

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko - technologická

Extrakty z přírodních matric jako možné antimikrobiální substance

Bc. Magdaléna Csánová

Diplomová práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Magdaléna Csánová**
Osobní číslo: **C15612**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Extrakty z přírodních matric jako možné antimikrobiální substance**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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 stručně věnujte shrnutí základních informací o rodu *Arcobacter* a *Cronobacter*.

2. Věnujte se problematice přírodních látek, jejich potenciálním antimikrobiálním účinkům a možnostem testování.

Experimentální část:

3. Proveďte extrakci látek z přírodních matric, připravte různé extrakty i s využitím různých rozpouštědel pro následné testování.

4. Otestujte antimikrobiální účinky získaných extraktů na vybrané zástupce arkobakterů a kronobakterů, případně i na další bakterie.

5. Závěrem vyhodnoťte antimikrobiální potenciál testovaných látek.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. David Šilha, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

28. listopadu 2016

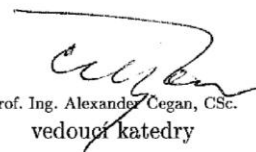
Termín odevzdání diplomové práce:

12. května 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Cegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

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.

V Pardubicích dne

Bc. Magdaléna Csánová

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce panu Ing. Davidovi Šilhovi PhD. za všechny rady, předané zkušenosti a vždy přátelský, vztřícný a profesionální přístup. Dále děkuji Ing. Simoně Kučerové a Bc. Barboře Vackové za psychickou podporu a přátelskou atmosféru v laboratoři.

V neposlední řadě také děkuji své rodině a především svému snoubenci Janovi za psychickou, morální a finanční podporu po celou dobu studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá antimikrobiální účinností přírodních matric proti vybraným kmenům rodu *Arcobacter* a *Cronobacter*, jejichž taxonomie, morfologie, patogenita, laboratorní diagnostika a terapie byly shrnuty v teoretické části. Pro testování antimikrobiální účinnosti byly připraveny extrakty z 13 přírodních materiálů, a to z anýzu, badyánu, hřebíčku, jalovce, muškátového ořechu, skořice, dále z celeru, celerové natě, červeného hlávkového zelí, červené řepy, smrkového jehličí, borovicového jehličí a šípku. Přírodní matrice byly extrahovány a rozpuštěny v různých rozpouštědlech. U všech testovaných extraktů byla potvrzena antimikrobiální aktivita vůči testovaným kmenům, což může mít potenciální využití v medicíně, ale i potravinářském průmyslu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Arcobacter, *Cronobacter*, extrakt, antimikrobiální aktivita, disková difúzní metoda, diluční metoda

TITLE

Extracts from natural materials as a potential antimicrobial substances

ANNOTATION

The thesis deals with the antimicrobial activity of natural matrices against selected strains of *Arcobacter* and *Cronobacter*, whose taxonomy, morphology, pathogenicity, laboratory diagnosis and treatment was summarized in the theoretical part of the thesis. Extracts for the antimicrobial activity testing were prepared from 13 natural materials: from anise, star anise, clove, juniper, nutmeg, cinnamon, then from celery, celery stem, red cabbage, red beet, pine needles, spruce needles and rose hip. Natural matrices were extracted and dissolved in various solvents. Antimicrobial activity was confirmed in all of the tested extracts against the tested strains, which may be used in medicine as well as food industry.

KEYWORDS

Arcobacter, *Cronobacter*, extract, antimicrobial activity, disc diffusion method, dilution method

OBSAH

ÚVOD	15
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 Rod <i>Arcobacter</i>	16
1.1.1 Taxonomie <i>Arcobacter</i> spp.....	16
1.1.2 Morfologie a citlivost k vnějším vlivům.....	16
1.1.3 Onemocnění vyvolaná arkobaktery	17
1.1.4 Patogenita a faktory virulence	18
1.1.5 Laboratorní diagnostika <i>Arcobacter</i> spp.....	19
1.1.6 Léčba onemocnění vyvolaných arkobaktery	21
1.2 Rod <i>Cronobacter</i>	21
1.2.1 Taxonomie <i>Cronobacter</i> spp.	21
1.2.2 Morfologie a citlivost k vnějším vlivům.....	22
1.2.3 Patogenita a faktory vitulence.....	22
1.2.4 Onemocnění vyvolaná kronobaktery	23
1.2.5 Laboratorní diagnostika <i>Cronobacter</i> spp.	24
1.2.6 Léčba onemocnění vyvolaných kronobaktery	25
1.3 Inhibiční účinky syntetických látek	26
1.3.1 Dělení antibiotik	27
1.3.2 Charakteristika vybraných tříd antibiotik	27
1.3.3 Vznik rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům.....	29
1.4 Inhibiční účinky přírodních látek	30
1.4.1 Antimikrobiální účinek přírodních látek.....	31
1.4.2 Charakteristika vybraných skupin přírodních látek	32
1.5 Metody stanovení antimikrobiální účinnosti.....	34
1.5.1 Disková difúzní metoda	34
1.5.2 Diluční metoda.....	35

1.5.3	E-test	36
1.6	Charakteristika vybranných přírodních látek	37
1.6.1	Anýz (<i>Pimpinella anisum</i>)	37
1.6.2	Badyán (<i>Illicium verum</i>)	38
1.6.3	Hřebíček (<i>Eugenia aromaticum</i>)	39
1.6.4	Jalovec (<i>Juniperus communis</i> L.)	40
1.6.5	Muškatový ořech (<i>Myristica fragrans</i>).....	41
1.6.6	Skořice cejlonská (<i>Cinammonum zeylonicum</i>).....	42
1.6.7	Smrk ztepilý (<i>Picea abies</i>).....	43
1.6.8	Šípek (<i>Rosa canina</i>).....	43
1.6.9	Ostatní přírodní látky s antimikrobiálním potenciálem	44
2	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	47
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	48
3.1	Materiál a metody	48
3.1.1	Chemikálie	48
3.1.2	Pomůcky a potřeby	48
3.1.3	Přístroje.....	48
3.1.4	Roztoky a činidla	49
3.1.5	Pevná a tekutá kultivační média	50
3.2	Bakteriální kmeny	51
3.3	Příprava extraktů z přírodních matric s antimikrobiálním potenciálem.....	52
3.4	Testování antimikrobiální účinnosti připravených extraktů diskovou difúzní metodou	53
3.4.1	Příprava bakteriální suspenze	53
3.4.2	Postup provedení diskové difúzní metody.....	54
3.5	Testování minimální inhibiční koncentrace u vybraných extraktů diluční metodou	54

3.5.1	Příprava bakteriální suspenze	54
3.5.2	Postup provedení diluční metody	55
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	56
4.1	Stanovení antimikrobiální účinnosti testovaných extraktů diskovou difúzní metodou	56
4.1.1	Extrakt z anýzu	57
4.1.2	Extrakt z badyánu	58
4.1.3	Extrakt z hřebíčku	60
4.1.4	Extrakt z jalovce	62
4.1.5	Extrakt z muškátového oříšku	64
4.1.6	Extrakt ze skořice	66
4.1.7	Extrakt ze smrkového jehličí	69
4.1.8	Extrakt z šípku	71
4.1.9	Další extrakty s antimikrobiálním potenciálem	73
4.2	Stanovení minimálních inhibičních koncentrací vybraných extraktů mikrodiluční metodou	82
5	ZÁVĚR	95
6	SEZNAM LITERATURY	97
7	PŘÍLOHY	114

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Snímek <i>Arcobacter aeaerophilus</i> IR - 1 z SEM	17
Obrázek 2 Mechanismus virulence <i>Arcobacter</i> spp.	19
Obrázek 3 Snímek <i>C. sakazakii</i> z fluorescenčního mikroskopu	22
Obrázek 4 Schéma imunochromatografického testovacího proužku.	25
Obrázek 5 Obecný vzorec flavonu obsahující flavonové jádro.....	33
Obrázek 6 Vyšetření antimikrobiální účinnosti pomocí E-testu na M-H agaru.....	37
Obrázek 7 Semena anýzu	37
Obrázek 8 Semena badyánu	39
Obrázek 9 Hřebíček.....	39
Obrázek 10 Plody jalovce.....	40
Obrázek 11 Muškátový ořech.....	41
Obrázek 12 Kůra skořicovníku cejlonského.....	42
Obrázek 13 Větev smrku ztepilého	43
Obrázek 14 Plody šípku.....	44

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled bakteriálních kmenů použitých pro testování antimikrobiální účinnosti přírodních látek	51
Tabulka 2 Přehled přírodních matric použitých k přípravě extraktů a testování antimikrobiální účinnosti	52
Tabulka 3 Přehled navážek a objemů rozpouštědla použitých k přípravě extraktů	56
Tabulka 4 Antimikrobiální účinnost extraktu z anýzu - <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>	57
Tabulka 5 Antimikrobiální účinnosti extraktu z anýzu - <i>C. sakazakii</i> , <i>C. muytjensii</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	57
Tabulka 6 Antimikrobiální účinnosti badyánového extraktu - <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>	59
Tabulka 7 Antimikrobiální účinnosti badyánového extraktu - <i>C. sakazakii</i> , <i>C. muytjensii</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	59
Tabulka 8 Antimikrobiální účinnosti hřebíčkového extraktu - <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>	61
Tabulka 9 Antimikrobiální účinnosti hřebíčkového extraktu - <i>C. sakazakii</i> , <i>C. muytjensii</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	61
Tabulka 10 Antimikrobiální účinnosti extraktu z jalovce - <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>	63
Tabulka 11 Antimikrobiální účinnosti extraktu z jalovce - <i>C. sakazakii</i> , <i>C. muytjensii</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	63
Tabulka 12 Antimikrobiální účinnosti extraktu z muškátového oříšku - <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>	65
Tabulka 13 Antimikrobiální účinnosti extraktu z muškátového oříšku - <i>C. sakazakii</i> , <i>C. muytjensii</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	65
Tabulka 14 Antimikrobiální účinnosti extraktu ze skořice - <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>	67
Tabulka 15 Antimikrobiální účinnosti extraktu ze skořice - <i>C. sakazakii</i> , <i>C. muytjensii</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	67
Tabulka 16 Antimikrobiální účinnosti extraktu ze smrkového jehličí - <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>	69
Tabulka 17 Antimikrobiální účinnosti extraktu ze smrkového jehličí - <i>C. sakazakii</i> , <i>C. muytjensii</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	70
Tabulka 18 Antimikrobiální účinnosti extraktu z šípku - <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>	71

Tabulka 19 Antimikrobiální účinnosti extraktu z šípku - <i>C. sakazakii</i> , <i>C. muytjensii</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	72
Tabulka 20 Antimikrobiální účinnosti extraktu z borovicového jehličí - <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>	74
Tabulka 21 Antimikrobiální účinnosti extraktu z borovicového jehličí - <i>C. sakazakii</i> , <i>C. muytjensii</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	74
Tabulka 22 Antimikrobiální účinnosti extraktu z celeru - <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>	76
Tabulka 23 Antimikrobiální účinnosti extraktu z celeru - <i>C. sakazakii</i> , <i>C. muytjensii</i> , <i>E.coli</i> , <i>S. aureus</i>	76
Tabulka 24 Antimikrobiální účinnosti extraktu z celerové natě - <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>	77
Tabulka 25 Antimikrobiální účinnosti extraktu z celerové natě - <i>C. sakazakii</i> , <i>C. muytjensii</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	77
Tabulka 26 Antimikrobiální účinnosti extraktu z červené řepy - <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>	79
Tabulka 27 Antimikrobiální účinnosti extraktu z červené řepy - <i>C. sakazakii</i> , <i>C. muytjensii</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	79
Tabulka 28 Antimikrobiální účinnosti extraktu z červeného hlávkového zelí - <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>	80
Tabulka 29 Antimikrobiální účinnosti extraktu z červeného hlávkového zelí - <i>C. sakazakii</i> , <i>C. muytjensii</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	81
Tabulka 30 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro <i>A. butzleri</i> CCUG 30484 - extrakt z anýzu, badyánu, jalovce a hřebíčku.....	83
Tabulka 31 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro <i>A. butzleri</i> CCUG 30484 - extrakt z muškátového oříšku, skořice, smrkového jehličí a šípku	84
Tabulka 32 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro <i>A. butzleri</i> LMG 10828 - extrakt z anýzu, badyánu, jalovce a hřebíčku.....	85
Tabulka 33 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro <i>A. butzleri</i> LMG 10828 - extrakt z muškátového oříšku, skořice, smrkového jehličí a šípku	86
Tabulka 34 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro <i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13 - extrakt z anýzu, badyánu, jalovce a hřebíčku.....	87
Tabulka 35 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro <i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13 - extrakt z muškátového oříšku, skořice, smrkového jehličí a šípku	88

Tabulka 36 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro <i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050	
- extrakt z anýzu, badyánu, jalovce a hřebíčku.....	89
Tabulka 37 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro <i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050	
- extrakt z muškátového oříšku, skořice, smrkového jehličí a šípku	90
Tabulka 38 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro <i>C. sakazakii</i> CCM 3461	
- extrakt z anýzu, hřebíčku, muškátového oříšku a skořice	91
Tabulka 39 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro <i>C. sakazakii</i> CCM 3461	
- extrakt z badyánu, jalovce, smrkového jehličí a šípku.....	92
Tabulka 40 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro <i>C. sakazakii</i> CCM 3461	
- extrakt z anýzu, badyánu, jalovce, muškátového oříšku, smrkového jehličí a šípku	93

SEZNAM ZKRATEK

A.	<i>Arcobacter</i>
ATCC	Americká sbírka mikroorganismů
BHI	<i>angl.</i> Brain Heart Infusion Broth
C.	<i>Cronobacter</i>
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CFU	kolonie tvořící jednotka
CCUG	Švédská sbírka mikroorganismů
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E.	<i>Escherichia</i>
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
LMG	Belgická sbírka mikroorganismů
M-H	Mueller-Hintonové agar
MALDI/TOF	ionizace laserem za účasti matrice s detektorem doby letu
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	meticilin - rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
OmpA	vnější membránový protein A
PCR	polymerázová řetězová reakce
PVC	polyvinylchlorid
RAPD	náhodná amplifikace polymorfnní DNA
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
S.	<i>Staphylococcus</i>
SEM	rastrovací elektronový mikroskop
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	<i>angl.</i> Tryptone Soya Agar
UPa	sbírka mikroorganismů Univerzity Pardubice
UV	ultrafialové záření

ÚVOD

Esenciální oleje a extrakty z přírodních látek byly od středověku známy pro své významné léčivé účinky, které byly využity ve farmacii při výrobě řady léků. Přírodní látky obsahují ve své struktuře fenoly a polyfenoly, anthokyanidy, flavonoidy, alkaloidy a terpeny, které se podílejí na antimikrobiální aktivitě přírodních matric. Po nástupu antibiotik jako léků první volby bylo využití antimikrobiálně působících přírodních látek na ústupu. Dnes vzhledem ke zvyšující se rezistenci bakterií vůči antibiotikům jsou antimikrobiálně působící přírodní látky novou alternativou k potenciálnímu využití v potravinářství, farmacii, medicíně nebo kosmetice.

K testování antimikrobiální účinnosti extraktů z přírodních matric byly vybrány 4 kmeny rodu *Arcobacter* a 2 kmeny rodu *Cronobacter*. Oba testované rody byly relativně nedávno objevenými, i přes to se u některých jejich zástupců objevují multirezistentní kmeny. Z tohoto důvodu nabývá testování antimikrobiální účinnosti přírodních extraktů proti daným kmenům na významu.

Cílem této diplomové práce je zpracování přírodních matric a příprava extraktů extrahovaných ve třech různých rozpouštědlech. Dále testování jejich antimikrobiální aktivity na vybrané kmeny rodu *Arcobacter* a *Cronobacter*.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Rod *Arcobacter*

1.1.1 Taxonomie *Arcobacter* spp.

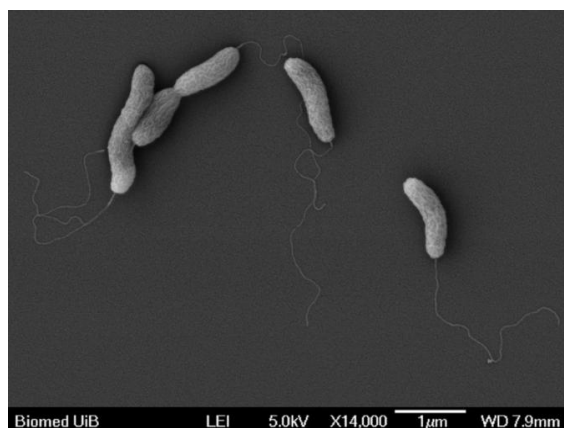
Rod *Arcobacter* (A.) patří do domény *Bacteria*, kmenu *Proteobacteria*, třídy *Epsilonproteobacteria*, řádu *Campylobacteriales* a čeledi *Campylobacteraceae* (Giacometti *et al.*, 2015).

Čeď *Campylobacteraceae* zahrnuje rody *Arcobacter* a *Campylobacter*. Arkobaktery byly dříve součástí rodu *Campylobacter* a byly označovány jako aerotolerantní mikroorganismy kampylobakterům podobné. Ellis *et al.* (1977) poprvé izoloval zástupce tohoto rodu z přirozeně potracených plodů skotu. V roce 1991 byl rod *Arcobacter* vyčleněn jako samostatný rod.

1.1.2 Morfologie a citlivost k vnějším vlivům

Arkobaktery jsou gramnegativní, nesporulující, mírně zakřivené (tvaru písmene S, nebo spirály) bakterie (viz obrázek 1). Arkobaktery jsou 0,2 – 0,9 µm široké a 1 – 3 µm dlouhé bakterie. Jeden polární bičík bakterii umožňuje charakteristický kývavý až spirálový pohyb. *Arcobacter* spp. je oxidáza pozitivní, kataláza pozitivní, ureáza negativní patogen.

Množí se při 15 – 32 °C, však může se množit i při 41,5 °C. Arkobaktery mohou růst za přítomnosti kyslíku, ale ještě lepší jsou mikroaerofilní podmínky s 3 – 10 % O₂, 5 – 10 % CO₂. Fermentují sacharidy na organické kyseliny, aminokyseliny využívají jako zdroj uhlíku (Adesiji *et al.*, 2012; Atabay *et al.*, 2014; Lehner *et al.*, 2005; Van den Abeele *et al.*, 2014).



Obrázek 1 Snímek *Arcobacter aeaerophilus* IR - 1 z SEM (Roalkvam *et al.*, 2015).

1.1.3 Onemocnění vyvolaná arkobaktery

Rod *Arcobacter* zahrnuje k dnešnímu dni 25 druhů. Nejčastěji se v souvislosti s onemocněním lidí a zvířat vyskytuje *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*.

A. butzleri se nachází ve vzorcích vyskytujících se v prostředí. Nejčastěji byl izolován z neupravené vody. Ve vyspělých zemích je hlavním zdrojem nákazy z potravy. *A. butzleri* byl izolován z různých potravin, nejčastěji však na mase. *A. butzleri* není pouze zvířecí patogen, ale může být i patogenem lidským. Taylor *et al.* (1991) identifikoval agens ve vzorcích stolice thajských dětí s průjmem. Průjem má často vodnatý charakter, je doprovázen bolestí břicha, celkovou nevolností nebo i zvracením. Byly však popsány i případy dětí, které trpěly bolestí břicha bez průjmu. Jejich stav byl natolik závažný, že byla nutná hospitalizace. Dále byla zjištěna spojitost s cestovatelským průjmem. *A. butzleri* může také způsobovat bakteriémiu a tím zhoršovat stav u lidí s jiným onemocněním, např. s jaterní cirhózou nebo gangrénou slepého střeva (Adesiji *et al.*, 2012; Collado *et al.*, 2011; Giacomenti *et al.*, 2015; Prouzet - Mauléon *et al.*, 2006).

A. cryaerophilus (podskupiny 1A a 1B) byl poprvé izolován z výkalů, reprodukčních orgánů, potracených plodů hospodářských zvířat a z mléka krav s mastitidou. U lidí je spojován hlavně s gastrointestinálními chorobami. *A. skirrowii* byl poprvé získán z výkalů jehňat s průjmovým onemocněním a z předčasně narozených mláďat hospodářských zvířat. *A. nitrofigilis* byl izolován z kořenů a kořenových sedimentů bahenní rostliny *Spartina alterniflora* (Collado *et al.*, 2011; Lehner *et al.*, 2005).

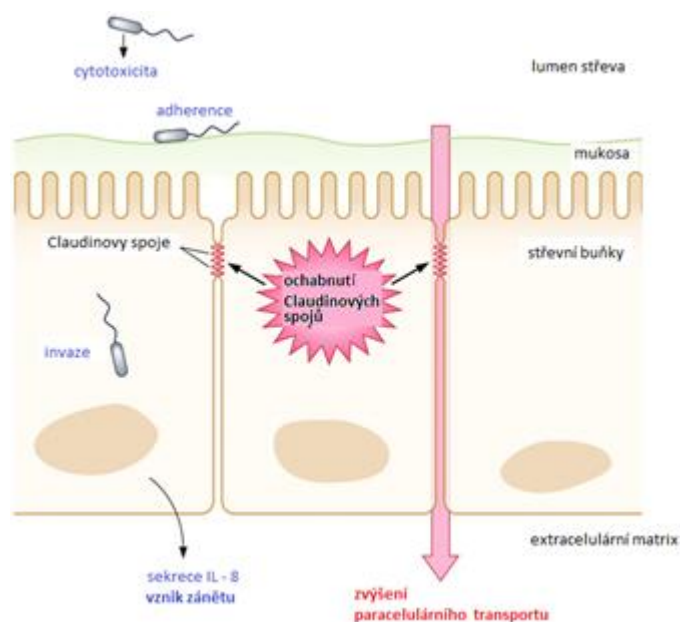
Wirsen *et al.* (2002) popsali na pobřeží moře bakterii metabolizující sulfid, kdy na základě fylogenetické analýzy byl nově identifikovaný druh později pojmenován jako *A. sulfidicus*. Dalším druhem izolovaným z kuřecího masa je *A. cibarius*. Novými druhy rodu

Arcobacter spp. jsou: *A. halophilus* (izolovaný ze slané laguny), *A. mytili* (izolovaný z mušlí), *A. anaerophilus* (získaný ze sedimentu z říční vody) *A. thereius* (izolovaný z prasečích abortů), *A. marinus* (izolovaný z mořské vody, mořských řas a hvězdic), *A. trophiarum* (izolovaný z výkalů prasat), *A. defluvii* (izolovaný z odpadních vod), *A. molluscorum* (získaný z mušlí a ústřic), *A. ellissi* (izolovaný z mušlí), *A. bivalviorum* (izolovaný z mušlí), *A. venerupis* (získaný poprvé ze škeblí), *A. cloacea* (izolovaný z odpadních vod, škeblí a jiných korýšů), *A. suis* (izolovaný z vepřového masa, užitkové vody), *A. ebronises* (získaný z vody na pobřeží Pacifiku) a *A. aquimarinus* (získaný z mořské vody) (Collado *et al.*, 2011; Figueras *et al.*, 2011; Lehner *et al.*, 2005; Jyothsna *et al.*, 2013; Levican *et al.*, 2012; 2013; 2014).

1.1.4 Patogenita a faktory virulence

Patogenita a virulenční mechanismy arko-bakterů dosud nejsou zcela známy. V současné době je známa pouze jejich schopnost adherence, invazivity a cytotoxicity. Invazivita byla prokázána především u *A. cryaerophilus* a *A. butzleri*. *A. butzleri* kolonizuje střevní sliznici zvířat, dále má schopnost aglutinovat erytrocyty, a to jak lidské, tak i zvířecí.

Mechanismus průniku arko-bakterů do buněk střevní sliznice a následně vznik průjmu byl studován na lidské střevní sliznici. Výsledky ukázaly, že proces byl zprostředkován sníženou expresí spojů Claudinových proteinů. Následkem porušení epiteliální bariéry dochází k vyplavení extracelulární tekutiny do extracelulárního prostoru a tím vzniku průjmu. Dále se zvyšuje hladina interleukinu 8 (IL-8) v postižené tkáni s následným rozvojem zánětu (Collado *et al.* 2011). V současnosti známý mechanismus virulence *Arcobacter* spp., tzn. adheze, produkce toxinu, indukce zánětu a zvýšení paracelulární tekutiny můžeme schématicky vidět na obrázku 2.



Obrázek 2 Mechanismus virulence *Arcobacter* spp.
(převzato a upraveno dle Collado *et al.*, 2011).

