+$  patogenům. Také bylo například zjištěno, že v kombinaci čaje s léčivem došlo ke zvýšení aktivity enzymu cytochromu P450 (CYP3A4) ve střevě potkanů, což vedlo ke snížení účinnosti

benzodiazepinu midazolamu. Čaj také indukuje jaterní enzymy CYP450, což vede ke zvýšení metabolismu mnoha léčiv (Hübsch et al., 2014).

### 1.3.9 Antimikrobiální účinky čajů

Jedním z oblíbených nápojů po celém světě je čaj. Prášek čajového extraktu, což je vedlejší produkt při zpracování čaje, obsahuje také velké množství fenolických sloučenin. Tyto vedlejší produkty obsahují aktivní složky, jako je kofein a jiné polyfenoly, včetně tříslovin, flavanolů, flavandiolů, flavonoidů a fenolových kyselin používané jako přírodní konzervační látky (Friedman, 2007). Čajové listy navíc také obsahují těkavé oleje, polysacharidy, aminokyseliny, lipidy, vitamíny a prvky jako jsou např. fluor a mangan (Sharangi, 2009).

Polyfenoly jsou nejvíce biologicky aktivní skupinou čajových složek, zejména některých katechinů. Nejdůležitějšími čajovými katechiny jsou epigalokatechin-3-galát (EGCG), epigalokatechin (EGC), epikatechin-3-galát (ECG) a epikatechin (EC) (Lin et al., 2003). V černém čaji jsou obsaženy převážně theaflaviny, což jsou zoxidované katechiny, které jsou účinné především proti virům, zvláště virům způsobující chřipkovou onemocnění (Lübeck, 2007). Hlavními theaflaviny černého čaje jsou theaflavin, theaflavin-3-galát, theaflavin-3'-galát a theaflavin-3,3'-galát. Tyto sloučeniny jsou zbarveny oranžově až červeně, což způsobuje typické zbarvení černého čaje (Chan et al., 2011). Byla studována řada biologických funkcí čajových polyfenolů a bylo zjištěno, že zahrnují účinky antioxidantní, antimutagenní, antikarcinogenní, dále inhibiční účinky na růst nádoru a imortalizované buňky (Lin et al., 2003).

Rozdíly v obsahu katechinu a kofeinu v čajových matricích jsou výsledkem mnoha faktorů, jako jsou např. sklizeň, klima, půda, stáří listů a samotné zpracování čaje (Gramza-Michałowska et al., 2016).

Bylo zjištěno, že přidavek mléka nebo cukru do čaje způsobí mírnou změnu antimikrobiálního účinku. Pokles inhibičního účinku po přidání mléka a cukru do čaje může být přičítán tvorbě komplexu mléčných bílkovin s polyfenoly, či antimikrobiálními složkami čaje, což je činí nepřístupnými pro jejich inhibiční účinek. Ve skutečnosti řada dalších studií prokázala, že přidávání mléka do čaje neovlivňuje bioaktivitu čajových flavonoidů a ani nemění antioxidantní aktivitu čaje (Arora et al., 2009).

### **1.3.9.1 Metabolismus polyfenolů**

Polyfenoly jsou během prvního průchodu metabolismem natolik změněny, že se typické molekulární formy liší od těch, které se vyskytují v původním zdroji potravy. EGCG je poměrně stabilní v žaludku a v tenkém střevě. Při testech provedených na potkanech bylo zjištěno, že obsah EGCG ve střevě prudce vzroste během několika hodin a je detekovatelný po 8 hodin od podané jedné dávky EGCG (50 mg). Absorbované čajové katechiny jsou biotransformovány v játrech na konjugované metabolity, jmenovitě glukuronidované, methylované a sulfátované deriváty. Zatímco EGC a EC jsou hlavně konjugované, EGCG je obvykle přítomen ve volné formě v lidské plazmě. Některé katechiny transportovány do střeva mohou být glukuronidovány enzymem glukuronosyltransferázou nacházející se ve sliznici střeva (Sajilata et al., 2008). Po absorpci jsou katechiny distribuovány do všech tkáních těla, zejména do jícnu, tenkého střeva a tlustého střeva (Yang et al., 2000; Lambert a Yang, 2003). Nejvyšší koncentrace katechinů se v plazmě člověka objeví po 1,5 až 2,6 hodinách a vrátí se na výchozí hodnotu po 24 hodinách (Sajilata et al., 2008). Avšak ne všechny katechiny z čajových extraktů mají antibakteriální aktivitu (Almajano et al., 2008).

Komplex oxidovaných polyfenolů v čaji se často nazývá tanin. Na rozdíl od některých sloučenin z jiných rostlin, které mají také tento obecný název, čajové taniny nejsou škodlivé a čaje neobsahují kyselinu taninovou (Hamilton-Miller, 1995).

U theaflavinů dochází k nízké biologické dostupnosti, ne však z důvodu degradace v gastrointestinálním traktu v důsledku pH nebo teploty, ale kvůli vysoké molekulové hmotnosti a velké polární ploše těchto sloučenin. Sloučeniny s molekulovou hmotností vyšší než 500 Da mají špatnou biologickou dostupnost vzhledem k jejich velké skutečné velikosti (vysoká molekulová hmotnost) (Sajilata et al., 2008).

### **1.3.9.2 Možné mechanismy účinků katechinů**

Vedle přímých antimikrobiálních účinků katechinů (např. poškození bakteriální buněčné membrány, inhibice syntézy mastných kyselin, inhibice enzymové aktivity atd.), existují také některé účinky, které mohou přispívat k celkovému antimikrobiálnímu účinku u infikovaných jedinců. Tyto účinky zahrnují inhibici zánětu (zejména zánětu způsobeného oxidačním stresem), konkrétněji zvýšením syntézy oxidu dusnatého (Reygaert, 2014).

Možné mechanismy účinků katechinů na bakterie:

#### *Poškození buněčné membrány*

Poškození bakteriální buněčné membrány inhibuje schopnost bakterií vázat se na hostitelské buňky (Sharma et al., 2012) a inhibuje schopnost bakterií vázat se navzájem, aby vytvořily biofilmy, které jsou významné v jejich patogenezi (Blanco et al., 2005). Poškození bakteriální membrány také vede k neschopnosti bakterií vylučovat toxiny (Reygaert, 2014).

#### *Inhibice syntézy mastných kyselin*

Mastné kyseliny v bakteriích hrají důležitou funkci. Slouží jako vynikající zdroj energie a jsou součástí fosfolipidových buněčných membrán. V jistých studiích bylo zjištěno, že inhibice syntézy mastných kyselin zeleným čajem inhibuje bakteriální produkci toxických metabolitů (Reygaert, 2014).

#### *Inhibice jiné enzymové aktivity*

Výzkumníci zjistili, že katechiny zeleného čaje mají inhibiční účinek na proteiny tyrosinfosfatázy a cysteinové proteázy u některých anaerobních perorálních bakterií. Dále bylo také zjištěno, že katechiny zeleného čaje mají schopnost zasahovat interakcemi do replikace DNA a tím inhibovat funkci DNA gyrázy (Reygaert, 2014). Při nedávné studii bylo prozkoumáno, že bioflavonoidy (včetně těch pocházejících ze zeleného čaje) mohou inhibovat aktivitu bakteriální ATP syntázy, což snižuje schopnost mikroorganismů produkovat dostatečnou energii (Chinnam et al., 2010).

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Použitý materiál, přístroje a pomůcky

#### 2.1.1 Kultivační média

- M-H agar (Mueller Hinton Agar) - HiMedia, Indie

Složení:

hovězí masová infuse	z 300 g/l
kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5 g/l
škrob	1,5 g/l
agar	17 g/l

Konečné pH (25 °C) = 7,3 ± 0,1

Pro přípravu dané půdy bylo naváženo 38 g komerční směsi na 1000 ml destilované vody. Erlenmeyerova baňka s živnou půdou byla přikryta alobalem a sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Po vychladnutí cca na 50 °C byla půda nalita do sterilních plastových Petriho misek.

- TSA agar (Tryptone Soya Agar) - HiMedia, Indie

Složení:

enzymatický hydrolyzát kaseinu	15 g/l
sójový pepton	5 g/l
chlorid sodný	5 g/l
agar	15 g/l

Konečné pH (25 °C) = 7,3 ± 0,2

Pro přípravu dané půdy bylo naváženo 40 g komerční směsi na 1000 ml destilované vody. Erlenmeyerova baňka s živnou půdou byla přikryta alobalem a sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Po vychladnutí cca na 50 °C byla půda nalita do sterilních plastových Petriho misek.

- BHI bujón (Brain Heart Infusion Broth) - HiMedia, Indie

Složení:

telecí mozková infuse	z 200 g/l
hovězí srdcová infuse	z 250 g/l
proteásový pepton	10 g/l
chlorid sodný	5 g/l
hydrogenfosforečnan di(sodný)	2,5 g/l
dextrosa	2 g/l

Konečné pH (25 °C) = 7,4 ± 0,2

Pro přípravu dané půdy bylo naváženo 37 g komerční směsi na 1000 ml destilované vody. Živná půda byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

- Fyziologický roztok

Pro přípravu fyziologického roztoku byl naváženo 8,5 g chloride sodného na 1000 ml destilované vody. Roztok v uzavřené lahvi byl sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

### 2.1.2 Chemikálie

Ethanol 96%

Lach-ner, Česká republika

Chlorid sodný

Lach-ner, Česká republika

### 2.1.3 Pomůcky

Dávkovač disků (Disc dispenser)	Oxoid, Velká Británie
Filtrační papír FILTRAK 388	Spezialpapierfabrik Niederschlag, Německo
Filtr papírový S – do šálků	ManuTea, Česká republika
Mikrotitrační destičky (96 jamek, PE)	SPL Life Sciences, Korea
Plastové Petriho misky	VWR International, Česká republika
Sterilní disky (blank, ø 6 mm)	Oxoid, Velká Británie
Sterilní jednorázové inokulační kličky 1 µl	BIOLOGIX, USA
Stěrové tampony	Deltalab, Španělsko
Běžné laboratorní pomůcky z plastu, skla a kovu	

### 2.1.4 Přístroje

Analytické váhy KERN KB	KERN, Německo
Analytické váhy KERN ALS 120-4N	KERN, Německo
Autokláv	BMT, Česká republika
Automatické mikropipety Discovery Comfort	HTL, Polsko
Automatické mikropipety Biohit	Biohit, Finsko
BACMED 6iG2	Aspiag s.r.o., Česká republika
Biologický termostat ST 3 COMF/S	POL-EKO, Polsko
Biologický termostat CO <sub>2</sub> CELL 48	MMM-Group, Kanada
Biologický termostat BT 120	Laboratorní přístroje Praha, Česká republika
Horkovzdušný sterilizátor STERIMAT 5104.2	BMT, Česká republika
Chladnička Gorenje RK 6201 BW	Gorenje, Slovinsko
Chladnička Zanussi ZRA 40100 WA	Zanussi, Itálie
McFarland Densitometr	Biosan, USA

## 2.2 Vzorky sypaných čajů zahrnutých do studie

Pro všechna testování bylo použito 7 vzorků sypaných čajů. Všechny testované čaje pocházely od firmy *ManuTea – Sypané čaje z vybraných plantáží světa z České republiky*. Přehled všech vzorků je zobrazen v Tab. 3. včetně informací k přípravě čajových nálevů, které vycházely z informací od dodavatele. Vzhled jednotlivých čajů je zachycena na Obr. 4.

Tab. 3: Seznam použitých sypaných čajů

<i>Název čaje</i>	<i>Země původu</i>	<i>Doba vyluhování</i>	<i>Teplota vody</i>
<b>Zelený čaj – SENCHA MAKATO</b>	Japonsko	2-3 minuty	70-80 °C
<b>Bílý čaj – CHINA PAI MU TAN</b>	Čína	2-3 minuty	70-80 °C
<b>Žlutý čaj – HUANG DA CHA</b>	Čína	2-3 minuty	70-80 °C
<b>Oolong – OOLONG CHINA SE CHUNG</b>	Čína	5 minut	80-90 °C
<b>Černý čaj – ASSAM TGFOP1 SONIPUR BIO</b>	Indie	3-5 minut	100 °C
<b>Pu-erh – PU ERH STD</b>	Čína	3-5 minut	100 °C
<b>Rooibos – ROOIBOS TEA SUPERGRADE BIO</b>	Jižní Afrika	3-5 minut	100 °C



**A****B****C****D****E****F****G**

*Obr. 4:* Přehled testovaných vzorků sypaných čajů: **A**-zelený čaj-SENCHA MAKATO; **B**-bílý čaj-CHINA PAI MU TAN; **C**-žlutý čaj-HUANG DA CHA; **D**-oolong-OOLONG CHINA SE CHUNG; **E**-černý čaj-ASSAM TGFOP1 SONIPUR BIO; **F**-Pu-erh-PU ERH STD; **G**-rooibos-ROOIBOS TEA SUPERGRADE BIO (foto autor)

## 2.3 Použité bakteriální kmeny

V této diplomové práci byly pro experimentální účely použity následující 4 bakteriální kmeny:

- *Arcobacter butzleri* CCUG 30484
- *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8 - izolát (ČOV Třebíč)
- *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050
- *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13 - izolát (ČOV Záboří nad Labem)

Tyto kmeny arkobakterů pocházely ze Sbírký mikroorganismů Univerzity Göteborg ve Švédsku (CCUG), z České sbírky mikroorganismů Masarykovy Univerzity v Brně (CCM) a interní sbírky mikroorganismů Univerzity Pardubice (UPa).

### 2.3.1 Uchovávání bakteriálních kmenů

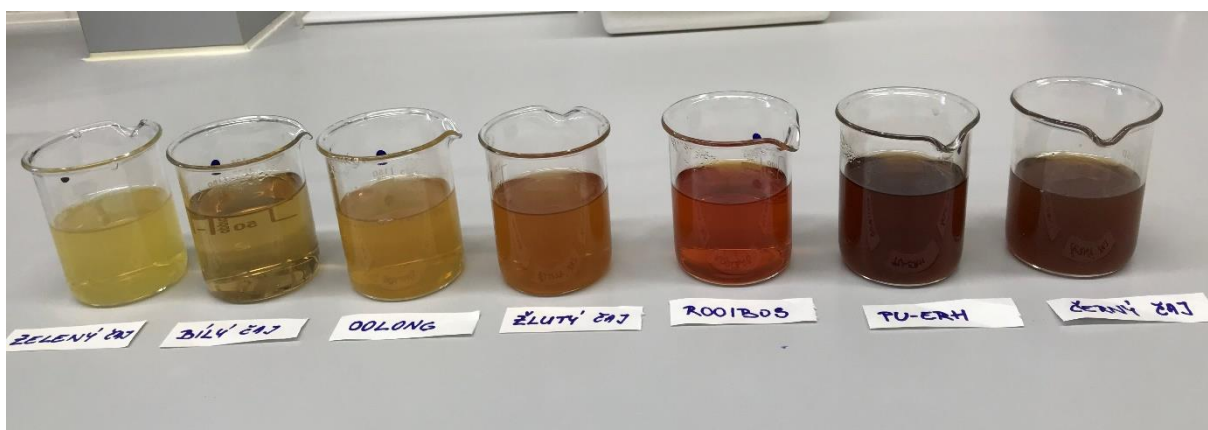
Všechny 4 kmeny byly po kultivaci při 30 °C po dobu 24–48 hodin uchovávány v chladničce naočkované na TSA agaru, avšak toto uchování bylo pouze po dobu několika dní. Pro dlouhodobé uchování byly jednotlivé kmeny zaočkovány do BHI bujónu (pomnožení při 30 °C po dobu 48–72 hodin) a poté skladovány v při chladničkové teplotě.

### 2.3.2 Příprava bakteriální suspenze

Před každým experimentem byl daný kmen vyočkován z BHI bujónu na TSA agar a kultivován při 30 °C po dobu 48–72 hod. Z izolovaných kolonií byla připravena bakteriální suspenze buněk ve fyziologickém roztoku – stupeň č. 3 McFarlandovy zákalové stupnice ( $10^8$  CFU/ml). Takto vzniklá buněčná suspenze byla řádně zhomogenizována a ověřena denzitometricky. Vzniklá bakteriální suspenze byla naředěna desítkovým ředěním ve fyziologickém roztoku na požadovanou denzitu buněk  $10^6$  nebo  $10^5$  CFU/ml v závislosti na daném experimentu. Denzita  $10^6$  CFU/ml byla použita pro stanovení mikrodiluční metodou a diskovou difúzní metodou. Pro přežívání arkobakterů v čajových nálevech byla použita denzita buněk  $10^5$  CFU/ml. Zároveň byla vždy provedena i kontrola skutečného počtu buněk, tj. byla připravena denzita buněk  $10^3$  CFU/ml, 100  $\mu$ l této suspenze bylo inokulováno na povrch M-H agaru a rozetřeno L-hokejkou. Po kultivaci bylo zkontrolováno, že počty narostlých kolonií odpovídaly denzitě  $10^2$  CFU/ml.

## 2.4 Příprava čajových nálevů a přežívání *Arcobacter* spp. v čajových nálevech

Jednotlivé nálevy čajů byly připraveny podle návodu uvedeného na obalech, a to 1 čajová lžička čaje byla vložena do papírového filtru, sloužícího jako nálevový sáček. Takto připravený nálevový sáček ve sterilní kádince byl zalit 1,5-2 dl horké vody o určité teplotě a přikrytý alobalem louhován po předepsanou dobu. Teploty horké vody a doby louhování pro jednotlivé druhy čajů jsou uvedeny v Tab. 3. Všech 7 testovaných čajových nálevů je zobrazeno na Obr. 5.



Obr. 5: Testované čajové nálevy zleva: zelený čaj, bílý čaj, čaj oolong, žlutý čaj, čaj rooibos, Pu-erh čaj a černý čaj (foto autor)

Takto vzniklý čajový nálev byl ochlazen na laboratorní teplotu. Dále byla připravena i bakteriální suspenze arko-bakterů ve fyziologickém roztoku o denzitě  $10^5$  CFU/ml. Do 9 ml ochlazeného čaje byla přidána bakteriální suspenze (1 ml) a vše bylo dobře promícháno na vortexu. Po zvolených expozičních časech (1, 2, 3, 6, 17 a 24 hodin) bylo provedeno vyočkování na povrch M-H agaru. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 24-48 hodin. Takto provedený test byl proveden v dubletu a opakován 2x. Po inkubaci byly spočítány vyrostlé kolonie na povrchu agaru a vyhodnoceny.

Pro každý test byla také provedena současně kontrola životaschopnosti bakteriální suspenze. Z výchozí denzity buněk  $10^8$  CFU/ml byla desítkovým ředěním ve fyziologickém roztoku připravena denzita  $10^3$  CFU/ml. Ze suspenze o této denzitě bylo pipetováno na povrch TSA agaru 100  $\mu$ l a roztřeno L-hokejkou. Kontrola byla též provedena v dubletech.