Dalším významným virulenčním faktorem u arkobakterů je tvorba biofilmu. Schopnost arkobakterů kolonizovat inertní povrchy ve formě biofilmů zvýhodňuje tyto bakterie v přežití za nepříznivých podmínek. Kolonizuje hlavně v trubkách vodovodního potrubí z jakéhokoliv materiálu (kov, plast, nerez), ale i v prostředí jatek, kde adhekuje hlavně na příslušných předmětech. Arkobaktery mohou tvořit biofilm prakticky na jakémkoliv povrchu. Schopnost tvořit biofilm se liší v rámci druhu, ale i kmene. Nejčastěji tvoří biofilm *A. butzleri*. Se schopností tvořit biofilm souvisí i vznik bakteriální rezistence vůči antibiotikům (Ferreira *et al.*, 2013).

1.1.5 Laboratorní diagnostika *Arcobacter* spp.

K izolaci *Arcobacter* spp. ze stolice bylo použito mnoho metod. Zprvu se používaly modifikovaná media původně sloužící ke kultivaci kampylobakterů nebo leptospir (Leptospira Ellinghausen – McCullough – Johnson – Harris (EMJH) médium). Médium bylo doplněno o 5 – fluorouracil. Atabay *et al.* (2014) ve své studii použil ke kultivaci arkobakterů bujón obohacený kombinací antibiotik (cefoperazon, amfotericin a teicoplanin). Toto médium sloužilo pro izolaci tří nejčastějších arkobakterů (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*) z různých typů vzorků. Tyto metody využívají zejména schopnosti arkobakterů růst při nižších teplotách a za aerobních podmínek. Tím se zabránilo růstu kampylobakterů. Houf *et al.* (2001) vyvinul specifické izolační metody využitím *Arcobacter* media

obohaceným o 5 antibiotik (cefoperazon, trimetoprim, amfotericin, novobiocin a 5 - fluorouracil) (Atabay *et al.*, 2014; Merga *et al.*, 2011).

V posledním desetiletí se stále častěji používají citlivější a specifitější metody k identifikaci bakterií. Jedná se o metody molekulárně - biologické. Tyto metody zahrnují např. polymerázovou řetězovou reakci (PCR), DNA hybridizace, náhodné amplifikace polymorfni DNA (RAPD) a analýza polymorfismu délky restričních fragmentů (RFLP) (Böhme *et al.*, 2010).

PCR umožňuje detekci i nekultivovaných buněk. Předpokladem pro navrhování primerů je dostupnost genomové sekvenční informace a 16S a 23S rRNA. Výhodou je vysoká citlivost a specifčnost detekce. Naopak velkou nevýhodou je, že detekujeme jak živé, tak mrtvé buňky, čímž ztrácíme možnost objektivních výsledků vzhledem k životaschopnosti buněk. Další nevýhodou může být použití metody ve vzorcích životního prostředí. V životním prostředí se může nacházet mnoho inhibičních látek snižující aktivitu *Taq* polymerázy. Proto je nezbytné před samotnou analýzou vzorek vhodnými metodami přečistit. Na bázi PCR byla vyvinuta metoda, která tyto nedostatky PCR odstraňuje. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je metoda, kdy použijeme značené oligonukleotidové sondy. Sondy jsou specifické pro rRNA.

FISH technika nám umožňuje určit řadu morfologických charakteristik cílových mikroorganismů, jejich velikost a buněčný obsah rRNA. Využívá se pro detekci specifických bakteriálních skupin ve smíšených vzorcích z prostředí, včetně sladkovodní nebo mořské vody. FISH je rychlá metoda detekce bakterií bez potřeby kultivace mikroorganismu. Neovlivňují ji inhibiční látky z životního prostředí, jak je tomu u PCR. FISH může být použita v kombinaci s PCR (Fera *et al.*, 2010; Moreno *et al.*, 2003).

Další metodou k identifikaci mikroorganismů je MALDI/TOF (ionizace laserem za účasti matrice s detektorem doby letu) spojená s detekcí hmotnostním spektrometrem (MS). Alispahic *et al.* (2010) vytvořili referenční knihovnu pro nejvýznamnější zástupce rodu *Arcobacter*. Zjistili, že se zástupci rodu *Arcobacter* v některých signálech hmotnostního spektra shodují. Některé signály spektra jsou však pro ně jedinečné. Dále zjistili, že malé odlišnosti ve spektrech mohou být v rámci kmenů jednoho druhu.

1.1.6 Léčba onemocnění vyvolaných arkobaktery

Terapie *Arcobacter* je založena na antibiotické léčbě. Jako u jiných mikroorganismů tak i u arkobakterů se setkáváme s problémem zvyšující se rezistence na antibiotika. Byly již zaznamenány multirezistentní kmeny *A. butzleri*, které nejsou citlivé na léčbu antibiotiky. Nejúčinnějšími prostředky proti nejčastějším arkobakterům (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*) byly stanoveny kanamycin, amikacin, gentamicin, streptomycin, tetracyklin. Dále byly účinné také kombinace antibiotik amoxicilin/ kyselina klavulávová, ampicilin/ sulbaktam a ofloxacin. Fluorochinolony (levofloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin) byly také testovány na antimikrobiální účinnost proti *A. butzleri* a *A. cryaerophilus*. Testované fluorochinolony vykazovaly dobrou účinnost proti arkobakterům (Ferreira *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2013).

Existují tu však rozdílné názory v rámci studií. Rozdíly v citlivosti na určitá antibiotika mohou být vlivem častého používání k léčbě, nebo prevenci onemocnění u zvířat, ale i u lidí. To souvisí i s vysokou rezistencí k ciprofloxacinu, který se používá jako lék první linie u infekcí způsobených *Campylobacteraceae* (Son *et al.*, 2007; Ünver *et al.*, 2013).

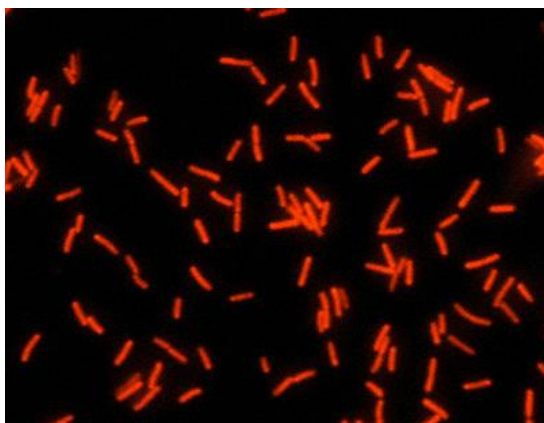
1.2 Rod *Cronobacter*

1.2.1 Taxonomie *Cronobacter* spp.

Rod *Cronobacter* (*C.*) patří do domény *Bacteria*, kmenu *Proteobacteria*, třídy *Gammaproteobacteria*, řádu *Enterobacteriales* a čeledi *Enterobacteriaceae* (Lehner *et al.*, 2013).

Cronobacter spp. jsou nesporulující, gramnegativní bakterie, které patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Úzce souvisí s rody *Enterobacter* a *Citrobacter*. *Cronobacter* je relativně nedávno popsán (2007). Do roku 2008 byl znám pouze jeden druh tohoto rodu, *C. sakazakii*, označován jako *Enterobacter sakazakii*. Od enterobakterů se však kronobaktery odlišují tvorbou žlutého pigmentu.

Dnes známe 13 druhů, *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis*, a šestý, dosud nepojmenovaný druh označovaný jako *C. genomospecies 1*. Nově popsány druhy jsou dále *C. condimenti* a *C. universalis* (Joseph *et al.*, 2012; Lawley *et al.*, 2012).



Obrázek 3 Snímek *C. sakazakii* z fluorescenčního mikroskopu (dostupné z <http://www.vermicon.com/de>, cit. 18. 11. 2016).

1.2.2 Morfologie a citlivost k vnějším vlivům

Kronobaktery jsou rovné tyčky (viz obrázek 3) mající délku 1 - 0,6 μm a šířku 0,3 - 1 μm . Kronobaktery jsou kataláza pozitivní, oxidáza negativní mikroorganismy. Většina zástupců má jeden peritrichiální bičík, který jim umožňuje pohyb.

Pro růst je zapotřebí teplota od 6 do 45 $^{\circ}\text{C}$, teplotní optimum je však 37 - 43 $^{\circ}\text{C}$. Některé druhy mají schopnost růst i při teplotách mezi 4 - 47 $^{\circ}\text{C}$. Rostou v rozmezí pH 5 - 10. Dobře snáší až 7% koncentraci chloridu sodného, 100 mM síranu amonného, dusičnanu sodného a dusitanu sodného. Dále dobře snáší prostředí s 200 mM fosforečnanu sodného, 5 % síranu sodného, 20 % ethylenglykolu a až 20 mM benzoátu sodného.

Jako ostatní příslušníci čeledi *Enterobacteriaceae* jsou kronobaktery fakultativně anaerobní mikroorganismy. Jsou velmi biochemicky aktivní. Podle biochemické aktivity jsou rozděleny do 16 biotypů. Redukují dusičnan na dusitan a produkují acetoin (Voges-Proskauer test). MR test (methyl red test) mají negativní. Fermentují většinu sacharidů, které využívá jako jediný zdroj uhlíku. Většinou neprodukují plyn, neprodukují sirovodík, nehydrolyzují močovinu, produkce indolu je variabilní, nedekarboxylují lysin a β - D - glukuronidázu (Forsythe, 2010; Iversen *et al.*, 2007; Joseph *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010; Motarjemi *et al.*, 2014).

1.2.3 Patogenita a faktory vitulence

Všechny druhy rodu *Cronobacter* jsou považovány za potenciálně patogenní. Onemocnění dětí a dospělých však nejčastěji způsobují pouze tři druhy, jsou to *C. sakazakii*, *C. malonaticus* a *C. turinensis*.

Přesný mechanismus virulence zatím není známý. Předpokládá se, že kronobaktery pomocí enzymů (elastázy, glykopeptidázy, kolagenázy, proteázy, endotoxiny) napadají lidské střevní buňky. Tím naruší střevní epitel a dostávají se do krevního oběhu. V krevním oběhu jsou pohlcovány makrofágy, ve kterých některé druhy dokáží přežívat a replikovat se. Následně kronobaktery napadají hematoencefalickou bariéru (HEB) a dostávají se do mozku a způsobují meningitidu (Ricke *et al.*, 2015).

Významnou roli v patogenezi by mohl mít vnější membránový protein A (OmpA). Díky tomuto proteinu kronobaktery napadají gastrointestinální trakt hostitele. Podílí se na invazi lidských endoteliálních buněk střeva a epiteliálních buněk mozkové tkáně. Tím dochází k invazi do mozku, vzniku infekce a destrukci mikrovaskulárních endoteliálních buněk. Přesný mechanismus vedoucí k poničení mozkových buněk není znám. Je pravděpodobné, že k poškození může docházet i následkem obrané reakce hostitele proti infekci (Ricke *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2015).

Mezi další virulenční faktory kronobakterů, které se mohou významně podílet v patogenezi, patří tvorba biofilmu. Biofilm je obecně definován jako společenství bakterií přiléhající k cizímu povrchu. Kronobaktery mají schopnost tvořit biofilm na povrchu mnoha materiálů jako např. sklo, nerez, polyvinylchlorid (PVC), polykarbonát, silikon nebo povrch trávicí trubice. Další možností by mohla být produkce enterotoxinu. Tepelně stabilní endotoxin hraje hlavní roli při narušení integrity střevní bariéry. Tím se bakterie dostává z gastrointestinálního traktu do krve, kde způsobuje bakteriémi. Přesný mechanismus virulence však není znám (Drudy *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2012; Motarjemi *et al.*, 2014).

1.2.4 Onemocnění vyvolaná kronobaktery

Infekční dávka není přesně známa, ale předpokládá se, že již 1000 buněk může způsobit onemocnění. Nejčastěji se onemocnění vyvolané kronobaktery vyskytuje u nedonošených, nebo předčasně narozených dětí na novorozeneckých jednotkách intenzivní péče. Jedná se především o septikémie nebo meningitidy. Nejčastějším původcem je *C. sakazakii*, ale i *C. malonaticus* a *C. turninesis*.

U meningitid často dochází k hrubé destrukci mozku, což má za následek mentální retardaci, nebo v nejhorším případě může být onemocnění letální (40 - 80 %). Patogeneze meningitidy se liší od meningitid způsobených jinými bakteriemi. Bakterie způsobuje cystické změny, abscesy, hydrocefalus, odumření mozkové tkáně a zkapalnění bílé mozkové hmoty. Pacient trpí těžkými neurologickými následky, jako hydrocefalus, ochrnutí, retardací.

Infekce vzniká mezi 4. a 5. dnem po narození. Průběh je velmi náhlý a rychlý a při nezačínání léčby může nastat smrt i do několika hodin až dnů od propuknutí prvních příznaků (Friedemann, 2007; Lawley *et al.*, 2012; Ricke *et al.*, 2015; Taylor, 2015).

Infekce u dospělých jsou zásadně charakteru bakteriemií, jako infekcí močového ústrojí a infekcí ran. Častým původcem je *C. malonaticus* ST 7. Infekce způsobené kronobaktery u dospělých zahrnují širokou škálu příznaků jako jsou záněty spojivek, sepse žlučníku, sepse močového ústrojí, zánět slepého střeva, rané infekce nebo zápal plic.

Zdrojem nákazy může být sušená kojenecká výživa. Současné poznatky ukazují, že onemocnění může způsobit méně jak 3 CFU/ 100 g sušeného mléka. Dalšími zdroji nákazy může být kontaminované prostředí (půda, voda), rostlinné materiály, sýry, obiloviny, kvašené nápoje, ovoce a zelenina (Lawley *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010; Ricke *et al.*, 2015; Stoll *et al.*, 2004).

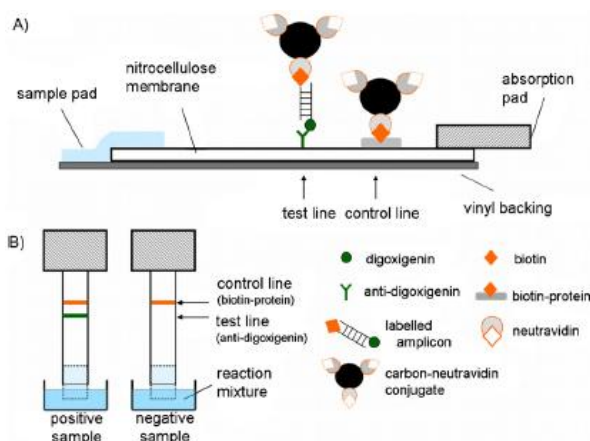
1.2.5 Laboratorní diagnostika *Cronobacter* spp.

Kultivační průkaz kronobakterů je založen na detekci enzymu α -glukosidázy, které je možné detekovat na řadě selektivních, nebo chromogenních agarových půd. Pro rozlišení kronobakterů od ostatních *Enterobacteriaceae* se k základnímu médiu přidává X- α -Glc (5-brom-4-chlor-3-indolyl- α -D-glukopyranosid). Mezi tyto média patří mimo jiné Druggan-Forsythe-Iversen agar (DFI), Chromokult *Enterobacter sakazakii*, ESIA (*Enterobacter sakazakii* isolation agar) agar. Na DFI agaru vyrůstají kronobaktery v modře zbarvených koloniích. Další média používaná ke kultivaci kronobakterů je TSA (Tryptone Soya Agar), na kterém vyrůstají ve žlutě pigmentovaných koloniích. K dispozici jsou i dvě nová média, využívající fluorogenu 4-methylumbelliferyl- α -D-glukopyranosid (MU α Glc). Hydolýzou tohoto substrátu α -glukosidázou se uvolní 4 - methylumbeliferol a tím dojde k emisi záření v UV světle. Média obsahující tento substrát jsou Leuschner Donald Baird Cox (LDBC) agar a Oh - Kang (OK) agar (Corry *et al.*, 2012; Doyle *et al.*, 2013; Yates *et al.*, 2016).

Tradiční mikrobiologické techniky pro detekci *Cronobacter* jsou velmi pracné a náročné. Standardní postup často zahrnuje několik kroků, které trvají 6 - 7 dní, což prodlužuje dobu identifikace a potvrzení diagnózy. V současné době se, mimo tradičních metod, stále častěji používají metody, které mají zrychlit, zjednodušit a zlevnit detekci kronobakterů. Byla popsána řada technik na bázi biosenzorů pro rychlou a citlivou detekci patogenu, včetně fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), real time PCR, infračervené

spektroskopie, DNA mikroanalýzy. Tyto techniky vyžadují sofistikované vybavení a vysoce kvalifikované pracovníky, čímž se značně zvyšují náklady na analýzu (Blažková *et al.*, 2011; Deer *et al.*, 2010; Motarjemi *et al.*, 2014).

Jednoduchou, rychlou metodou detekce kronobakterů může být imunochromatografická metoda detekce nukleových kyselin. Tato metoda je kombinací chromatografie na tenké vrstvě s konvenční interakcí bioafinitního páru (antigen - protilátka, avidin - biotin). Blažková *et al.* (2011) rozšířili možnost aplikace tohoto testu pro detekci amplikonu PCR (viz obrázek 4). Pokud jsou kronobaktery ve vzorku přítomny dochází k vazbě imobilizované protilátky proti digoxigeninu s amplifikovaným produktem značeným digoxigeninem. Koloidní uhlíkové nanočástice slouží k vizualizaci vzniku imunokomplexu během 10 minut. Tento test detekuje méně jak 10 bakteriální buněk ve vzorku potravin. Jedná se o jeden z nejrychlejších testů pro průkaz kronobakterů ve vzorcích potravin.



Obrázek 4 Schéma imunochromatografického testovacího proužku. *Pozn.:* A) znázorňuje boční pohled na imunochromatografický proužek a princip testu; B) znázorňuje čelní pohled a výsledek v případě positivity a negativity testu. (převzato z Blažková *et al.*, 2011).

1.2.6 Léčba onemocnění vyvolaných kronobaktery

Terapie infekcí způsobených kronobaktery je založena především na antibiotické léčbě. Zástupci rodu *Cronobacter* jsou přirozeně rezistentní vůči všem makrolidům, linkomycinu, klindalmycinu, streptograminům, rifampicinu, kyselině fusidové a fosfomycinu. Infekce způsobené kronobaktery lze léčit tetracykliny, aminoglykosidy, chloramfenikolem, nebo také beta-laktamovými antibiotiky. Dále jsou kronobaktery citlivé na léčbu antifoláty nebo chinolony.

Infekce způsobené *C. sakazakii* jsou obvykle léčeny kombinací antibiotik ampicilin - gentamicin nebo ampicilin - chloramfenikol. Nicméně s objevující se rezistencí k ampicilinu v důsledku produkce beta - laktamázy byl nahrazen karbamenem nebo cefalosporiny nové generaci. K léčbě lze použít i kombinace antibiotik trimetoprim - sulfamethoxazol (Drudy *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014).

1.3 Inhibiční účinky syntetických látek

Největším úspěchem v lékařství je možnost antibiotické léčby chorob způsobených mikroorganismy. V polovině 19. století bylo zjištěno, že plíseň na bramborách je způsobena houbami a kažení vína a piva bakteriemi. V roce 1865 Lister poprvé použil fenol jako účinné antiseptikum. Dále byla vyvinuta celá řada jednoduchých látek, které byly použity jako lokální antibakteriální prostředky. Mezi tyto sloučeniny patří např. thymol, hexachlorofen nebo formaldehyd (Hanson, 2006).

Antibiotika jsou sekundární nízkomolekulární látky produkované mikroorganismy, které usmrcují nebo inhibují růst mikroorganismů. Antibiotika mohou být buď přírodní produkty a jejich polosyntetické deriváty, nebo také syntetické sloučeniny napodobující strukturu přírodních látek. Obecně jsou antibiotika vyrobena biosynteticky z přírodních zdrojů. Často jsou však chemicky modifikována tak, aby měla co nejlepší terapeutický efekt. Mezi hlavní mikroorganismy produkující antimikrobiální látky patří *Actinobacteria*, zejména druh *Streptomyces*, dále plísně (*Penicilium notatum*) a některé vláknité bakterie (Steglich *et al.*, 2000; Vardanyan *et al.*, 2016).

Termín "antibiotikum" byl poprvé představen Selmanem Waksmanem v roce 1941. Po objevení penicilinu hledání nových antibioticky účinných látek stále pokračuje. V současné době bylo popsáno přibližně 16 500 účinných antimikrobiálních látek. Přibližně 100 z nich lze používat v běžné lékařské praxi. Léčba antibiotickými látkami, které by neměly způsobovat poškození hostitele, označujeme jako chemoterapie. Jsou nedílnou součástí terapie chorob způsobenými patogenními mikroorganismy (Daintith a Martin, 2010; Davies *et al.*, 2010; Jennings *et al.*, 2017).

1.3.1 Dělení antibiotik

Antibiotika můžeme klasifikovat dle spektra působení, mechanismu účinku, biosyntetického původu nebo chemické struktury. Dle specifity je dělíme na látky bakteriostatické a bakteriocidní. Látky, které inhibují růst mikroorganismů označujeme jako bakteriostatické. Bakteriostatická antibiotika zasahují do proteosyntézy bakterií a tím způsobují inhibici růstu. Látky, které bakterie usmrcují označujeme jako baktericidní. Baktericidní antibiotika obvykle působí na buněčné struktury, jako je cytoplazmatická membrána, replikaci, transkripci, translaci, respirační metabolismus, nebo transport železa.

Dle spektra účinku lze antibiotika dělit na široce, středně a úzko spektrá. Antibiotika s širokým spektrem účinku působí jak na grampozitivní, tak i gramnegativní bakterie. Antibiotika se středním spektrem účinku působí pouze na určitou skupinu mikroorganismů. Úzko spektrá antibiotika působí pouze na jednu skupinu mikroorganismů.

Nejčastěji používanou klasifikací antibiotik je dle jejich chemické struktury na beta-laktamová antibiotika (peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktany), tetracykliny, makrolidová antibiotika, aminoglykosidy, peptidová antibiotiky, linkosamidy, streptogramy (Doyle *et al.*, 2013; Robinson, 2000; Steglich *et al.*, 2000; Vardanyan *et al.*, 2016).

1.3.2 Charakteristika vybraných tříd antibiotik

Mezi lety 1930 - 1960 bylo vyrobeno více než 20 nových tříd antibiotik. Avšak pouze 4 skupiny byly uvedeny na trh. Do těchto 4 tříd antibiotik patří beta-laktamy, tetracykliny, makrolidy a aminoglykosidy (Vardanyan *et al.*, 2016).

Betalaktamová antibiotika

Beta-laktamová antibiotika jsou nejčastěji používaná v klinické praxi. Beta-laktamová antibiotika obsahují ve struktuře beta-laktamový kruh, jehož struktura může být porušena působením bakteriální β -laktamázy. Z hlediska specifity se jedná o baktericidní antibiotika, která zasahují do biosyntézy peptidoglykanové vrstvy bakteriální stěny. Tím dochází k nevratnému zablokování penicilin-vázajících proteinů, včetně karboxypeptidázy, endopeptidázy a transpeptidázy.

Penicilin vázající proteiny jsou skupina proteinů, které usnadňují zesíťování nově syntetizovaného peptidoglykanu do buněčné stěny. Pokud dojde ke styku s β -laktamovými antibiotiky, dochází k vytvoření slabé bakteriální stěny a následné lýze bakteriální buňky.

Do beta-laktamových antibiotik lze zařadit penicilin, cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamy (Doyle *et al.*, 2013; Robinson, 2000).

Tetracyklinová antibiotika

Tetracykliny jsou širokospektrá antibiotika produkovaná streptomycety. Tyto přírodní, nebo polosyntetické deriváty jsou používané ve veterinární i humánní medicíně. Tetracykliny působí proti gramnegativním, grampozitivním mikroorganismům, ale také např. proti chlamydiím, mykoplasmatům, riketsiím, dále proti některým prvokům a virům.

Mechanismus účinku je založen na inhibici syntézy proteinů, jedná se tedy o bakteriostatická antibiotika. Tetracykliny zabraňují připojení aminoacyl-tRNA na místo ribozomálního akceptoru. Mezi tetracyklinová antibiotika patří například tetracyklin, doxycyklin, oxytetracyklin (Chopra *et al.*, 2001; Steglich *et al.*, 2000).

Makrolidová antibiotika

Makrolidy jsou skupinou antibiotik produkovaných různými kmeny *Streptomyces*, nebo plísněmi. Tvoří skupinu sloučenin s výrazným 12 až 16 člennými makrocyklickými laktonovými kruhy se substituovanými aminosacharidy (deoxyhexóza, aminodeoxyhexóza). Přírodní makrolidy se obecně skládají z makrocyklického laktonového kruhu s glykosidickými vazbami. Makrolidy jsou bakteriostatická antibiotika, avšak některá mohou při použití vysoké koncentrace působit až baktericidně. Působí proti grampozitivním bakteriím, mohou dále působit proti spirochetám, riketsiím nebo virům.