## **2.5 Příprava čajových extraktů**

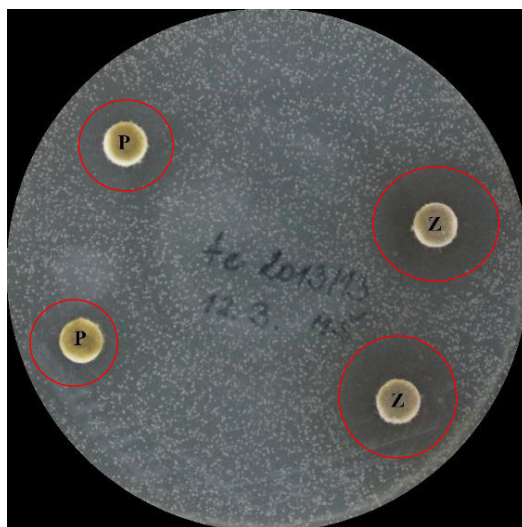
Pro přípravu jednotlivých extraktů byl nejprve navážen (cca 10 g) vzorek čaje do kádinky a bylo přidáno 50 ml 96% ethanolu. Kádinky byly dobře zakryty alobalem a ponechány k louhování v temnu při laboratorní teplotě po dobu 4 dní s občasným promícháním. Po 4 dnech byly extrakty zfiltrány přes filtrační papír. Přefiltrované extrakty byly rozlity do prázdných Petriho misek a vloženy do termostatu vyhřátého na 37 °C na 3-5 dní. Po odpaření rozpouštědla byly jednotlivé extrakty seškrabány kovovou špachtlí a zváženy. Extrakty byly poté v mikrozkušavkách rozpuštěny v 96% ethanolu na koncentraci 100 mg/ml. Takto připravené extrakty byly uchovávány v chladničce pro pozdější testování.

## **2.6 Stanovení citlivosti arkobakterů diskovou difúzní metodou**

Ke stanovení citlivosti arkobakterů na čajové extrakty byla využita disková difúzní metoda. Do připravené bakteriální suspenze o denzitě  $10^6$  CFU/ml byl namočen stěrový tampón a lehce otřen o vnitřní stěnu zkumavky. Pomocí stěrového tampónu byla kultura přenesena na povrch TSA agarů tak, aby došlo k dokonalému nátěru po celém povrchu agarů.

Na povrch takto připravené misky s bakteriální suspenzí byly pomocí dispenzoru nadávkovány 4 sterilní blankové disky o průměru 6 mm. Pomocí automatické pipety bylo na 3 disky nadávkováno 8  $\mu$ l určitého zhomogenizovaného extraktu. Na poslední z disků bylo nadávkováno 8  $\mu$ l samotného ethanolu, sloužícího jako kontrola antimikrobiálního účinku samotného ethanolu. Takto připravená Petriho miska s nadávkovanými disky a extrakty byla vložena do termostatu vyhřívajícího na 30 °C na dobu 24-48 hodin. Po kultivaci byly odečteny vzniklé zóny inhibice kolem jednotlivých disků. Takto provedený experiment byl proveden 2x a výsledky jsou vyjádřeny jako průměr z naměřených hodnot  $\pm$  směrodatná odchylka. V rámci interpretace výsledků nebyly od naměřených hodnot inhibičních zón extraktů odečítány inhibiční zóny samotného rozpouštědla (ethanol). Ukázka vzniklých inhibičních zón je zachycena na Obr. 6.

Zároveň byla provedena i kontrola bakteriální suspenze. Výchozí suspenze  $10^8$  CFU/ml byla desítkovým ředěním zředěna na denzitu  $10^3$  CFU/ml. Na povrch TSA agarů bylo aplikováno pomocí automatické pipety 100  $\mu$ l suspenze a rozetřeno do sucha L-hokejkou. Kontroly byly provedeny opět 2x.



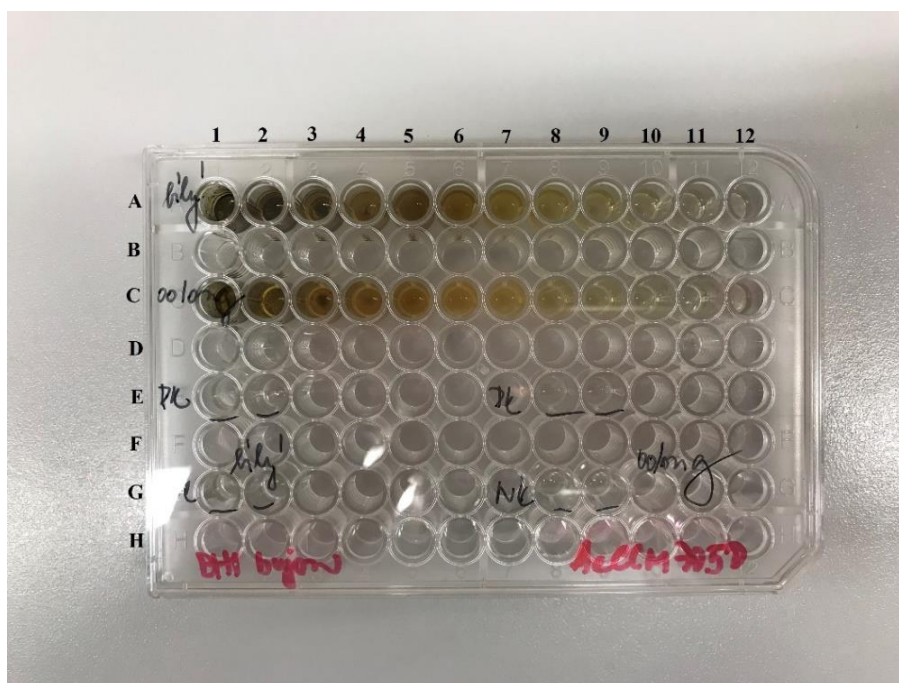
Obr. 6: Disková difúzní metoda – kmen: *A. cryaerophilus* UPa 2013/13, disky: vlevo-Pu-erh extrakt; vpravo-extrakt ze zeleného čaje (foto autor)

## 2.7 Stanovení minimálních inhibičních koncentrací čajových extraktů

Mikrodiluční metoda pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla prováděna v polyethylenových mikrotitrační destičkách s 96 jamkami.

Prvním krokem bylo připravení dvojkové ředící řady extraktu. Do první jamky prvního řádku bylo napipetováno 180  $\mu$ l příslušného extraktu v 96% ethanolu o koncentraci 100 mg/ml a do ostatních jamek (jamka 2-12) 90  $\mu$ l BHI bujónu. Postupným přenášením 90  $\mu$ l suspenze pomocí pipety z předešlé jamky do nové byla připravena ředící řada v rozsahu koncentrací 50-0,049 mg/ml (tj. jamky 2-12). Do takto připravené ředící řady byl napipetován objem 10  $\mu$ l bakteriální suspenze testovaného mikroorganismu o buněčné denzitě  $10^6$  CFU/ml. Současně byla provedena i 2x kontrola pozitivní a negativní. Pozitivní kontrola pro ověření životaschopnosti bakteriální suspenze byla připravena napipetováním 90  $\mu$ l BHI bujónu a 10  $\mu$ l bakteriální suspenze o denzitě  $10^6$  CFU/ml. Negativní kontrola byla připravena pouze napipetováním 100  $\mu$ l BHI bujónu a sloužila k ověření sterility samotného bujónu.

Takto připravená mikrotitrační destička byla přikryta víčkem, promíchána na třepače a vložena do plastového sáčku, aby se zamezilo vysychání. Uzavřená destička byla kultivována v termostatu při 30 °C po dobu 24 hodin. Ukázka mikrotitrační destičky před kultivací je zobrazena na Obr. 7.

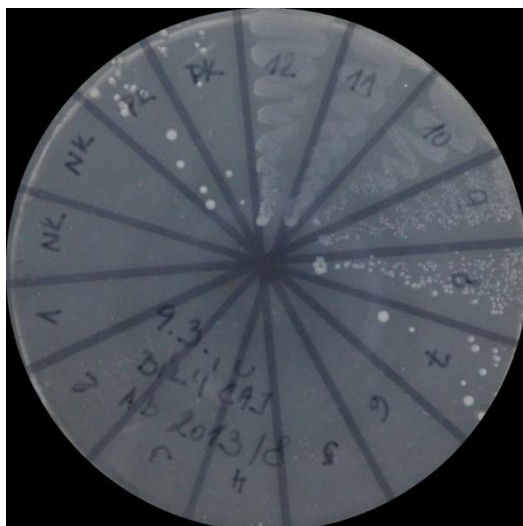


Obr. 7: Mikrotitrační destička s připravenou řadou extraktů z bílého čaje a čaje oolong zaočkována suspenzí *A. cryaerophilus* CCM 7050 (foto autor)

Po 24 hodinové kultivaci byla destička promíchána na třepačce a všechny zaočkované jamky byly následně vyočkovány na výseč TSA agaru. Tímto způsobem zaočkované TSA agary byly kultivovány v termostatu při 30 °C po dobu 24-48 hodin. Po kultivaci byly odečteny minimální inhibiční koncentrace, tzn. nejnižší koncentrace extraktu, které již inhibovaly růst testovaného kmenu. Stanovení minimálních inhibičních koncentrací pro každý extrakt bylo opakováno 2x. Ukázka výseče s narostlým kmenem je zachycena na Obr. 8.

Stejně jako u ostatních metod, i v tomto případě byla provedena kontrola bakteriální suspenze. Na povrch TSA agaru bylo napipetováno 100 µl bakteriální suspenze o denzitě  $10^3$  CFU/ml, rozetřeno L-hokejkou a po kultivaci byly spočítány vyrostlé kolonie. Tato kontrola pro ověření správně připravené suspenze byla opět 2x opakována.





Obr. 8: Stanovení MIC extraktu z bílého čaje proti *A. butzleri* UPa 2013/8; výšeče reprezentují jednotlivé koncentrace extraktu; PK=pozitivní kontrola, NK=negativní kontrola (foto autor)

## 2.8 Stanovení antioxidační kapacity čajových nálevů

Nejprve byly připraveny čajové nálevy podle návodu uvedeného dle kapitoly 2.2 a Tab. 3. Nálevy byly 100x zředěny destilovanou vodou. Do 10 ml odměrné baňky byl odměřen 1 ml zředěného nálevu a doplněno destilovanou vodou po rysku. Stejným způsobem byl připraven i slepý pokus pouze s destilovanou vodou. Dále byl připraven do 100 ml odměrné baňky zásobní roztok látky Trolox o koncentraci 250  $\mu\text{g/ml}$  v 95% ethanolu z něhož byla dále připravena kalibrační řada o koncentracích 5, 10, 15, 20 a 25  $\mu\text{g/ml}$  do 10 ml odměrných baněk a vše doplněno vodou po rysku.

Z takto připravených vzorků a kalibračních roztoků bylo pipetováno 500  $\mu\text{l}$  do zkumavky a následně ke každému vzorku bylo přidáno 5 ml methanolického roztoku DPPH (2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl) o koncentraci 25  $\mu\text{g/ml}$ . Zkumavky byly ponechány 20 min reagovat na temném místě při laboratorní teplotě a poté byl změřen úbytek absorbance při 517 nm.

### 2.8.1 Vyjádření výsledků

Jelikož metoda využívající redukce DPPH radikálu ke stanovení antioxidační kapacity je brána jako orientační, výsledky jsou uváděny v procentech DPPH radikálu inhibovaného při reakci I (%). Výpočet byl proveden dle vztahu:

$$I (\%) = \frac{A_{sp} - A_{vz}}{A_{sp}} \cdot 100$$

Kde hodnota  $A_{sp}$  byla absorbance slepého pokusu a  $A_{vz}$  absorbance vzorku. Byl sestaven kalibrační graf včetně příslušné rovnice regrese a následně vypočteny hodnoty antioxidační kapacity pro vzorky čajových nálevů.



## 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 3.1 Přežívání *Arcobacter* spp. v čajových nálevech

Pro dané testování byly připraveny čajové nálevy podle postupu, jak již bylo popsáno v kapitole 2.4. Po zalití čajových lístků horkou vodou došlo k jejich plnému rozvinutí.

V následujících Grafech 1-7 jsou znázorněny výsledky přežívání bakterie *Arcobacter* spp. v jednotlivých čajových nálevech po expozici 0, 2, 3, 6, 17 a 24 hodin. Výsledné hodnoty v grafech jsou průměrem ze 4 naměřených hodnot. Součástí hodnot jsou zaznamenány i chybové úsečky pro kalkulovanou směrodatnou odchylku. Všechny naměřené hodnoty a jejich průměry včetně hodnot směrodatné odchylky jsou součástí Přílohy 1-7.

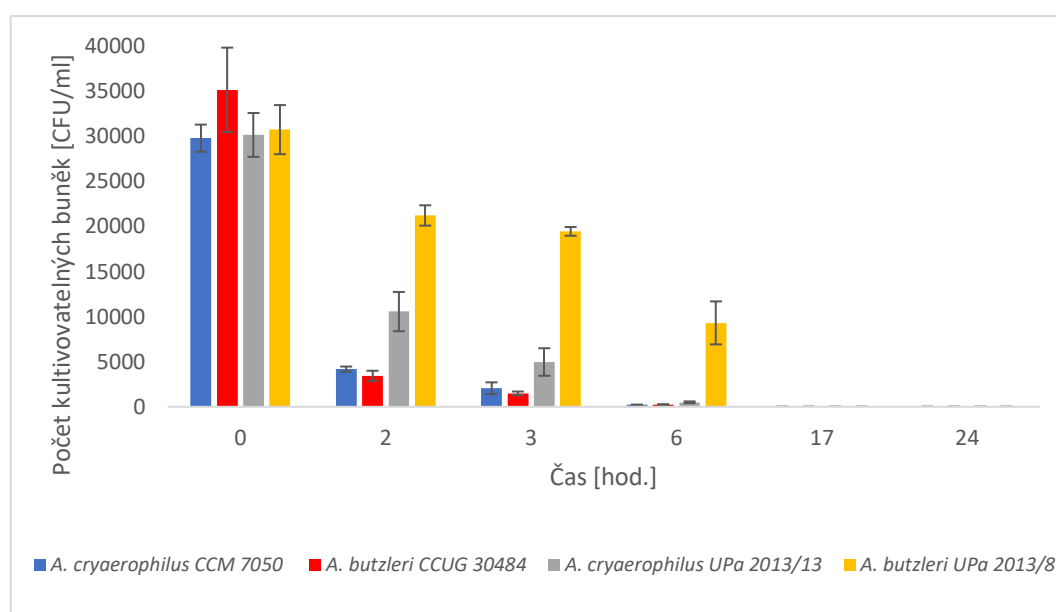
Obecně již po 17 hodinách expozice nebylo patrné přežívání arkobakterů. Lze tedy říci, že všech 7 testovaných vzorků sypaných čajů působilo proti *Arcobacter* spp. antibakteriálně. Lze konstatovat, že arkobaktery izolované z prostředí vod byly odolnější k účinku čajových nálevů. Důvodem toho nejspíše bylo, že pocházely z reálného prostředí a byly přizpůsobivější k delšímu přežívání za nepříznivých podmínek.

Za jeden z nejvíce antimikrobiálně působících nálevů lze považovat nálev ze zeleného čaje. Tento čaj patří mezi čaje nefermentované (Hashimoto et al., 2007). Za antimikrobiálně účinné látky v čajových lístcích můžeme považovat katechiny, především katechin EGCG (Gramza et al., 2005; Reygaert, 2014). Avšak podobné antimikrobiální účinky proti *Arcobacter* spp. vykazoval i nálev z černého čaje. Černý čaj je čaj fermentovaný a má tedy rozdílný způsob zpracování, než čaj zelený (Ozdemir et al., 2017). Společnou vlastností těchto dvou čajů je obsah kofeinu, což může též hrát důležitou roli v antimikrobiální účinnosti proti bakteriím *Arcobacter* spp.

Dalším nálevem s vysokou antimikrobiální aktivitou je nálev z bílého čaje, který stejně jako nálev ze zeleného čaje obsahuje velké množství katechinů, převážně EGCG (Almajano et al., 2008).

### 3.1.1 Zelený čaj – SENCHA MAKATO

Z Grafu 1 je patrné, že zelený čaj působil nejvíce antimikrobiálně na sbírkové bakterie *A. butzleri* CCUG 30484 a *A. cryaerophilus* CCM 7050. Po 2 a 3 hodinách expozice došlo k nejvyššímu poklesu počtu životaschopných buněk. Zatímco izolát *A. butzleri* UPa 2013/8 patřil mezi nejodolnější vůči nálevu ze zeleného čaje, i po 6 hodinách bylo zjištěno  $9,3 \times 10^3$  CFU/ml. Kmen *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 byl ve srovnání s *A. cryaerophilus* CCM 7050 odolnější, byl pozorován pozvolnější pokles počtu životaschopných a kultivovaných buněk, avšak po 6 hodinách expozice byly počty již srovnatelné (u izolátu bylo zjištěno  $5,0 \times 10^2$  CFU/ml, u sbírkového kmenu jich bylo  $2,1 \times 10^2$  CFU/ml).

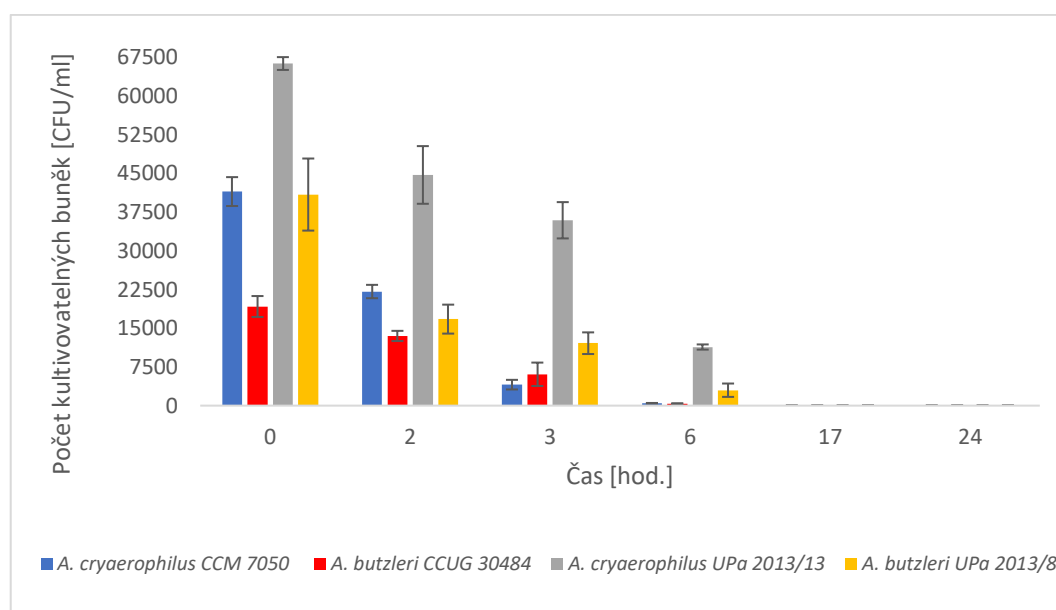


Graf 1: Přežívání *Arcobacter* spp. v nálevu ze zeleného čaje, (n=4)

V minulosti byla popsána studie zabývající se antimikrobiálním účinkem čajů na bakterie *H. pylori* a *C. jejuni*, avšak za použití extraktů ze zeleného a černého čaje v PBS pufru. Bylo zjištěno, že oba extrakty působily stejně baktericidně na dané  $G^-$  bakterie. K antimikrobiálnímu účinku došlo u *H. pylori* po 5 hodinách od zaočkování bakterie do extraktu. U bakterie *C. jejuni* došlo k inhibici již po 4 hodinách od expozice (Diker a Hascelik, 1994). Lze tedy usuzovat, že antimikrobiální účinek extraktů je rychlejší proti  $G^-$  bakteriím ve srovnání s čajovými nálevy testovanými v této studii. Důvod je nejspíše takový, že v extraktech je zakonzentrováno větší množství účinných látek antimikrobiálně působících na dané bakterie.