Mechanismus účinku makrolidových antibiotik je založen na inhibici syntézy proteinů v bakteriální buňce během translokace. Makrolidová antibiotika klasifikujeme do tří generací. Mezi nejvýznamnější zástupce makrolidových antibiotik lze zařadit klarithromycin, erytromycin nebo josamycin (Steglich *et al.*, 2000; Vardanyan *et al.*, 2016).

Aminoglykosidová antibiotika

Aminoglykosidy jsou jedny z nejstarších antibiotik, v klinické praxi se používají k léčbě již desítky let. Aminoglykosidy jsou multifunkční hydrofilní cukry, na kterých jsou navázány amino nebo hydroxylové skupiny. Vykazují vazebnou afinitu k nukleovým kyselinám, zejména k prokaryotické rRNA.

Obecně patří mezi širokospektrá antibiotika, která působí proti grampozitivním, gramnegativním organismům, ale i proti mykobakteriím. Všechny aminoglykosidy mají velmi závažné nežádoucí účinky (nefrotoxicita, neurotoxicita, ototoxicita). Do této skupiny patří m.j. streptomycin, neomycin, kanamycin, gentamycin (Cammack *et al.*, 2006; Kotra *et al.*, 2000; Vardanyan *et al.*, 2016).

Chinolonová a fluorochinolonová antibiotika

Další významnou skupinou antibiotik jsou fluorochinolony. Fluorochinolony jsou skupina antibiotik používající se jak v humánní tak veterinární medicíně. Původní chinolony, patřící do první generace, nebyly fluorované. Mezi chinolony první generace patří například kyselina nalidixová nebo kyselina oxolinová. Přidáním fluoru do struktury chinolonů se rozšířilo antimikrobiální spektrum. Působí proti gramnegativním i grampozitivním mikroorganismům. Tato antibiotika patří do druhé generace a zahrnují léky jako jsou ciprofloxacin, nebo ofloxacin. Fluorochinolonová antibiotika se dále dělí na třetí a čtvrtou generaci. Čtvrtá generace působí kromě grampozitivních a gramnegativních mikroorganismů i na anaerobní mikroorganismy (Bhandari *et al.*, 2009; Gerczei *et al.*, 2014).

Fluorochinolony vykazují baktericidní působení inhibicí bakteriální topoisomerázy II. a IV. typu. Tyto enzymy se významně podílejí na replikaci DNA. Inhibují možnost rozvolnění dvoušroubovice DNA, a tím blokují bakteriální replikaci (Grumezescu, 2016; Robinson *et al.*, 2004).

1.3.3 Vznik rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům

Antibiotické látky mohou mít pro lidský organismus i škodlivé účinky, často jsou velice toxické. Mohou způsobovat alergie, které mohou mít závažné život ohrožující komplikace (anafylaktický šok). Ve vzácných případech mohou poškozovat ledviny, játra, mít neurologické účinky, poškozovat sluch. Jedná se hlavně o případy, kdy jsou léky podávány dlouhou dobu ve vysokých dávkách (Doyle *et al.*, 2013; Steglich *et al.*, 2000).

Úspěšné použití jakýchkoliv terapeutických činidel je ovlivněn možným vývojem tolerance nebo rezistence. To platí zvláště pro látky používané při léčbě bakteriálních, plísňových, parazitárních a virových infekcí. Řada biochemických a fyziologických mechanismů může mít za následek rozvoj rezistence.

Antimikrobiální rezistence v širším slova smyslu je snížená náchylnost mikrobu na skupinu antibiotik nebo na antibiotikum, které by za normálních okolností růst mikroba inhibovalo nebo zabijelo. Častěji než přirozená rezistence nastává rezistence získaná. Jedná se o odolnost vůči jednomu nebo více antibiotikům se stejným mechanismem účinku, aniž by patogen byl stále v kontaktu s původním antibiotikem. Rozvoj rezistence je velký celosvětový problém (Méndez - Vilas, 2013; Steglich *et al.*, 2000; Zankari *et al.*, 2012).

Vývoj generací mikroorganismů rezistentních na antibiotika má za následek mnohaletý selekční tlak vlivem nadužívání antibiotik. Nedávné studie mechanismu vzniku rezistence uvádí více než 20 000 potenciálních genů pro rezistenci. Tento alarmující výsledek by mohl v budoucnu znamenat nemožnost použití antibiotické léčby. Dobrým alternativním řešením by mohlo být použití přírodních antimikrobiálně působících látek (Davies *et al.*, 2010; Doyle *et al.*, 2013).

1.4 Inhibiční účinky přírodních látek

Byliny a koření byly od středověku využívány nejen pro svou aromatickou složku, ale také v potravinářství a lidovém léčitelství. Termín "koření" byl poprvé použit až ve 12. století. Avšak již v raných civilizacích používali listy některých keřů pro zlepšení chuti masa. Egypťané používali směs koření (např. anýz, kmín, majoránku) ke konzervaci těl při mumifikacích. Vonné silice a parfémy byly používány při církevních rituálech. O významnosti přírodních látek se zmiňoval ve svých spisech již Hippokrates, průkopník moderní medicíny, Theophrastus, řecký vědec a filozof, nebo Dioscorides, známý jako otec botaniky. Což dokládá, že koření bylo součástí života i ve velmi raných fázích lidské historie (Barros-Velázquez, 2016; Burt, 2004; Škrinjar a Nemet, 2009).

Později bylo prokázáno, že lidé, kteří používají koření a byliny jsou zdravější a dožívají se vyššího věku. Proto se užívání koření a bylin používalo k prevenci před nachlazením, rakovinou nebo jako "neutralizátor" jedů. Ve středověku se sušilo koření (skořice, česnek nebo oregano) a používalo se jako desinfekční prostředek k boji proti šíření moru. Mimo to bylo koření a některé rostliny vždy používány k výrobě parfémů (Barros-Velázquez, 2016; Škrinjar a Nemet, 2009).

Před tím, než může být vonná silice použita nebo analyzována, musí předcházet zpracování rostlinné matrice. Metody zpracování rostlinné matrice mohou být různorodé, např. parní destilace, extrakce rozpouštědlem, lisování za studena, simultánní destilace

s následnou extrakcí. Ačkoliv se tyto metody k získávání silic používají řadu let, mají své nevýhody. Při zpracování rostlinné matrice dochází ke ztrátě některých těkavých látek, k nízké účinnosti extrakce, k tepelné nebo hydrolytické degradaci, případně mohou zůstat v extraktu toxické zbytky rozpouštědla. Způsoby extrakce značně ovlivňují chemické složení a chemické složky vonných silic. Proto je vždy velmi důležité zvolit co možná nejvhodnější metodu k izolaci vonných silic z rostlinných matric (Burt, 2004; Reyes-Jurado *et al.*, 2014).

1.4.1 Antimikrobiální účinek přírodních látek

Mnoho antimikrobiálně působících látek přítomných v rostlinách může být součástí jejich přirozeného obranného mechanismu. V důsledku toho inhibují růst alimentárních patogenů. Antimikrobiální látky mohou být produkovány i v důsledku stresu z neaktivních prekurzorů aktivací enzymů přítomných v rostlinných tkáních (Gyawali a Ibrahim, 2014; Tiwari *et al.*, 2009).

Výtažky z bylin, resp. jejich sekundární metabolity, byli používány pro své antimikrobiální účinky k řadě účelů. Např. sekundární metabolit digitoxin, získávaný z listů náprstníku červeného (*Digitalis purpureae*), se používá k léčbě srdečního selhání. Chinin, alkaloid obsažený v kůře chinovníku lékařského (*Cinchona officinalis*) a jeho deriváty, byli používány k léčbě malárie. Mimo terapeutických účinků mají sekundární metabolity výtažků bylin další prospěšné účinky. Mohou být použity také ke konzervaci potravin. Bylo zjištěno, že olej z bazalky pravé (*Ocimum basilicum*) je velmi vhodný k dezinfekci salátů.

Mimo antimikrobiálních vlastností má řada látek i účinky antioxidační. Přítomnost antioxidačních i antimikrobiálních vlastností v jedné molekule činí sloučeninu účinnějším konzervantem. Toho se využívá v potravinářství, nebo také v kosmetickém průmyslu (Cowan, 1999; Méndez-Vilas, 2011; Gyawali a Ibrahim, 2014).

Obecně platí, že gramnegativní bakterie jsou méně citlivé, nebo nemusí vykazovat žádný účinek vůči antimikrobiálním látkám. To je dáno stavbou bakteriální stěny gramnegativních bakterií. To však neznamená, že grampozitivní bakterie jsou striktně citlivější vůči přírodním antimikrobiálním látkám (Tajkarimi *et al.*, 2010).

1.4.2 Charakteristika vybraných skupin přírodních látek

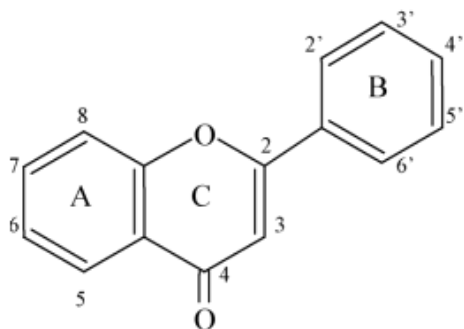
Rostliny jsou téměř neomezeně schopny syntézy aromatických látek. Většina těchto látek obsahuje ve své struktuře fenol nebo deriváty fenolu. Odhaduje se, že existuje více jak 12 000 druhů sekundárních metabolitů produkovaných rostlinami. Hlavní přirozenou úlohou těchto metabolitů je ochrana rostlin před škůdci, mikroorganismy a býložravými organismy. Kromě fenolu a jeho derivátů mohou rostliny ve své struktuře obsahovat alkaloidy, terpeny a éterické oleje nebo lektiny (Cowan, 1999; Gyawali a Ibrahim, 2014; Tiwari *et al.*, 2009).

Přírodní fenoly, polyfenoly a flavonoidy

Sloučeniny obsahující ve své struktuře fenol jsou široce v přírodě rozšířenou skupinou. Hydroxylová skupina vyskytující se v molekule fenolu je hlavním činitelem antimikrobiálního účinku. Tato skupina se integruje do buněčné membrány bakterií a iniciuje porušení membránové struktury. Tím může dojít k úniku buněčných struktur a následně buněčné smrti. Přítomnost hydroxylové skupiny ve struktuře fenolu hrající v antimikrobiální aktivitě důležitou roli např. v molekule karvakrolu nebo thymolu (Gyawali a Ibrahim, 2014; Weerakkody *et al.*, 2010; Wojdyło *et al.*, 2007).

Polyfenoly jsou sekundární metabolity rostlin přirozeně vyskytující se u všech vyšších rostlin. Slouží jako přirozená obrana rostlin na vnější podmínky, proti rostlinným patogenům nebo škůdcům. V průběhu posledních let byly polyfenoly studovány pro jejich potenciální vliv na některé chronické choroby. Bylo prokázáno, že tyto látky mají schopnost snižovat aktivitu některých enzymů, nebo se účastní na regulaci některých receptorů signálních drah. Kromě toho vykazují polyfenoly vysokou antimikrobiální aktivitu proti širokému spektru mikroorganismů (Almajano *et al.*, 2008; Daglia, 2012).

Mezi polyfenoly lze zařadit v přírodě zcela běžně se vyskytující flavonoidy. Tyto látky se nachází např. v ovoci, zelenině, čaji, víně, kávě nebo pivu. Základní stavební strukturou je 2-fenyl-benzopyran nebo flavanové jádro (viz obrázek 5). Kromě antimikrobiálního účinku mají flavonoidy i antioxidační, protizánětlivé účinky a dále pozitivní vliv na funkci cévní stěny. Flavonoidy mají inhibiční účinek proti některým kmenům gram pozitivních a gram negativních bakterií a dále některých plísní, kvasinek a virů (Almajano *et al.*, 2008; Cushnie *et al.*, 2005; Daglia, 2012; Taleb-Contini *et al.*, 2003; Orhan *et al.*, 2010). Mezi flavonoidy patří např. chalkony, anthokyanidy, proanthokyanidy, flavony nebo isoflavonoidy (Wojdyło *et al.*, 2007).



Obrázek 5 Obecný vzorec flavonu obsahující flavonové jádro (převzato a upraveno dle Cushnie *et al.*, 2005).

Přírodní alkaloidy

Další velkou skupinou látek s významným antimikrobiálním účinkem jsou alkaloidy. Alkaloidy jsou organické látky obsahující ve své chemické struktuře heterocyklický dusík nebo může být dusík součástí postranního řetězce. Většina alkaloidů jsou mikrobiálního, rostlinného a živočišného původu. Jejich významné účinky jsou již dlouho známy a využívány v lékařství i farmacii.

První z lékařského hlediska významným zástupcem alkaloidů byl morfin izolovaný z máku setého (*Papaver somniferum*). Základní struktura alkaloidů sloužila jako předloha pro výrobu některých syntetických nebo polosyntetických antibiotik, např. metrinidazolu, linezolidu nebo trimetoprimu (Cai *et al.*, 2004; Cowan, 1999; Qiu *et al.*, 2014).

Terpeny, terpenoidy a éterické oleje

Vonné silice (nebo také éterické oleje) jsou aromatické olejovité kapaliny získávané z rostlinného materiálu (květín, pupenů, semen, větví, kůry, dřeva, ovoce nebo kořenů). Tyto oleje jsou sekundární metabolity, které ve své struktuře obsahují sloučeninu na bázi isoprenu nazývanou terpeny. Pokud terpeny ve své struktuře mají inkorporovaný kyslík, označujeme je jako terpenoidy. Tyto látky jsou charakteristické tím, že dávají rostlinám jejich typickou vůni.

Jsou široce používány pro své baktericidní, antimykotické, antivirové, antiparazitární, léčivé a antitoxické účinky. Využívají se hlavně ve farmacii, potravinářství, medicíně, ale i v zemědělských odvětvích (insekticidy). Typickými terpenoidy jsou menthol, kafr, farnesol a artemisin (Burt, 2004; Cowan, 1999; Méndez - Vilas, 2013; Reyes-Jurado *et al.*, 2014; Tiwari *et al.*, 2009).

1.5 Metody stanovení antimikrobiální účinnosti

Metody stanovení antimikrobiální účinnosti přírodních látek je stejně zásadní, jako stanovení citlivosti mikroorganismů k antibiotikům. Přírodní produkty, ať čisté nebo ve formě extraktů poskytují díky jejich chemické rozmanitosti prakticky neomezené možnosti pro tvorbu aditiv, nebo léků. Proto má antimikrobiální testování velký potenciál pro své jednoduché provedení, rychlost, reprodukovatelnost a levnost metody. Je několik metod pro detekci antimikrobiální aktivity. Nejčastějšími metodami jak testovat antimikrobiální aktivitu je disková difúzní metoda, diluční metoda a E-test (Klančnik *et al.*, 2010; Othman *et al.*, 2011).

1.5.1 Disková difúzní metoda

Již v roce 1889 Beijerinck použil agarovou difúzi ke studiu vlivu auxinů (rostlinných hormonů) na růst bakterií. Dalším významným popisem zjednodušené difúzní metody zaznamenal Fleming (1927), který si povšimnul inhibičního účinku penicilinu na pevných médiích. Postupně byla difúzní metoda rozvíjena až do roku 1940, kdy Heatley představil použití filtračního savého papíru pro nasycení antimikrobiálním činidlem. Velikost používaného disku byla postupně zdokonalována ostatními vědci, až do dnešní podoby 6 - 6,5 cm velkých papírových disků. V roce 1966 byla disková difúzní metoda standardizována Bauerem a Kirbym, podle kterých byla později i pojmenována. Od roku 1975 se stala základní metodou uznávanou Národním výborem pro klinické laboratorní standardy (NCCLS). V rámci Evropy je používáno nejméně 6 různých systémů pro testování antimikrobiální účinnosti (Wheat, 2001).

Podstata této kvalitativní metody je měření zóny inhibice v milimetrech okolo disku. Průměr zóny okolo každého disku s antimikrobiálním činidlem se vztahuje k citlivosti testovaného mikroorganismu na danou látku a rychlosti difúze činidla agarovým médiem. Výsledky tohoto testu poskytují informace o tom, zda testovaný bakteriální kmen je citlivý, intermediální nebo rezistentní k testovanému antimikrobiálnímu činidlu. Výhodou této metody je jednoduchost provedení testu, bez potřeby speciálního vybavení, snadná interpretace a finanční nenáročnost (Chauhan, 2016; Jorgensen *et al.*, 2009).

Test se provádí na kultivačním médiu, obvykle se používá Mueller-Hintonové (M-H) agar. Pro provedení testu je nejprve připravena bakteriální suspenze testovaného kmene. Densita bakteriální suspenze je přibližně $1 - 2 \times 10^8$ CFU/ml,

což odpovídá 0,5 - 1 McFarlandovy zákalové stupnice. Suspenze je pomocí tamponu nebo L-hokejky rozetřena na celou plochu M-H agaru. Po inokulaci kultivačního média se pomocí dávkovače disků aplikují disky. Je důležité, aby byly disky aplikovány těsně na kultivační medium, aby došlo k dostatečnému nasáknutí disku. Takto připravené Petriho misky jsou kultivovány v termostatu příslušného teplotního optima, obvykle 37 - 38 °C, 24 - 48 hodin. Po kultivaci se měří kolem každého disku zóna inhibice pomocí milimetrového pravítka nebo pomocí automatických analyzátorů autibiogramů. Zóna inhibice je zóna bez nárůstu testovaného mikroorganismu vznikající kolem disku po kultivaci v termostatu (Jorgensen *et al.*, 2009; Sandler, 2016).

V případě antibiotických disků obsahují standardizované množství daného antibiotika. Disk je vždy označen zkratkou daného antibiotika a číslem označující koncentraci antibiotika nasyceného v disku. Pokud se použijí blankové disky, tedy bez nasycení antibiotikem, lze je použít např. pro testování přírodních antimikrobiálně působících látek. U toho způsobu se na blankový disk dávkuje příslušné množství testovaného extraktu. Extrakt je nejčastěji zhotoven rozpuštěním v ethanolu, methanolu, Tweenu-20, Tweenu-80, dimethylsulfoxidu (DMSO) nebo polyethylenglykolu (Barros-Velázquez, 2016; Cammack, 2006).

1.5.2 Diluční metoda

Diluční metoda je kvantitativní metoda, kterou lze stanovit minimální inhibiční nebo baktericidní koncentraci. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je nejnižší koncentrace inhibující růst testovaného organismu. Minimální baktericidní koncentrace (MBC) je nejnižší koncentrace usmrcující 99,9 % testovaných organismů. Obecně platí, že hodnota MBC je nižší nebo stejná ve srovnání s MIC (Barros-Velázquez, 2016; Jorgensen *et al.*, 2009).

MIC lze stanovit nejčastěji pomocí ředící řady za použití mikrotitrační destičky, která má standardně 96 jamek. Pro stanovení MIC je nejprve připraveno ředící řada antimikrobiální látky, které je vždy stejný objem, liší se pouze v koncentraci. Nejčastěji se používá dvojkové ředění antimikrobiální látky tedy např. 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 a 0,5 mg/ml. Koncentrace testované látky se volí individuálně pro každou antimikrobiální látku tak, aby byla co nejspecifičtější pro danou antimikrobiální látku a byl pokryt celý rozsah koncentrací pro stanovení MIC. Poté je připravena bakteriální suspenze testovaného kmene o denzitě 1 - 5 x 10⁵ CFU/ml. Objem bakteriální suspenze je ve všech jamkách stejný a obvykle se pohybuje 0,01 - 0,05 ml/jamku. Stanovení MIC se v destičce pro jeden testovaný bakteriální kmen připravuje v dubletu

nebo tripletu a je vždy zahrnuta pozitivní a negativní kontrola (Jorgensen *et al.*, 2009; Sandler, 2016).

Takto připravená destička je kultivována v termostatu při optimální teplotě, obvykle 37 °C, 24 - 48 hodin. Po inkubaci se zákal odečítá buď vizuálně, nebo pomocí automatické čtečky. První jamku bez viditelného nárůstu testovaného bakteriálního kmene, lze označit jako MIC. Výsledky jsou zatíženy chybou pouze +/- jedno dvojkové ředění (Jorgensen *et al.*, 2009; Sandler, 2016).

Stanovení MIC lze provést i ve zkumavkách, kdy je postup stejný jako u provedení v destičce, ale je nutné použít větších objemů. Tato metoda byla používána dříve, před miniaturizací diluční metody. Hlavní výhodou byla možnost kvantitativního výsledku, avšak tento postup byl zdlouhavý, byla zde možnost chyb při přípravě ředění antimikrobiální látky (Jorgensen *et al.*, 2009).

1.5.3 E-test

E-test je kvantitativní komerčně dodávaný test pro stanovení antimikrobiální účinnosti. Jedná se zpravidla o impregnovaný proužek obsahující gradient koncentrací antimikrobiální látky. Proužek je umístěn na povrch naočkované kultury testovaného kmene a po 24 - 48 hodinové kultivaci v termostatu za optimální teploty odečítáme výsledek testu. MIC v tomto případě je určena průsečíkem ve spodní části elipsovité zóny inhibice s testovacím proužkem (viz obrázek 6).

Nevýhodou této metody může být interpretace koncového bodu, které může být neostré a hodnota MIC nemusí být odečtena správně. Tuto metodu je vhodné použít v případě, že je potřeba zjistit MIC pouze u kultivačně náročného kmene, který vyžaduje speciální kultivační medium a podmínky kultivace. V ostatních případech platí, že hodnoty E-testu dobře korigují s hodnotami MIC provedených v mikrotitrační destičce (Jorgensen *et al.*, 2009).



Obrázek 6 Vyšetření antimikrobiální účinnosti pomocí E-testu na M-H agaru (převzato a upraveno dle Jorgensen *et al.*, 2009).

1.6 Charakteristika vybranných přírodních látek

1.6.1 Anýz (*Pimpinella anisum*)

Pimpinella (P.) anisum je jednou z nejstarších koření patřící do čeledi *Apiaceae*. Jedná se trvalou léčivou rostlinu asi 30 - 50 cm vysokou, kvetoucí bíle s malými, zelenožlutými semeny. Anýz vyžaduje pro své pěstování teplé a suché prostředí, proto dobře roste ve východním Středomoří, západní Asii, Středním východě, Mexiku, Egyptě a ve Španělsku. *P. anisum* se pěstuje hlavně pro svá semena (viz obrázek 7), která se sklízí od srpna do září (Ullah *et al.*, 2013).



Obrázek 7 Semena anýzu (převzato a upraveno dle <http://www.davidkovokoreni.cz>).

Anýz obsahuje 1,5 - 6 % těkavých olejů, což mu dává jeho typické aroma. Hlavní složkou tohoto koření je *trans*-anethol, dále obsahuje lipidy s vysokým obsahem mastných kyselin (např. kyseliny palmitové a olejové), sacharidy (kolem 4 %) a proteiny (asi

18 %). Kromě *trans*-anetholu byla prokázána přítomnost eugenolu, methylchavikolu, anisaldehydu, estragolu, polyeny, polyacetyleny a další látky. Na základě plynové chromatografie

se ukázalo, že obsah estragolu v anýzu je asi 2,4 % a *trans*-anetholu dokonce 76,9 - 93,9 %. Obsah esenciálních olejů v anýzu se může lišit v závislosti na podmínkách prostředí a genetického potenciálu rostliny (Kozłowska *et al.*, 2016; Shojaii *et al.*, 2012; Ullah *et al.*, 2013).

V medicíně se anýz nebo jeho esenciální olej je využíván proti nadýmání, na podporu vykašlávání, jako diuretikum, antiseptikum, antispasmodikum gastrointestinálního traktu a může pomoci i proti migréně. Lze použít u kojících žen pro podporu produkce mléka v období laktace a novorozencům zároveň může pomoci jako prevence zažívacích obtíží. Dále se anýz vyznačuje významnými antibakteriálními, antimykotickými, insekticidními a antioxidačními účinky. V potravinářství se anýz používá pro zlepšení aroma a chuti potraviny, rybích výrobků, zmrzliny, cukrovinek a žvýkaček. Své místo nachází i ve farmacii a kosmetickém průmyslu pro výrobu mastí, zubních past, kloktadel a nebo ústních vod (Shojaii *et al.*, 2012; Ullah *et al.*, 2013).

1.6.2 Badyán (*Illicium verum*)

Badyán je plod badyáníku pravého (*Illicium verum*) typického hvězdicovitého tvaru a charakteristické vůně připomínající anýz. Badyáník je stálezelený strom s kopinatými listy s typicky vonící rostoucí v zelených lesích jižní Číny a horských oblastech Indočíny. Hvězdičky badyánu se obvykle skládají z 8 - 13 cípů spojených centrálně a obsahující lesklé hnědé semeno (viz obrázek 8). Původem toto koření pochází z jižní Číny a severního Vietnamu a pěstuje se téměř výhradně v jižní Číně, Vietnamu a Japonsku (Parthasarathy *et al.*, 2008; Peter, 2004).

Hlavní účinnou složkou badyánu je anethol, dále je bohatým zdrojem ligninů a seskviterpenů. Badyán je dále zdrojem kyseliny šikimové, která je primárně používána pro výrobu protivirového léku (Wang *et al.*, 2011).



Obrázek 8 Semena badyánu
(převzato a upraveno dle <http://www.wday.ru>).

Badyán je nejčastěji využíván v čínské kuchyni jako součást kořenících směsí na maso nebo zeleniny a do polévek. V Evropě se častěji používá k aromatizaci lékořice a jiných cukrovinek, bonbónů, žvýkaček, v pekařství, dezertů nebo sušenek. Ve Francii se používá jako přísada pro výrobu alkoholických nápojů. Esenciální olej z badyánu se uplatňuje k výrobě parfémů a ve farmacii. Badyán má také významné zdravotní a léčebné účinky, jako např. má antibakteriální, antiparazitární a antivirové účinky, působí proti nadýmání, jako antidiuretikum, při bolesti břicha, včetně kolikovitých bolestí, poruchách zažívání. Dále se extrakty z badyánu používají pro přípravu léků proti kašli (Peter, 2004; Wang *et al.*, 2011).

1.6.3 Hřebíček (*Eugenia aromaticum*)

Hřebíček (viz obrázek 10) jsou sušená poupata a kalich hřebíčkovce vonného (*Syzygium aromaticum*) patřící do čeledi Myrtovité (*Myrtaceae*). Hřebíčkovec vonný je stálezelený tropický strom dorůstající až do 15 metrů, má podlouhlé, lesklé, zelené listy vejčitého tvaru. Na koncích větví se v období květu nachází tmavě růžové pupeny, které později vykvetou v bílé, voňavé květy. Sklizeň hřebíčku je v období, kdy pupeny dosáhnou plné velikosti. Hřebíček se původně pěstoval hlavně v jihovýchodní Asii, nyní se pěstuje po celém světě, zejména v Indonésii, Zanzibaru, Madagaskaru, Filipínách, Indii, dále na Srí Lance, Tanzanii nebo Brazílii (Charles, 2013).



Obrázek 9 Hřebíček
(převzato a upraveno dle <https://www.webareal.cz>).

Hřebíček má antimikrobiální účinky, lze ho použít jako prevence vzniku zubního kazu a parodontitidy, lze využít při astmatu a alergických reakcích. Hlavní účinné složky hřebíčku jsou eugenol (24,371 mg/g) a eugenylacetát (2,354 mg/g), které mají antioxidační účinky, aktivují žaludeční trávicí enzymy a *in vivo* zabraňují oxidačnímu stresu. Zejména oxidační stres je často spojován s mnoha nemocemi, včetně aterosklerosy, rakoviny, diabetu a imunodeficiencí. Dále hřebíček obsahuje flavonoidy, kyselinu gallovou a fenol (Lee *et al.*, 2001).

1.6.4 Jalovec (*Juniperus communis* L.)

Jalovec (*Juniperus communis* L.) je stálezelený keř dosahující výšky až 5 metrů listy zakončenými ostrými trny. Původem se jalovec pěstuje na severní polokouli, ale roste i v suchých oblastech v Evropě, Asii, Africe a Severní Americe. Bobule jalovce jsou kulaté, modro-fialové barvy. Hlavní složkou esenciálního oleje z bobulí jalovce jsou alfa-pinen (35 %), myrcen (30 %), dále beta-pinen, sabinen, limonen, p-cymen a některé seskviterpeny (Charles, 2013).

Bobule jalovce jsou používány hlavně jako koření k přípravě pokrmů, marinád, masa, paštik, zelí, zvěřiny a polévek. Extrakty a oleje jsou používány v alkoholických a nealkoholických nápojích, do pečiva a do výrobků z masa. V lékařství lze extrakty z bobulí nebo listů jalovce využít pro své antioxidační, antimikrobiální, antiparazitární, antimykotické účinky, dále jako antiseptikum a diuretikum (Ennajjar *et al.*, 2009; Charles, 2013).



Obrázek 10 Plody jalovce
(převzato a upraveno dle <http://www.koreni.cz>).

1.6.5 Muškátový ořech (*Myristica fragrans*)

Muškatový ořech je semeno muškátovníku vonného (*Myristica fragrans*) patřící do čeledi Muškátovníkovité (*Myristicaceae*). Muškátovník je stálezelený strom dorůstající asi 15 metrů s tmavězelenými listy, který kvete žlutě zbarvenými květy. Všechny části muškátovníku jsou velmi aromatické. Velké, těžké semeno je muškátový oříšek, který má vrásčité povrch, je oválného tvaru (viz obrázek 11). Muškátový oříšek je původem z ostrovů banda v Indonésii, ale dnes je pěstován v jižní Indii, na Srí Lance, v Sumatře nebo Malajsii (Charles, 2013).



Obrázek 11 Muškátový ořech
(převzato a upraveno dle <http://www.koreni.cz>).

Muškatový oříšek obsahuje 11 % těkavých esenciálních olejů, kde hlavní složkami silice jsou alfa-pinen, beta-pinen, sabinen a myristicin. Dále je zdrojem mastných kyselin a dalších fytochemikálií, jako jsou fenolové sloučeniny, steroly a skvalen. Muškátový oříšek má intenzivní sladké, kořeněné aroma, a proto se používá hlavně v potravinářství jako koření do koláčů, pudinků, sušenek, cukroví, k ochucení polévek, masných pokrmů nebo zeleniny. Dále lze využít muškátový oříšek využít pro své léčebné účinky. Často se používá k léčbě gastrointestinálních potíží, ke snížení horečky, zlepšení astmatu nebo onemocnění dýchacích cest. Dále má toto koření výrazné antimikrobiální, protizánětlivé, protinádorové, antioxidační účinky, může být použit při úlevě od bolesti způsobené artritidou, nebo revmatismem. Při používání muškátového oříšku se však musí dbát na použitou dávku, protože při předávkování může působit halucinogenně (Charles, 2013; Kozłowska *et al.*, 2016).

1.6.6 Skořice cejlonská (*Cinammonum zeylonicum*)

Skořicovník cejlonský (*Cinammonum zeylonicum*) je tropický stále zelený, středně velký strom s velmi aromatickou kůrou a listy. Skořicovník přirozeně roste na Srí Lance a v některých částech Indie. Pro komerční účely se dále pěstuje v Africe, Jižní Americe, Západní Indii, Indonésii a na Seychelích. Ze skořicovníku se získává především skořicová kůra, která je srolována do typického cívkového tvaru (viz obrázek 12). Hlavní složkou skořice je aldehyd kyseliny skořicové, který dává skořici její charakteristickou vůni a chuť. Esenciální olej získaný ze skořicové kůry obsahuje z 90 % kyselinu skořicovou. Skořicová kůra dále obsahuje prokyanidy, diterpeny, polysacharidy, eugenol (70 - 90 %), flavonoidy, terpenoidy, kumariky a další látky (Barros-Velázquez, 2016; Charles, 2013).



Obrázek 12 Kůra skořicovníku cejlonského
(převzato a upraveno dle <http://www.mydlovysvet.cz>).

V lidovém léčitelství se používala skořice k léčbě nachlazení, nevolností, při zánětech, revmatismu, zvracení a menstruačních bolestech. Dále má skořice protizánětlivé, antimikrobiální, antioxidační, imunomodulační účinky, vliv na kardiovaskulární systém, snižuje hladinu cholesterolu. Některé studie ukázaly, že skořice reguluje hladinu glukózy v krvi a působí jako prevence některých národových onemocnění. Dále ve spojení s konzumací skořice bylo prokázáno zmírnění příznaků Alzheimerovy choroby (Charles, 2013).

Skořici lze využít pro její charakteristické aroma pro výrobu různých potravin, cukrovinek, žvýkaček, extrakt ze skořice se používá k výrobě parfémů a léčivých přípravků (Rao *et al.*, 2014).

1.6.7 Smrk ztepilý (*Picea abies*)

Smrk ztepilý (*Picea abies*) je jehličnatý strom dorůstající výšky až 60 m s šířkou kmene do 150 cm. Koruna smrku je pravidelného kónického tvaru s krátkými, silnými větvemi. Smrkové jehličí (viz obrázek 13) je asi 1,5 cm dlouhé, v příčném řezu čtvercového tvaru, světle až tmavě zelené barvy s tupými konci. Tento jehličnan původně rostl v horských lesích, intenzivních údolích, v rašeliništích a lokalitách s kyselou půdou a vysokou půdní vlhkostí. Dnes smrk roste po celé severní polokouli, především ve vysokých polohách Evropy, lze ho však nalézt i v některých částech Asie (Durrant *et al.*, 2016; Krása, 2007).



Obrázek 13 Větev smrku ztepilého
(převzato a upraveno dle <http://www.dumabyt.cz>).

Smrk patří mezi světlé, měkké dřevo, které lze využít k dalšímu zpracování v různých hospodářských odvětvích. Při opracování dřeva se odstraňuje kůra, kterou lze využít jako mulčovací kůru v zahradnictví, nebo na výrobu briket a pelet. Smrková kůra je bohatá na bioaktivní látky, jako jsou např. polyfenoly. Tyto chemické látky by mohly mít potenciální využití ve farmaceutickém průmyslu (Miranda *et al.*, 2012).

1.6.8 Šípek (*Rosa canina*)

Rod *Rosa* zahrnuje více než 100 různých druhů, které jsou pěstovány v Evropě, Asii, na Středním východě nebo Severní Americe. *Rosa canina* (růže šípková) je popínavý keř dosahující výšky až 3,5 metrů, který kvete bílými až světle růžovými květy. Po odkvetení vyrostou červeno-oranžové oválné plody (viz obrázek 14), které lze využít v potravinářství na výrobu džusů, vína, čajů, želé nebo džemů. Šípek obsahuje několik bioaktivních sloučenin, jako jsou cukry, organické kyseliny, pektiny, flavonoidy, třísloviny, karotenoidy, mastné kyseliny, vitaminy (vitamin C, B1, B2, K, PP a E) a další makro a mikro prvky.

Zejména obsah vitamínu C je v šípkových plodech mnohem větší (30-1300 mg/100g), než např. v citrusových plodech. Semena šípku jsou bohatá na mastné kyseliny, především obsahují kyselinu linolovou, olejovou, palmitovou, stearovou a arachidonovou (Roman *et al.*, 2013; Turkben *et al.*, 2010).



Obrázek 14 Plody šípku
(převzato a upraveno dle <http://www.womanandstyle.cz>).

Vzhledem k vysokému obsahu biologicky aktivních látek jsou šípkové plody využívány k léčení nebo prevenci některých chorob. Extrakty nebo produkty obsahující šípek pomáhají posilovat obranyschopnost proti nachlazení, chřipce a onemocněním dýchacího systému. Šípek lze využít také při zánětlivých chorobách, při léčbě osteoartritidy, jako diuretikum, při zánětech žaludku nebo jiných gastrointestinálních potížích. Dále má šípek antioxidační, antimutagenní a antikarcinogenní účinky. Nedávné studie ukazují, že extrakty z šípku by mohly účinně inhibovat tvorbu biofilnu tvořeného meticilin-rezistentním *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Roman *et al.*, 2013; Turkben *et al.*, 2010).

1.6.9 Ostatní přírodní látky s antimikrobiálním potenciálem

Borovice lesní (Pinus sylvestris)

Borovice lesní je jeden z nejrozšířenějších jehličnatých stromů na světě. Borovice se nacházejí prakticky v jakékoli zeměpisné šířce i nadmořské výšce. Jedná se o středně velký strom, který dosahuje v průměru výšky 23 - 27 m. Kůra borovice je většinou v horní části červeno - oranžové barvy, zatímco na spodní části zvrásněná a popraskaná. Jehličí na zimní období neopadává, je modrozelené nebo šedo-zelené barvy. Jehlice jsou většinou v párech a jsou 5 - 7 cm dlouhé a díky silné voskové vrstvě jsou odolné chladnému, ale i suchému počasí (Durrant *et al.*, 2016).

Borovice je hospodářská dřevina, která díky vysokému obsahu pryskyřice je borovicové dřevo odolné hlavně k vodě a vlhku, proto se využívá hlavně pro výrobu vodních staveb. Dále lze využít borovicové dřevo na stavbu konstrukcí, k výrobě řeziva a je také dobré palivo. Své využití borovice nachází i v obuvnictví, výroba ševcovské smůly, tiskařství nebo textilním průmyslu na výrobu koberec nebo pokrývek. Silice získané z jehličí a pupenů borovic mají antiseptické účinky nebo lze je také použít při onemocnění dýchacího ústrojí, revmatických chorobách, jako sedativa nebo k aromaterapii (Leugnerová, 2007).

Celer bulvový (Apium graveolens L. var. rapaceum)

Celer neboli také miřík je dvouletá rostlina, patřící do čeledi Miříkovité (*Apiaceae*). Skládá se z nadzemní části a bulvy, která je typická svým aroma. Charakteristické aroma je způsobeno obsahem selanolidu. Celer byl pěstovaný od začátku 19. století, kdy se pěstoval hlavně pro svou nadzemní část. Postupem času se začala používat i bulva, která vlivem šlechtění dostala dnešní podobu, barvu i konzistenci (Pekárková, 2005).

Tato kořenová zelenina lze využít v kuchyni na výrobu pomazánek, salátů nebo do polévek jak v syrovém tak vařené podobě. Jako ostatní kořenová zelenina je celer bohatý na vitaminy a minerály. Jedinou nevýhodou může být obsah zdravotně škodlivých dusičnanů, které mohou být obsaženy v půdě. Avšak při správném zpracování půdy tento problém může být vyřešen (Rožek, 2013).

Červená řepa (Beta vulgaris var. rubra)

Červená řepa (*Beta vulgaris rubra*) je kořenová zelenina, která patří do čeledi Laskavcovité (*Amaranthaceae*). Pěstuje se po celém světě hlavně pro svou bulvu, která obsahuje mnoho fytochemických látek, jako např. kyselinu listovou, kyselinu askorbovou (vitamin C), karotenoidy, flavonoidy a kyseliny obsahující fenol. Červená řepa je navíc jedná z mála zelenin obsahující velmi biologicky aktivních pigmentů zvaných betainy. Betainy jsou ve vodě rozpustné dusíkaté sloučeniny, které dávají řepě červenofialové zabarvení a proto jsou používány v potravinářství jako přírodní barviva (E162) (Clifford *et al.*, 2015).

Tyto pigmenty mají vysokou antioxidační a protizánětlivou aktivitu, čímž mohou působit jako prevence oxidativního stresu a chronických zánětů, jako je onemocnění jater, kloubů nebo rakoviny. Nedávné studie ukazují, že červená řepa má prospěšný vliv na kardiovaskulární systém, může regulovat vysoký krevní tlak a působit jako prevence

aterosklerózy, dále působí protizánětlivě, může zlepšovat příznaky spojené s diabetem 2. typu a demencí (Clifford *et al.*, 2015; Čanadanović-Brunet *et al.*, 2011; Featherstone, 2016).

Hlávkové zelí - červené (Brassica oleracea var. rubra)

Hlávkové zelí je zelenina patřící společně s kapustou a brokolicí do čeledi Brukvovité (*Brassicaceae*). Konzumace zelí je spojováno s velmi prospěšným vlivem na zdraví, a to především na imunitní, gastrointestinální a kardiovaskulární systémy, působí jako prevence rakoviny. Dále červené zelí obsahuje antioxidant anthokyan, který dává rostlině červené až fialové zbarvení. Bylo prokázáno, že anthokyan obsažený v červeném zelí zpomaluje proliferaci nádorových buněk, dokáže usmrtit již vytvořené rakovinné buňky a zabraňuje tvorbě nových nádorových populací. Dále anthokyan potlačují zánět, který může vést ke kardiovaskulárním chorobám (Ware, 2016).

Fermentované zelí je zdroj probiotik, které mají dobrý vliv na trávení a imunitní systém. Bakterie způsobující kvašení zelí vytvářejí kyselé prostředí, napomáhají rozvíjet chuť a enzymy produkované v procesu kvašení uvolňují vitaminy a minerály obsažené v zelí. Navíc vláknina a voda obsažená v zelí napomáhá k prevenci zácpy a udržuje zdravý trávicí trakt (Ware, 2016).

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce na téma "*Extrakty z přírodních matric jako možné antimikrobiální substance*" bylo:

- v úvodu práce shrnout základní informace o rodu *Arcobacter* a *Cronobacter*, věnovat se problematice přírodních látek, jejich potenciálním antimikrobiálním účinkům a možnostem testování
- v experimentální části provést extrakci látek z přírodních matric, připravit různé extrakty i s využitím různých rozpouštědel pro následné testování vybraných zástupců arkobakterů a kronobakterů, případně dalších bakterií
- závěrem zhodnotit antimikrobiální potenciál testovaných látek.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Chemikálie

Ethanol 96%	(Lach-ner, ČR)
Dimethylsulfoxid 98%	(Penta, ČR)
Isopropanol 99,96%	(Lach-ner, ČR)
Methanol 99,96%	(Lach-ner, ČR)

3.1.2 Pomůcky a potřeby

Běžné plastové, skleněné, pryžové a kovové pomůcky	
Filtrační papír	
Dávkovač disků (6 místný)	(Oxoid, UK)
Kahan	
Mikropipety automatické	(Discovery, Německo)
Mikropipety automatické	(Eppendorf, Německo)
Mikrotitrační destičky	(SPL Live Sciences, Korea)
Mikrozkmavky	(BioTech, ČR)
Sterilní disky (Ø 6 mm)	(Oxoid, UK)
Sterilní zkumavky	(Meus, Itálie)

3.1.3 Přístroje

Analytické váhy KERN 440-43	(Kern, Německo)
Analytické váhy	(BOECO, Německo)
Autokláv PS 20A	(BMT, ČR)
Autokláv Sterilab	(BMT, ČR)
BACMED 6iG2	(Aspiag, ČR)
Biologický termostat BT120M	(Laboratorní přístroje Praha, ČR)
Horkovzdušný sterilizátor STERIMAT 5104.2	(BMT, ČR)
Chladnička RK 6201BW	(Gorenje, Slovinsko)
Chladnička ZRA 40100 WA	(Zanussi, ČR)

McFarland denzitometr	(Biosan, USA)
Votrex	(Heidolph, Německo)
Vortex IKA MS 3 digital	(IKA, Německo)

3.1.4 Roztoky a činidla

Fyziologický roztok

Složení:	chlorid sodný	8,5 g
----------	---------------	-------

Navážka 8,5 g chloridu sodného byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody a roztok byl autoklávován při 121 °C po dobu 15 minut.

20% DMSO

(Penta, ČR)

Složení:	DMSO 98%	8,0 ml
----------	----------	--------

8,0 ml DMSO (98%) bylo smícháno s 32,0 ml sterilní destilované vody.

1M Tris /HCl

Složení:	H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃	121,1 g
	kyselina chlorovodíková 36%	42 ml
	hydroxid sodný 5 mol/l	

Navážka 121,1 g H₂NC(CH₂OH)₃ byla rozpuštěna v 958 ml destilované vody a následně bylo přidáno 42 ml kyseliny chlorovodíkové (36%). Po úpravě pH hydroxidem sodným na hodnotu 8,0 byl roztok autoklávován při 121 °C po dobu 15 minut.

Sterilní destilovaná voda

Složení:	destilovaná voda	450 ml
----------	------------------	--------

Destilovaná voda byla autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut.

3.1.5 Pevná a tekutá kultivační média

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

pH (25 °C) = 7,3 ± 2

Navážka 40,0 g byla rozpuštěna ve 1000 ml destilované vody a vzniklý roztok byl autoklávován při 121 °C po dobu 15 minut.

Mueller - Hinton agar (HiMedia, Indie)

Složení:	hovězí masová infuze	2 g/l (z 300 g/l)
	kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5 g/l
	škrob	1,5 g/l
	agar	17 g/l

pH (25 °C) = 7,3 ± 0,1

Navážka 21 g byla rozpuštěna ve 1000 ml destilované vody a vzniklý roztok byl autoklávován při 121 °C po dobu 15 minut.

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

Složení:	telecí mozková infuze	12,5 g/l (z 200 g/l)
	hovězí srdcová infuze	5 g/l (z 250 g/l)
	proteosový pepton	10 g/l
	chlorid sodný	5 g/l
	hydrogenfosforečnan disodný	2,5 g/l
	dextrosa	2 g/l

pH (25 °C) = 7,4 ± 0,2

Navážka 37 g práškové směsi bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a vzniklý roztok byl autoklávován při 121 °C po dobu 15 minut.

Mueller - Hinton bujón (Mueller - Hinton Broth) (HiMedia, Indie)

Složení:	hovězí masová infuze	2 g/l (z 300 g/l)
	enzymatický hydrolyzát kaseinu	17,5 g/l
	škrob	1,5 g/l

pH (25 °C) = 7,4 ± 0,2

Navážka 21 g práškové směsi byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody a vzniklý roztok byl autoklávován při 121 °C po dobu 15 minut.

3.2 Bakteriální kmeny

Ke zjištění citlivosti testovaných mikroorganismů k přírodním látkám byly použity referenční kmeny rodu *Arcobacter* a rodu *Cronobacter*. Používané bakteriální kmeny pocházely ze Švédské sbírky mikroorganismů Univerzity Göteborg (CCUG), Belgické sbírky mikroorganismů Univerzity Ghent (LMG), České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně (CCM) a Americké sbírky mikroorganismů (ATCC). Dále byl použit kmen *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 pocházející z interní sbírky mikroorganismů Univerzity Pardubice (UPa). Jako srovnávací kmeny byly použity *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953. Přehled bakteriálních kmenů použitých pro testování antimikrobiální účinnosti přírodních látek zaznamenává tabulka 1.

Tabulka 1 Přehled bakteriálních kmenů použitých pro testování antimikrobiální účinnosti přírodních látek

Mikroorganismus	Kmen
<i>Arcobacter butzleri</i>	CCUG 30484
<i>Arcobacter butzleri</i>	LMG 10828
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	UPa 2013/13
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	CCM 7050
<i>Cronobacter sakazakii</i>	CCM 3461
<i>Cronobacter muytjensii</i>	ATCC 51329
<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 3953

Bakteriální kmeny rodu *Arcobacter* byly po vyočkování na TSA agar vždy alespoň 2x pasážovány a kultivovány při 30 °C, po dobu 24 - 48 hodin. Pasažované kultury byly uchovávány při chladničkové teplotě (4 °C). Takto připravené kultury byly vhodné k dalšímu použití a testování. Pro dlouhodobé uchování byly bakteriální kmeny rodu *Arcobacter* uchovávány v BHI bujónu při 30 °C.

Bakteriální kmeny rodu *Cronobacter*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* byly uchovávány v BHI bujónu při 30 °C a po vyočkování na TSA agar byly vždy alespoň 2x pasážovány. Pasažované kultury byly kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Takto připravené kultury byly pak vhodné pro další použití a testování.

3.3 Příprava extraktů z přírodních matric s antimikrobiálním potenciálem

Antimikrobiální aktivita přírodních matric v případě testovaných mikroorganismů byla ověřena u 13 přírodních látek. Z těchto přírodních látek byly připraveny extrakty, které byly následně testovány. Tabulka 2 shrnuje přehled přírodních matric k následné přípravě extraktů pro antimikrobiální testování.

Tabulka 2 Přehled přírodních matric použitých k přípravě extraktů a testování antimikrobiální účinnosti

Přírodní matrice	Botanický název	Použitá část	Výrobce / původ
Anýz	<i>Pimpinella anisum</i>	semeno	Vitana a.s., ČR
Badyán	<i>Illicium verum</i>	plod	Vitana a. s., ČR
Borovice lesní	<i>Pinus sylvestris</i>	jehlice	les, okres Kutná Hora, ČR
Celer bulvový	<i>Apium graveolens</i> L. var. <i>rapaceum</i>	nať	vlastní produkce, okres
		bulva	Kutná Hora, ČR
Červená řepa	<i>Beta vulgaris</i> var. <i>rubra</i>	bulva	Tesco
Hlávkové zelí červené	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>rubra</i>	bulva	Kaufland
Hřebíček	<i>Eugenia aromaticum</i>	pupen a kalich	Avokádo, ČR
Jalovec	<i>Juniperus communis</i> L.	bobule	Vitana a.s., ČR
Muškatový oříšek	<i>Myristica fragrans</i>	plod	Vitana a.s., ČR
Skořice cejlonská	<i>Cinammonum zeylonicum</i>	kůra	Vitana a. s., ČR
Smrk ztepilý	<i>Picea abies</i>	jehlice	les, okres Nymburk, ČR
Šípek	<i>Rosa canina</i>	plod	volná příroda, okres Nymburk, ČR

Přírodní matrice byly po sběru omyty pitnou vodou, osušeny, dle potřeby očištěny, pokrájeny na menší části, dle potřeby rozdrobeny a homogenizovány v třecí misce s tloučkem. Takto připravený materiál byl v odpovídajícím množství navážen na laboratorních vahách. Navážené vzorky byly extrahovány v dostatečném množství ethanolu (96%), popř. methanolu (99,96%) nebo isopropanolu (99,96%) v uzavřené nádobě v temnu po dobu 3-4 dní.