### 3.1.2 Bílý čaj – CHINA PAI MU TAN

Oba izoláty arko bakterů byly odolnější vůči nálevu z bílého čaje a přežily v něm ve větší míře než sbírkové kmeny. Nálev z bílého čaje vykazoval podobný antimikrobiální efekt proti sbírkovým kmenům *A. butzleri* CCUG 30484 a *A. cryaerophilus* CCM 7050, jako nálev ze zeleného čaje, jak je možné vidět v Grafu 2. Avšak větší rozdíly mezi těmito čaji byly zaznamenány pouze u stanovení antioxidační kapacity (u nálevu z bílého čaje byla zjištěna hodnota antioxidační kapacity 34,38 mg/100 g, zatímco u nálevu ze zeleného čaje byla změřena hodnota 82,36 mg/100 g).



Graf 2: Přežívání *Arcobacter* spp. v nálevu z bílého čaje, (n=4)

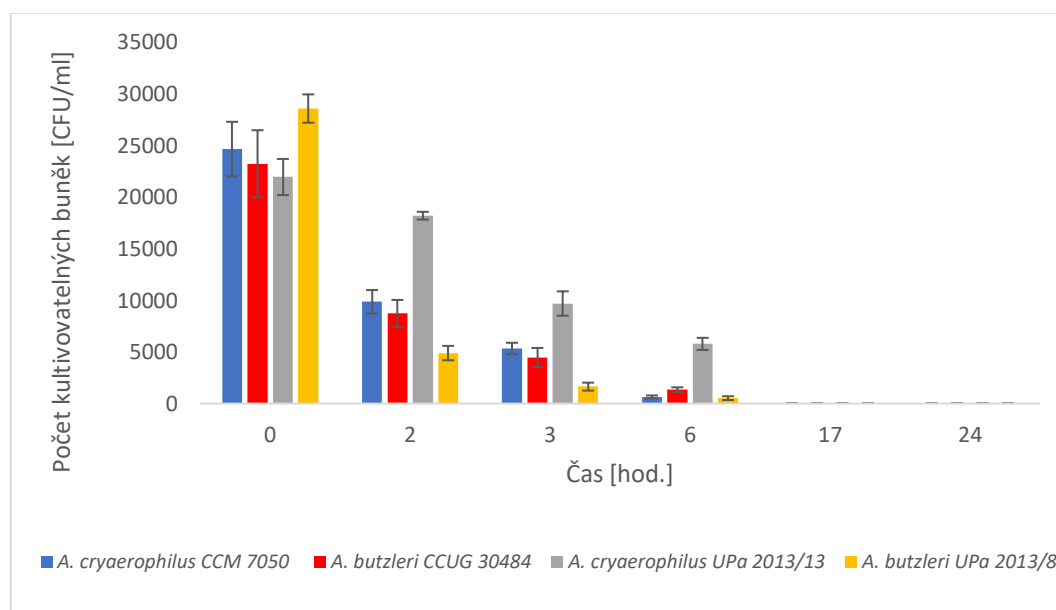
Podobné antimikrobiální výsledky s nálevem z čaje zeleného mohou být způsobeny předpokládaným vysokým obsahem katechinu EGCG u obou nálevů. V dřívější literatuře bylo zjištěno, že obsah EGCG katechinů u bílého čaje vykazoval hodnotu 1525 mg/100 g čajových lístků a u zeleného čaje 2409 mg/100 g čajových lístků. Na rozdíl od nálevu z čaje černého, ve kterém bylo zjištěno pouze 270 mg/100 g čajových lístků (Almajano et al., 2008).

Bílý čaj patří mezi čaje lehce fermentované, zatímco černý čaj je čaj plně fermentovaný. Ve srovnání těchto dvou nálevů po 6 hodinách expozice vykazovaly oba nálevy podobné výsledky, i když se jedná o rozdílné druhy čajů. Významný rozdíl nastal pouze u bakterie *A. cryaerophilus* UPa 2013/13. Nálev z černého čaje byl antimikrobiálně účinnější

a po 6 hodinách bylo zaznamenáno  $7,1 \times 10^2$  CFU/ml, zatímco u nálevu z bílého čaje bylo ve stejný expoziční čas zjištěno  $1,1 \times 10^4$  CFU/ml.

### 3.1.3 Žlutý čaj – HUANG DA CHA

Nálev ze žlutého čaje byl antimikrobiálně nejúčinnější vůči izolátu *A. butzleri* UPa 2013/8. Sbírkový kmen *A. butzleri* CCUG 30484 byl také citlivější k přežívání v nálevu a po 6 hodinách expozice bylo zjištěno  $1,3 \times 10^3$  CFU /ml. Ve srovnání např. s izolátem *A. cryaerophilus* UPa 2013/13, který v tomto nálevu byl nejodolnější bylo po stejné době expozice zjištěno  $5,8 \times 10^3$  CFU/ml, což je patrné z Grafu 3.



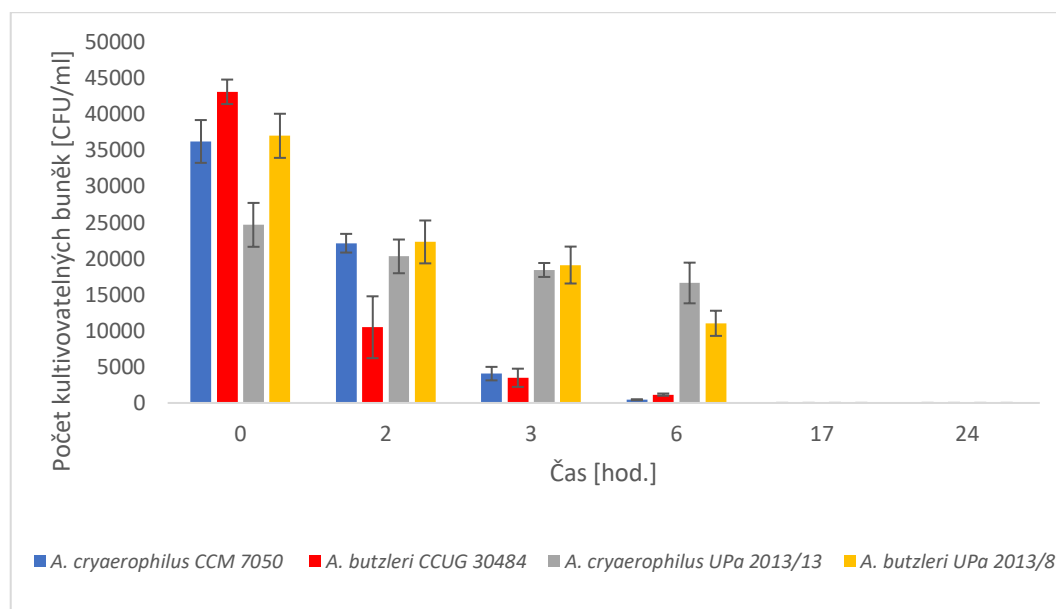
Graf 3: Přežívání *Arcobacter* spp. v nálevu ze žlutého čaje, (n=4)

U žlutého čaje bylo dříve zjištěno, že obsahuje 20-30 % polyfenolů, což je srovnatelné nebo vyšší než u zeleného čaje a také obsahuje 10x více kyseliny galové než čaj zelený (Xu et al., 2018). Obdobné výsledky jako u čaje žlutého lze tedy vidět i u nálevu ze zeleného čaje. U obou čajů došlo k rapidnímu poklesu počtu životaschopných buněk v závislosti na době expozice. Oba nálevy mají víceméně podobné antimikrobiální účinky na *Arcobacter* spp., avšak čaj žlutý byl účinnější na *A. butzleri* UPa 2013/8, zatímco zelený čaj na druhý izolát zahrnutý do této studie, tedy *A. cryaerophilus* UPa 2013/13.

V dřívější studii bylo zjištěno, že žlutý čaj inhiboval růst střevních mikroorganismů, jako např. *E. coli* (Xu, et al., 2018).

### 3.1.4 Oolong – OOLONG CHINA SE CHUNG

Tento druh čaje patří mezi čaje polofermentované, tedy tvoří jakýsi přechod mezi nefermentovaným zeleným čajem a plně fermentovaným čajem černým. Ve srovnání s těmito nálevy vykazuje podobnou antimikrobiální účinnost na izolát *A. butzleri* UPa 2013/8. Tento izolát byl u nálevů z čajů oolong, zeleného a černého nejvíce rezistentní a přežíval po 6 hodinové expozici v největších počtech buněk. Stejně tomu bylo i u druhého izolátu *A. cryaerophilus* UPa 2013/13, který byl opět v nálevu z čaje oolong odolnější než oba sbírkové kmeny. Tyto výsledky jsou zaznamenány v Grafu 4.



Graf 4: Přežívání *Arcobacter* spp. v nálevu z čaje oolong, (n=4)

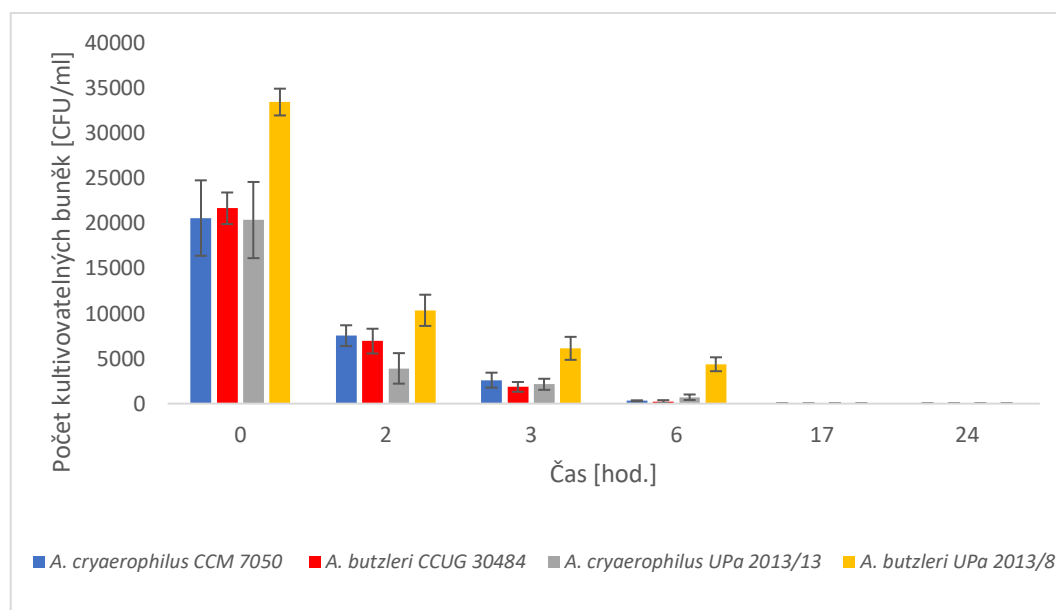
Existují studie, ve kterých bylo popsáno, že dochází ke snížení antimikrobiální aktivity čajů s rostoucím stupněm jejich fermentace. Původně přítomné čajové katechiny nebo polyfenoly ztrácejí svoji antimikrobiální aktivitu v průběhu enzymatické oxidace (Mo et al., 2008). Z výsledků, které byly získány během testování nálevů, tento fakt ale nelze stoprocentně potvrdit. Avšak ve srovnání s nálevem ze zeleného čaje opravdu došlo u nálevu z čaje oolong

ke snížení antimikrobiální aktivity, klesající trend počtu kolonií v jednotlivých časech byl pozvolnější a nedocházelo k tak rychlé inhibici arko-bakterů.

Zatímco v porovnání s nálevem z čaje černého, u které by se podle této teorie očekávala nejnižší inhibice ze všech nálevů, byl výsledek překvapující. Nálev vykazoval antimikrobiální aktivitu podobnou nálevu ze zeleného čaje. V případě izolátu *A. butzleri* UPa 2013/8 byl nálev z černého čaje účinnější a po 6 hodinách expozice bylo zjištěno pouze  $4,4 \times 10^3$  CFU/ml, zatímco u nálevu ze zeleného čaje bylo změřeno  $9,3 \times 10^3$  CFU/ml.

### 3.1.5 Černý čaj – ASSAM TGFOP1 SONIPUR BIO

Za velmi antimikrobiálně účinný čajový nálev lze vedle zeleného považovat i ten z černého čaje, jak vyplývá z Grafu 5. I v tomto případě již po 2 hodinách po zaočkování bakterie do nálevu došlo ke snížení počtu životaschopných buněk o více jak polovinu oproti hodnotám v čase zaočkování. Nejdolnější bakterií lze v tomto smyslu u nálevu z černého čaje považovat také izolát *A. butzleri* UPa 2013/8, stejně jako u nálevu ze zeleného čaje. Sbírkové kmeny, jak *A. cryaerophilus* CCM 7050, tak *A. butzleri* CCUG 30484 vykazovaly podobný klesající trend v nálevu černého čaje podobně jako izolát *A. cryaerophilus* UPa 2013/13.



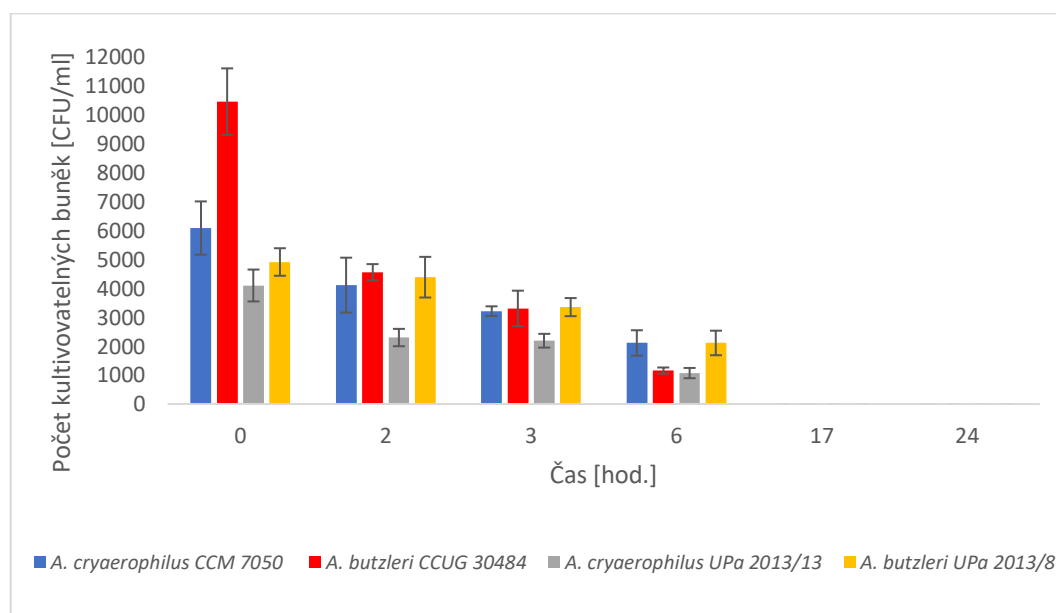
Graf 5: Přežívání *Arcobacter* spp. v nálevu z černého čaje, (n=4)

Za další pozitivní přínos tohoto čajového nálevu lze považovat vysokou antioxidační kapacitu. Tato antioxidační kapacita byla jednou z nejvyšších naměřených a byla vyšší než u nálevu ze zeleného čaje nebo čaje bílého.

Byla provedena studie, ve které byl testován extrakt z černého čaj v pufru PBS proti bakteriím *C. jejuni* a *C. coli*. V tomto případě byl extrakt proti bakteriím účinnější a došlo k úplné inhibici již za 4 hodiny (Diker et al., 1991). Stejně jako u nálevu ze zelené čaje lze říci, že extrakty jsou v proti G<sup>-</sup> bakteriím účinnější než samotné čajové nálevy.

### 3.1.6 Pu-erh – PU ERH STD

U všech čajových nálevů byly izoláty arkobakterů více rezistentní než sbírkové kmeny a po expozici 6 hodin přeživaly v nálevech ve větších počtech. U nálevu z čaje Pu-erh, jak je možno vidět v Grafu 6, byly počty kolonií jak obou izolátů *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 a *A. butzleri* UPa 2013/8, tak obou sbírkových kmenů *A. cryaerophilus* CCM 7050 a *A. butzleri* CCUG 30484 téměř vyrovnány. U Pu-erh nálevu nedocházelo k tak prudkému klesání počtů životaschopných buněk ve srovnání s ostatními čajovými nálevy.



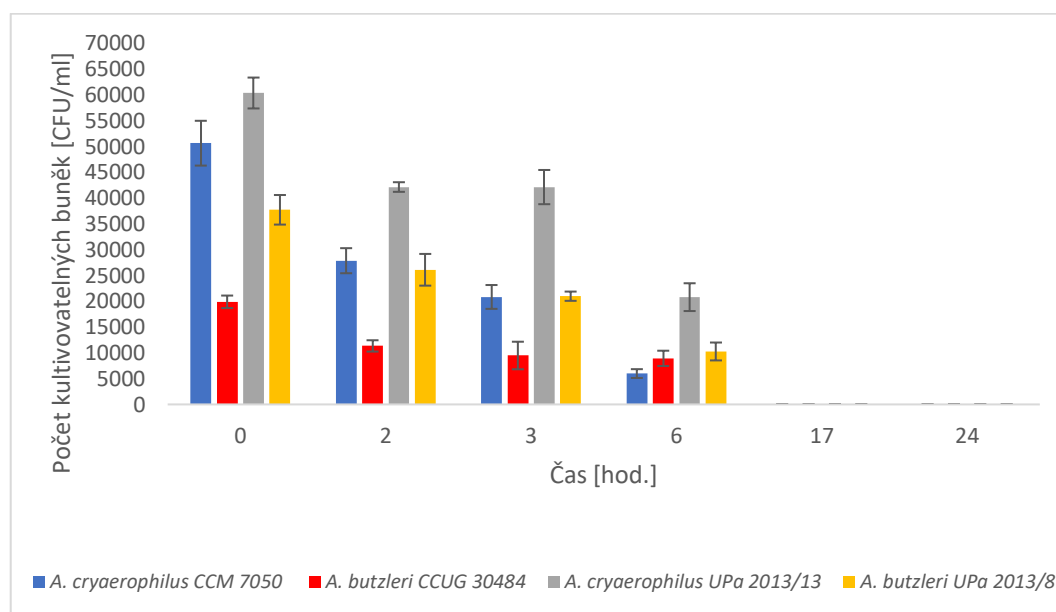
Graf 6: Přežívání *Arcobacter* spp. v nálevu z Pu-erh čaje, (n=4)

Ve srovnání nálevu Pu-erh s nálevem ze žlutého čaje byly oba nálevy téměř stejně antimikrobiálně účinné proti arkobakterům. Oba druhy těchto čajů totiž patří mezi čaje fermentované mikroorganismy. Zatímco u nálevu ze žlutého čaje, který byl antimikrobiálně účinnějším na izolát *A. butzleri* UPa 2013/8, nálev z Pu-erh čaje byl mnohem účinnějším na izolát *A. cryaerophilus* UPa 2013/13.

Bylo zjištěno, že tento vzorek čaje byl již z výroby kontaminován sporotvornými bakteriemi, které přežívaly i přípravu čajového nálevu. Díky přítomnosti těchto bakterií ve všech časech expozice docházelo ke špatnému odečítání narostlých kolonií arkobakterů, které jsou známy horšími růstovými vlastnostmi ve srovnání s jinými bakteriemi (Šilha et al., 2015). Z tohoto důvodu mohou být výsledky lehce zkresleny.

### 3.1.7 Rooibos – ROOIBOS TEA SUPERGRADE BIO

Z Grafu 7 lze vyčíst, že nálev z čaje rooibos působil nejnižším antimikrobiálním účinkem ze všech testovaných nálevů. Po expozici 6 hodin byly počty kolonií i u sbírkových kmenů v hodnotách nad počty  $5,0 \times 10^3$  CFU/ml.



Graf 7: Přežívání *Arcobacter* spp. v nálevu z rooibos čaje, (n=4)



Mezi jednotlivými časy zaočkování nedocházelo u všech 4 arkobakterů k rychlému úbytku počtu životaschopných buněk. Lze tedy předvídat, že pomalu klesající trend by pokračoval i v časech dalších, které nebyly sledovány a k úplné inhibici by mohlo dojít v expozičním čase 6-17 hodin. Ve srovnání s nálevem z čaje zeleného nebo černého, došlo po expozici 6 hodin k prudkému poklesu počtu životaschopných buněk a lze předpokládat, že v dalších nesledovaných časech, např. po 8 hodinách by již nemusel být žádný nárůst kolonií na M-H agaru.

### **3.2 Stanovení citlivosti *Arcobacter* spp. diskovou difúzní metodou**

Tab. 4 zobrazuje průměrné inhibiční zóny získané diskovou difúzní metodou pro jednotlivé čajové extrakty, které byly předmětem testování u bakterií rodu *Arcobacter*. Všechny získané hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry inhibičních zón se směrodatnou odchylkou a jsou uváděny včetně  $\varnothing$  disků (6 mm). Současně s extrakty byla zjišťována inhibiční zóna čistého 96% ethanolu. V tomto případě byla zóna inhibice rozpouštědla v průměru 8-9 mm. Vzhledem k tomu, že byl hodnocen ethanolový roztok získaného extraktu, z výsledných hodnot inhibičních zón testovaných extraktů nebyly odečítány inhibiční účinky samotného rozpouštědla (ethanol).

Jednotlivé ethanolové extrakty byly připraveny v koncentraci 100 mg/ml podle postupu uvedeného v kapitole 2.5.

V případě jednotlivých extraktů byly značné rozdíly jak v získané výtěžnosti, tak v jednotlivých strukturách extraktu. U zeleného, žlutého a bílého čaje po 4denním louhování nedošlo k rozvinutí jednotlivých lístků. Avšak došlo k tomu, že se do 96% ethanolu extrahovaly antimikrobiální účinné látky, ale také barviva. Po odpaření rozpouštědla šly extrakty dobře seškrabat, byly spíše prachové povahy s velkou výtěžností. Takto vzniklé extrakty po opětovném rozpuštění v 96% ethanolu byly tmavě zelené až naředlé. Velkou výtěžnost měl i seškrabaný extrakt z čaje oolong a po rozpuštění v 96% ethanolu vznikl též tmavý extrakt. Jinak tomu bylo u černého čaje, který měl nejmenší výtěžnost z testovaných vzorků čajů. Vzniklý extrakt po 4denním louhování, zfiltrování a odpařením rozpouštědla měl světle hnědou až zlatou barvu a velmi jemné prachové částičky. Po navážení a rozpuštění v 96% ethanolu měl vzniklý extrakt hnědou barvu a ve srovnání s ostatními extrakty byl nejsvětější. U čajů Pu-erh a rooibos vznikly po odpaření ethanolu špatně seškrabatelné extrakty, nedošlo k úplnému

vysušení a byly mazlavé. Oba připravené extrakty byly opět tmavé barvy zelené až šedé, stejně jako ostatní ethanolové extrakty

Tab. 4: Stanovení citlivosti arko-bakterů diskovou difúzní metodou, (n=6), výsledky vyjádřeny jako průměr ± SD

	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050	<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> UPa 2013/8
<b>Průměr inhibičních zón [mm]</b>				
<b>Zelený čaj</b>	15,0 ± 0,9	20,0 ± 1,2	21,3 ± 0,5	14,7 ± 0,5
<b>Bílý čaj</b>	13,2 ± 0,8	15,7 ± 1,0	18,8 ± 0,4	14,7 ± 0,8
<b>Žlutý čaj</b>	15,8 ± 0,8	18,6 ± 1,0	19,0 ± 0,9	14,5 ± 1,0
<b>Oolong</b>	15,8 ± 0,7	14,8 ± 0,8	18,3 ± 0,5	14,5 ± 0,6
<b>Černý čaj</b>	11,5 ± 0,6	11,0 ± 0,9	16,3 ± 1,6	10,7 ± 0,8
<b>Pu-erh</b>	9,1 ± 0,5	9,7 ± 0,5	11,3 ± 0,5	9,0 ± 0,6
<b>Rooibos</b>	8,7 ± 0,5	9,5 ± 0,6	9,3 ± 0,5	9,0 ± 0,6

Značné rozdíly v zónách inhibice, byly jak mezi jednotlivými čaji, tak i mezi jednotlivými kmeny. U sbírkového kmenu *A. cryaerophilus* CCM 7050 byly menší zóny inhibice než u izolátu *A. cryaerophilus* UPa 2013/13. U druhého kmenu tomu bylo právě naopak – u sbírkového kmenu *A. butzleri* CCUG 30484 byly inhibiční zóny větší než u izolátu *A. butzleri* UPa 2013/8. Celkově největší zóny inhibice byly naměřeny u *A. cryaerophilus* UPa 2013/13, kromě extraktu z čaje rooibos, u kterého byla největší zóna u *A. butzleri* CCUG 30484.

### 3.2.1 Zelený čaj – SENCHA MAKATO

Stejně jako připravené nálevy, tak i čajové extrakty působily na všechny 4 arko-baktery antimikrobiálně, což je velmi pozitivní zjištění. Nejvyšší antimikrobiální účinky na arko-baktery vykazoval stejně jako u připraveného nálevu extrakt ze zeleného čaje. Jak je možné vidět v Tab. 4, největší inhibiční zóna byla naměřena 21,3 mm, a to u bakterie *A. cryaerophilus*

UPa 2013/13 a tato inhibiční zóna byla největší ze všech naměřených inhibičních zón u všech testovaných extraktů a bakteriálních kmenů. U tohoto extraktu byla také naměřena druhá největší průměrná zóna 20,0 mm u sbírkové bakterie *A. butzleri* CCUG 30484.

Dříve byla provedena studie, která se zabývala antimikrobiálními vlastnostmi proti *E. coli*, avšak za použití čajového nálevu nikoliv extraktu ze zeleného čaje. V tomto případě byla naměřena průměrná inhibiční zóna jen 6,2 mm a při testování bakterie *B. cereus* byla průměrná inhibiční zóna 13,9 mm (Almajano et al., 2008). Ve srovnání extraktů a nálevů působí ethanolové extrakty na bakterie obecně vyšším antimikrobiálním účinkem.

Ovšem v jiné studii byla zjištěna u *E. coli* průměrná inhibiční zóna 14 mm. Tato zóna inhibice byla naměřena v přítomnosti vodného extraktu z čaje zeleného, který pocházel z Bangladéše (Nibir et al., 2017). Z tohoto a předešlého tvrzení vyplývá, že použití vodného extraktu na *E. coli* je antimikrobiálně účinnější než použití čajového nálevu.

Jiná studie se zase zabývala antimikrobiálním účinkem 20% PBS extraktu ze zeleného a černého čaje na bakterie *H. pylori* a *C. jejuni*. Diskovou difúzní metodou byly u *H. pylori* zjištěny velikosti inhibičních zón v rozmezí 16-21 mm. U *C. jejuni*, která v této studii byla jako kontrolní organismus, byla naměřena inhibiční zóna 22 mm. Jak u zón inhibice extraktu ze zeleného čaje, tak extraktu z čaje černého nebyly rozdíly (Diker a Hascelik, 1994). Tyto velikosti inhibičních zón odpovídaly zhruba naměřeným hodnotám pro bakterie *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 a *A. butzleri* CCUG 30484 u zeleného čaje. U extraktu z čaje černého vyšly průměrné inhibiční zóny odlišné než ty popsané v literatuře. Pouze podobná hodnota inhibiční zóny s bakterií *H. pylori* byla naměřena u *A. cryaerophilus* UPa 2013/13, a to 16,3 mm.

Velikost inhibičních zón byla také zjišťována u *H. pylori* za použití ethanolového extraktu o koncentraci 9,375 mg. V tomto případě byla naměřena průměrná zóna inhibice pouze 7,5 mm (Reygaert, 2014). Ve srovnání s PBS extraktem byl tento ethanolový extrakt méně antimikrobiálně účinný proti *H. pylori*.

Použitím vodného extraktu ze zeleného čaje byla zjištěna průměrná zóna inhibice 12 mm proti  $G^-$  bakterii *Pseudomonas fluorescens*. U  $G^+$  bakterií byly naměřeny větší zóny inhibice, např. u bakterie *Staphylococcus epidermidis* průměrně až 20 mm (Sharma et al., 2012). Z tohoto zjištění lze tvrdit, že vodné extrakty jsou účinnější proti  $G^+$  bakteriím, zatímco ethanolové proti  $G^-$  bakteriím.

V dřívější studii bylo provedeno testování, které se zabývalo antibakteriální aktivitou methanolového extraktu ze zeleného čaje proti G<sup>-</sup> bakterii *Aeromonas hydrophila*. Při použité koncentraci extraktu 100 mg/ml byla zjištěna průměrná zóna inhibice 13,8 mm (Akbar, 2014). Tato velikost inhibiční zóny byla menší než naměřená u *Arcobacter* spp., nejbližší hodnota odpovídala průměrné inhibiční zóně u *A. butzleri* UPa 2013/8, která byla 14,7 mm. Aeromonády patří stejně jako arkobakterie mezi patogenní bakterie a vyskytují se v potravinách, vodách a životním prostředí (Janda a Abbott, 2010).

### 3.2.2 Bílý čaj – CHINA PAI MU TAN

Ethanolový extrakt z bílého čaje v případě stanovení antimikrobiální citlivost pomocí diskové difúzní metody lze svým antibakteriálním potenciálem zařadit až za extrakty ze zeleného a žlutého čaje, protože u něj byly naměřeny menší zóny inhibice, viz Tab. 4. Zatímco při stanovení antimikrobiální účinnosti připravených čajových nálevů vykazoval bílý čaj obdobné účinky na bakterie jako nálev ze zeleného čaje. Extrakt z bílého čaje vykazoval největší průměrnou zónu inhibice u bakterie *A. cryaerophilus* UPa 2013/13. Stejně tomu bylo i u zbylých extraktů kromě čaje rooibos, největší zóna inhibice byla naměřena u *A. butzleri* CCUG 30484, a to 9,5 mm.

Dříve byla provedena studie, která se zabývala antimikrobiálním účinkem bílého čaje o koncentraci 1 mg/ml proti bakterii *E. coli* ATCC 25922. V tomto případě byla naměřena zóna inhibice průměrně 9,0 mm (Koech et al., 2013). Takto malá velikost inhibiční zóny nebyla naměřena u žádného kmenu u extraktu z bílého čaje. Dále byla ve studii zjištěna zóna inhibice průměrně 20,0 mm, a to u G<sup>+</sup> bakterie *S. aureus* ATCC 25923 (Koech et al., 2013). V našem experimentu byla naměřena největší zóna inhibice u extraktu z bílého čaje u izolátu *A. cryaerophilus* UPa 2013/13, a to zóna o velikosti 18,8 mm.

Při použití nálevu z bílého čaje proti bakterii *E. coli* metodou diskové difúze byla zjištěna zóna inhibice 6,4 mm. Zatímco u bakterie *B. cereus* byla naměřena průměrná zóna inhibice 12,5 mm (Almajano et al., 2008). Stejně jako u zeleného čaje, i v tomto případě čajové nálevy neměly tak velký antimikrobiální účinek, jako čajové extrakty z bílého čaje proti *Arcobacter* spp., u kterých vyšly zóny inhibice v rozmezí 13,2-18,8 mm.

Ethanolový extrakt z bílého čaje měl stejné antimikrobiální účinky proti *A. butzleri* UPa 2013/8 stejně jako extrakt připravený z čaje zeleného. U extraktů z bílého a zeleného čaje proti tomuto

izolátu byla změřena průměrná inhibiční zóna 14,7 mm. Avšak extrakt ze zeleného čaje vykazoval vyšší antimikrobiální účinky proti zbylým třem arkobakterům ve srovnání s extraktem z bílého čaje, u něhož byly naměřeny menší zóny inhibice.

### 3.2.3 Žlutý čaj – HUANG DA CHA

Téměř stejné antimikrobiální účinky proti arkobakterům jako měl extrakt ze zeleného čaje vykazoval i extrakt ze žlutého čaje. U bakterií *A. butzleri* CCUG 30484 a *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 byly průměrné zóny inhibice velmi podobné zónám u extraktu z čaje zeleného. Největší zóna inhibice byla změřena stejně jako u zeleného čaje u *A. cryaerophilus* UPa 2013/13, která byla 19,0 mm jak je možno vidět v Tab. 4.

Třetí největší zóna inhibice ze všech naměřených, a to 19,0 mm, byla právě zjištěna u *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 za použití extraktu ze žlutého čaje. U testování nálevu ze žlutého čaje bylo zjištěno, že nálev působil nejvíce antimikrobiálně na izolát *A. butzleri* UPa 2013/8. Zatímco extrakt ze žlutého čaje působil stejně proti tomuto izolátu jako extrakty z čaje zeleného, bílého a oolong a průměrná zóna inhibice byla 14,5-14,7 mm.

### 3.2.4 Oolong – OOLONG CHINA SE CHUNG

Srovnatelné antimikrobiální účinky jako extrakt z bílého čaje, který se připravuje lehkou fermentací, vykazoval extrakt z čaje oolong, který patří mezi polofermentované čaje (Hashimoto et al., 2007). U extraktů z bílého čaje a čaje oolong byly zóny inhibice nepatrně menší než u extraktů ze zeleného a žlutého čaje, což lze vyčíst z Tab. 4. Avšak úplně stejné zóny inhibice byly naměřeny i ve srovnání čaje oolong se žlutým čajem. U obou ethanolových extraktů byla zjištěna zóna inhibice 15,8 mm proti bakterii *A. cryaerophilus* CCM 7050 a 14,5 mm proti *A. butzleri* UPa 2013/8.

Při testování přežívání *Arcobacter* spp. v čajových nálevech bylo zjištěno, že nálev z čaje oolong působil v největší míře antimikrobiálně na oba sbírkové kmeny, a to na *A. cryaerophilus* CCM 7050 a *A. butzleri* CCUG 30484. Avšak výsledky testování diskovou difúzní metodou jsou odlišné. Touto metodou byl zjištěn nejvyšší antimikrobiální účinek proti izolátu *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 a byla naměřena průměrná zóna inhibice 18,3 mm.

### 3.2.5 Černý čaj – ASSAM TGFOP1 SONIPUR BIO

Extrakt z černého čaje v tomto případě patřil mezi méně antimikrobiálně účinné proti bakteriím rodu *Arcobacter*. V Tab. 4 lze vidět, že největší průměrná zóna inhibice byla naměřena u bakterie *A. cryaerophilus* UPa 2013/13, a to 16,3 mm. U ostatních arkobakterů byla průměrná zóna inhibice v rozmezí 10,7-11,5 mm, což je velmi nízká antimikrobiální účinnost, pokud vezmeme v potaz, že čistý 96% ethanol měl průměrnou zónu inhibice 8-9 mm.

Ve srovnání s nálevem připraveného z černého čaje působil extrakt nižším antimikrobiálním účinkem než extrakt ze zeleného čaje. Avšak v případě testování nálevů, měl nálev z černého čaje obdobné antimikrobiální účinky, jako nálev ze zeleného čaje.

V minulosti byla provedena studie, která se zabývala antibakteriálním efektem černého čaje o koncentraci 1 mg/ml. Antimikrobiální účinek černého čaje proti bakterii *E. coli* ATCC 25922 byl zjištěn pomocí diskové difúzní metody a velikosti inhibičních zón byly v rozmezí 6,2-6,7 mm, zatímco u bakterie *S. aureus* ATCC 25923 byly inhibiční zóny v rozmezí 14,0-14,9 mm (Koech et al., 2013). Z tohoto tvrzení je zřejmé, že černý čaj je antimikrobiálně účinnější na *Arcobacter* spp. než na *E. coli*, ale u bakterie *S. aureus* byla zóna inhibice větší než u *Arcobacter* spp.

V literatuře byla popsána studie, která se zabývala antimikrobiálním účinkem vodného extraktu z černého čaje proti *E. coli*. Ve výzkumu byl zjišťován antimikrobiální účinek na danou bakterii v závislosti na druzích drceného čaje tříděného podle kvality listů. U druhu *Flowery Broken Orange Pekoe* (FBOP) byla zjištěna zóna inhibice 9 mm, zatímco u *Broken Orange Pekoe* (BOP) byla zóna jen 7 mm (Nibir et al., 2017). Oba tyto druhy čajů patří mezi čaje zlomkovité, s tím rozdílem, že FBOP je hrubší a obsahuje i čajové pupeny (Teegschwendner.cz).

### 3.2.6 Pu-erh – PU ERH STD

U extraktu z čaje Pu-erh byly naměřeny jedny z nejmenších průměrných zón inhibice v rozmezí 9,0-11,3 mm, přičemž největší zóna měřila průměrně 11,3 mm a byla zaznamenána u bakterie *A. cryaerophilus* UPa 2013/13, jak lze vidět v Tab. 4. Stejně jako u ostatních čajových extraktů, i v tomto případě byla největší zóna u izolátu. Lze tedy říci, že téměř všechny připravované extrakty působily nejvyšším antimikrobiálním účinkem proti bakterii *A. cryaerophilus*

UPa 2013/13. Nízká antimikrobiální aktivita čaje Pu-erh může být způsobena přítomností pouze EC katechinu, zbylé 3 hlavní katechiny se v daném čaji nenacházejí (Wu et al., 2007).

Existuje studie, která se zabývala účinkem Pu-erh extraktu proti bakterii *E. coli* za použití různých koncentrací v rozmezí 10-60 mg/ml. Bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací roste i zóna inhibice. Při koncentraci 10 mg/ml Pu-erh extraktu byla zóna inhibice 8,3 mm, zatímco při koncentraci 60 mg/ml byla velikost inhibiční zóny již 14,8 mm (Su et al., 2012). Ve srovnání s *Arcobacter* spp. při použití Pu-erh extraktu o koncentraci 100 mg/ml byly zóny inhibice mnohem menší a pohybovaly se kolem 9,0-9,7 mm. Pu-erh extrakt působil tedy vyšším antimikrobiálním účinkem proti *E. coli* i za použití nižší koncentrace extraktu. Lze říci, že stejné velikosti inhibičních zón jako u *E. coli* by bylo možné změřit u *Arcobacter* spp. při použití extraktu Pu-erh o koncentraci zhruba 20 mg/ml (Su et al., 2012).

### 3.2.7 Rooibos – ROOIBOS TEA SUPERGRADE BIO

Nálev i extrakt z čaje rooibos patřily mezi nejméně antimikrobiálně účinné proti bakteriím. V případě ethanolového extraktu byly zjištěny nejmenší průměrné zóny inhibice proti *Arcobacter* spp. Hlavním důvodem nízké antimikrobiální aktivity může být nepřítomnost katechinů. Tyto čajové katechiny se vyskytují pouze u čajů pocházejících z *Camellia sinensis* (Almajano et al., 2008).

Velikosti inhibičních zón se u extraktu z čaje rooibos pohybovaly v rozmezí 8,7-9,5 mm. V tomto experimentu se jednalo pouze o nepatrné zóny kolem disků, které odpovídaly velikosti inhibičních zón čistého 96% ethanolu. Mezi jednotlivými kmeny *Arcobacter* spp. nebyly značné rozdíly ve velikosti zón inhibice, jako tomu bylo např. u extraktu ze zeleného čaje. U zeleného čaje byla nejmenší zóna inhibice zjištěna 14,7 mm a největší zóna inhibice 21,3 mm. Ethanolový extrakt z čaje rooibos jako jediný z testovaných extraktů nevykazoval nejvyšší antimikrobiální účinek proti izolátu *A. cryaerophilus* UPa 2013/13, jak lze vyčíst z Tab. 4. Největší zóna inhibice u extraktu z čaje rooibos byla naměřena u sbírkového kmenu *A. butzleri* CCUG 30484.