U všech extraktů byla následně provedena filtrace. Přefiltrované roztoky byly nality do Petriho misek (Ø 12 cm) a vloženy do termostatu vyhřátého na 37 °C. Po odpaření veškerého rozpouštědla byly extrakty rozpuštěny ve finálních rozpouštědlech, tedy 1M Tris/HCl, 20% DMSO nebo 96% ethanolu, a to tak, aby výsledná koncentrace vždy odpovídala koncentraci 100 mg/ml.

Takto připravené extrakty byly použity pro testování antimikrobiální účinnosti na vybrané bakteriální kmeny rodu *Arcobacter*, *Cronobacter*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*.

3.4 Testování antimikrobiální účinnosti připravených extraktů diskovou difúzní metodou

Jako kvalitativní metoda pro testování antimikrobiální účinnosti vybraných extraktů byla použita disková difúzní metoda. Pomocí této metody lze zjistit, zda má testovaná látka antimikrobiální účinek vůči zástupcům testovaných kmenů bakterií. Výsledkem této metody je odečtení inhibiční zóny, kterou lze změřit pomocí milimetrového pravítka nebo automatickým analyzátozem inhibičních zón.

3.4.1 Příprava bakteriální suspenze

Z čerstvě kultivované bakteriální kultury příslušného kmene byla připravena bakteriální suspenze. Suspenze pro diskovou difúzní metodu o denzitě 0,5 - 1 McFarlandovy zákalové stupnice (tedy 10^8 CFU/ml) byla připravena inokulací bakteriálního kmene do 2 ml fyziologického roztoku a takto připravená suspenze byla vortexována. Skutečná denzita bakteriální suspenze byla vždy ověřena kultivační metodou vyočkováním 100 µl buněčné denzity 10^3 CFU/ml na povrch TSA agaru a následným počítáním kolonií.

3.4.2 Postup provedení diskové difúzní metody

Bakteriální suspenze o denzitě 10^8 CFU/ml byla rozetřena na Mueller-Hinton agar. Poté byly na kultivační medium aplikovány blankové testovací disky (\varnothing 6 mm) pomocí dávkovače disků. Na každý disk bylo nadávkováno 8 μ l příslušného testovaného extraktu. Extrakty byly testovány vždy v dubletech. Takto připravené vzorky byly kultivovány v termostatu při 30, popř. 37 °C, po dobu 24 - 48 hodin. Po kultivaci byly odečteny průměry inhibičních zón všech testovaných extraktů extrahovaných 1M Tris/HCl, 20% DMSO a 96% ethanolu a hodnoty v milimetrech byly zaznamenány do tabulky (viz tabulka 4 - 29). Dále byla provedena i negativní kontrola - ověření případné antimikrobiální účinnosti samotných rozpouštědel, ve kterých byly extrakty rozpuštěny.

3.5 Testování minimální inhibiční koncentrace u vybraných extraktů diluční metodou

Přírodní extrakty, které vykazovaly nejvyšší antimikrobiální účinnost byly vybrány ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). MIC byly stanoveny u 8 extraktů, které byly extrahovány v 96% ethanolu a následně rozpuštěny ve 20% DMSO a 96% ethanolu. Všechna stanovení byla provedena v dubletu pro všechny do této studie zahrnuté kmeny rodu *Arcobacter*, tedy pro *A. butzleri* CCUG 30484, *A. butzleri* LMG 10828, *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 a *A. cryaerophilus* CCM 7050. Dále byly MIC stanoveny též u kmene *Cronobacter sakazakii* CCM 3461.

3.5.1 Příprava bakteriální suspenze

Z čerstvě kultivované bakteriální kultury příslušného kmene byla připravena bakteriální suspenze 10^8 CFU/ml. Tato denzita bakteriální suspenze byla následně desítkovým způsobem naředěna na suspenzi o buněčné denzitě 10^6 CFU/ml, která byla následně použita pro zaočkování testovaných koncentrací daných extraktů. Skutečná denzita bakteriální suspenze byla vždy ověřena kultivační metodou, a to vyočkováním 100 μ l buněčné denzity 10^3 CFU/ml na povrch TSA agaru a následným spočítáním kolonií.

3.5.2 Postup provedení diluční metody

Diluční metoda byla provedena v polystyrenové mikrotitrační destičce s rovným dnem s 96 jamkami tvaru P (SPL Live Sciences, Korea). Nejprve byla v destičce připravena dvojková ředící řada příslušného extraktu ředěného Mueller-Hintonové bujónem. Pro stanovení MIC testovaných extraktů v případě testování *A. butzleri* a *A. cryaerophilus* byly použity v rozsahu koncentrací 10 - $4,9 \times 10^{-3}$ mg/ml. V případě *C. sakazakii* CCM 3461 byly zvoleny koncentrace v rozsahu 10 - $4,9 \times 10^{-3}$ mg/ml, dále 100 - 3,125 mg/ml (pro extrakty rozpuštěné ve 20% DMSO) a 25 - $1,22 \times 10^{-2}$ mg/ml (pro extrakty rozpuštěné v 96% ethanolu). Do každé jamky byl pipetován objem 90 μ l extraktu příslušné koncentrace a dále bylo aplikováno 10 μ l bakteriální suspenze testovaného mikroorganismu o buněčné denzitě 10^6 CFU/ml. Dále byla provedena pozitivní kontrola – 90 μ l Mueller-Hinton bujónu inokulovaného 10 μ l bakteriální suspenze o buněčné denzitě 10^6 CFU/ml a negativní kontrola – 100 μ l Mueller-Hintonové bujónu. Takto připravená mikrotitrační destička byla kultivována v termostatu při 30 °C (popř. 37 °C) po dobu 24 hodin.

Po 24 hodinové kultivaci byly všechny testované pozice mikrotitrační destičky vyočkovány na TSA agar a kultivovány v termostatu při 30 °C, popř. 37 °C po dobu 24 hodin. Poté byla odečtena minimální inhibiční koncentrace, tedy nejnižší koncentrace extraktu, která inhibuje růst testovaného bakteriálního kmene za výše uvedených experimentálních podmínek.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení antimikrobiální účinnosti testovaných extraktů diskovou difúzní metodou

Stanovení antimikrobiální účinnosti diskovou difúzní metodou bylo provedeno u 13 extraktů, které byly připraveny extrakcí ve 3 různých extrakčních činidlech s následným odpařením a rozpuštěním ve třech podílech v 1M Tris/HCl, 20% DMSO nebo 96% ethanolu. Navážky, objem rozpouštědla a výtěžky extraktů použitých při zpracování přírodních matric pro testování antimikrobiální účinnosti shrnuje tabulka 3. Koncentrace výsledného extraktu byla vždy 100 mg/ml. Mikrobiální čistota extraktů byla vždy ověřena kultivační metodou.

Pro zjištění antimikrobiální účinnosti byly použity kmeny *A. butzleri* CCUG 30484, *A. butzleri* LMG 10828, *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 a *A. cryaerophilus* CCM 7050. Dále byly pro testování použity *C. sakazakii* CCM 3461, *C. mutyjensii* ATTC 51329 a jako srovnávací mikroorganismy *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953.

Tabulka 3 Přehled navážek a objemů rozpouštědla použitých k přípravě extraktů

Přírodní matrice	Navážka (g)	Objem rozpouštědla (ml)	Výtěžek extraktu (g)
Anýz	24,5	50	0,2658 ^c
Badyán	6,2	20	0,1964 ^c
Borovice lesní	30,0 ^a	100 ^a	0,3622 - 1,0720 ^{b,c,d}
Celer bulvový	30,0 ^a	80 ^a	0,8440 - 1,2296 ^{b,c,d}
Celerová nať	30,0 ^a	100 ^a	0,9122 - 1,6313 ^{b,c,d}
Červená řepa	30,0	60	0,4077 ^c
Červené hlávkové zelí	30,0	60	0,3580 ^c
Hřebíček	30,0 ^a	100 ^a	1,3989 - 2,0844 ^{b,c,d}
Jalovec	10	40	0,9000 ^c
Muškatový oříšek	8,6	20	0,1733 ^c
Skořice	12,5 - 19,1 ^a	30 - 50 ^a	0,1578 - 0,7055 ^{b,c,d}
Smrkové jehličí	30,0 ^a	100 ^a	0,4861 - 1,5074 ^{b,c,d}
Šípek	30,0 ^a	80 ^a	1,3906 - 1,6581 ^{b,c,d}

^a ... Extrakty extrahované v isopropanolu, ethanolu a methanolu; ^b ... extrakty extrahované v isopropanolu; ^c ... extrakty extrahované v ethanolu; ^d ... extrakty extrahované v methanolu.

4.1.1 Extrakt z anýzu

Antimikrobiální účinnost anýzového extraktu byla shrnuta v tabulce 4 -5. Jako nejvíce antimikrobiálně působící extrakt proti arkobakterům byl zjištěn extrakt rozpuštěný v ethanolu. Z testovaných arkobakterů byl nejvíce odolný *A. butzleri* CCUG 30484 (velikost zóny inhibice 8 mm). Méně odolné byly oba testované kmeny *A. cryaerophilus* s průměrem zóny inhibice 11 mm. Pro *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 byla zjištěna velikost zóny inhibice extraktu rozpuštěného v Tris/HCl a DMSO 8 mm. Pro ostatní akrobaktery byla antimikrobiální účinnost těchto extraktů méně významná (velikost zóny inhibice do 7 mm).

V případě kronobakterů nebyly zjištěny významné zóny inhibice, naměřené zóny v podstatě odpovídaly antimikrobiálním účinkům samotných rozpouštědel. Extrakty z anýzu rozpuštěné v Tris/HCl a DMSO neměly proti testovaným kronobakterům významnou antimikrobiální účinnost (velikost zóny inhibice do 7 mm).

Tabulka 4 Antimikrobiální účinnost extraktu z anýzu - *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> LMG 10828	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050
EtOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,0	8 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	8 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,0
	96% EtOH	8 ± 2,0	11 ± 1,0	10 ± 0,0	11 ± 0,5

konc. ... koncentrace; EtOH ... 96% ethanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 8 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Tabulka 5 Antimikrobiální účinnosti extraktu z anýzu - *C. sakazakii*, *C. mytjensii*, *E. coli*, *S. aureus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>C. sakazakii</i> CCM 3461	<i>C. mytjensii</i> ATCC 51329	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>S. aureus</i> CCM 3953
EtOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,0	7 ± 0,0	7 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	7 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	10 ± 0,0	10 ± 1,0	10 ± 0,0	9 ± 0,0

konc. ... koncentrace; etOH ... 96% ethanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: *C. sakazakii* CCM 3461... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 10 mm; *C. mytjensii* ATCC 51329... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 12 mm; *E. coli* CCM 3954 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 11 mm; *S. aureus* CCM 3953 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO, 96% ethanol ... 6 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Antimikrobiální účinnost anýzového extraktu byla dříve popsána v několika studiích (Ibrahim *et al.*, 2017; Prabuseenivasan *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007). V těchto studiích byly pomocí diskové difúzní metody testovány extrakty z anýzu proti některým grampozitivním a gramnegativním bakteriím. I přesto, že byla použita jiná metodika přípravy extraktů z anýzu, všechny studie poskytují velmi zajímavé výsledky. Kirsch *et al.* (2011) ve své studii zjistili, že po aplikaci esenciálního oleje z anýzu na kultury některých plísní (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium moniliforme*) byla ovlivněna produkce toxinu produkovaná danými plísněmi (aflatoxin, ochratoxin A, fumonisin).

Na testované arkobaktery v dostupné literatuře nebyla zaznamenána dřívější studie zabývající se testováním antimikrobiální účinnosti anýzového extraktu. Existují však studie testující antimikrobiální účinnost esenciálního oleje z anýzu proti *Campylobacter jejuni*, který je blízce příbuzný námi testovaným arkobakterům. Cwikla *et al.* (2010) testovali ve své studii antimikrobiální účinnost esenciálního oleje z anýzu rozpuštěného v ethanolu a DMSO. V této studii byla potvrzena antimikrobiální účinnost testovaného esenciálního oleje proti danému mikroorganismu v závislosti na dávce testovaného vzorku. Antimikrobiální účinnost esenciálního oleje z anýzu proti kamylobakterům byla popsána např. ve studii Friedman *et al.* (2002).

Al-Nabulsi *et al.* (2015) testovali antimikrobiální účinnost anýzového esenciálního oleje proti směsi kmenů *C. sakazakii*. V této studii byla potvrzena antimikrobiální účinnost esenciálního oleje z anýzových semen. Dále Gülcin *et al.* (2003) testovali antimikrobiální účinnost ethanolového extraktu z anýzu proti *Enterobacter aerogenes*, který je blízce příbuzný rodu *Cronobacter*. V případě testovaného enterobaktera byla zjištěna velikost zóny inhibice ethanolového extraktu 8 mm, což je méně než u námi testovaných kronobakterů, u kterých byla naměřena velikost zóny inhibice 10 mm.

4.1.2 Extrakt z badyánu

Nejúčinnějším extraktem z badyánu proti testovaným bakteriím byl extrakt rozpuštěný v ethanolu, u kterého se zóny inhibice pohybovaly v rozmezí 11 - 16 mm. Největší antimikrobiální účinnost badyánového extraktu byla prokázána proti *A. cryaerophilus* CCM 7050, u kterého byla naměřena velikost zóny inhibice 16 mm. Dále byly naměřeny inhibiční zóny 7 - 9 mm (extrakt rozpuštěný v DMSO). Nejmenší antimikrobiální účinnost badyánového extraktu byla zjištěna u extraktů rozpuštěných v Tris/HCl (velikost zóny inhibice 7 - 8 mm).

V případě kronobakterů byl z testovaných extraktů nejúčinnější také ethanolový extrakt. Pro *C. sakazakii* CCM 3461 byla naměřena zóna inhibice tohoto extraktu 11 mm. Pro *C. muytjenii* ATCC 51329 byla zjištěna velikost zóny inhibice daného extraktu 13 mm. Dále byla u testovaných kronobakterů zjištěna velikost zóny inhibice 7 - 8 mm (extrakty rozpuštěné v Tris/HCl a DMSO). Tabulka 6 - 7 zaznamenává antimikrobiální účinnost badyánového extraktu proti testovaným kmenům rodu *Arcobacter* a *Cronobacter*.

Tabulka 6 Antimikrobiální účinnosti badyánového extraktu - *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> LMG 10828	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050
EtOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,0	7 ± 0,0	7 ± 0,5	8 ± 0,0
	20% DMSO	8 ± 0,0	9 ± 0,0	8 ± 0,0	8 ± 0,0
	96% EtOH	13 ± 0,5	13 ± 0,5	13 ± 0,5	16 ± 2,5

konc. ... koncentrace; EtOH ... 96% ethanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 8 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Tabulka 7 Antimikrobiální účinnosti badyánového extraktu - *C. sakazakii*, *C. muytjensii*, *E. coli*, *S. aureus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>C. sakazakii</i> CCM 3461	<i>C. muytjensii</i> ATCC 51329	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>S. aureus</i> CCM 3953
EtOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,0	7 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	8 ± 0,0	7 ± 0,0	7 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	11 ± 1,0	13 ± 1,0	10 ± 0,0	8 ± 0,0

konc. ... koncentrace; etOH ... 96% ethanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: *C. sakazakii* CCM 3461... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 10 mm; *C. muytjensii* ATCC 51329... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 12 mm; *E. coli* CCM 3954 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 11 mm; *S. aureus* CCM 3953 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO, 96% ethanol ... 6 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Antimikrobiální účinnost badyánového extraktu na testované arkobaktery a kronobaktery nebyla v dostupné literatuře doposud testována. I přesto existují publikace popisující antimikrobiální účinnost esenciálního oleje z badyánu proti *Campylobacter jejuni* (Friedman *et al.*, 2002). Dále byla antimikrobiální účinnost esenciálního oleje nebo extraktu z badyánu popsána v několika dalších publikacích (Singh *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012).

V těchto studiích byl pomocí diskové difúzní metody testován acetonový extrakt a také esenciální olej z badyánu proti vybraným grampozitivním a gramnegativním bakteriím, popř. některým kvasinkám a plísním. I přesto, že byla použita jiná metodika přípravy extraktů z badyánu, obě studie potvrzují významnou antimikrobiální účinnost testované matrice. Ibrahim *et al.* (2017) ve své publikaci testovali antimikrobiální účinnost methanolového extraktu z badyánu, který byl v průběhu extrakce ozářen dvěma druhy radioaktivního záření. V této studii bylo zjištěno, že ani radioaktivní záření nemělo prakticky žádný vliv na antimikrobiálně působící látky obsažené v extraktu z badyánu.

4.1.3 Extrakt z hřebíčku

Hřebíčkový extrakt byl jeden z nejvíce antimikrobiálně účinných extraktů proti testovaným bakteriím. Antimikrobiální účinnost hřebíčkového extraktu proti testovaným arko bakterům a kronobakterům byla zaznamenána do tabulky 8 - 9. Nejvíce antimikrobiálně účinné extrakty na testované kmeny rodu *Arcobacter* byly extrakty methanolové, a to jak rozpuštěné v DMSO (velikost zóny inhibice 14 - 17 mm), tak extrakty rozpuštěné v ethanolu s velikostí zóny inhibice 14 - 16 mm. Nejnižší antimikrobiální účinnost proti arko bakterům byla zjištěna u extraktů rozpuštěných v Tris/HCl (velikost zóny inhibice 7 mm).

Dalším významně antimikrobiálně působícím extraktem z hřebíčku byly extrakty ethanolové. U těchto extraktů byla naměřena velikost zóny inhibice 14 - 18 mm (extrakty rozpuštěné v ethanolu a DMSO). U extraktů připravených rozpuštěním v Tris/HCl byly naměřeny zóny inhibice do 8 mm. Nejmenší antimikrobiální účinnost z použitých extrakčních rozpouštědel byla zjištěna u isopropanolových extraktů. Průměry zón inhibice se pohybovaly v rozmezí 7 - 13 mm.

Antimikrobiální účinnost hřebíčkového extraktu proti testovaným kronobakterům byla nižší než u arko bakterů. Největší zóny inhibice (16 - 17 mm) byly naměřeny u methanolových extraktů rozpuštěných v ethanolu. U ostatních extrakčních činidel (isopropanol, ethanol) byl zjištěn nejvyšší antimikrobiální účinek také u extraktů rozpuštěných v ethanolu (velikost zóny inhibice 12 - 14 mm). Nejnižší antimikrobiální aktivita proti kronobakterům byla zjištěna u extraktů rozpuštěných v Tris/HCl a DMSO (velikost zóny inhibice do 9 mm).

Tabulka 8 Antimikrobiální účinnosti **hřebíčkového** extraktu - *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> LMG10828	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050
IsopropOH	1M Tris/HCl	8 ± 0,5	8 ± 0,5	7 ± 0,8	8 ± 0,4
	20% DMSO	10 ± 0,9	10 ± 0,5	9 ± 1,2	9 ± 0,8
	96% EtOH	12 ± 0,9	13 ± 1,5	12 ± 2,1	13 ± 0,9
EtOH	1M TRIS/HCl	8 ± 0,8	6 ± 0,0	7 ± 0,8	7 ± 0,8
	20% DMSO	14 ± 1,6	15 ± 0,5	14 ± 0,5	15 ± 1,2
	96% EtOH	15 ± 1,2	18 ± 0,0	14 ± 0,8	15 ± 0,5
MetOH	1M TRIS/HCl	8 ± 0,5	13 ± 2,5	7 ± 0,8	8 ± 0,5
	20% DMSO	15 ± 0,5	17 ± 1,0	14 ± 1,6	17 ± 1,7
	96% EtOH	15 ± 0,5	16 ± 2,0	14 ± 1,6	15 ± 1,4

konc. ... koncentrace; IsopropOH ... 99,96% isopropanol; EtOH ... 96% ethanol; MetOH ... 99,96% methanol; ± směrodatná odchylka (n=3).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 8 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Tabulka 9 Antimikrobiální účinnosti **hřebíčkového** extraktu - *C. sakazakii*, *C. mytjensii*, *E. coli*, *S. aureus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>C. sakazakii</i> CCM 3461	<i>C. mytjensii</i> ATCC 51329	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>S. aureus</i> CCM 3953
IsopropOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,5	7 ± 0,5
	20% DMSO	7 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,5	7 ± 1,0
	96% EtOH	13 ± 2,0	12 ± 0,0	11 ± 2,0	11 ± 0,5
EtOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,5	6 ± 0,0	7 ± 0,5	6 ± 0,0
	20% DMSO	7 ± 0,5	9 ± 0,5	9 ± 0,5	8 ± 0,0
	96% EtOH	14 ± 2,0	14 ± 1,5	14 ± 0,0	12 ± 0,0
MetOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,0	7 ± 0,5	7 ± 0,5	7 ± 0,5
	20% DMSO	7 ± 0,0	7 ± 0,5	7 ± 0,5	9 ± 1,5
	96% EtOH	17 ± 0,5	16 ± 0,5	14 ± 0,0	13 ± 3,0

konc. ... koncentrace; IsopropOH ... 99,96% isopropanol; EtOH ... 96% ethanol; MetOH ... 99,96% methanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: *C. sakazakii* CCM 3461 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 10 mm; *C. mytjensii* ATCC 51329 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 12 mm; *E. coli* CCM 3954 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 11 mm; *S. aureus* CCM 3953 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO, 96% ethanol ... 6 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Podobné výsledky antimikrobiální účinnosti extraktu z hřebíčku byly již dříve publikovány Červenkou *et al.* (2006), který testoval kmen *A. butzleri* CCUG 30484.

U tohoto kmene byla zjištěna velikost zóny inhibice methanolového extraktu rozpuštěného v DMSO \pm 17 mm, což je obdobný výsledek jako byl zjištěn v této práci. Dále byla testována antimikrobiální účinnost esenciálního oleje z hřebíčku proti kmenu *A. butzleri* LMG 10828 (Irkin *et al.*, 2010). V této studii byly popsány také podobné výsledky jako u námi testovaných hřebíčkových extraktů i přes to, že antimikrobiální účinnost esenciálního oleje a extraktu nelze srovnávat.

Dále Sheeladevi a Ramanathan (2012) testovali antimikrobiální účinnost esenciálního oleje z hřebíčku mj. proti některým kmenům rodu *Campylobacter*. Při testování esenciálního oleje z hřebíčku u *Campylobacter* spp. byla naměřena velikost zóny inhibice 23,53 mm. Antimikrobiální účinnost esenciálního oleje z hřebíčku proti kampylobakterům byla také testována např. ve studii Feimanem *et al.* (2002).

Dále byl ethanolový extrakt z hřebíčku rozpuštěný v DMSO testován na antimikrobiální účinnost proti *Enterobacter aerogenes* (Nanasombat a Lohasupthawee, 2005). V této studii byl zjištěn průměr zóny inhibice 10 mm, tedy podobný průměr inhibiční zóny jako u námi testovaných kronobakterů.

Antimikrobiální účinnost extraktu z hřebíčku byla také testována i proti jiným gramnegativním a grampozitivním bakteriím, popř. proti některým kvasinkám a plísním (Al-Mariri a Safi, 2014; Prabuseenivasan *et al.*, 2006). V těchto publikacích byla opět potvrzena významná antimikrobiální účinnost tohoto koření.

4.1.4 Extrakt z jalovce

Antimikrobiální účinnost extraktu z jalovce byla zaznamenána v tabulce 10 - 11. U arkobaktrů byla zjištěna nejvyšší antimikrobiální účinnost u extraktu rozpuštěného v ethanolu. Antimikrobiální účinnost ethanolového extraktu proti *A. butzleri* CCUG 30484 byla nižší (velikost zóny inhibice 8 mm) než u *A. butzleri* LMG 10828 (velikost zóny inhibice 10 mm). Antimikrobiální účinnost téhož extraktu proti testovaným kmenům *A. cryaerophilus* byla totožná (velikost zóny inhibice 10 - 11 mm). Jalovcové extrakty rozpuštěné v Tris/HCl a DMSO neměly k testovaným arkobakterům významnou antimikrobiální účinnost.

Stejně tak proti testovaným kronobakterům neměl jalovcový extrakt významnou antimikrobiální účinnost, naměřené zóny inhibice odpovídaly antimikrobiální účinnosti čistých rozpouštědel.