Podobně malé zóny inhibice jako byly naměřeny u *Arcobacter* spp. byly popsány ve studii proti bakterie *B. cereus* a proti kvasince *Candida albicans* za použití nálevu z čaje rooibos. U bakterie byla zjištěna průměrná zóna inhibice 7,0 mm a u plísně 8,5 mm. Nejmenší průměrná zóna inhibice byla popsána u G<sup>+</sup> bakterie *Micrococcus luteus*. Velikost zóny byla pouze 6,4 mm

při aplikaci 50 µl na sterilní blankové disky (Ø 6 mm) (Almajano et al., 2008). Inhibiční zóna kolem disků byla v tomto případě nepatrná a dalo by se říci, že nálev z čaje rooibos nepůsobil antimikrobiálně na daný mikroorganismus.

### **3.3 Stanovení minimálních inhibičních koncentrací čajových extraktů proti *Arcobacter* spp.**

Stanovení minimálních inhibičních koncentrací čajových nálevů bylo provedeno pomocí mikrodiluční metody. Postup přípravy mikrotitrační destičky byl již popsán v kapitole 2.7. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byly odečítány tak, že byly zaznamenány nejnižší koncentrace, které inhibovaly viditelný růst arkobakterů (ukázka odečítané MIC je zachycena na Obr. 8).

Z experimentu je patrné, že všechny testované čajové extrakty inhibovaly růst *Arcobacter* spp., avšak rozdíly v hodnotách MIC mezi jednotlivými čaji byly pouze nepatrné. Ovšem značné rozdíly mezi jednotlivými čaji byly zaznamenány při testování přežívání *Arcobacter* spp. v čajových nálevem, při stanovení antioxidační kapacity nálevů a při stanovení inhibičních zón diskovou difúzní metodou. Velké rozdíly byly pozorovány např. u čaje zeleného nebo čaje rooibos, který patří mezi čaje bylinné. Avšak při stanovení MIC tomu tak nebylo. Při stanovení minimálních inhibičních koncentrací byly u *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 a *A. butzleri* CCUG 30484 zjištěny stejné inhibiční koncentrace extraktu jak u čaje rooibos, tak u čaje zeleného. Pouze u bakterií *A. cryaerophilus* CCM 7050 a *A. butzleri* UPa 2013/8 byly hodnoty inhibičních koncentrací nepatrně vyšší u extraktu z čaje rooibos než u extraktu ze zeleného čaje.

Zajímavostí toho experimentu bylo zjištění, že u izolátu *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 byly zjištěny hodnoty MIC stejné u všech testovaných čajových extraktů. Minimální inhibiční koncentrace byly vždy v rozmezí 1,563-3,125 mg/ml.

Celkově se minimální inhibiční koncentrace proti *Arcobacter* spp. u všech čajových extraktů pohybovaly v rozmezí 0,781-6,25 mg/ml. Přičemž nejvyšší hodnoty MIC, a to 3,125-6,25 mg/ml, byly zaznamenány u ethanolového extraktu z čaje Pu-erh. Nejnižší hodnoty MIC byly zjištěny v rozmezí 0,781-1,563 mg/ml u extraktů ze zeleného, žlutého a oolong čaje. Tyto hodnoty MIC vykazoval pouze sbírkový kmen *A. cryaerophilus* CCM 7050.



V Tab. 5 jsou zobrazeny souhrnné výsledky MIC všech testovaných ethanolových extraktů proti *Arcobacter* spp.

Tab. 5: Souhrn MIC čajových extraktů proti *Arcobacter* spp., (n=2)

	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050	<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> UPa 2013/8
<b>MIC čajových extraktů [mg/ml]</b>				
<b>Zelený čaj</b>	0,781-1,563	3,125	1,563-3,125	1,563
<b>Bílý čaj</b>	1,563-3,125	1,563-3,125	1,563-3,125	3,125
<b>Žlutý čaj</b>	0,781-1,563	3,125	1,563-3,125	1,563-3,125
<b>Oolong</b>	0,781-1,563	1,563-3,125	1,563-3,125	1,563-3,125
<b>Černý čaj</b>	3,125	3,125	1,563-3,125	1,563-3,125
<b>Pu-erh</b>	3,125-6,25	3,125	1,563-3,125	3,125-6,25
<b>Rooibos</b>	3,125	3,125	1,563-3,125	3,125

### 3.3.1 Zelený čaj – SENCHA MAKATO

V Tab. 6 jsou zobrazeny hodnoty MIC ethanolového extraktu ze zeleného čaje proti *Arcobacter* spp. Nejnižší hodnota MIC byla zjištěna u sbírkového kmenu *A. cryaerophilus* CCM 7050, a to 0,781-1,563 mg/ml. Lze říci, že extrakt ze zeleného čaje byl proti tomuto kmenu neúčinnější. Dále bylo zjištěno, že izolát *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 nepatřil mezi nejcitlivější proti extraktu a byla zjištěna hodnota MIC v rozmezí 1,563-3,125 mg/ml. U kmenu *A. butzleri* byla experimentem zjištěna vyšší hodnota MIC u sbírkového kmenu než u izolátu z vodního prostředí. U bakterie *A. cryaerophilus* tomu bylo právě naopak a vyšší minimální inhibiční koncentrace vykazoval izolát oproti sbírkovému kmenu.

Tab. 6: Stanovení minimálních inhibičních koncentrací extraktu ze zeleného čaje proti *Arcobacter* spp., (n=2)

<b>Zelený čaj</b>					
Pozice v MTD	Koncentrace extraktu [mg/ml]	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050	<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> UPa 2013/8
2	50	- -	- -	- -	- -
3	25	- -	- -	- -	- -
4	12,5	- -	- -	- -	- -
5	6,25	- -	- -	- -	- -
6	3,125	- -	- -	- -	- -
7	1,563	- -	+ +	- +	- -
8	0,781	+ -	+ +	+ +	+ +
9	0,390	+ +	+ +	+ +	+ +
10	0,195	+ +	+ +	+ +	+ +
11	0,098	+ +	+ +	+ +	+ +
12	0,049	+ +	+ +	+ +	+ +

+ ... pozitivní růst první měření, - ...negativní růst první měření; + ... pozitivní růst druhé měření, -... negativní růst druhé měření; MTD...mikrotitrační destička

V minulosti byla provedena studie, která se zabývala MIC u bakterie *Streptococcus mutans*. Hodnota MIC u extraktu ze zeleného čaje byla 62,5 µg/ml (Shagana a Geetha, 2017). Při stanovení MIC u *Arcobacter* spp. byly nejnižší koncentrace v rozmezí 0,781-6,25 mg/ml. Lze říci, že k inhibici G<sup>-</sup> bakterií je potřeba vyšších hodnot koncentrace čajového extraktu než k inhibici G<sup>+</sup> bakterií. Tato skutečnost byla potvrzena v nejedné studii. Bylo zjištěno, že G<sup>-</sup> jsou méně citlivé na antimikrobiální látky vzhledem k lipopolysaridové vnější membráně (Tajkarimi et al., 2010). Jiná provedená studie se zabývala stanovení MIC také u G<sup>+</sup> *St. mutans*. V této studii však byly použity extrakty ze 70% propanonu a MIC byla naměřena v rozsahu 2 mg/ml (Smullen et al., 2007). Dalo by se říci, že 70% propanonový extrakt byl méně antimikrobiálně účinný proti *St. mutans* a vykazoval podobné inhibiční vlastnosti jako ethanový extrakt proti *A. cryaerophilus* UPa 2013/13, u kterého byla naměřena MIC v rozmezí 1,563-3,125 mg/ml.

Existuje článek, ve kterém je popsán antimikrobiální účinek vodného extraktu ze zeleného čaje na bakterii *E. coli* ATCC 8739. U bakterie *E. coli* byla zjištěna minimální baktericidní koncentrace (MBC) extraktu ze zeleného čaje průměrně 2460 µg/ml (Dhaouadi et al., 2016).

V dřívější literatuře byla zjištěna hodnota MIC methanolového extraktu ze zeleného čaje proti bakterii *Aeromonas hydrophila*. U této G<sup>-</sup> bakterie vyšla hodnota MIC 0,8 mg/ml. Existuje klasifikace rostlinných extraktů na základě jejich hodnot MIC, a to silná inhibice < 500 µg/ml, mírná inhibice 600 µg/ml < MIC < 1500 µg/ml a nízká inhibice > 1600 µg/ml. Na základě této

klasifikace, extrakt ze zeleného čaje vykazuje silnější inhibiční aktivitu proti bakterii *Aeromonas hydrophila* (Akbari, 2014). Podobné hodnoty MIC jako u *Aeromonas hydrophila* byly zjištěny také u sbírkového kmenu *A. cryaerophilus* CCM 7050. U tohoto arkobaktera byly zjištěny hodnoty MIC extraktu v rozmezí 0,781-1,563 mg/ml. Stejně hodnoty MIC jako u extraktu ze zeleného čaje byly naměřeny také u extraktů z čaje žlutého a oolong též u bakterie *A. cryaerophilus* CCM 7050.

Stejně jako u bakterie *Aeromonas hydrophila*, i u G<sup>-</sup> bakterie *E. coli* byla provedena studie a byla zjištěna hodnota MIC 0,8 mg/ml u methanolového extraktu ze zeleného čaje. Vyšší hodnota minimální inhibiční koncentrace byla zaznamenána u bakterie *Enterococcus faecalis*, a to 1,6 mg/ml (Reygaert, 2014). V této studii tedy nebylo potvrzeno, že G<sup>-</sup> bakterie jsou více odolnější proti antimikrobiálním látkám než bakterie G<sup>+</sup> (Tajkarimi et al., 2010).

### 3.3.2 Bílý čaj – CHINA PAI MU TAN

U ethanolového extraktu z bílého čaje byly zjištěny hodnoty MIC v rozmezí 1,563-3,125 mg/ml proti *Arcobacter* spp. jak je zobrazeno v Tab. 7. Nejvyšší hodnota MIC, tedy 3,125 mg/ml byla zaznamenána u izolátu *A. butzleri* UPa 2013/8. Podobné výsledky byly zjištěny i u přežívání *Arcobacter* spp. v čajových nálevech.

Tab. 7: Stanovení minimálních inhibičních koncentrací extraktu z bílého čaje proti *Arcobacter* spp., (n=2)

<i>Bílý čaj</i>					
Pozice v MTD	Koncentrace extraktu [mg/ml]	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050	<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> UPa 2013/8
2	50	- -	- -	- -	- -
3	25	- -	- -	- -	- -
4	12,5	- -	- -	- -	- -
5	6,25	- -	- -	- -	- -
6	3,125	- -	- -	- -	- -
7	1,563	+ -	+ -	- +	+ +
8	0,781	+ +	+ +	+ +	+ +
9	0,390	+ +	+ +	+ +	+ +
10	0,195	+ +	+ +	+ +	+ +
11	0,098	+ +	+ +	+ +	+ +
12	0,049	+ +	+ +	+ +	+ +

+ ... pozitivní růst první měření, - ... negativní růst první měření; + ... pozitivní růst druhé měření, -... negativní růst druhé měření; MTD...mikrotitrační destička

U tohoto extraktu z bílého čaje nebyly značné rozdíly v minimálních inhibičních koncentracích mezi jednotlivými sbírkovými kmeny a izoláty. Totožné rozmezí hodnot MIC bylo naměřeno u *A. cryaerophilus* CCM 7050 a *A. cryaerophilus* UPa 2013/13.

V literatuře byla popsána studie, která zkoumala hodnoty MIC extraktu z bílého čaje proti bakterii *Streptococcus mutans*. Zjištěna hodnota MIC byla 62,5 µg/ml. Navíc také byla zjištěna hodnota MBC, která vyšla 31,25 µg/ml (Shagana a Geetha, 2017).

### 3.3.3 Žlutý čaj – HUANG DA CHA

Z Tab. 8 je možno vyčíst, že extrakt ze žlutého čaje vykazoval obdobné hodnoty minimálních inhibičních koncentrací jako extrakt z čaje zeleného. Hodnoty se nepatrně lišily pouze u izolátu *A. butzleri* UPa 2013/8, s tím že u žlutého čaje byly hodnoty MIC v rozmezí 1,563-3,125 mg/ml, zatímco u zeleného čaje byla hodnota MIC 1,563 mg/ml. Srovnatelné antimikrobiální účinky těchto dvou čajů byly také potvrzeny diskovou difúzní metodou. Nejnižší hodnoty MIC 0,781-1,563 mg/ml byly naměřeny u sbírkového kmenu *A. cryaerophilus* CCM 7050 a jednalo se tedy o nejcitlivější bakterii vůči extraktu ze žlutého čaje.

Tab. 8: Stanovení minimálních inhibičních koncentrací extraktu ze žlutého čaje proti *Arcobacter* spp., (n=2)

Žlutý čaj					
Pozice v MTD	Koncentrace extraktu [mg/ml]	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050	<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> UPa 2013/8
2	50	- -	- -	- -	- -
3	25	- -	- -	- -	- -
4	12,5	- -	- -	- -	- -
5	6,25	- -	- -	- -	- -
6	3,125	- -	- -	- -	- -
7	1,563	- -	+ +	- +	+ -
8	0,781	+ -	+ +	+ +	+ +
9	0,390	+ +	+ +	+ +	+ +
10	0,195	+ +	+ +	+ +	+ +
11	0,098	+ +	+ +	+ +	+ +
12	0,049	+ +	+ +	+ +	+ +

+ ... pozitivní růst první měření, - ... negativní růst první měření; + ... pozitivní růst druhé měření, -... negativní růst druhé měření; MTD...mikrotitrační destička

U extraktu ze žlutého čaje byly zjištěny stejné hodnoty MIC v rozmezí 1,563-3,125 mg/ml u izolátů *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 a *A. butzleri* UPa 2013/8. Avšak z pohledu diskové difúzní metody vyšly u těchto izolátů hodnoty inhibičních zón odlišné.

### 3.3.4 Oolong – OOLONG CHINA SE CHUNG

Obdobné antibakteriální výsledky jako ethanolový extrakt z čaje zeleného a žlutého vykazoval i extrakt z čaje oolong proti bakterii *A. cryaerophilus* CCM 7050, jak je zřejmé z Tab. 9. I u extraktu z čaje oolong byly zjištěny jedny z nejnižších hodnot inhibičních koncentrací. Hodnoty MIC v tomto případě byly v rozmezí 0,781-1,563 mg/ml.

Tab. 9: Stanovení minimálních inhibičních koncentrací extraktu z čaje oolong proti *Arcobacter* spp., (n=2)

Oolong					
Pozice v MTD	Koncentrace extraktu [mg/ml]	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050	<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> UPa 2013/8
2	50	- -	- -	- -	- -
3	25	- -	- -	- -	- -
4	12,5	- -	- -	- -	- -
5	6,25	- -	- -	- -	- -
6	3,125	- -	- -	- -	- -
7	1,563	- -	+ -	- +	+ -
8	0,781	+ -	+ +	+ +	+ +
9	0,390	+ +	+ +	+ +	+ +
10	0,195	+ +	+ +	+ +	+ +
11	0,098	+ +	+ +	+ +	+ +
12	0,049	+ +	+ +	+ +	+ +

+ ... pozitivní růst první měření, - ...negativní růst první měření; + ... pozitivní růst druhé měření, -... negativní růst druhé měření; MTD...mikrotitrační destička

Dalo by se říci, že jak nálev, tak i extrakt z čaje oolong patřily mezi antimikrobiálně nejúčinnější proti sbírkovému kmenu *A. cryaerophilus* CCM 7050. U ostatních arkobakterů byly zjištěny hodnoty MIC u extraktu z čaje oolong v rozmezí 1,563-3,125 mg/ml bez ohledu na to, zda se jednalo o sbírkové kmeny nebo o izoláty.

Existuje studie, která se zabývala antimikrobiálním účinkem vodného extraktu o koncentraci 100 mg/ml proti kvasince *Candida albicans*. Vědci zjistili, že hodnota MIC extraktu z čaje

oolong byla 1,25 mg/ml (Chen et al., 2015). Ve srovnání hodnot MIC vykazoval vodný extrakt podobnou antimikrobiální aktivitu jako ethanolový extrakt proti sbírkovému kmenu *A. cryaerophilus* CCM 7050.

### 3.3.5 Černý čaj – ASSAM TGFOP1 SONIPUR BIO

Hodnoty MIC u extraktu z černého čaje byly stejné jak u obou sbírkových kmenů, tak u obou izolátů. U *A. cryaerophilus* CCM 7050 a *A. butzleri* CCGU 30484 byla hodnota MIC 3,125 mg/ml, zatímco u izolátů *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 a *A. butzleri* UPa 2013/8 byly hodnoty MIC v rozmezí 1,563-3,125 mg/ml. Tyto hodnoty minimálních inhibičních koncentrací lze vyčíst z Tab. 10. Stejně výsledky MIC byly zjištěny také u extraktu z čaje žlutého, avšak tam se hodnoty lišily pouze u sbírkového kmenu *A. cryaerophilus* CCM 7050 a hodnota MIC u extraktu z čaje žlutého byla v rozmezí 0,781-1,563 mg/ml.

Tab. 10: Stanovení minimálních inhibičních koncentrací extraktu z černého čaje proti *Arcobacter* spp., (n=2)

Černý čaj					
Pozice v MTD	Koncentrace extraktu [mg/ml]	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050	<i>A. butzleri</i> CCGU 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> UPa 2013/8
2	50	- -	- -	- -	- -
3	25	- -	- -	- -	- -
4	12,5	- -	- -	- -	- -
5	6,25	- -	- -	- -	- -
6	3,125	- -	- -	- -	- -
7	1,563	+ +	+ +	- +	+ -
8	0,781	+ +	+ +	+ +	+ +
9	0,390	+ +	+ +	+ +	+ +
10	0,195	+ +	+ +	+ +	+ +
11	0,098	+ +	+ +	+ +	+ +
12	0,049	+ +	+ +	+ +	+ +

+ ... pozitivní růst první měření, - ...negativní růst první měření; + ... pozitivní růst druhé měření, -... negativní růst druhé měření; MTD...mikrotitrační destička

Během testování přežívání *Arcobacter* spp. v nálevu bylo zjištěno, že černý čaj působil vysokým antimikrobiálním účinkem srovnatelným s čajem zeleným. V mikrodiluční metodě tato skutečnost nebyla potvrzena a extrakt z černého čaje patřil mezi čaje s nižším

antimikrobiálním účinkem na arkobaktery. Také při použití ethanolového extraktu z čaje černého byly zaznamenány nižší hodnoty inhibičních zón.

V literatuře byla popsána studie, která se zabývala stanovením hodnot MIC extraktu z černého čaje u bakterie *Streptococcus mutans*. Ve srovnání s extraktem z čaje bílého a zeleného vyšla hodnota MIC o polovinu nižší a bylo naměřeno 31,25 µg/ml. Dále byla také zjištěna hodnota MBC, která byla 15,62 µg/ml (Shagana a Geetha, 2017). Při pouhém pohledu do Tab. 5 je zřejmé, že tak nízké hodnoty MIC jako byly zjištěny u *St. mutans* nebyly u *Arcobacter* spp. zaznamenány. Další studie se zabývala vlivem 70% propanonového extraktu opět na bakterii *St. mutans*. V tomto případě byla zjištěna hodnota MIC v rozmezí 4-8 mg/ml (Smullen et al., 2007). Tyto hodnoty ovšem neodpovídaly hodnotám naměřeným v předešlé literatuře a lze říci, že 70% extrakt z propanonu vykazoval nižší antimikrobiální účinky proti *St. mutans*.

V minulosti byla provedena studie, ve které byla popsána příprava ethanolového extraktu o koncentraci 10 mg/ml z černého čaje a stanovena MIC extraktu u bakterie *Salmonella enterica* serovar Typhi. Hodnota MIC se pohybovala v rozmezí 400-600 µg/ml (Mandal et al., 2011). V jiné studii byly zase popsány hodnoty MIC pro tuto bakterii v rozmezí 79,56-91,98 mg/ml za použití methanolového extraktu (Tiwari et al., 2005). Lze tedy říci, že vyšší antimikrobiální účinek proti *Salmonella enterica* serovar Typhi vykazoval ethanolový extrakt oproti extraktu methanolovému.

V jisté studii bylo zjištěno, že vodný extrakt z černého čaje o koncentraci 100 mg/ml může vykazovat antimikrobiální účinky proti kvasince *Candida albicans*. U osmi testovaných vzorků černého čaje bylo zjištěno, že pouze jeden z nich inhiboval růst kvasinky a byla u něho zjištěna hodnota MIC 1,25 mg/ml. Avšak antimikrobiálně byl extrakt z černého čaje účinnější proti *Candida glabrata*, u které byly zjištěny hodnoty MIC v rozmezí 0,078-0,313 mg/ml (Chen et al., 2015).

### **3.3.6 Pu-erh – PU ERH STD**

Extrakt z čaje Pu-erh vykazoval nejvyšší naměřené hodnoty MIC v rozmezí 3,125-6,25 mg/ml, jak je možno vidět v Tab. 11. Podobné výsledky jako u extraktu z čaje Pu-erh byly zjištěny i u testování antimikrobiálního účinku diskovou difúzní metodou. V této metodě byly změřeny malé velikosti inhibičních zón a spolu s extraktem z čaje rooibos patřily tyto inhibiční zóny mezi nejnižší naměřené. Lze tedy konstatovat, že připravený ethanolový extrakt působil nižším

antimikrobiálním účinkem proti *Arcobacter* spp., např. ve srovnání s extraktem ze zeleného čaje.

Tab. 11: Stanovení minimálních inhibičních koncentrací extraktu z čaje Pu-erh proti *Arcobacter* spp., (n=2)

<i>Pu-erh</i>					
Pozice v MTD	Koncentrace extraktu [mg/ml]	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050	<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> UPa 2013/8
2	50	- -	- -	- -	- -
3	25	- -	- -	- -	- -
4	12,5	- -	- -	- -	- -
5	6,25	- -	- -	- -	- -
6	3,125	- +	- -	- -	+ -
7	1,563	+ +	+ +	+ -	+ +
8	0,781	+ +	+ +	+ +	+ +
9	0,390	+ +	+ +	+ +	+ +
10	0,195	+ +	+ +	+ +	+ +
11	0,098	+ +	+ +	+ +	+ +
12	0,049	+ +	+ +	+ +	+ +

+ ... pozitivní růst první měření, - ...negativní růst první měření; + ... pozitivní růst druhé měření, -... negativní růst druhé měření; MTD...mikrotitrační destička

V minulé studii se vědci zabývali stanovením MIC vodného extraktu čaje Pu-erh. Vodný extrakt byl připraven smícháním Pu-erh čaje s vroucí vodou, směs byla následně centrifugována a vzniklá horní vrstva byla zahuštěna ve vakuu na práškový extrakt. Hodnota MIC práškového extraktu poté byla zjištěna pro bakterie *E. coli* (0,48 mg/ml) a *S. aureus* (0,74 mg/ml) (Hu et al., 2010).

Také byla stanovena MIC u nanočástic čajového prášku Pu-erh (NPTP). Bylo zjištěno, že hodnota MIC prášku Pu-erh proti *E. coli* byla 9,0 mg/ml (Su et al., 2012). Z tohoto zjištění vyplývá, že čajové nanočástice jsou méně antimikrobiálně účinné proti bakterii *E. coli*. V našem experimentu nebyly takto vysoké hodnoty MIC zaznamenány u žádného čajového extraktu proti *Arcobacter* spp.



### 3.3.7 Rooibos – ROOIBOS TEA SUPERGRADE BIO

U čaje rooibos, respektive u jeho extraktu, byly zjištěny jedny z nejvyšších hodnot MIC. Avšak nejvyšší MIC byly naměřeny u extraktu z čaje Pu-erh a lze tedy tento extrakt považovat za nejméně antimikrobiálně působící proti arkoobakterům. Vyhodnocené hodnoty MIC u extraktu z čaje rooibos byly vcelku stejné u všech kmenů *Arcobacter* spp., a to 3,125 mg/ml. Pouze u izolátu *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 byla zjištěna hodnota MIC v rozmezí 1,563-3,125 mg/ml, jak je možno vidět v Tab. 12. Mikrodiluční metodou bylo také zjištěno, že hodnoty MIC extraktu z čaje rooibos odpovídaly hodnotám MIC naměřených u extraktu z čaje černého. Hodnoty se lišily pouze u izolátu *A. butzleri* UPa 2013/8.

Tab. 12: Stanovení minimálních inhibičních koncentrací extraktu z čaje rooibos proti *Arcobacter* spp., (n=2)

<i>Rooibos</i>					
Pozice v MTD	Koncentrace extraktu [mg/ml]	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050	<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> UPa 2013/8
2	50	- -	- -	- -	- -
3	25	- -	- -	- -	- -
4	12,5	- -	- -	- -	- -
5	6,25	- -	- -	- -	- -
6	3,125	- -	- -	- -	- -
7	1,563	+ +	+ +	- +	+ +
8	0,781	+ +	+ +	+ +	+ +
9	0,390	+ +	+ +	+ +	+ +
10	0,195	+ +	+ +	+ +	+ +
11	0,098	+ +	+ +	+ +	+ +
12	0,049	+ +	+ +	+ +	+ +

+ ... pozitivní růst první měření, - ...negativní růst první měření; + ... pozitivní růst druhé měření, -... negativní růst druhé měření; MTD...mikrotitrační destička

V minulosti byla popsána studie, která zkoumala antimikrobiální vliv čaje rooibos na G<sup>+</sup> bakterii *Propionibacterium acnes*. Byly připraveny ethanolové extrakty, u kterých byla zjišťována hodnota MIC, která byla 125 µg/ml (Sharma a Lall, 2014).

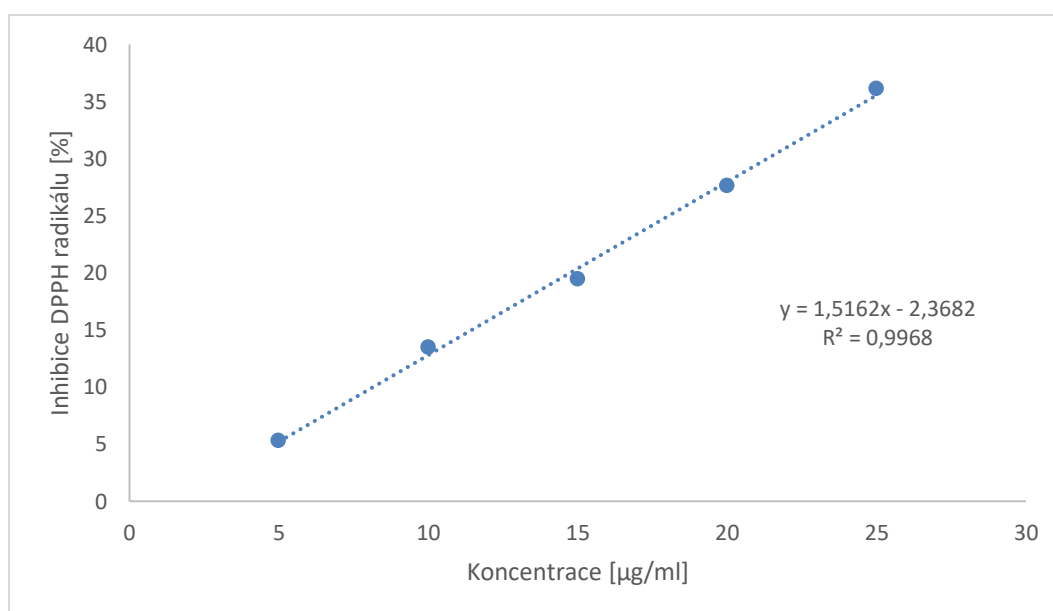
V jiné studii byla popsána interakce extraktu z čaje rooibos s antibiotiky proti *E. coli* ATCC 25922. Hodnota MIC samotného organického extraktu z čaje rooibos byla 1500 µg/ml, zatímco v kombinaci s ciprofloxacinem klesla hodnota MIC na 500 µg/ml (Hübsch et al., 2014). Takto nízká hodnota MIC díky antibiotiku nebyla zjištěna u žádného čajového extraktu.

### 3.4 Stanovení antioxidační kapacity čajových nálevů

Hodnoty I [%] byly vypočítány podle vztahu uvedeného v kapitole 2.8.1. Následným dosazením do rovnice regrese (viz Graf 8) a vynásobením faktorem zředění byly zjištěny jednotlivé hodnoty antioxidační kapacity. Finální výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent Troloxu v mg na 100 ml čajového nálevu a stejně tak v molárních koncentracích (viz Tab. 13).

Tab. 13: Stanovení antioxidační kapacity čajových nálevů metodou s DPPH radikálem, (n=3)

	<i>Absorbance</i>	<i>Inhibice DPPH radikálu I [%]</i>	<i>Antioxidační kapacita [μg/ml]</i>	<i>Antioxidační kapacita [mg/100 ml]</i>	<i>Antioxidační kapacita [mmol/l]</i>
<b>Zelený čaj</b>	0,528	10,119	823,60	<b>82,36</b>	<b>3,29</b>
<b>Bílý čaj</b>	0,570	2,845	343,83	<b>34,38</b>	<b>1,37</b>
<b>Žlutý čaj</b>	0,427	27,257	1953,93	<b>195,39</b>	<b>7,81</b>
<b>Oolong</b>	0,519	11,584	920,23	<b>92,02</b>	<b>3,68</b>
<b>Černý čaj</b>	0,451	23,117	1680,89	<b>168,09</b>	<b>6,71</b>
<b>Pu-erh</b>	0,555	5,519	520,23	<b>52,02</b>	<b>2,08</b>
<b>Rooibos</b>	0,563	4,037	422,48	<b>42,24</b>	<b>1,69</b>



Graf 8: Kalibrační křivka standardu látky Trolox

Na základě spektrofotometrické analýzy čajových nálevů bylo zjištěno, že nejvyšší antioxidační kapacitu vykazoval nálev z čaje žlutého (195,39 mg/100 ml). Druhá nejvyšší antioxidační kapacita (168,09 mg/100 ml) byla zjištěna naopak u černého čaje. Nejnižší hodnota (34,38 mg/100 ml) byla překvapivě naměřena u nálevu z čaje bílého, i když tento nálev vykazoval jedny z nejvyšších antimikrobiálních účinků proti *Arcobacter* spp. Podobné antimikrobiální účinky vůči přežívání arkobakterů v nálevech byly zjištěny jak u nálevu z bílého čaje, tak u nálevu ze zeleného čaje. V případě stanovení antioxidační kapacity byly hodnoty těchto dvou nálevů ovšem odlišné. Je tedy předpokladatelné, že čaje obsahují antimikrobiálně působící komponenty vedle antioxidačních látek.

Při testování přežívání *Arcobacter* spp. v čajových nálevech bylo zjištěno, že obdobnou antimikrobiální aktivitu jako měl nálev ze zeleného čaje vykazoval i nálev z čaje černého. Ovšem při testování antibakteriálních účinků čajových extraktů byly výsledky černého a zeleného čaje odlišné. U extraktu z černého čaje byly naměřeny zóny inhibice menší než u zeleného čaj. Při stanovení antioxidační kapacity, avšak bylo zjištěno, že nálev z černého čaje měl hodnotu antioxidační kapacity téměř dvojnásobně vyšší než nálev ze zeleného čaje.

U nálevu z čaje oolong byla zjištěna antioxidační kapacita v hodnotě 92,02 mg/100 ml. Tyto antioxidační účinky zhruba odpovídaly těm, které byly naměřeny u i nálevu z čaje zeleného. Během testování přežívání *Arcobacter* spp. v nálevu z čaje oolong bylo zjištěno, že měl podobné antimikrobiální účinky jako nálev z čaje zeleného a černého, avšak byl méně účinný proti izolátům *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 a *A. butzleri* UPa 2013/8. Extrakt z čaje oolong měl i téměř stejné MIC jako extrakt ze zeleného čaje a zóny inhibice se pouze výrazně lišily u sbírkového kmenu *A. butzleri* CCUG 30484.

Mezi čaje s nejnižší antimikrobiální aktivitou patřil čaj rooibos. U jeho nálevu bylo zjištěno, že i po 6 hodinách expozice byly počty životaschopných buněk nad  $5,0 \times 10^3$  CFU/ml. U extraktu z čaje rooibos byly také naměřeny nejmenší zóny inhibice a při stanovení MIC patřil rooibos po nálevu z čaje Pu-erh za druhý s nejvyššími naměřenými hodnotami. V případě stanovení antioxidační kapacity byly u čaje rooibos zjištěny stejně jako u nálevu z bílého čaje jedny z nejnižších hodnot. Z hlediska antioxidační kapacity i antimikrobiálního účinku lze čaj rooibos, a to jak nálev, tak extrakt považovat za nejméně účinný.

Dalším méně antimikrobiálně účinným čajem proti *Arcobacter* spp. byl čaj Pu-erh. Stejně tomu bylo i u antioxidační kapacity u čaje Pu-erh. Antioxidační kapacita pařila mezi nejnižší a byla

naměřena hodnota 52,02 mg/100 ml. Podobně nízké hodnoty antioxidační kapacity byly zjištěny také u čaje rooibos a čaje bílého.

V literatuře byla popsána studie, která se zabývala stanovením antioxidační kapacity sušenek, do kterých byly přidány čajové listy žlutého a zeleného čaje. Vyšší antioxidační kapacita pomocí metody s DPPH radikálem byla zjištěna při použití žlutého čaje, a to hodnota 468,2 mg/100 g čerstvých sušenek. Při použití zeleného čaje byla naměřena hodnota 270,3 mg/100 g čerstvých sušenek, která po 3 měsících skladování sušenek klesla na 201,1 mg/100 g. Antioxidační kapacita u žlutého čaje i po 3 měsících skladování sušenek byla vysoká a klesla pouze na hodnotu 447,2 mg/100 g (Gramza-Michałowska et al., 2016). Při stanovení antioxidační kapacity u čajových nálevů vyšly hodnoty u žlutého čaje též vyšší než u čaje zeleného a nálev ze žlutého čaje měl nejvyšší antioxidační kapacitu ze všech testovaných nálevů. Vyšší hodnoty antioxidační kapacity zjištěny ve studii jsou způsobeny pravděpodobně použitím celých čajových lístků do přípravy sušenek.

V minulosti byla provedena studie, která se zabývala spektrofotometrickým stanovením antioxidační kapacity čajových nálevů. Nejvyšší hodnota antioxidační kapacity metodou s DPPH radikálem byla naměřena u nálevu z čaje zeleného. Hodnota zjištěna ve studii byla 4,80 mmol/l Troloxu. Další vysoké hodnoty antioxidační kapacity vykazovaly nálevy z čaje černého a čaje žlutého, tedy 4,45 a 4,37 mmol/l. Antioxidační kapacity čaje bílého a oolong se téměř nelišily, naměřené hodnoty byly 3,66 a 3,88 mmol/l (Gorjanović et al., 2012). V našem provedeném experimentu byly zjištěny hodnoty odlišné než ty uvedené v literatuře. U zeleného čaje byla zjištěna nižší hodnota 3,29 mmol/l, u černého čaje naopak vyšší, a to 6,71 mmol/l. Stejně hodnoty jako hodnoty popsané ve studii vykazoval i nálev z čaje oolong, spektrofotometrickou analýzou byla zjištěna antioxidační kapacita 3,68 mmol/l, avšak nálev z bílého čaje měl hodnotu antioxidační kapacity pouze 1,37 mmol/l. U nálevu z čaje rooibos byla zjištěna jedna z nejnižších hodnot, a to 1,69 mmol/l, jak lze vidět v Tab. 13.

Další studie se zabývala antioxidační kapacitou ethanolového extraktu z čaje černého. Bylo zjištěno, že při použití extraktu z 80% ethanolu byla antioxidační kapacita metodou s DPPH radikálem 3,17  $\mu\text{mol TE/mg}$  extraktu, zatímco při použití 50% ethanolu byla hodnota 3,91  $\mu\text{mol TE/mg}$  (Güçlü Üstündağ et al., 2016). V našem experimentu bylo ovšem zjištěno, že nálev z čaje černého měl antioxidační kapacitu 6,71 mmol/l. Z poznatků získaných z literatury a z vlastního experimentu lze usuzovat, že nálev z čaje černého má vyšší hodnotu antioxidační kapacity ve srovnání s čajovým extraktem z ethanolu.

Jiná studie se zabývala studiem antioxidační kapacity nálevu z čaje rooibos. Bylo zjištěno, že po snížení počáteční absorbance DPPH o 50 % byla hodnota antioxidační kapacity nálevu 740  $\mu\text{g/ml}$  (Shikanga et al., 2010). Z hodnot získaných experimentem byla zjištěna antioxidační kapacita u nálevu z čaje rooibos ovšem nižší, a to 422,48  $\mu\text{g/ml}$ .

V minulosti byla provedena studie, která stanovovala antioxidační kapacitu u nálevů z čajů fermentovaných a nefermentovaných. U čerstvého nálevu z čaje Pu-erh byla zjištěna hodnota antioxidační kapacity 2,0 mmol/l. Také byla stanovena antioxidační kapacita u čaje rooibos, která vyšla cca 1,5 mmol/l. U obou nálevů také byla měřena antioxidační kapacita po 12 měsících skladování při mrazírenských teplotách. Po opětovném měření po roce bylo zjištěno, že oba nálevy nevykazovaly žádnou antioxidační kapacitu (Bancirova, 2010). Obě tyto hodnoty antioxidační kapacity čerstvých nálevů odpovídaly hodnotám získaným během našeho experimentu u nálevu z čaje Pu-erh (2,08 mmol/l) a z čaje rooibos (1,69 mmol/l).

## 4 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala antimikrobiálním účinkem čajových nálevů a extraktů proti *Arcobacter* spp. Bakterie rodu *Arcobacter* patří do čeledi *Campylobacteraceae* a mají mnoho společných znaků s rodem *Campylobacter* a čeledí *Helicobacteraceae*. I když jsou arkobaktery schopny růst v širokém teplotním rozmezí, patří mezi velice citlivé organismy a jejich kultivace byla mnohdy obtížná. Tato pohyblivá tyčinkovitá bakterie je považována za patogenní bakterii jak lidí, tak i zvířat. V poslední době neustále přibývá onemocnění způsobených touto bakterií. Největší pozornost je věnována syrovým masným výrobkům a nepasterizovaným mléčným výrobkům, u kterých může být vysoké riziko přenosu na člověka. Mezi druhy arkobakterů, které způsobují klinická onemocnění patří především *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*. Ve většině případů onemocnění způsobené arkobaktery nevyžaduje antimikrobiální léčbu, stejně jako je tomu u rodu *Campylobacter*. V závažných případech je však antibiotická léčba nezbytná. Bohužel z důvodu nesprávného používání a dávkování antibiotik dochází ke značné rezistenci mikroorganismů vůči syntetickým léčivům. Z těchto skutečností je potřeba neustále hledat nové přírodní antimikrobiální látky, které budou stejně účinné či účinnější jak uměle vyráběné látky, cenově dostupnější a zdravotně nezávadné. Alternativou k syntetickým látkám může být použití čajových extraktů a nálevů, u kterých byly zjištěny slibné inhibiční účinky na bakterie rodu *Arcobacter*.