Tabulka 10 Antimikrobiální účinnosti extraktu z **jalovce** - *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> LMG10828	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050
EtOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	8 ± 2,0	11 ± 0,5	10 ± 0,0	10 ± 0,0

konc. ... koncentrace; EtOH ... 96% ethanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 8 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Tabulka 11 Antimikrobiální účinnosti extraktu z **jalovce** - *C. sakazakii*, *C. muytjensii*, *E. coli*, *S. aureus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>C. sakazakii</i> CCM 3461	<i>C. muytjensii</i> ATCC 51329	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>S. aureus</i> CCM 3953
EtOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,0
	96% EtOH	9 ± 0,0	10 ± 0,5	10 ± 0,0	12 ± 0,5

konc. ... koncentrace; EtOH ... 96% ethanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: *C. sakazakii* CCM 3461... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 10 mm; *C. muytjensii* ATCC 51329... 1M Tris/HCl; 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 12 mm; *E. coli* CCM 3954 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 11mm; *S. aureus* CCM 3953 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO, 96% ethanol ... 6 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

I přesto, že nebyla zaznamenána antimikrobiální účinnost daného extraktu proti arko-bakterům a kronobakterům, existují některé publikace, které se zabývají testováním antimikrobiální účinností extraktů nebo esenciálních olejů z jalovce proti příbuzným bakteriím. Sela *et al.* (2015) popisují ve své publikaci antimikrobiální účinek esenciálního oleje z jalovce rozpuštěného v DMSO proti *Campylobacter jejuni*. V této studii byla zjištěna velikost zóny inhibice testovaného esenciálního oleje 14 - 19 mm. Antimikrobiální účinnost esenciálního oleje z jalovcových bobulí proti kampylobakterům byla také testována ve studii Freiman *et al.* (2002).

Al-Mariri a Safi (2014) testovali antimikrobiální účinnost esenciálního oleje z jalovce rozpuštěného v DMSO. Esenciální olej použitý k testování měl koncentraci 5 %. V této studii byla proti vybraným bakteriím (*E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus* spp., *Klebsiella pneumoniae*) zjištěna významná antimikrobiální účinnost testovaného esenciálního oleje. Antimikrobiální účinnost esenciálního oleje z jalovce testovali na vybrané

gramnegativní a grampozitivní mikroorganismy také ve své publikaci Pepeljnjak *et al.* (2005). V této publikaci byla k testování antimikrobiálního účinku esenciálního oleje z jalovce použita jamková disková difúzní metoda a pro testování byla dále připravena buněčná suspenze odpovídající koncentraci pouze 3×10^6 CFU/ml. V příslušné studii byla zaznamenána významná antimikrobiální účinnost (velikost zóny inhibice testovaných bakterií až 17 mm), což může být dáno jiným metodickým postupem, ale i citlivostí daných bakterií k testovanému extraktu.

Dále ve své studii testovali antimikrobiální účinnost extraktů extrahovaných v methanolu, vodě, ethylacetátu, chloformu a hexanu rozpuštěné v deionizované vodě s příměsí 1% DMSO také Fernandez a Cock (2016). Pro testování antimikrobiální účinnosti byly použity jiné grampozitivní (*Staphylococcus aureus*) a gramnegativní (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baylii*) bakterie, i přes to byla zjištěna významná antimikrobiální účinnost daných extraktů.

4.1.5 Extrakt z muškátového oříšku

Proti testovaným akrobakterům a kronobakterům byla zjištěna nejvyšší antimikrobiální účinnost daného extraktu rozpuštěného v ethanolu. Zóny inhibice se v případě arkobakterů pohybovaly v rozmezí 10 - 13 mm. Zóny inhibice v případě testovaných kronobakterů byly naměřeny menší, než u arkobakterů, a to 9 - 11 mm. Extrakty rozpuštěné v Tris/HCl a DMSO poskytovaly oproti extraktům rozpuštěných v ethanolu nižší antimikrobiální účinnost. Průměry zóny inhibice těchto extraktů pro testované arkobaktery a kronobaktery se pohybovaly do 8 mm.

Zatím co u arkobakterů byla naměřena antimikrobiální účinnost jak u extraktů rozpuštěných v Tris/HCl (průměr zóny inhibice do 8 mm), tak u extraktů rozpuštěných v DMSO (průměr zóny inhibice 7 - 8 mm), u kronobakterů byla antimikrobiální účinnost zjištěna pouze u extraktů rozpuštěných v Tris/HCl (velikost zóny inhibice do 7 mm). Dále byly zjištěny rozdíly v průměru zóny inhibice testovaných extraktů i v rámci testovaných kmenů rodu *Arcobacter*. Antimikrobiální účinnost testovaného extraktu proti kmenům *A. cryaerophilus* byla vyšší než u testovaných kmenů *A. butzleri*. Výsledky antimikrobiální účinnosti extraktu z muškátového oříšku byly zaznamenány do tabulky 12 - 13.

Tabulka 12 Antimikrobiální účinnosti extraktu z **muškátového oříšku** - *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> LMG 10828	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050
EtOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	8 ± 0,5	6 ± 0,0	7 ± 0,0
	20% DMSO	7 ± 0,0	8 ± 0,0	7 ± 0,0	7 ± 0,0
	96% EtOH	10 ± 0,5	13 ± 0,5	10 ± 0,0	11 ± 1,0

konc. ... koncentrace; EtOH ... 96% ethanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 8 mm; průměr papírového disku 6 mm.

Tabulka 13 Antimikrobiální účinnosti extraktu z **muškátového oříšku** - *C. sakazakii*, *C. mytjensii*, *E. coli*, *S. aureus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>C. sakazakii</i> CCM 3461	<i>C. mytjensii</i> ATCC 51329	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>S. aureus</i> CCM 3953
EtOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,0	7 ± 0,0	7 ± 0,5	7 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	8 ± 0,5
	96% EtOH	11 ± 0,0	9 ± 0,0	10 ± 0,5	11 ± 0,5

konc. ... koncentrace; etOH ... 96% ethanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: *C. sakazakii* CCM 3461 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 10 mm; *C. mytjensii* ATCC 51329 ... 1M Tris/HCl; 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 12 mm; *E. coli* CCM 3954 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 11mm; *S. aureus* CCM 3953 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO, 96% ethanol ... 6 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Extrakty z muškátového oříšku proti testovaným kmenům rodu *Arcobacter* a *Cronobacter* nebyly v dostupné literatuře dříve popsány. Ve studii Nanasombat a Lohasupthawee (2005) byla popsána antimikrobiální účinnost ethanolového extraktu a esenciálního oleje z muškátového oříšku proti *Enterobacter aerogenes*. Zatímco esenciální olej neměl významnou antimikrobiální účinnost, u ethanolového extraktu byla zjištěna velikost zóny inhibice 10 mm, což je podobný výsledek jako byl zjištěn v této diplomové práci. V dalších studiích byla testována antimikrobiální účinnost esenciálního oleje z muškátového oříšku proti *Campylobacter jejuni*, např. ve studii Friedman *et al.* (2002).

Dále byly publikovány studie testující extrakty nebo esenciální oleje z muškátového oříšku popisující podobné výsledky antimikrobiální účinnosti jako byly zjištěny v této diplomové práci (Indu *et al.*, 2006). Prabuseenivasan *et al.* (2006) použili ve své publikaci pro testování antimikrobiální účinnosti esenciálního oleje z muškátového oříšku rozpuštěný v DMSO a Tweenu 80 proti vybraným grampozitivním (*Staphylococcus aureus*,

Bacillus subtilis) a gramnegativním (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*) mikroorganismům. V této studii byla zjištěna významná antimikrobiální účinnost testovaného vzorku, což mohlo být způsobeno mj. také použitím bakteriální suspenze o nižší denzitě (10^5 CFU/ml), nebo také použitím impregnace testovacího disku vyšší koncentrací esenciálního oleje.

4.1.6 Extrakt ze skořice

Extrakt ze skořice byly jedny z nejvíce antimikrobiálně působících extraktů testovaných v této práci. Antimikrobiální účinnost extraktu ze skořice proti vybraným kmenům rodu *Arcobacter* a *Cronobacter* byla shrnuta do tabulky 14 - 15. Z použitých rozpouštědel nejvyšší antimikrobiální účinnost měl v případě arkobakterů extrakt extrahovaný v isopropanolu, poté v ethanolu a methanolu. Antimikrobiální účinnost byla zaznamenána u všech tří finálních rozpouštědel (Tris/HCl, DMSO i ethanolu).

V případě testovaných akrobakterů byl k extraktům ze skořice nejvíce citlivý *A. cryaerophilus*, a to oba testované kmeny. Velikost zóny inhibice měřila 7 - 15 mm (extrakt rozpuštěný v Tris/HCl), 10 - 20 mm (extrakt rozpuštěný v DMSO) a největší zóny inhibice byly naměřeny u extraktů rozpuštěných v ethanolu, a to 22 - 34 mm. Naopak nejméně citlivý byl kmen *A. buzleri* UPa 2013/13, u kterého byla naměřena zóna inhibice maximálně do 17 mm. Významná antimikrobiální účinnost těchto extraktů byla naměřena i proti *A. buzleri* CCUG 30484. U tohoto kmene byla zjištěna nižší citlivost u isopropanolového a ethanolového extraktu rozpuštěného v Tris/HCl (velikost zóny inhibice do 7 mm). Dále byla zjištěna významná antimikrobiální účinnost u extraktů rozpuštěných v DMSO, průměr zóny inhibice 12 - 15 mm. Nejvyšší antimikrobiální účinnost proti tomuto kmenu měly opět extrakt rozpuštěný v ethanolu (velikost zóny inhibice 21 - 32 mm).

V případě testovaných kronobakterů byla zjištěna nižší antimikrobiální účinnost než proti testovaným arkobakterům. Některé extrakt (rozpuštěný v Tris/HCl, DMSO) neměly pro námi testované kronobaktery významnou antimikrobiální účinnost (velikost zóny inhibice maximálně do 7 mm). Extrakt rozpuštěný v ethanolu neměly k testovaným kronobakterům také významnou antimikrobiální účinnost, velikost zóny inhibice v podstatě odpovídala velikosti zóny inhibice samotných rozpouštědel.

Tabulka 14 Antimikrobiální účinnosti extraktu ze **skořice** - *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> LMG 10828	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050
IsopropOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,0	12 ± 0,5	12 ± 0,5	15 ± 0,0
	20% DMSO	12 ± 0,0	15 ± 0,0	16 ± 0,0	20 ± 0,0
	96% EtOH	32 ± 0,0	29 ± 1,0	17 ± 0,0	34 ± 2,0
EtOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,0	10 ± 0,0	7 ± 0,0	10 ± 0,0
	20% DMSO	13 ± 1,0	11 ± 1,0	8 ± 0,0	13 ± 1,0
	96% EtOH	21 ± 1,0	34 ± 0,0	15 ± 0,5	32 ± 0,0
MetOH	1M Tris/HCl	14 ± 0,0	8 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,0
	20% DMSO	15 ± 0,0	10 ± 0,0	6 ± 0,0	19 ± 1,0
	96% EtOH	22 ± 0,0	22 ± 0,0	10 ± 0,0	30 ± 0,0

konc. ... koncentrace; IsopropOH ... 99,96% isopropanol; EtOH ... 96% ethanol; MetOH ... 99,96% methanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 8 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Tabulka 15 Antimikrobiální účinnosti extraktu ze **skořice** - *C. sakazakii*, *C. mytjensii*, *E. coli*, *S. aureus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>C. sakazakii</i> CCM 3461	<i>C. mytjensii</i> ATCC 51329	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>S. aureus</i> CCM 3953
IsopropOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	8 ± 0,0	10 ± 0,0	9 ± 0,0	9 ± 0,0
EtOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	9 ± 0,0	10 ± 0,0	8 ± 0,5	9 ± 0,0
MetOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	7 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	10 ± 0,5	9 ± 0,0	7 ± 0,0	9 ± 0,0

konc. ... koncentrace; IsopropOH ... 99,96% isopropanol; EtOH ... 96% ethanol; MetOH ... 99,96% methanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: *C. sakazakii* CCM 3461 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 10 mm; *C. mytjensii* ATCC 51329 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 12 mm; *E. coli* CCM 3954 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 11 mm; *S. aureus* CCM 3953 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO, 96% ethanol ... 6 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Tyto extrakty byly již dříve testovány na některé kmeny rodu *Arcobacter*, kdy byly zjištěny obdobné výsledky jako u námi testovaných arko-bakterů.

Červenka *et al.* (2006) testovali ve své studii antimikrobiální účinnost proti *A. butzleri* CCUG 30484, u kterého byla naměřena velikost zóny inhibice methanolového extraktu \pm 19 mm. Dále byla antimikrobiální účinnost skořicového esenciálního oleje proti *A. butzleri* popsána i ve studii Irkin *et al.* (2010). V této studii byly testovány příslušné bakterie izolované z masných výrobků. Většina testovaných izolátů byla citlivá k testovanému esenciálnímu oleji, naměřené průměry zóny inhibice byla 23 - 51 mm.

Dále byla testována antimikrobiální účinnost esenciálního oleje nebo extraktu ze skořice i proti příbuzným bakteriím, tedy kampylobakterům. Sheeladevi a Ramanathan (2012) popsali ve své studii antimikrobiální účinnost esenciálního oleje ze skořice mj. proti *Campylobacter* spp., která byla stanovena pomocí difúzní metody v jamkách o velikosti 6 mm. V této studii byl stanoven průměr zóny inhibice daného esenciálního oleje proti kampylobakterům 21,47 mm. I přes to, že antimikrobiální účinnost esenciálního oleje a extraktu je neporovnatelná, tento výsledek potvrzuje antimikrobiální účinnost proti kampylobakterům, blízkým příbuzným arkobakterům.

Dále Al-Nabulsi *et al.* (2014) testovali antimikrobiální účinnost skořicového esenciálního oleje proti směsi kmenů *C. sakazakii*. Pro testování byla v této publikaci použita bakteriální suspenze o denzitě 10^5 CFU/ml a dále bylo na testovací disk aplikováno 20 μ l příslušného esenciálního oleje. Za výše popsaných podmínek testování antimikrobiální účinnosti proti *C. sakazakii* byl naměřen průměr zóny inhibice 32 - 40 mm. Antimikrobiální účinnost ethanolového extraktu rozpuštěného v 10% DMSO byla testována proti *Enterobacter aerogenes* ve studii Nanasombat a Lohasupthawee (2005). Výsledná koncentrace tohoto extraktu byla 400 mg/ml. Antimikrobiální účinnost tohoto extraktu byla obdobná jako byla zjištěna u námi testovaných kronobakterů (velikost zóny inhibice 8 mm).

Extrakty nebo esenciální olej ze skořicové kůry byly publikovány i v dalších studiích např. ve studii Al-Mariri a Safi (2014) testovali antimikrobiální účinnost skořicového esenciálního oleje rozpuštěného v DMSO proti vybraným gramnegativním (*E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus* spp. *Klebsiella pneumoniae*) bakteriím.

4.1.7 Extrakt ze smrkového jehličí

Antimikrobiální účinek extraktu ze smrkového jehličí byl v případě arkobakterů nejvyšší u extraktů rozpuštěných v ethanolu. U tohoto extraktu byla antimikrobiální účinnost výraznější proti použitým kmenům *A. cryaerophilus* (velikost zóny inhibice 10 - 15 mm) než proti *A. butzleri* (velikost zóny inhibice 9 - 11 mm). Největší antimikrobiální účinnost proti *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 měl isopropanolový extrakt (velikost zóny inhibice 15 mm). V případě kronobakterů byla naměřena nejvyšší antimikrobiální účinnost také u extraktů rozpuštěných v ethanolu, průměr zóny inhibice 8 - 12 mm. U *C. sakazakii* CCM 3461 byla zjištěna největší antimikrobiální účinnost extraktu extrahovaného v ethanolu (průměr zóny inhibice 12 mm), dále u extraktů extrahovaných v methanolu (velikost zóny inhibice 11 mm). U ostatních rozpouštědel (Tris/HCl, DMSO) byla zjištěna antimikrobiální účinnost nižší (průměr zóny inhibice do 8 mm), a to jak u akrobakterů tak kronobakterů. Výsledky testování antimikrobiální účinnosti extraktu ze smrkového jehličí proti testovaným mikroorganismům byly zaznamenány do tabulky 16 - 17.

Tabulka 16 Antimikrobiální účinnosti extraktu ze **smrkového jehličí** - *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> LMG 10828	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050
IsopropOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,0
	20% DMSO	8 ± 0,0	8 ± 0,0	7 ± 0,0	8 ± 0,0
	96% EtOH	9 ± 0,0	15 ± 0,0	9 ± 0,0	10 ± 0,0
EtOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,0
	20% DMSO	7 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,0	7 ± 0,0
	96% EtOH	10 ± 0,0	11 ± 1,0	9 ± 0,0	11 ± 1,0
MetOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,0
	96% EtOH	11 ± 0,5	11 ± 0,5	10 ± 0,0	10 ± 0,0

konc. ... koncentrace; IsopropOH ... 99,96% isopropanol; EtOH ... 96% ethanol; MetOH ... 99,96% methanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 8 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Tabulka 17 Antimikrobiální účinnosti extraktu ze **smrkového jehličí** - *C. sakazakii*, *C. mytjensii*, *E. coli*, *S. aureus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>C. sakazakii</i> CCM 3461	<i>C. mytjensii</i> ATCC 51329	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>S. aureus</i> CCM 3953
IsopropOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	7 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	8 ± 0,0	9 ± 0,0	7 ± 0,0	7 ± 0,0
EtOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	12 ± 0,5	10 ± 0,5	9 ± 1,0	9 ± 0,0
MetOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	10 ± 0,5	10 ± 0,5	9 ± 1,0	8 ± 0,0

konc. ... koncentrace; IsopropOH ... 99,96% isopropanol; EtOH ... 96% ethanol; MetOH ... 99,96% methanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: C. sakazakii CCM 3461... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 10 mm; *C. mytjensii* ATCC 51329... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 12 mm; *E. coli* CCM 3954 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 11 mm; *S. aureus* CCM 3953 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO, 96% ethanol ... 6 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Antimikrobiální účinnost éterického oleje ze smrkového jehličí rozpuštěného v methanolu proti vybraným grampozitivním (*Staphylococcus aureus*), gramnegativním (*E. coli*, *Klasiella* spp., *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa*) bakteriím a proti některým plísním (*Aspergillus* spp., *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans*) a kvasinkám (*Candida albicans*) byla dříve popsána ve studii Singh Bharat a Praveen (2016). V této studii byla pro testování antimikrobiální účinnosti esenciálního oleje z dané matrice rozpuštěného v methanolu použita jamková disková difúzní metoda a do jamky bylo aplikováno 50 µl vzorku. Tato odlišnost v metodickém postupu může být příčinou, že pro dané mikroorganismy byla zaznamenána významná antimikrobiální účinnost tohoto esenciálního oleje.

Antimikrobiální účinnost esenciálního olej ze smrkového jehličí proti některým grampozitivním a gramnegativním bakteriím popř. některým plísním testoval ve své studii také Poaty *et al.* (2015). Antimikrobiální účinnost extraktu ze smrkového jehličí proti zástupcům rodu *Arcobacter* a *Cronobacter* nebyla v dostupné literatuře dosud zaznamenána.

4.1.8 Extrakt z šípku

Nejvyšší antimikrobiální účinnost proti testovaným arkoobakterům měly extrakty rozpuštěné v ethanolu (velikost zóny inhibice 9 - 13 mm). Nejvíce antimikrobiálně účinný z testovaných extrakčních činidel byl ethanolový extrakt následně rozpuštěný v ethanolu, u kterého byla naměřena velikost zóny inhibice 12 - 13 mm (oba kmeny *A. butzleri*) a o něco méně bylo naměřeno v případě obou kmenů *A. cryaerophilus* (průměr zóny inhibice 9 - 11). Antimikrobiální účinnost extraktů rozpuštěných v Tris/HCl a DMSO proti akrobakterům byla méně významná, průměr zóny inhibice byl maximálně do 8 mm (viz tabulka 18).

V případě testovaných kronobakterů nebyla zjištěna významná antimikrobiální účinnost testovaných extraktů z šípku. Velikost zóny inhibice v podstatě odpovídala velikosti zóny inhibice čistých rozpouštědel (viz tabulka 19). Extrakt připravený extrakcí v methanolu nebyl v 96 % ethanolu rozpustný a proto nebylo možné otestovat antimikrobiální účinnost toho extraktu.

Tabulka 18 Antimikrobiální účinnosti extraktu z šípku - *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> LMG 10828	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050
IsopropOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,0	7 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	7 ± 0,0	7 ± 0,0	7 ± 0,0
	96% EtOH	11 ± 0,0	10 ± 0,0	10 ± 1,0	11 ± 0,5
EtOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,5
	20% DMSO	6 ± 0,0	8 ± 0,5	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	13 ± 2,5	9 ± 1,0	12 ± 0,5	11 ± 0,5
MetOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	7 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	7 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	-	-	-	-

konc. ... koncentrace; IsopropOH ... 99,96% isopropanol; EtOH ... 96% ethanol; MetOH ... 99,96% methanol; - ... extrakt nerozpustný v 96% ethanolu; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 8 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Tabulka 19 Antimikrobiální účinnosti extraktu z šípku - *C. sakazakii*, *C. muytjensii*, *E. coli*, *S. aureus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>C. sakazakii</i> CCM 3461	<i>C. muytjensii</i> ATCC 513 29	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>S. aureus</i> CCM 3953
IsopropOH	1M TRIS/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	9 ± 0,0	10 ± 0,5	10 ± 0,5	9 ± 0,5
EtOH	1M TRIS/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	10 ± 0,5	9 ± 0,0	10 ± 0,0	9 ± 0,5
MetOH	1M TRIS/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	-	-	-	-

konc. ... koncentrace; IsopropOH ... 99,96% isopropanol; EtOH ... 96% ethanol; MetOH ... 99,96% methanol; - ... extrakt nerozpustný v 96% ethanolu; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: *C. sakazakii* CCM 3461... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 10 mm; *C. muytjensii* ATCC 51329... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 12 mm; *E. coli* CCM 3954 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 11 mm; *S. aureus* CCM 3953 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO, 96% ethanol ... 6 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Proti námi testovaným zástupcům rodu *Arcobacter* a *Cronobacter* nebyl šípkový extrakt v dostupné literatuře dříve testován, proto námi získané výsledky nelze objektivně porovnat s jinými studiemi. I přesto existuje řada studií zabývajících se antimikrobiální účinností šípkových extraktů proti některým grampozitivním a gramnegativním bakteriím, popř. některým kvasinkám a plísním. K testování antimikrobiální účinnosti methanolového extraktu z šípku použili Moustafa a Alrumman (2015) testovací disky impregnované daným extraktem. I za použití těchto podmínek byla u některých testovaných bakterií (*Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*) zaznamenána podobná antimikrobiální účinnost tohoto extraktu jako u námi testovaných bakterií (velikost zóny inhibice 9 - 11 mm).

Dále Ozturk Yilmaz a Ercisli (2011) testovali antimikrobiální účinnost extraktů z šípku extrahované v methanolu, vodě, chloroformu, petroletheru, diethyletheru a acetonu, které byly následně rozpuštěny v DMSO. Koncentrace použitá k testování těchto extraktů odpovídala koncentraci 0,33 g/ml. Pro testování antimikrobiální účinnosti použili ve své studii Ozturk Yilmaz a Ercisli (2011) vybrané gramnegativní (*Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* spp., *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*)

a grampozitivní (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*) bakterie, popř některé kvasinky (*Candida albicans*, *Candida* spp.).

Další studie zabývající se antimikrobiální účinností methanolového a ethanolového extraktu z šípkových květů publikovala Rovná *et al.* (2015). V této studii byla použita bakteriální suspenze 10^5 CFU/ml a impregnované testovací disky o průměru 9 mm. Za výše popsaných podmínek testování byla u vybraných gramnegativních bakterií (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), některých a plísní (*Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum*, *Alternaria alternata*) naměřena velikost zóny inhibice ethanolového i methanolového extraktu 1,33 - 4,33 mm.

4.1.9 Další extrakty s antimikrobiálním potenciálem

Extrakt z borovicového jehličí

Antimikrobiální účinnost testovaných extraktů z borovicového jehličí proti zástupcům rodu *Arcobacter* a *Cronobacter* byla shrnuta v tabulce 20 - 21. Nejvíce antimikrobiálně účinné byly proti testovaným arkobakterům ethanolové extrakty rozpuštěné v ethanolu s velikostí zóny inhibice 11 mm. Dalším významně antimikrobiálně působícími extrakty byly extrakty methanolové rozpuštěné v ethanolu (velikost zóny inhibice 9 - 11 mm) a extrakty isopropanolové také rozpuštěné v ethanolu (velikost zóny inhibice 9 - 11 mm). K testovaným extraktům byly více citlivé kmeny *A. cryaerophilus* než testované kmeny *A. buzleri*. Nejmenší citlivost byla zjištěna u kmene *A. buzleri* CCUG 30484 u isopropanolového extraktu rozpuštěného v ethanolu, u kterého nebyla zjištěna významná zóna inhibice.