Čaj vzniká zpracováním listů čajovníku čínského (*Camellia sinensis* L.) pocházejícího z jihovýchodní Asie. Čínské čaje jsou rozděleny do šesti kategorií na základě výrobního procesu a stupně fermentace na: zelený čaj, bílý čaj, žlutý čaj, oolong čaj, černý čaj a Pu-erh čaj. Součástí testování antimikrobiálních účinků proti *Arcobacter* spp. byly tyto zmíněné druhy čajů a také jeden bylinný čaj rooibos, který nepochází z čajovníku čínského. V této diplomové práci byly použity pro experimenty 2 sbírkové kmeny *A. butzleri* CCUG 30484 a *A. cryaerophilus* CCM 7050 a dva izoláty z vodního prostředí *A. butzleri* UPa 2013/8 a *A. cryaerophilus* UPa 2013/13.

Jednou z metod využívanou pro stanovení antimikrobiální aktivity čajů bylo testování přežívání *Arcobacter* spp. v čajových nálevech. U všech testovaných čajových nálevů došlo k úplné inhibici mikroorganismů již po 17 hodinách expozice. Nejvyšší antimikrobiální účinek vykazoval nálev ze zeleného čaje. Během expozice v časech 0-6 hodin došlo k prudkému poklesu počtu životaschopných buněk. Nejodolnější bakterií v tomto případě byl izolát

*A. butzleri* UPa 2013/8. Stejně antimikrobiální účinky vykazoval i nálev z černého čaje. Podobný trend inhibice arkobakterů v nálevu jako byl u zeleného čaje, bylo možné pozorovat také u nálevu z bílého a žlutého čaje. Nálev ze žlutého čaje naopak patřil mezi čaje, který byl ze všech testovaných antimikrobiálně neúčinnější vůči izolátu *A. butzleri* UPa 2013/8. Všechny testované čajové nálevy byly antimikrobiálně účinnější na sbírkové kmeny než na izolované kmeny z reálných vodních prostředí. Tato skutečnost je velice patrná u nálevu z čaje oolong, u kterého bylo zjištěno, že i po 6 hodinách expozice byly počty životaschopných buněk u izolovaných kmenů  $1,7 \times 10^4$  a  $1,1 \times 10^4$  CFU/ml. Za nejnižší antimikrobiálně účinný nálev lze považovat ten z čaje rooibos, u kterého docházelo k pomalému klesání počtu životaschopných buněk. Nálev z čaje Pu-erh působil téměř stejným antimikrobiálním účinkem jak na sbírkové kmeny, tak na oba izoláty.

Diskovou difúzní metodou byly zjišťovány zóny inhibice u ethanolových extraktů. Největší zóny inhibice, a tedy nejvyšší antimikrobiální účinky byly zjištěny u čaje zeleného, jako tomu bylo i u testování přežívání *Arcobacter* spp. v nálevech. U extraktu ze zeleného čaje byla největší inhibiční zóna zjištěna u izolátu *A. cryaerophilus* UPa 2013/13, a to o velikosti 21,3 mm. Druhá největší inhibiční zóna 20,0 mm byla též zaznamenána u tohoto extraktu v přítomnosti bakterie *A. butzleri* CCUG 30484. Dalším velmi účinným extraktem proti arkobakterům byl extrakt z čaje žlutého, který působil nejvyšším antimikrobiálním účinkem také na bakterii *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 a zóna inhibice byla 19,0 mm. V případě testování inhibičních účinků nálevů byl žlutý čaj neúčinnější na druhý izolát, který ovšem vykazoval zónu inhibice pouze 14,5 mm. Značně velké zóny inhibice byly naměřeny také u extraktů z čaje bílého a oolong. Extrakt z čaje černého diskovou difúzní metodou vykazoval zóny inhibice 10,7-16,3 mm, což se nedalo srovnat se zónami inhibice naměřenými u extraktu ze zeleného čaje. Ethanolový extrakt z černého čaje tedy působil nižším antimikrobiálním účinkem proti *Arcobacter* spp. než připravený čajový nálev. Tato skutečnost byla i u extraktu z čaje Pu-erh. U něho bylo zjištěno, že patřil mezi nejméně antimikrobiálně účinné, zóny inhibice byly v rozmezí 9,0-11,3 mm. Nálev i extrakt z čaje rooibos vykazovaly ovšem nejnižší antimikrobiální účinek na *Arcobacter* spp. Zóny inhibice byly naměřeny v rozmezí 8,7-9,5 mm, přičemž zóny čistého 96% ethanolu byly v rozmezí 8-9 mm.

U čajových nálevů byly také zjišťovány hodnoty antioxidační kapacity. Nejvyšší hodnota byla naměřena u žlutého čaje, a to 195,39 mg/100 g. Druhou nejvyšší antioxidační kapacitu měl čaj černý a po něm následoval čaj oolong. V tomto experimentu skončil zelený čaj až na čtvrtém

místě s hodnotou 82,36 mg/100 g. Nejnižší hodnota antioxidační kapacity byla v tomto případě naměřena u nálevu z bílého čaje.

Další metodou, kterou byly zjišťovány antimikrobiální účinky bylo stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) čajových extraktů. Stejně jako u diskové metody, i v tomto případě byly nejvyšší antimikrobiální účinky zjištěny u zeleného a žlutého čaje. Nejnižší hodnoty MIC byly v rozmezí 0,781-1,563 mg/ml a byly zjištěny u bakterie *A. cryaerophilus* CCM 7050. Nejvyšší naměřené hodnoty MIC u extraktu z čaje zeleného a žlutého byly pouze 3,125 mg/ml. Mezi tyto dva extrakty lze zařadit i čaj oolong, u něhož také byly zjištěny nejnižší hodnoty MIC a antimikrobiálními účinky se extrakty navzájem podobaly. Nejnižší antimikrobiální účinky byly tak jako u diskové metody naměřeny u extraktů z černého čaje, Pu-erh a rooibos čaje. Mikrodiluční metodou vyšel nejnižší antimikrobiální účinek u extraktu z čaje Pu-erh. U bakterií *A. cryaerophilus* CCM 7050 a *A. butzleri* UPa 2013/8 byly zjištěny v přítomnosti extraktu z čaje Pu-erh nejvyšší hodnoty MIC, a to 3,125-6,25 mg/ml.

Z daných experimentů vyplývá, že všechny testované čajové nálevy a extrakty vykazovaly inhibiční účinek na bakterie. Především díky přítomným katechinům v čajových lístcích, působily nálevy i extrakty antimikrobiálně proti *Arcobacter* spp. Tyto pozitivní účinky je možné nadále využívat nejen v potravinářském průmyslu a farmacii, ale i v jiných odvětvích. Tudíž by bylo ku prospěchu, kdyby v budoucnu byly čaje využívány i k jiným účelům než k pouhé konzumaci. Jelikož toto téma diplomové práce nebylo doposud pořádně prozkoumáno a slibné antimikrobiální účinky byly potvrzeny, bylo by vhodné dále pokračovat při testování čajových nálevů a extraktů i proti jiným mikroorganismům.



## 5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Akbary, P., 2014. *In Vitro* Inhibitory Activity of the Leaf Methanol Extract of Green Tea (*Camellia sinensis*) against *Lactococcus garvieae* and *Aeromonas hydrophila* Isolated of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Advances in Microbiology*. 4: 829-834.

Almajano, M. P., Carbó, R., Jiménez, J. A. L., Gordon, M. H., 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*. 108(1): 55-63.

Arora, D. S., Kaur, G. J., Kaur, H., 2009. Antibacterial Activity of Tea and Coffee: Their Extracts and Preparations. *International Journal of Food Properties*. 12(2): 286-294.

Bancirova, M., 2010. Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. *Food Research International*. 43: 1379–1382.

Blanco, A. R., Sudano-Roccaro, A., Spoto, G. C., Nostro, A., Rusciano, D., 2005. Epigallocatechin gallate inhibits biofilm formation by ocular staphylococcal isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(10): 4339-4343.

Bor, T., Aljaloud, S. O., Gyawali, R., Ibrahim, A. S., 2016. Antimicrobials from herbs, spices, and plants. *Fruits, Vegetables, and Herbs: Bioactive Foods in Health Promotion*. Oxford: Academic Press, s. 551-578, ISBN: 978-0-12-802972-5.

Bruins, M. J., Cermak, R., Kiers, J. L., van der Meulen, J., van Amelsvoort, J. M. M., van Klinken, B. J. W., 2006. In vivo and in vitro effects of tea extracts on enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced intestinal fluid loss in animal models. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 43(4): 459-469.

Burda, A., 2013. *O kávě, čaji a dalších nápojích*. Opava [i.e. Praha]: Carter\reproplus, s. 66-82, ISBN 978-80-87613-00-9.

Collado. L., Figueras, M. J., 2011. Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*. 24(1): 174-192.

Dai, W., Xie, D., Lu, M., Li, P., Lv, H., Yang, C., Peng, Q., Zhu, Y., Guo, L., Zhang, Y., Tan, J., Lin, Z., 2017. Characterization of white tea metabolome: Comparison against green and black tea by a nontargeted metabolomics approach. *Food Research International*. 96: 40-45.

- Damiani, E., Bacchetti, T., Padella, L., Tiano, L., Carloni, P., 2014. Antioxidant activity of different white teas: Comparison of hot and cold tea infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*. 33(1): 59-66.
- Dhaouadi, K., Belkhir, M., Raboudi, F., Mecha, E., Ghommeme, I., Bronze, M. D. R., Ammar, H., Fattouch, S., 2016. Pomegranate and mint syrup addition to green tea beverage stabilized its polyphenolic content and biofunctional potentials during refrigerated storage. *Journal of Food Science and Technology*. 53(2): 1164-1177.
- Diker, K. S., Akan, M., Hascelik, G., Yurdakök, M., 1991. The bactericidal activity of tea against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 12: 34-35.
- Diker, K. S., Hascelik, G., 1994. The bactericidal activity of tea against *Helicobacter pylori*. *Letters in Applied Microbiology*. 19: 299-300.
- Eden, T., 1958. The development of tea culture. *Tea*. London: Longman, s. 1–4.
- Friedman, M., 2007. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51(1): 116–134.
- Girbau, C., Guerra, C., Martínez-Malaxetxebarria, I., Alonso, R., Fernández-Astorga, A., 2015. Prevalence of ten putative virulence genes in the emerging foodborne pathogen *Arcobacter* isolated from food products. *Food Microbiology*. 52: 146-149.
- González, A., Bayas Morejón, I. F., Ferrús, M. A., 2017. Isolation, molecular identification and quinolone-susceptibility testing of *Arcobacter* spp. isolated from fresh vegetables in Spain. *Food Microbiology*. 65: 279-283.
- González, I., Fernández-Tomé, S., García, T., Martín, R., 2014. Genus-specific PCR assay for screening *Arcobacter* spp. in chicken meat. *Journal of the science of food and agriculture*. 94(6): 1218-1224.
- Gorjanović, S., Komes, D., Pastor, F. T., Belščak-Cvitanović, A., Pezo, L., Hečimović, I., Sužnjević, D., 2012. Antioxidant Capacity of Teas and Herbal Infusions: Polarographic Assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(38): 9573-9580.
- Graham, H., 1983. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. New York: Wiley-Interscience, s. 628-644.

- Gramza, A., Korczak, J., Amarowicz, R., 2005. Tea Polyphenols – their antioxidant properties and biological activity-a review. *Polish Journal of Food And Nutrition Sciences*.14/55(3): 219-235.
- Gramza-Michałowska, A., Kobus-Cisowska, J., Kmiecik, D., Korczak, J., Helak, B., Dziedzic, K., Górecka, D., 2016. Antioxidative potential, nutritional value and sensory profiles of confectionery fortified with green and yellow tea leaves (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry*. 211: 448-454.
- Güçlü Üstündağ, Ö., Erşan, S., Özcan, E., Özcan, G., Kayra, N., Ekinci, F. Y., 2016. Black tea processing waste as a source of antioxidant and antimicrobial phenolic compounds. *European Food Research and Technology*. 242(9): 1523-1532.
- Gyawali, R., Ibrahim, S. A., 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*. 46: 412-429.
- Hacioglu, M., Dosler, S., Birteksoz Tan, A. S., Otuk, G., 2017. Antimicrobial activities of widely consumed herbal teas, alone or in combination with antibiotics: an *in vitro* study. *PeerJ*. 5: e3467.
- Hamilton-Miller, J. M. T., 1995. Antimicrobial Properties of Tea (*Camellia sinensis* L.). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39(11): 2375-2377.
- Haslam, E., 2003. Thoughts on thearubigins. *Phytochemistry*. 64(1): 61–73.
- Hashimoto, T., Goto, M., Sakakibara, H., Oi, N., Okamoto, M., Kanazawa, K., 2007. Yellow tea is more potent than other types of tea in suppressing liver toxicity induced by carbon tetrachloride in rats. *Phytotherapy Research*. 21(7): 668-670.
- Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., Gaastra, W., 2006. *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Veterinary Microbiology*. 115(1-3): 1-13.
- Hsu, T.-T. D., Lee, J., 2015. Global Distribution and Prevalence of *Arcobacter* in Food and Water. *Zoonoses and Public Health*. 62(8): 579-589.
- Hu, Y., Jia, J., Qiao, J., Ge, C., Cao, Z., 2010. Antimicrobial activity of pu-erh tea extracts *in vitro* and its effects on the preservation of cooled mutton. *Journal of Food Safety*. 30(1): 177-195.

- Hübsch, Z., Van Vuuren, S. F., Van Zyl, R. L., 2014. Can rooibos (*Aspalathus linearis*) tea have an effect on conventional antimicrobial therapies? *South African Journal of Botany*. 93: 148-156.
- Chan, E. W. C., Soh, E. Y., Tie, P. P., Law, Y. P., 2011. Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy Research*. 3(4): 266-272.
- Chen, C.-S., Chan, H.-C., Chang, Y.-N., Liu, B.-L., Chen, Y.-S., 2009. Effects of bacterial strains on sensory quality of Pu-erh tea in an improved pile-fermentation process. *Journal of Sensory Studies*. 24(4): 534-553.
- Chen, L., Zhou, Z. X., Yang, Y. J., 2007. Genetic improvement and breeding of tea plant (*Camellia sinensis*) in China: from individual selection to hybridization and molecular breeding. *Euphytica*. 154: 239–248.
- Chen, M., Zhai, L., Arendrup, M. C., 2015. *In vitro* activity of 23 tea extractions and epigallocatechin gallate against *Candida species*. *Medical Mycology*. 53(2): 194-198.
- Chinnam, N., Dadi, P. K., Sabri, S. A., Ahmad, M., Kabir, M. A., Ahmad, Z., 2010. Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner. *International Journal of Biological Macromolecules*. 46(5): 478-486.
- Chou, C.-C., Lin, L.-L., Chung, K.-T., 1999. Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season. *International Journal of Food Microbiology*. 48(2): 125-130.
- Chow, K., Kramerová, I., 1998. *Všechny čaje Číny*. Praha: DharmaGaia, s. 122-280, ISBN 80-85905-54-X.
- Ilyasova, D., Martin, C., Sandler, R. S., 2003. Tea intake and risk of colon cancer in African-Americans and whites: North Carolina colon cancer study. *Cancer Causes & Control*. 14: 676-772.
- Iwu, M. W., Duncan, A. R., Okunji, C. O., 1999. New antimicrobials of plant origin. *Perspectives on new crops and new uses*. Alexandria, VA: ASHS Press, s. 457–462, ISBN 0-9615027-0-3.
- Janda, J. M., Abbott, S. L., 2010. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 23(1): 35-73.

- Koech, K. R., Wachira, F. N., Ngure, R. M., Wanyoko, J. K., Bii, C. C., Karori, S. M., Kerio, L. C., 2013. Antimicrobial, synergistic and antioxidant activities of tea polyphenols. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Badajoz: Formatex Research Center, s. 971-981, ISBN 978-84-942134-0-3.
- Lai, P., Roy, J., 2004. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Current Medicinal Chemistry*. 11: 1451-1460.
- Lambert, J. D., Yang, C. S., 2003. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *The Journal of Nutrition*. 133(10): 3262S–3267S.
- Lehner, A., Tasara, T., Stephan, R., 2005. Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. *International Journal of Food Microbiology*. 102(2): 127-135.
- Levican, A., Rubio-Arcos, S., Martinez-Murcia, A., Collado, L., Figueras, M. J., 2015. *Arcobacter ebronensis* sp. nov. and *Arcobacter aquimarinus* sp. nov., two new species isolated from marine environment. *Systematic and Applied Microbiology*. 38(1): 30-35.
- Lin, Y.-S., Tsai, Y.-J., Tsay, J.-S., Lin, J.-K., 2003. Factors Affecting the Levels of Tea Polyphenols and Caffeine in Tea Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(7): 1864–1873.
- Lübeck, W., 2007. *Zelený čaj: uzdravující požitek*. Olomouc: Fontána, s. 141-142, ISBN 978-80-7336-413-7.
- Mandal, S., DebMandal, M., Pal, N. K., Saha, K., 2011. Inhibitory and killing activities of black tea (*Camellia sinensis*) extract against *Salmonella enterica* serovar Typhi and *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor serotype Ogawa isolates. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 4(2): 115-121.
- Mario, G. F., 2010. The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. *Physiology & Behavior*. 100(1): 33–41.
- MBio.ASM.org [online] - dostupné z: <http://mbio.asm.org/content/4/3/e00217-13/F2.expansion.html> - [cit. 2018-02-10].
- Mitscher, L. A., Dolby, V., 2006. *Kniha o zeleném čaji: Čínský pramen mláďí: Jak pomocí zeleného čaje předcházet rakovině a zpomalovat stárnutí*. Praha: Zems; Praha: Pragma, s. 191, ISBN 80-903305-9-2 (Zems), ISBN 80-7205-153-9 (Pragma).

- Mo, H., Zhu, Y., Chen, Z., 2008. Microbial fermented tea – a potential source of natural food preservatives. *Trends in Food Science & Technology*. 19(3): 124-130.
- Mulky, M. J., Sharma, V. S., 1993. *Tea Culture, Processing and Marketing*. New Delhi: Oxford and IBH Publishing, s. 147-186, ISBN 8120408144.
- Nibir, Y. M., Sumit, A. F., Akhand, A. A., Ahsan, N., Hossain, M. S., 2017. Comparative assessment of total polyphenols, antioxidant and antimicrobial activity of different tea varieties of Bangladesh. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7(4): 352-357.
- Noormandi, A., Dabaghzadeh, F., 2015. Effects of green tea on *Escherichia coli* as a uropathogen. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 5(1): 15-20.
- Ozdemir, F., Tontul, I., Balci-Torun, F., Topuz, A., 2017. Effect of rolling methods and storage on volatile constituents of Turkish black tea. *Flavour and Fragrance Journal*. 32(5): 362-375.
- Perumalla, A. V. S., Hettiarachchy, N. S., 2011. Green tea and grape seed extracts-Potential applications in food safety and quality. *Food Research International*. 44(4): 827-839.
- Pharmapoint.cz [online] - dostupné z: <http://www.pharmapoint.cz/herbar/cajovnik-cinsky/> [cit. 2018-02-08].
- Ramees, T. P., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R. S., Kumar, A., Saminathan, M., Tiwari, R., Malik, Y. S., Singh, R. K., 2017. *Arcobacter*: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control – a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*. 37(1): 136-161.
- Reygaert, W. C., 2014. The antimicrobial possibilities of green tea. *Frontiers in Microbiology*. 5: 434.
- Sajilata, M. G., Bajaj, P. R., Singhal, R. S., 2008. Tea Polyphenols as Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 7(3): 229–254.
- Savoia, D., 2012. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiology*. 7(8): 979-990.
- Segal, M., 1996. Tea: A story of serendipity. *FDA Consumer*. 30: 22-26.