Dále nebyla zaznamenána významná antimikrobiální účinnost testovaných extraktů proti kronobakterům, velikost zóny inhibice odpovídala velikosti zóny inhibice čistých rozpouštědel. I přesto byla u kmene *C. muytjensii* ATCC 51329 zjištěna vyšší citlivost k testovaným extraktům než u kmene *C. sakazakii* CCM 3461. U extraktů rozpuštěných v Tris/HCl a DMSO nebyl pro testované arkobaktery a kronobaktery zaznamenán antimikrobiální účinek. Extrakt z borovicového jehličí připravený extrakcí v isopropanolu nebyl v 1M Tris/HCl rozpustný, a proto nebylo možné testovat antimikrobiální účinnost tohoto extraktu proti daným mikroorganismům.

Tabulka 20 Antimikrobiální účinnosti extraktu z borovicového jehličí - *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> LMG 10828	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050
IsopropOH	1M Tris/HCl	-	-	-	-
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,5
	96% EtOH	6 ± 0,0	10 ± 0,0	9 ± 1,0	11 ± 0,5
EtOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	7 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	11 ± 1,0	11 ± 0,5	11 ± 0,5	11 ± 0,5
MetOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	7 ± 0,5	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,0
	96% EtOH	11 ± 1,0	9 ± 0,0	11 ± 0,5	11 ± 0,0

konc. ... koncentrace; IsopropOH ... 99,96% isopropanol; EtOH ... 96% ethanol; MetOH ... 99,96% methanol; - ... extrakt nerozpustný v 1M Tris/HCl; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 8 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Tabulka 21 Antimikrobiální účinnosti extraktu z borovicového jehličí - *C. sakazakii*, *C. muytjensii*, *E. coli*, *S. aureus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>C. sakazakii</i> CCM 3461	<i>C. muytjensii</i> ATCC 51329	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>S. aureus</i> CCM 3953
IsopropOH	1M Tris/HCl	-	-	-	-
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	6 ± 0,0	7 ± 0,0	7 ± 0,0	7 ± 0,0
EtOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	6 ± 0,0	10 ± 1,0	10 ± 0,5	12 ± 0,5
MetOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,5	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	10 ± 1,5	10 ± 0,5	8 ± 1,5	7 ± 0,0

konc. ... koncentrace; IsopropOH ... 99,96% isopropanol; EtOH ... 96% ethanol; MetOH ... 99,96% methanol; - ... extrakt nerozpustný v 1M Tris/HCl; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: *C. sakazakii* CCM 3461 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 10 mm; *C. muytjensii* ATCC 51329 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 12 mm; *E. coli* CCM 3954 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 11 mm; *S. aureus* CCM 3953 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO, 96% ethanol ... 6 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

V dostupné literatuře byla dříve testována antimikrobiální účinnost extraktů nebo esenciálních olejů z borovicového jehličí proti příbuzným bakteriím testovaných

arkobakterům a kronobakterům. Antimikrobiální účinnost esenciálního oleje z borovicového jehličí proti *Campylobacter jejuni* byla publikována ve studii Friedman *et al.* (2002). Dále byly publikovány studie zabývající se antimikrobiální účinností ethanolových extraktů z borovicového jehličí, kůry a šišek proti *Enterobacter aerogenes* (Bissa *et al.*, 2008). Velikost zóny inhibice ethanolového extraktu z borovicového jehličí byla naměřena 4 mm, což odpovídá antimikrobiální účinnosti proti námi testovaným kronobakterům.

Extrakt z borovicového jehličí byl dále testován i ve studii Apetrei *et al.* (2011) a také Lee *et al.* (2008). Pro testování extraktu z borovicového jehličí byl použit jiný metodický postup přípravy extraktu. Apetrei *et al.* (2011) ve své studii testovali methanoloové extrakty z borovicové kůry a jehličí jamkovou difúzní metodou proti některým grampozitivním (*Staphylococcus aureus*) a gramnegativním mikroorganismům (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), ale i proti některým kvasinkám (*Candida albicans*). V této studii byla zjištěna vyšší antimikrobiální účinnost methanoloového extraktu z dané matrice (průměr zóny inhibice 12,66 - 25,66 mm) ve srovnání s výsledky uvedenými v této diplomové práci. Lee *et al.* (2008) použili pro stanovení antimikrobiální účinnosti proti vybranným bakteriím, kvasinkám a plísním esenciální olej rozpuštěný v 5% DMSO. Tato studie potvrzuje obdobnou antimikrobiální účinnost extraktů a esenciálních olejů z borovicového jehličí, která byla zjištěna i v této práci.

Extrakt z celeru a celerové natě

Proti testovaným arkobakterům byl nejvíce antimikrobiálně účinný extrakt rozpuštěný v ethanolu a to jak u extraktů z celeru tak celerové natě. U *A. butzleri* CCUG 30484 byla naměřena zóna inhibice ethanolových extraktů z celeru 9 - 11 mm, zatím co u *A. butzleri* LMG 10828 byly naměřeny průměry zón inhibice těchto extraktů 11 - 12 mm. Pro oba kmeny *A. cryaerophilus* byly naměřeny zóny inhibice ethanolových extraktů 9 - 11 mm. U extraktů z celerové natě byly pro testované akrobaktery naměřeny obdobné výsledky. Extrakty rozpuštěné v Tris/HCl a DMSO vykazovaly antimikrobiální účinnost proti akrobakterům nižší, velikost zóny inhibice maximálně do 7 mm a to jak u extraktů z celeru tak celerové natě.

V případě kronobakterů byly také nejvíce antimikrobiálně účinné extrakty rozpuštěné v ethanolu. Menší citlivost vůči těmto extraktům byla zjištěna u *C. mytjensii* ATCC 51329 a to jak u extraktů z celeru (velikost zóny inhibice 8 - 11 mm), tak u extraktů z celerové natě (velikost zóny inhibice 10 mm). Extrakty rozpuštěné v Tris/HCl a DMSO nebyly pro námi

testované kronobaktery antimikrobiálně účinné, velikost zóny inhibice do 7 mm. Výsledky testování antimikrobiální účinnosti extraktů z celerů a celerové natě proti arkobakterům a kronobakterům jsou shrnuty v tabulkách 22 - 25.

Tabulka 22 Antimikrobiální účinnosti extraktu z **celeru** - *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> LMG10828	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050
IsopropOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,5
	96% EtOH	9 ± 1,0	10 ± 0,5	11 ± 0,5	10 ± 0,0
EtOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,5
	20% DMSO	6 ± 0,0	7 ± 1,0	6 ± 0,0	7 ± 0,5
	96% EtOH	11 ± 0,0	9 ± 0,0	12 ± 0,0	10 ± 0,5
MetOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,5
	20% DMSO	6 ± 0,0	7 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,0
	96% EtOH	10 ± 0,0	11 ± 0,5	12 ± 0,5	10 ± 0,0

konc. ... koncentrace; IsopropOH ... 99,96% isopropanol; EtOH ... 96% ethanol; MetOH ... 99,96% methanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 8 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Tabulka 23 Antimikrobiální účinnosti extraktu z **celeru** - *C. sakazakii*, *C. mytjensii*, *E.coli*, *S. aureus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>C. sakazakii</i> CCM 3461	<i>C. mytjensii</i> ATCC 51329	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>S. aureus</i> CCM 3953
IsopropOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	9 ± 0,0	10 ± 0,5	10 ± 0,5	8 ± 0,0
EtOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	9 ± 0,5	8 ± 1,5	8 ± 1,5	9 ± 0,0
MetOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	6 ± 0,0	11 ± 0,5	10 ± 0,5	8 ± 0,0

konc. ... koncentrace; IsopropOH ... 99,96% isopropanol; EtOH ... 96% ethanol; MetOH ... 99,96% methanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: *C. sakazakii* CCM 3461... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 10 mm; *C. mytjensii* ATCC 51329... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 12 mm; *E. coli* CCM 3954 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 11 mm; *S. aureus* CCM 3953 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO, 96% ethanol ... 6 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Tabulka 24 Antimikrobiální účinnosti extraktu z **celerové natě** - *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> LMG 10828	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050
IsopropOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,5
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,5
	96% EtOH	8 ± 0,0	9 ± 0,0	9 ± 0,0	11 ± 0,5
EtOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,5
	96% EtOH	11 ± 1,0	9 ± 0,5	11 ± 0,5	10 ± 1,0
MetOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	12 ± 0,5	9 ± 1,0	10 ± 1,5	12 ± 0,5

konc. ... koncentrace; IsopropOH ... 99,96% isopropanol; EtOH ... 96% ethanol; MetOH ... 99,96% methanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 8 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Tabulka 25 Antimikrobiální účinnosti extraktu z **celerové natě** - *C. sakazakii*, *C. muytjensii*, *E. coli*, *S. aureus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>C. sakazakii</i> CCM 3461	<i>C. muytjensii</i> ATCC 51329	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>S. aureus</i> CCM 3953
IsopropOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,5	7 ± 0,5	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	7 ± 0,5	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	9 ± 1,0	10 ± 0,5	9 ± 1,0	7 ± 0,0
EtOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,5	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	7 ± 0,5	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	11 ± 0,5	10 ± 0,0	9 ± 0,5	6 ± 0,0
MetOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	7 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	8 ± 0,0	10 ± 0,5	9 ± 0,5	8 ± 1,5

konc. ... koncentrace; IsopropOH ... 99,96% isopropanol; EtOH ... 96% ethanol; MetOH ... 99,96% methanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: *C. sakazakii* CCM 3461... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 10 mm; *C. muytjensii* ATCC 51329... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 12 mm; *E. coli* CCM 3954 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 11 mm; *S. aureus* CCM 3953 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO, 96% ethanol ... 6 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

V dostupné literatuře nebyla zjištěna studie zaznamenávající testování antimikrobiální účinnosti extraktů z celeru a celerové natě proti námi testovaným arkobakterům a kronobakterům. Byly však testovány mikroorganismy blízké příbuzné námi testovaným, tedy zástupci rodu *Enterobacter* a *Campylobacter*. Al-Talib *et al.* (2016) testovali ve své studii antimikrobiální účinnost vodného extraktu z celeru proti *Enterobacter cloacea*. V této studii nebyla zjištěna antimikrobiální účinnost daného extraktu proti *Enterobacter cloacea*. Tento výsledek potvrzuje výše zjištěnou antimikrobiální účinnost proti testovaným kronobakterům. Dále Sipailiene *et al.* (2005) testoval antimikrobiální účinnost esenciálního oleje z celerové natě proti *Enterobacter aerogenes*. V této studii byla zjištěna vyšší antimikrobiální účinnost esenciálního oleje z celeru proti *Enterobacter aerogenes*, naměřená velikost zóny inhibice odpovídala až 19 mm v závislosti na koncentraci esenciálního oleje. Také Friedman *et al.* (2002) již dříve popsal ve své studii antimikrobiální účinnost esenciálního oleje z celeru proti *Campylobacter jejuni*.

Celerový extrakt byl dříve také testován na antimikrobiální aktivitu proti jiným gram pozitivním a gram negativním bakteriím a některým kvasinkám. Ve své studii např. Dostbil *et al.* (2007) testoval antimikrobiální účinnost extraktu z celeru extrahovaného v diethyletheru. Pro testování vybraných bakterií (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatum*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*) a kvasinek (*Candida albicans*) byla v dané studii použita bakteriální suspenze o denzitě 10^8 - 10^9 CFU/ml a koncentrace extraktu 30 μ g/disk. Za použití výše popsaných podmínek byla zjištěna velikost zóny inhibice daných mikroorganismů 11 - 18 mm, což je více než bylo zjištěno v této diplomové práci.

Extrakt z červené řepy

Tabulka 26 - 27 shrnuje výsledky antimikrobiální účinnosti extraktů z červené řepy proti testovaným kmenům rodu *Arcobacter* a *Cronobacter*.

Po stanovení antimikrobiální účinnosti všech extraktů z červené řepy byla zjištěna nejvyšší antimikrobiální účinnost ethanolového extraktu. Velikost zóny inhibice u testovaných kmenů *A. butzleri* byla naměřena 11 - 12 mm, u kmenů *A. cryaerophilus* o trochu menší, a to 10 - 11 mm. Pro testované kronobaktery nebyla antimikrobiální účinnost extraktu z červené řepy tak výrazná jako v případě arkobakterů. Naměřené zóny inhibice v podstatě odpovídaly průměru zóny inhibice samotných rozpouštědel.

Extrakt z červené řepy rozpuštěný v Tris/HCl nebo v DMSO nebyly pro námi testované mikroby antimikrobiálně účinné (velikost zóny inhibice do 7 mm).

Tabulka 26 Antimikrobiální účinnosti extraktu z červené řepy - *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> LMG 10828	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050
EtOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	11 ± 0,5	11 ± 0,5	12 ± 0,5	10 ± 0,0

konc. ... koncentrace; etOH ... 96% ethanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 8 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Tabulka 27 Antimikrobiální účinnosti extraktu z červené řepy - *C. sakazakii*, *C. mytjensii*, *E. coli*, *S. aureus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>C. sakazakii</i> CCM 3461	<i>C. mytjensii</i> ATCC 513 29	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>S. aureus</i> CCM 3953
EtOH	1M Tris/HCl	7 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% EtOH	9 ± 1,5	9 ± 0,5	10 ± 0,0	7 ± 0,5

konc. ... koncentrace; EtOH ... 96% ethanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: *C. sakazakii* CCM 3461... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 10 mm; *C. mytjensii* ATCC 51329... 1M Tris/HCl; 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 12 mm; *E. coli* CCM 3954 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 11mm; *S. aureus* CCM 3953 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO, 96% ethanol ... 6 mm; průměr testovacího disku 6 mm;

Antimikrobiální účinnost okyseleného ethanolového extraktu z červené řepy rozpuštěný v destilované vodě byla testována proti *Enterobacter cloacae* ve studii Veličanski *et al.*, (2011). Vulić *et al.* (2013) testovali antimikrobiální účinnost extraktu z červené řepy za použití stejného extrakčního postupu také proti *Enterobacter cloacae*. Pro testování byla v obou výše zmíněných studiích použita mimo klasické diskové difúzní metody, také jamková difúzní metoda, u které bylo aplikováno 100 µl extraktu. Zatím co antimikrobiální účinnost testovaného extraktu klasickou difúzní metodou neposkytovala významné výsledky, po provedení testování téhož extraktu jamkovou difúzní metodou byla zaznamenána u obou výše zmíněných studiích velikost zóny inhibice 12 mm.

I další studie testovali antimikrobiální účinnost extraktu ze červené řepy proti vybraným grampozitivním (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*) a gramnegativním bakteriím (*Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*) popř. některým kvasinkám (*Sacharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*) a plísním (*Aspergillus niger*) např. v publikaci Boo *et al.* (2012).

Extrakt z červeného hlávkového zelí

Extrakt z červeného hlávkového zelí byl připraven extrakcí v ethanolu, který byl po odpaření extrakčního rozpouštědla rozpuštěn ve třech podílech ve finálních rozpouštědlech (1M Tris/HCl, 20% DMSO a 96% ethanol). Výsledná koncentrace extraktů odpovídala koncentraci 100 mg/ml. Výsledky testování antimikrobiální účinnosti proti testovaným akrobakterům a kronobakterům byly shrnuty do tabulky 28 a 29.

Proti testovaným arkobakterům byla zjištěna nejvyšší antimikrobiální účinnost extraktu rozpuštěného v ethanolu. Velikost zóny inhibice byla u všech testovaných arkobakterů naměřena 10 - 11 mm. Extrakty rozpuštěné v Tris/HCl a DMSO neměly proti testované arkobaktery významnou antimikrobiální účinnost. Proti testovaným kronobaktrům nebyla zjištěna významná antimikrobiální účinnost testovaných extraktů z červeného zelí. Průměr zóny inhibice v podstatě odpovídala velikosti zóny inhbice samotného rozpouštědla.

Tabulka 28 Antimikrobiální účinnosti extraktu z **červeného hlávkového zelí** - *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. cryaerophilus</i> UPa 2013/13	<i>A. butzleri</i> LMG 10828	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 7050
EtOH	1M Tris/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	7 ± 0,0
	96% EtOH	11 ± 0,0	10 ± 0,5	11 ± 0,0	11 ± 0,5

konc. ... koncentrace; etOH ... 96% ethanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 8 mm; průměr testovacího disku 6 mm.

Tabulka 29 Antimikrobiální účinnosti extraktu z červeného hlávkového zelí - *C. sakazakii*, *C. muytjensii*, *E. coli*, *S. aureus*

Bakteriální kmen/ druh extraktu (konc. 100 mg/ml)		Inhibiční zóna - průměr (mm)			
		<i>C. sakazakii</i> CCM 3461	<i>C. muytjensii</i> ATCC 51329	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>S. aureus</i> CCM 3953
etOH	1M TRIS/HCl	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	20% DMSO	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0	6 ± 0,0
	96% ethanol	10 ± 0,5	10 ± 0,5	10 ± 0,0	9 ± 0,5

konc. ... koncentrace; EtOH ... 96% ethanol; ± směrodatná odchylka (n=2).

Pozn.: zóny inhibice rozpouštědel bez extraktu: *C. sakazakii* CCM 3461... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 10 mm; *C. muytjensii* ATCC 51329... 1M Tris/HCl; 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 12 mm; *E. coli* CCM 3954 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO ... 6 mm; 96% ethanol ... 11mm; *S. aureus* CCM 3953 ... 1M Tris/HCl, 20% DMSO, 96% ethanol ... 6 mm; průměr papírového disku 6 mm.

Antimikrobiální účinnost extraktů z červeného zelí byla již dříve publikovaná v několika studiích (Boo *et al.*, 2012; Guild, 2014). V těchto studiích byla použita jiná metodika přípravy extraktů a také byly testovány jiné mikroorganismy. Hafidh *et al.* (2011) se ve své publikaci zabývali antimikrobiální účinností methanolového extraktu z dané suroviny. Pro jejich testování byla použita koncentrace 200 a 500 mg/ml, tedy vyšší než u námi testovaných extraktů. Testovány byly některé grampozitivní (*Staphylococcus aureus*) a gramnegativní (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*) bakterie, u kterých byla zaznamenána významná antimikrobiální účinnost testovaného extraktu. V dostupné literatuře nebyla zaznamenána publikace zabývající se antimikrobiální účinností extraktu z červeného hlávkového zelí proti námi testovaným mikroorganismům.

4.2 Stanovení minimálních inhibičních koncentrací vybraných extraktů mikrodiluční metodou

Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) v 96 jamkové mikrotitrační destičce bylo provedeno pro 8 antimikrobiálně neúčinnější extrakty, tedy pro extrakt z anýzu, badyánu, hřebíčku, skořice, jalovce, muškátového oříšku a dále pro extrakt ze smrkového jehličí a šípku. Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace byly použity extrakty extrahované v ethanolu a následně rozpuštěné v 96% ethanolu a 20% DMSO. MIC těchto extraktů byla stanovena pro všechny testované kmeny rodu *Arcobacter* a dále pro kmen *C. sakazakii* CCM 3461.

MIC testovaných extraktů pro *A. buzleri* CCUG 30484 jsou zaznamenány v tabulce 30 - 31. Z níže uvedených tabulek je zřejmé, že extrakty rozpuštěné v DMSO a ethanolu měly obdobnou schopnost inhibovat růst tohoto kmene. Pro tento kmen byla zjištěna MIC 0,313 mg/ml u extraktů z anýzu a badyánu rozpuštěných v DMSO a 0,156 - 0,313 mg/ml v případě extraktů rozpuštěných v ethanolu. Extrakt z jalovce rozpuštěný v DMSO měl schopnost inhibovat růst daného kmene již v koncentraci 1,25 - 0,625 mg/ml, obdobná MIC byla zjištěna u téže extraktu rozpuštěného v ethanolu, a to 0,625 mg/ml. Nejvyšší schopnost potlačit růst *A. buzleri* CCUG 30484 měl extrakt z hřebíčku, a to jak rozpuštěný v ethanolu (MIC 0,039 - 0,019 mg/ml), tak extrakt rozpuštěný v DMSO (MIC 0,019 mg/ml).

Tabulka 30 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro *A. buzleri* CCUG 30484 - extrakt z anýzu, badyánu, jalovce a hřebíčku

Druh extraktu		Koncentrační rozsah (mg/ml)												
		10,0	5,0	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,039	0,019	0,0097	0,0049	
A-D	A	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
A-E	A	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
B-D	A	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
B-E	A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
J-D	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
J-E	A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
H-D	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
H-E	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

A-D ... extrakt z anýzu rozpuštěný ve 20% DMSO; A-E ... extrakt z anýzu rozpuštěný v 96% ethanolu; B-D ... extrakt z badyánu rozpuštěný ve 20% DMSO; B-E ... extrakt z badyánu rozpuštěný v 96% ethanolu; J-D ... extrakt z jalovce rozpuštěný ve 20% DMSO; J-E ... extrakt z jalovce rozpuštěný v 96% ethanolu; H-D ... extrakt z hřebíčku rozpuštěný ve 20% DMSO; H-E ... extrakt z hřebíčku rozpuštěný v 96% ethanolu; A, B ... experiment pro daný extrakt provedený v dubletu; - ... bez nárůstu; + ... pozitivní nárůst.

Dále byla stanovena pro kmen *A. buzleri* CCUG 30484 minimální inhibiční koncentrace extraktu z muškátového oříšku, která pro extrakt rozpuštěný v DMSO odpovídala koncentraci 0,156 mg/ml a pro extrakt rozpuštěný v ethanolu 0,078 - 0,156 mg/ml. Stejná hodnota MIC byla zjištěna i u extraktu ze skořice rozpuštěného v DMSO, tedy 0,078 - 0,156 mg/ml. U extraktu ze skořice rozpuštěného v ethanolu byla zjištěna koncentrace potlačující růst tohoto kmene 0,039 - 0,156 mg/ml. Extrakty ze skořice a muškátového oříšku patřily k extraktům mající velmi významnou schopnost potlačit růst tohoto kmene. MIC extraktu ze smrkového jehličí rozpuštěného v DMSO a ethanolu pro daný kmen odpovídala MIC zjištěné u anýzu a badyánu. U extraktu ze šípku rozpuštěného v DMSO byla zjištěna koncentrace inhibující růst tohoto kmene 0,078 mg/ml a pro extrakt rozpuštěný v ethanolu byla zjištěna MIC 0,625 mg/ml.

Tabulka 31 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro *A. butzleri* CCUG 30484 - extrakt z muškátového oříšku, skořice, smrkového jehličí a šípku

Druh extraktu		Koncentrační rozsah (mg/ml)											
		10,0	5,0	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,039	0,019	0,0097	0,0049
M-D	A	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
M-E	A	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
S-D	A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
S-E	A	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Sm-D	A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Sm-E	A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Š-D	A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Š-E	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

M-D ... extrakt z muškátového oříšku rozpuštěný ve 20% DMSO; M-E ... extrakt z muškátového oříšku rozpuštěný v 96% ethanolu; S-D ... extrakt ze skořice rozpuštěný ve 20% DMSO; S-E ... extrakt ze skořice rozpuštěný v 96% ethanolu; Sm-D ... extrakt ze smrkového jehličí rozpuštěný ve 20% DMSO; Sm-E ... extrakt ze smrkového jehličí rozpuštěný v 96% ethanolu; Š-D ... extrakt z šípku rozpuštěný ve 20% DMSO; Š-E ... extrakt z šípku rozpuštěný v 96% ethanolu; A, B ... experiment pro daný extrakt provedený v dubletu; - ... bez nárůstu; + ... pozitivní nárůst.

Minimální inhibiční koncentrace testovaných extraktů pro *A. butzleri* LMG 10828 byla zaznamenána v tabulce 32 - 33. U těchto extraktů byla opět schopnost potlačit růst daného kmene v rámci použitých rozpouštědel (DMSO, ethanol) obdobná. Výsledky zjištěné u tohoto kmene byly obdobné jako byly zjištěny u *A. butzleri* CCUG 30484. U extraktu z anýzu rozpuštěného v DMSO byla zjištěna nejnižší koncentrace potlačující růst daného kmene 1,25 -2,5 mg/ml. Pro tentýž extrakt rozpuštěný v ethanolu byla zjištěna MIC odpovídající koncentraci 0,625 mg/ml. U extraktů z badyánu, jalovce a hřebíčku byla zjištěna shodná hodnota MIC pro extrakty rozpuštěné v DMSO i ethanolu. Pro extrakt z badyánu byla MIC testovaného kmene odpovídající koncentraci 1,25 mg/ml, pro extrakt z jalovce byla MIC 2,5 mg/ml a pro extrakt z hřebíčku byla zjištěna MIC daného kmene 0,625 mg/ml.