- Shagana, J. A., Geetha, R., 2017. Comparative Analysis of Antimicrobial Activity of Black Tea, Green Tea and White Tea Extracts on *Streptococcus Mutans* by Tube Dilution Method. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 9(9): 1581-1582.
- Shan, B., Cai, Yi-Z., Brooks, J. D., Corke, H., 2007. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*. 117(1): 112-119.
- Sharangi, A. B., 2009. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. *Food Research International*. 42(5-6): 529-535.
- Sharangi, A. B., Wasim Siddiqui, M. D., Dávila Aviña, J. E., 2014. Black Tea Magic: Overview of Global Research on Human Health and Therapeutic Potentialities. *Journal of Tea Science Research*. 4(1): 1-16.
- Sharma, A., Gupta, S., Sarethy, I. P., Dang, S., Gabrani, R., 2012. Green tea extract: possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens. *Food Chemistry*. 135(2): 672-675.
- Sharma, R., Lall, N., 2014. Antibacterial, antioxidant activities and cytotoxicity of plants against *Propionibacterium acnes*. *South African Journal of Science*. 110(11/12): 1-8.
- Shikanga, E. A., Combrinck, S., Regnier, T., 2010. South African *Lippia* herbal infusions: Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. *South African Journal of Botany*. 76: 567–571.
- Smullen, J., Koutsou, G. A., Foster, H. A., Zumbé, A., Storey, D. M., 2007. The Antibacterial Activity of Plant Extracts Containing Polyphenols against *Streptococcus mutans*. 41(5): 342-349.
- Steinmann, J., Buer, J., Pietschmann, T., Steinmann, E., 2013. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. *British Journal of Pharmacology*. 168(5): 1059-1073.
- Stoicov, C., Saffari, R., Houghton, J. M., 2009. Green tea inhibits *Helicobacter* growth *in vivo* and *in vitro*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 33(5): 473-478.
- Su, Y., Zhang, C., Wang, Y., Li, P., 2012. Antibacterial property and mechanism of a novel Pu-erh tea nanofibrous membrane. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93(4): 1663-1671.

- Šilha, D., Šilhová-Hrušková, L., Vytřasová, J., 2015. Modified isolation method of *Arcobacter* spp. from different environmental and food samples. *Folia Microbiologica*. 60: 515–521.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., Cliver, D. O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21(9): 1199-1218.
- Teegschwendner.cz [online] - dostupné z: [www.teegschwendner.cz/cajovy-lexikon/](http://www.teegschwendner.cz/cajovy-lexikon/) - [cit. 2018-04-18].
- 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*. 57(14): 5987-6000.
- Tiwari, R. P., Bharti, S. K., Kaur, H. D., Dikshit, R. P., Hoondal, G. S., 2005. Synergistic antimicrobial activity of tea & antibiotics. *Indian Journal of Medical Research*. 122: 80-84.
- Thoma, M., 2014. *77 čajů pro laiky i labužníky*. Praha: Slovart CZ, s. 13-165, ISBN: 978-80-7391-871-2.
- Vandamme, P., 2000. Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. *Campylobacter*. Washington, D.C.: ASM Press, s. 3-26, ISBN 1-55581-165-5.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., De Ley, J., 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* taxonomy: Emendation of Generic Descriptions and Proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41: 88–103.
- Wallace, R. J., 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society*. 63(4): 621-629.
- Wang, G., Zhao, Y., Tian, F., Jin, X., Chen, H., Liu, X., Zhang, Q., Zhao, J., Chen, Y., Zhang, H., Chen, W., 2014. Screening of adhesive lactobacilli with antagonistic activity against *Campylobacter jejuni*. *Food Control*. 44: 49-57.
- Wang, Q., Zhao, X., Qian, Y., Wang, R., 2013. *In vitro* antioxidative activity of yellow tea and its *in vivo* preventive effect on gastric injury. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 6: 423-426.
- Wight, W., 1962. Tea classification revised. *Current Science*. 31: 298–299.



- Wu, C. D., Wei, G. X., 2002. Tea as a functional food for oral health. *Nutrition*. 18(5): 443-444.
- Wu, S.-C., Yen, G.-C., Wang, B.-S., Chiu, C.-K., Yen, W.-J., Chang, L.-W., Duh, P.-D., 2007. Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea. *LWT – Food Science and Technology*. 40(3): 506-512.
- Xu, J., Wang, M., Zhao, J., Wang, Y.-H., Tang, Q., Khan, I. A., 2018. Yellow tea (*Camellia sinensis* L.), a promising Chinese tea: Processing, chemical constituents and health benefits. *Food Research International*. 107: 567-577.
- Yamamoto, T., Juneja, L. R., Chu, D. C., Kim, M., 1997. General chemical composition of green tea and its infusion. *Chemistry and applications of green tea*. New York: CRC Press, s. 13-22, ISBN 0-8493-4006-3.
- Yang, C. S., Chung, J. Y., Yang, G., Chhabra, S. K., Lee, M.-J., 2000. Tea and tea polyphenols in cancer prevention. *The Journal of Nutrition*. 130: 472S–478S.
- Zaveri, N. T., 2006. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sciences*. 78(18): 2073-2080.
- Zhao, Z. J., Tong, H. R., Zhou, L., Wang, E. X., Liu, Q. J., 2010. Fungal colonization of Pu-erh tea in Yunnan. *Journal of Food Safety*. 30(4): 769-784.
- Zuo, Y., Chen, H., Deng, Y., 2002. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and Pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*. 57(2): 307-316.

## 6 PŘÍLOHA

<b>Příloha 1:</b> Souhrnná tabulka hodnot získaných při testování přežívání <i>Arcobacter</i> spp. v nálevu ze zeleného čaje .....	91
<b>Příloha 2:</b> Souhrnná tabulka hodnot získaných při testování přežívání <i>Arcobacter</i> spp. v nálevu z bílého čaje .....	92
<b>Příloha 3:</b> Souhrnná tabulka hodnot získaných při testování přežívání <i>Arcobacter</i> spp. v nálevu ze žlutého čaje.....	93
<b>Příloha 4:</b> Souhrnná tabulka hodnot získaných při testování přežívání <i>Arcobacter</i> spp. v nálevu z čaje oolong .....	94
<b>Příloha 5:</b> Souhrnná tabulka hodnot získaných při testování přežívání <i>Arcobacter</i> spp. v nálevu z černého čaje.....	95
<b>Příloha 6:</b> Souhrnná tabulka hodnot získaných při testování přežívání <i>Arcobacter</i> spp. v nálevu z čaje Pu-erh.....	96
<b>Příloha 7:</b> Souhrnná tabulka hodnot získaných při testování přežívání <i>Arcobacter</i> spp. v nálevu z čaje rooibos .....	97

Příloha 1: Souhrnná tabulka hodnot získaných při testování přežívání *Arcobacter* spp. v nálevu ze zeleného čaje

<b><i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	28960	29360	28370	32260	<b>29737,5</b>	<b>1498,34</b>
2 hod.	3740	4090	4360	4490	<b>4170</b>	<b>287,14</b>
3 hod.	1090	2270	2890	1990	<b>2060</b>	<b>647,84</b>
6 hod.	180	270	N, P	190	<b>213,3</b>	<b>40,28</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. butzleri</i> CCUG 30484</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	29800	<b>41000</b>	29810	39720	<b>35082,5</b>	<b>4673,98</b>
2 hod.	4100	3210	3790	2650	<b>3437,5</b>	<b>555,67</b>
3 hod.	1780	1570	1390	1240	<b>1495</b>	<b>201,80</b>
6 hod.	270	250	280	190	<b>247,5</b>	<b>34,91</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	26760	33560	30480	29560	<b>30090</b>	<b>2427,07</b>
2 hod.	14080	8200	9640	10240	<b>10540</b>	<b>2174,12</b>
3 hod.	4200	3080	5360	7200	<b>4960</b>	<b>1523,94</b>
6 hod.	560	610	340	490	<b>500</b>	<b>101,73</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. butzleri</i> UPa 2013/8</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	31400	26280	31320	33720	<b>30680</b>	<b>2717,06</b>
2 hod.	19520	21560	22640	21000	<b>21180</b>	<b>1125,17</b>
3 hod.	19480	20080	18720	19400	<b>19420</b>	<b>482,08</b>
6 hod.	6280	8280	9800	12800	<b>9290</b>	<b>2380,15</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–

–... negativní růst; N, P... nepočitatelná nebo přerostlá miska; **červené hodnoty**... hodnoty nepočítány do směrodatné odchylky

Příloha 2: Souhrnná tabulka hodnot získaných při testování přežívání *Arcobacter* spp. v nálevu z bílého čaje

<b><i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	46000	46880	32400	40560	41460	2795,04
2 hod.	20960	22000	21200	24240	22100	1294,14
3 hod.	N, P	5000	2760	3480	3746,7	933,71
6 hod.	480	380	390	540	447,5	66,10
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. butzleri</i> CCUG 30484</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	16720	21840	17200	21040	19200	2025,26
2 hod.	14000	11920	13520	14560	13500	983,66
3 hod.	4360	3360	7800	8760	6070	2263,69
6 hod.	350	180	530	270	332,5	128,91
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	62880	78320	65360	58480	66260	1240
2 hod.	38240	33280	46800	60400	44680	5584,36
3 hod.	38320	35040	39680	30560	35900	3514,25
6 hod.	11360	12160	10840	11040	11350	503,09
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. butzleri</i> UPa 2013/8</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	47040	35520	32480	48480	40880	6982,03
2 hod.	21360	16620	14160	14880	16755	2805,08
3 hod.	9720	13800	10320	14520	12090	2096,35
6 hod.	4950	1530	3270	2190	2985	1293,40
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–

–... negativní růst; N, P... nepočitatelná nebo přerostlá miska; červené hodnoty... hodnoty nepočítány do směrodatné odchylky

Příloha 3: Souhrnná tabulka hodnot získaných při testování přežívání *Arcobacter* spp. v nálevu ze žlutého čaje

<b><i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	28760	23400	21560	24840	<b>24640</b>	<b>2647,57</b>
2 hod.	N, P	10960	9310	8200	<b>9490</b>	<b>1133,93</b>
3 hod.	5440	6120	4600	5200	<b>5340</b>	<b>544,42</b>
6 hod.	600	860	650	570	<b>645</b>	<b>140,45</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. butzleri</i> CCUG 30484</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	28280	22000	23280	19320	<b>23220</b>	<b>3252,14</b>
2 hod.	6960	8080	10360	9520	<b>8730</b>	<b>1307,33</b>
3 hod.	3520	3720	4760	5840	<b>4460</b>	<b>925,42</b>
6 hod.	1200	1030	1470	1640	<b>1335</b>	<b>235,85</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	22440	19400	24280	21640	<b>21940</b>	<b>1751,23</b>
2 hod.	17720	18720	18000	18350	<b>18197,5</b>	<b>375,26</b>
3 hod.	11600	9320	8920	N, P	<b>9946,7</b>	<b>1180,43</b>
6 hod.	5120	6560	5320	6120	<b>5780</b>	<b>585,49</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. butzleri</i> UPa 2013/8</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	26910	30600	27840	28930	<b>28570</b>	<b>1372,86</b>
2 hod.	5610	4160	4230	5560	<b>4890</b>	<b>695,67</b>
3 hod.	1850	2160	1360	1190	<b>1640</b>	<b>385,81</b>
6 hod.	540	290	470	800	<b>525</b>	<b>183,10</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–

–... negativní růst; N, P... nepočitatelná nebo přerostlá miska; **červené hodnoty**... hodnoty nepočítány do směrodatné odchylky

Příloha 4: Souhrnná tabulka hodnot získaných při testování přežívání *Arcobacter* spp. v nálevu z čaje oolong

<b><i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	35040	36720	32400	40560	<b>36180</b>	<b>2960,74</b>
2 hod.	20960	22000	21200	24240	<b>22100</b>	<b>1294,14</b>
3 hod.	N, P	5000	2760	3480	<b>3746,7</b>	<b>933,71</b>
6 hod.	480	380	390	540	<b>447,5</b>	<b>66,10</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. butzleri</i> CCUG 30484</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	48430	47620	<b>31640</b>	44500	<b>43047,5</b>	<b>1694,29</b>
2 hod.	14560	14930	5790	6630	<b>10477,5</b>	<b>4279,82</b>
3 hod.	3200	1990	3260	5480	<b>3482,5</b>	<b>1259,65</b>
6 hod.	1020	980	1330	1280	<b>1152,5</b>	<b>154,17</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	<b>16640</b>	25280	25040	31600	<b>24640</b>	<b>3037,43</b>
2 hod.	20640	18720	17840	23920	<b>20280</b>	<b>2332,72</b>
3 hod.	19120	17120	17840	19520	<b>18400</b>	<b>964,99</b>
6 hod.	17440	13520	14640	20800	<b>16600</b>	<b>2813,97</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. butzleri</i> UPa 2013/8</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	39120	39440	37440	31840	<b>36960</b>	<b>3052,08</b>
2 hod.	18000	21440	26080	23600	<b>22280</b>	<b>2966,75</b>
3 hod.	18960	18800	15680	22880	<b>19080</b>	<b>2554,06</b>
6 hod.	11440	13040	8240	11360	<b>11020</b>	<b>1739,31</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–

–... negativní růst; N, P... nepočitatelná nebo přerostlá miska; **červené hodnoty**... hodnoty nepočítány do směrodatné odchylky

Příloha 5: Souhrnná tabulka hodnot získaných při testování přežívání *Arcobacter* spp. v nálevu z černého čaje

<b><i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	15840	18480	20720	27120	<b>20540</b>	<b>4173,20</b>
2 hod.	6480	7360	6800	9440	<b>7520</b>	<b>1152,39</b>
3 hod.	1560	2720	2280	3840	<b>2600</b>	<b>827,04</b>
6 hod.	340	210	320	360	<b>307,5</b>	<b>58,04</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. butzleri</i> CCUG 30484</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	22960	18800	23200	21520	<b>21620</b>	<b>1750,31</b>
2 hod.	7160	9040	6040	5440	<b>6920</b>	<b>1370,84</b>
3 hod.	1680	2310	1040	2380	<b>1852,5</b>	<b>542,56</b>
6 hod.	440	320	70	90	<b>230</b>	<b>156,05</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	17680	15600	21280	26720	<b>20320</b>	<b>4216,92</b>
2 hod.	3000	2080	3920	6600	<b>3900</b>	<b>1689,14</b>
3 hod.	1800	2040	1560	3160	<b>2140</b>	<b>612,86</b>
6 hod.	1090	920	480	350	<b>710</b>	<b>304,55</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. butzleri</i> UPa 2013/8</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	31360	32880	35440	33840	<b>33380</b>	<b>1482,03</b>
2 hod.	8480	13000	9200	10640	<b>10330</b>	<b>1726,59</b>
3 hod.	4680	5200	6680	7920	<b>6120</b>	<b>1272,16</b>
6 hod.	3840	3520	5520	4560	<b>4360</b>	<b>768,37</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–

–... negativní růst; N, P... nepočitatelná nebo přerostlá miska; **červené hodnoty**... hodnoty nepočítány do směrodatné odchylky

Příloha 6: Souhrnná tabulka hodnot získaných při testování přežívání *Arcobacter* spp. v nálevu z čaje Pu-erh

<b><i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	7300	6400	4750	5900	<b>6087,5</b>	<b>920,85</b>
2 hod.	5250	4850	3250	3100	<b>4112,5</b>	<b>949,59</b>
3 hod.	3350	3400	3000	3100	<b>3212,5</b>	<b>167,24</b>
6 hod.	1500	1900	2600	2450	<b>2112,5</b>	<b>439,28</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. butzleri</i> CCUG 30484</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	9000	9080	<b>12280</b>	11480	<b>10460</b>	<b>1150,69</b>
2 hod.	5000	4600	4360	4280	<b>4560</b>	<b>280,00</b>
3 hod.	4040	3720	3000	2460	<b>3305</b>	<b>616,34</b>
6 hod.	1020	1310	1190	1110	<b>1157,5</b>	<b>106,62</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	4960	4200	3680	3560	<b>4100</b>	<b>551,72</b>
2 hod.	2440	2080	2720	1960	<b>2300</b>	<b>300,00</b>
3 hod.	2040	2400	1880	2440	<b>2190</b>	<b>237,28</b>
6 hod.	1280	840	960	1200	<b>1070</b>	<b>177,48</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b><i>A. butzleri</i> UPa 2013/8</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	4250	5550	5100	4750	<b>4912,5</b>	<b>476,15</b>
2 hod.	4700	3250	4450	5150	<b>4387,5</b>	<b>703,01</b>
3 hod.	3750	3260	2900	3500	<b>3352,5</b>	<b>313,48</b>
6 hod.	2150	1500	2700	2100	<b>2112,5</b>	<b>424,82</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–

–... negativní růst; N, P... nepočitatelná nebo přerostlá miska; **červené hodnoty**... hodnoty nepočítány do směrodatné odchylky



Příloha 7: Souhrnná tabulka hodnot získaných při testování přežívání *Arcobacter* spp. v nálevu z čaje rooibos

<b>A. cryaerophilus CCM 7050</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	55440	47520	45200	54240	<b>50600</b>	<b>4339,40</b>
2 hod.	26000	30800	29600	24960	<b>27840</b>	<b>2425,86</b>
3 hod.	22720	18000	23440	19120	<b>20820</b>	<b>2308,50</b>
6 hod.	5200	5360	7360	6000	<b>5980</b>	<b>851,12</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b>A. butzleri CCUG 30484</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	18600	<b>28820</b>	16200	15890	<b>19877,5</b>	<b>1211,07</b>
2 hod.	10450	13000	11630	10250	<b>11332,5</b>	<b>1097,69</b>
3 hod.	11610	12430	8020	5860	<b>9480</b>	<b>2668,12</b>
6 hod.	8600	8210	11400	7490	<b>8925</b>	<b>1483,38</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b>A. cryaerophilus UPa 2013/13</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	68560	<b>48160</b>	62800	61760	<b>60320</b>	<b>2990,71</b>
2 hod.	45520	<b>31920</b>	46640	44360	<b>42110</b>	<b>930,85</b>
3 hod.	46080	37200	43920	41200	<b>42100</b>	<b>3315,60</b>
6 hod.	N, P	19600	18960	24960	<b>21173,3</b>	<b>2690,30</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–
<b>A. butzleri UPa 2013/8</b>						
<i>Počty životaschopných buněk [CFU/ml]</i>						
Expozice	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	průměr	směrod. odch.
0 hod.	41600	43840	36960	<b>28400</b>	<b>37700</b>	<b>2865,15</b>
2 hod.	21520	25360	27600	29840	<b>26080</b>	<b>3072,46</b>
3 hod.	20560	21760	21840	19680	<b>20960</b>	<b>896,21</b>
6 hod.	11760	9680	7680	11920	<b>10260</b>	<b>1731,94</b>
17 hod.	–	–	–	–	–	–
24 hod.	–	–	–	–	–	–

–... negativní růst; N, P... nepočitatelná nebo přerostlá miska; **červené hodnoty**... hodnoty nepočítány do směrodatné odchylky