Tabulka 32 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro *A. buzleri* LMG 10828 - extrakt z anýzu, badyánu, jalovce a hřebíčku

Druh extraktu		Koncentrační rozsah (mg/ml)											
		10,0	5,0	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,039	0,019	0,0097	0,0049
A-D	A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A-E	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
B-D	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
B-E	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
J-D	A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
J-E	A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H-D	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
H-E	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

A-D ... extrakt z anýzu rozpuštěný ve 20% DMSO; A-E ... extrakt z anýzu rozpuštěný v 96% ethanolu; B-D ... extrakt z badyánu rozpuštěný ve 20% DMSO; B-E ... extrakt z badyánu rozpuštěný v 96% ethanolu; J-D ... extrakt z jalovce rozpuštěný ve 20% DMSO; J-E ... extrakt z jalovce rozpuštěný v 96% ethanolu; H-D ... extrakt z hřebíčku rozpuštěný ve 20% DMSO; H-E ... extrakt z hřebíčku rozpuštěný v 96% ethanolu; A, B ... experiment pro daný extrakt provedený v dubletu; - ... bez nárůstu; + ... pozitivní nárůst.

Dále pro extrakt z muškátového oříšku byla stanovena MIC pro *A. buzleri* LMG 10828 odpovídající MIC extraktu z anýzu rozpuštěného v DMSO, tedy koncentraci 1,25 - 2,5 mg/ml. Pro tentýž extrakt byla stanovena MIC extraktu rozpuštěného v ethanolu 2,5 mg/ml. Stejná MIC jako u extraktu z hřebíčku rozpuštěného v DMSO byla zjištěna i MIC extraktu ze skořice rozpuštěná v témže rozpouštědle a to 0,625 mg/ml. Nižší hodnota MIC byla stanovena pro extrakt ze skořice rozpuštěný v ethanolu, tedy rozmezí koncentrací 0,156 - 0,313 mg/ml. Nejnižší hodnoty MIC byly zjištěny pro tento kmen u extraktů ze smrkového jehličí a to jak rozpuštěných v DMSO, tak v ethanolu. MIC tohoto extraktu rozpuštěného v DMSO byla zjištěna při koncentraci 2,5 mg/ml a pro extrakty rozpuštěné v ethanolu již při koncentraci 2,5 - 5,0 mg/ml. Posledním extraktem, pro který byla stanovena MIC pro *A. buzleri* LMG 10828, byly extrakty z šípku. Pro tyto extrakty rozpuštěné v DMSO

byla zjištěna MIC odpovídající koncentraci 5,0 mg/ml a pro extrakty rozpuštěné v ethanolu byla MIC 1,25 - 2,5 mg/ml.

Tabulka 33 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro *A. butzleri* LMG 10828 - extrakt z muškátového oříšku, skořice, smrkového jehličí a šípku

Druh extraktu		Koncentrační rozsah (mg/ml)											
		10,0	5,0	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,039	0,019	0,0097	0,0049
M-D	A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M-E	A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-D	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S-E	A	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Sm-D	A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sm-E	A	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Š-D	A	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Š-E	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

M-D ... extrakt z muškátového oříšku rozpuštěný ve 20% DMSO; M-E ... extrakt z muškátového oříšku rozpuštěný v 96% ethanolu; S-D ... extrakt ze skořice rozpuštěný ve 20% DMSO; S-E ... extrakt ze skořice rozpuštěný v 96% ethanolu; Sm-D ... extrakt ze smrkového jehličí rozpuštěný ve 20% DMSO; Sm-E ... extrakt ze smrkového jehličí rozpuštěný v 96% ethanolu; Š-D ... extrakt z šípku rozpuštěný ve 20% DMSO; Š-E ... extrakt z šípku rozpuštěný v 96% ethanolu; A, B ... experiment pro daný extrakt provedený v dubletu; - ... bez nárůstu; + ... pozitivní nárůst.

Dále byla stanovena minimální inhibiční koncentrace pro *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 a výsledky stanovení byly zaznamenány v tabulce 34 - 35. Také u tohoto kmene byla schopnost testovaných extraktů inhibovat růst u použitých rozpouštědel (DMSO, ethanol) obdobná. Pro extrakty z anýzu rozpuštěného v DMSO byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace 2,5 mg/ml a pro extrakty rozpuštěné v ethanolu byla stanovena MIC 1,25 mg/ml. Stejná koncentrace byla zjištěna i v případě extraktu z badyánu rozpuštěného v DMSO. Nižší MIC byla stanovena u téhož extraktu rozpuštěného v ethanolu a to 0,625 mg/ml. Shodnou schopnost potlačit růst *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 měly

extrakty z jalovce rozpuštěné v DMSO a ethanolu, hodnota MIC odpovídala koncentraci 2,5 mg/ml. Tato koncentrace byla shodná jako v případě anýzového extraktu rozpuštěného v DMSO. Největší schopnost inhibovat růst daného kmene měly extrakty z hřebíčku, pro které byla zjištěna MIC 0,313 mg/ml (extrakty rozpuštěné v DMSO) a 0,313 - 0,625 mg/ml (extrakty rozpuštěné v ethanolu).

Tabulka 34 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 - extrakt z anýzu, badyánu, jalovce a hřebíčku

Druh extraktu		Koncentrační rozsah (mg/ml)											
		10,0	5,0	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,039	0,019	0,0097	0,0049
A-D	A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A-E	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
B-D	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
B-E	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
J-D	A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
J-E	A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H-D	A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
H-E	A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

A-D ... extrakt z anýzu rozpuštěný ve 20% DMSO; A-E ... extrakt z anýzu rozpuštěný v 96% ethanolu; B-D ... extrakt z badyánu rozpuštěný ve 20% DMSO; B-E ... extrakt z badyánu rozpuštěný v 96% ethanolu; J-D ... extrakt z jalovce rozpuštěný ve 20% DMSO; J-E ... extrakt z jalovce rozpuštěný v 96% ethanolu; H-D ... extrakt z hřebíčku rozpuštěný ve 20% DMSO; H-E ... extrakt z hřebíčku rozpuštěný v 96% ethanolu; A, B ... experiment pro daný extrakt provedený v dubletu; - ... bez nárůstu; + ... pozitivní nárůst.

Shodná hodnota MIC jako v případě extraktu z anýzu (rozpuštěného v ethanolu) a badyánu (rozpuštěného v DMSO) byla stanovena i u extraktu z muškátového oříšku rozpuštěného v DMSO (MIC 1,25 mg/ml). Dále byla zjištěna stejná schopnost potlačit růst testovaného kmene u extraktů z muškátového oříšku rozpuštěného v ethanolu a extraktu ze skořice rozpuštěné v DMSO. Hodnota MIC odpovídala koncentraci 0,625 mg/ml.

Nižší MIC byla zjištěna u extraktu ze skořice rozpuštěného v ethanolu, tedy 0,313 mg/ml. Tento extrakt byl dalším extraktem významně potlačující růst *A. cryaerophilus* UPa 2013/13. Dále pro tento kmen stanovena MIC u extraktů ze smrkového jehličí a šípku. U extraktů ze smrkového jehličí byla zjištěna hodnota MIC 1,25 - 2,5 mg/ml (extrakty rozpuštěné v DMSO) a 5,0 mg/ml (extrakty rozpuštěné v ethanolu). Posledními extrakty byly extrakty z šípku, u kterých byla zjištěna MIC pro daný kmen 1,25 mg/ml (extrakty rozpuštěné v DMSO) a 5,0 mg/ml (extrakty rozpuštěné v ethanolu).

Tabulka 35 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 - extrakt z muškátového oříšku, skořice, smrkového jehličí a šípku

Druh extraktu		Koncentrační rozsah (mg/ml)											
		10,0	5,0	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,039	0,019	0,0097	0,0049
M-D	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M-E	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S-D	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S-E	A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Sm-D	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sm-E	A	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Š-D	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Š-E	A	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

M-D ... extrakt z muškátového oříšku rozpuštěný ve 20% DMSO; M-E ... extrakt z muškátového oříšku rozpuštěný v 96% ethanolu; S-D ... extrakt ze skořice rozpuštěný ve 20% DMSO; S-E ... extrakt ze skořice rozpuštěný v 96% ethanolu; Sm-D ... extrakt ze smrkového jehličí rozpuštěný ve 20% DMSO; Sm-E ... extrakt ze smrkového jehličí rozpuštěný v 96% ethanolu; Š-D ... extrakt z šípku rozpuštěný ve 20% DMSO; Š-E ... extrakt z šípku rozpuštěný v 96% ethanolu; A, B ... experiment pro daný extrakt provedený v dubletu; - ... bez nárůstu; + ... pozitivní nárůst.

Minimální inhibiční koncentrace byla také stanovena pro *A. cryaerophilus* CCM 7050, jejíž výsledky jsou uvedeny v tabulce 36 - 37. Jak tomu bylo i u výše popsaných akrobakterů také u tohoto kmene byly zjištěny podobné výsledky MIC v rámci zvolených rozpuštědel

(DMSO, ethanol). Výsledky MIC *A. cryaerophilus* CCM 7050 byly obdobné s výsledky stanovení MIC *A. cryaerophilus* UPa 2013/13. Pro extrakty z anýzu byla stanovena MIC 0,313 - 0,625 mg/ml (extrakty rozpuštěné v DMSO) a pro extrakty rozpuštěné v ethanolu byla zjištěna MIC 0,625 mg/ml. Stejná hodnota MIC pro tento kmen byla zjištěna i u extraktu z badyánu rozpuštěného v ethanolu. U téhož extraktu rozpuštěného v DMSO byla stanovena hodnota MIC odpovídající koncentraci 0,625 - 1,25 mg/ml. Koncentrace inhibující růst daného kmene u extraktu z jalovce byla 1,25 - 2,5 mg/ml (extrakty rozpuštěné v DMSO) a 1,25 mg/ml (extrakty rozpuštěné v ethanolu). U extraktu z hřebíčku byla zjištěna nejnižší koncentrace inhibující růst tohoto kmene 0,625 mg/ml (extrakty rozpuštěné v DMSO) a v případě extraktů rozpuštěných v ethanolu byla zjištěna MIC 0,313 mg/ml.

Tabulka 36 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro *A. cryaerophilus* CCM 7050 - extrakt z anýzu, badyánu, jalovce a hřebíčku

Druh extraktu		Koncentrační rozsah (mg/ml)											
		10,0	5,0	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,039	0,019	0,0097	0,0049
A-D	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
A-E	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
B-D	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
B-E	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
J-D	A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
J-E	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
H-D	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
H-E	A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

A-D ... extrakt z anýzu rozpuštěný ve 20% DMSO; A-E ... extrakt z anýzu rozpuštěný v 96% ethanolu; B-D ... extrakt z badyánu rozpuštěný ve 20% DMSO; B-E ... extrakt z badyánu rozpuštěný v 96% ethanolu; J-D ... extrakt z jalovce rozpuštěný ve 20% DMSO; J-E ... extrakt z jalovce rozpuštěný v 96% ethanolu; H-D ... extrakt z hřebíčku rozpuštěný ve 20% DMSO; H-E ... extrakt z hřebíčku rozpuštěný v 96% ethanolu; A, B ... experiment pro daný extrakt provedený v dubletu; - ... bez nárůstu; + ... pozitivní nárůst.

Stejná hodnota MIC (0,313 mg/ml) byla zjištěna i v případě testovaných extraktů z muškátového oříšku rozpuštěného v ethanolu a extraktu ze skořice rozpuštěné v DMSO. U extraktu z muškátového oříšku rozpuštěného v DMSO byla zjištěna MIC 0,313 - 0,625 mg/ml. Nejvyšší schopnost inhibovat růst *A. cryaerophilus* CCM 7050 měl extrakt ze skořice rozpuštěný v ethanolu, u kterého byla stanovena MIC 0,156 mg/ml. Dále byla pro daný kmen stanovena MIC u extraktu ze smrkového jehličí a šípku. U extraktu ze smrkového jehličí zjištěna MIC 1,25 - 2,5 mg/ml (extrakt rozpuštěný v DMSO) a 2,5 mg/ml (extrakt rozpuštěný v ethanolu). V případě šípkového extraktu měl větší schopnost inhibovat růst tohoto kmene exxtrakt rozpuštěný v DMSO (MIC 1,25 mg/ml), než extrakt rozpuštěný v ethanolu (MIC 10mg/ml), tak jak je tomu u většiny testovaných extraktů.

Tabulka 37 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro *A. cryaerophilus* CCM 7050 - extrakt z muškátového oříšku, skořice, smrkového jehličí a šípku

Druh extraktu		Koncentrační rozsah (mg/ml)											
		10,0	5,0	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,039	0,019	0,0097	0,0049
M-D	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
M-E	A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
S-D	A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
S-E	A	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Sm-D	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sm-E	A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Š-D	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Š-E	A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

M-D ... extrakt z muškátového oříšku rozpuštěný ve 20% DMSO; M-E ... extrakt z muškátového oříšku rozpuštěný v 96% ethanolu; S-D ... extrakt ze skořice rozpuštěný ve 20% DMSO; S-E ... extrakt ze skořice rozpuštěný v 96% ethanolu; Sm-D ... extrakt ze smrkového jehličí rozpuštěný ve 20% DMSO; Sm-E ... extrakt ze smrkového jehličí rozpuštěný v 96% ethanolu; Š-D ... extrakt z šípku rozpuštěný ve 20% DMSO; Š-E ... extrakt z šípku rozpuštěný v 96% ethanolu; A, B ... experiment pro daný extrakt provedený v dubletu; - ... bez nárůstu; + ... pozitivní nárůst.

Dále pro stanovení MIC byl použit i u zástupce rodu *Cronobacter*, a to *C. sakazakii* CCM 3461. Pro tento kmen byly pro zachycení MIC použity 3 koncentrační rozsahy příslušných extraktů. Výsledky diluční metody pro tento kmen byl zaznamenán do tabulky 38 - 40. Oproti akrobakterům, u kterých byl rozdíl MIC mezi testovanými extrakty rozpuštěnými v DMSO a ethanolu minimální, byl v případě *C. sakazakii* CCM 3461 rozdíl MIC mezi rozpouštědly (DMSO, ethanol) u některých extraktů výrazný.

Shodná hodnota MIC (5,0 mg/ml) byla zjištěna u extraktů z anýzu rozpuštěného v ethanolu, muškátového oříšku rozpuštěného v ethanolu, dále extraktu z hřebíčku rozpuštěného v DMSO extraktu ze skořice také rozpuštěného v DMSO (viz tabulka 38). Nejnižší MIC pro daného kronobaktera byla zjištěna u extraktu z hřebíčku rozpuštěného v ethanolu a to 1,25 mg/ml a extraktu ze skořice rozpuštěné v ethanolu (MIC 2,5 mg/ml).

Tabulka 38 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro *C. sakazakii* CCM 3461 - extrakt z anýzu, hřebíčku, muškátového oříšku a skořice

Druh extraktu		Koncentrační rozsah (mg/ml)											
		10,0	5,0	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,039	0,019	0,0097	0,0049
A-E	A	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H-D	A	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H-E	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M-E	A	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-D	A	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-E	A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

A-E ... extrakt z anýzu rozpuštěný v 96% ethanolu; H-D ... extrakt z hřebíčku rozpuštěný ve 20% DMSO; H-E ... extrakt z hřebíčku rozpuštěný v 96% ethanolu; M-E ... extrakt z muškátového oříšku rozpuštěný v 96% ethanolu; S-D ... extrakt ze skořice rozpuštěný ve 20% DMSO; S-E ... extrakt ze skořice rozpuštěný v 96% ethanolu; A, B ... experiment pro daný extrakt provedený v dubletu; - ... bez nárůstu; + ... pozitivní nárůst.

Tabulka 39 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro *C. sakazakii* CCM 3461 - extrakt z badyánu, jalovce, smrkového jehličí a šípku

Druh extraktu		Koncentrační rozsah (mg/ml)											
		25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	0,39	0,195	0,097	0,048	0,024	0,0122
B-E	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
J-E	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Sm-E	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Š-E	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

B-E ... extrakt z badyánu rozpuštěný v 96% ethanolu; J-E ... extrakt z jalovce rozpuštěný v 96% ethanolu; Sm-E ... extrakt ze smrkového jehličí rozpuštěný v 96% ethanolu; Š-E ... extrakt z šípku rozpuštěný v 96% ethanolu; A, B ... experiment pro daný extrakt provedený v dubletu; - ... bez nárůstu; + ... pozitivní nárůst.

Pro *C. sakazakii* CCM 3461 byla stanovena MIC i u extraktů z badyánu, jalovce, smrkového jehličí a šípku rozpuštěných v ethanolu, která odpovídala u všech těchto extraktů koncentraci 1,56 mg/ml (viz tabulka 39).

U extraktů z anýzu a šípku rozpuštěných v DMSO byla zjištěna MIC pro *C. sakazakii* CCM 3461 odpovídající koncentraci 25 mg/ml. MIC daného kmene v případě extraktu z badyánu rozpuštěného v DMSO odpovídala koncentraci 12,5 mg/ml. Nejnižší schopnost inhibovat růst *C. sakazakii* CCM 3461 měla extrakty z jalovce, smrkového jehličí a šípku rozpuštěných v DMSO. V případě extraktů z jalovce a smrkového jehličí rozpuštěných v DMSO byla zjištěna MIC 50 mg/ml a u extraktu z šípku rozpuštěného v DMSO byla stanovena MIC 25 - 50 mg/ml. Výsledky diluční metody pro *C. sakazakii* CCM 3461 pro dané extrakty rozpuštěné v DMSO byly zaznamenány v tabulce 40.

Tabulka 40 Vyhodnocení mikrodiluční metody pro *C. sakazakii* CCM 3461 - extrakt z anýzu, badyánu, jalovce, muškátového oříšku, smrkového jehličí a šípku

Druh extraktu		Koncentrační rozsah (mg/ml)					
		100	50	25	12,5	6,25	3,125
A-D	A	-	-	-	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+
B-D	A	-	-	-	-	+	+
	B	-	-	-	-	+	+
J-D	A	-	-	+	+	+	+
	B	-	-	+	+	+	+
M-D	A	-	-	-	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+
Sm-D	A	-	-	+	+	+	+
	B	-	-	+	+	+	+
Š-D	A	-	-	+	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+

A-D ... extrakt z anýzu rozpuštěný ve 20% DMSO; B-D ... extrakt z badyánu rozpuštěný ve 20% DMSO; J-D ... extrakt z jalovce rozpuštěný ve 20% DMSO; M-D ... extrakt z muškátového oříšku ve 20% DMSO; Sm-D ... extrakt ze smrkového jehličí rozpuštěný ve 20% DMSO; Š-D ... extrakt z šípku rozpuštěný ve 20% DMSO; A, B ... experiment pro daný extrakt provedený v dubletu; - ... bez nárůstu; + ... pozitivní nárůst.

V dříve publikovaných studiích byly námi testované extrakty použity pro stanovení MIC pro některé campylobaktery a enterobaktery, blízké příbuzné arkobakterů a kronobakterů. Sheeladevi a Ramanathan (2012) ve své studii stanovili MIC esenciálních olejů ze skořice a hřebíčku pro *Campylobacter* spp., která odpovídala koncentraci 80 µl/ml (esenciální olej ze skořice) a 60 µl/ml (esenciální olej z hřebíčku). V dalších publikacích byla pro daný kmen *Campylobacter jejuni* stanovena MIC esenciálního oleje z jalovce, anýzu, muškátového oříšku, skořice a hřebíčku (Kovács *et al.*, 2016; Sela *et al.*, 2015; Smith-Palmer *et al.*, 1998). Kovács *et al.* (2016) stanovili MIC esenciálního oleje z hřebíčku odpovídající koncentraci 200 µg/ml. Pro testované arkobaktery nebyla z dostupné literatury dohledána publikace stanovující minimální inhibiční koncentraci námi tetovaných extraktů.

MIC některých testovaných extraktů byla dříve stanovena také pro *C. sakazakii* nebo bzla v některých publikacích MIC stanovena pro určité kmeny rodu *Enterobacter*. Al-Nabulsi *et al.* (2015) publikoval stanovení MIC esenciálního oleje ze skořice pro směs kmenů *C. sakazakii*. Nanasombat a Lohasupthawee (2005) ve své studii stanovili pro *Enterobacter aerogenes* MIC ethanolového extraktu ze skořice (MIC 166,7 mg/ml)

a hřebíčku (10,4 mg/ml) rozpuštěných v 10% DMSO. MIC zjištěná v této studii pro dané extrakty je vyšší než pro námi testovaný kmen *C. sakazakii* CCM 3461, pro který byla zjištěna MIC těchto extraktů 5,0 mg/ml. V této publikaci byla dále pro daný mikroorganismus stanovena MIC esenciálního oleje z muškátového oříšku.

MIC testovaných extraktů byla stanovena a publikována i v dalších studiích. V těchto studiích byla použita jiná metodika přípravy extraktů nebo byla MIC stanovena u esenciálních olejů. MIC byla stanovena pro vybrané grampozitivní (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) nebo gramnegativní (*E. coli*, *Yersenia enterocolitica*, *Listeria innocua*, *Proteus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) mikroorganismy, popř. pro některé kvasinky (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*) a plísně. Ozturk Yilmaz a Ercisli (2011) ve své studii stanovili MIC methanolového extraktu z šípku potlačující růst vybraných bakterií. MIC esenciálních olejů ze skořice, hřebíčku a anýzu byla stanovena ve studii Tarek *et al.* (2014). Freire *et al.* (2011) ve své publikaci stanovili MIC esenciálních olejů z anýzu a badyánu rozpuštěných v DMSO pro vybrané mikroorganismy (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus flavus*). MIC esenciálního oleje z jalovce byla také stanovena makrodiluční metodou celé řady grampozitivních a gramnegativních bakterií, popř. některých kvasinek a plísní ve studii Pepeljnjak *et al.* (2005).

5 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá antimikrobiální účinností přírodních matric na vybrané kmeny rodu *Arcobacter* a *Cronobacter*, pro které byla v teoretické části shrnuta taxonomie, morfologie, patogenita, laboratorní diagnostika a možnosti terapie. Dále byla v teoretické části zahrnuta kapitola popisující základní skupiny přírodních a syntetických látek inhibující růst mikroorganismů. Poslední kapitola teoretické části zahrnuje stručné seznámení s přírodními matricemi, které byly použity pro přípravu extraktů.

Pro testování antimikrobiální účinnosti byly připraveny extrakty z 13 přírodních materiálů, a to z anýzu, badyánu, hřebíčku, jalovce, muškátového ořechu, skořice, dále z celeru, celerové natě, červeného hlávkového zelí, červené řepy, smrkového jehličí, borovicového jehličí a šípku. Přírodní matrice byly extrahovány ve třech extrakčních činidlech a rozpuštěny v různých finálních rozpouštědlech. Antimikrobiální účinnost připravených extraktů byla testována diskovou difúzní metodou. Následně bylo vybráno 8 antimikrobiálně nejúčinnějších extraktů (rozpuštěných v DMSO a ethanolu), u kterých byla pro dané kmeny rodu *Arcobacter* a *Cronobacter* stanovena minimální inhibiční koncentrace mikrodiluční metodou.

Antimikrobiálně nejúčinnějším testovaným extraktem proti testovaným arkobakterům byly extrakty z hřebíčku a skořice. V případě extraktů z hřebíčku byla zjištěna nejvyšší antimikrobiální účinnost u extraktů rozpuštěných v ethanolu, významné zóny inhibice byly naměřeny i u extraktů rozpuštěných v Tris/HCl a DMSO. Extrakty ze skořice vykazovaly proti testovaným arkobakterům ještě vyšší antimikrobiální aktivitu, velikost naměřené zóny inhibice byla až 34 mm. Významná citlivost téhož extraktu byla zjištěna také pro extrakty rozpuštěné v Tris/HCl a DMSO (velikost zóny inhibice do 20 mm).

Významnou antimikrobiální účinnost měly také ethanolové extrakty z anýzu, badyánu, jalovce, muškátového oříšku a šípku. Obdobnou antimikrobiální účinnost proti testovaným arkobakterům měli extrakty z borovicového a smrkového jehličí. Nejnižší antimikrobiální účinnost vykazovaly extrakty z celeru a celerové natě, červeného hlávkového zelí a červené řepy. Antimikrobiální účinnost všech extraktů byla proti testovaným kronobakterům nižší než u arkobakterů. To mohlo být dáno vyšší odolností těchto bakterií. Některé extrakty neměly proti kronobakterům významou antimikrobiální účinnost.

Dále byla stanovena MIC u extraktů ze skořice, hřebíčku, anýzu, badyánu, muškátového oříšku, jalovce, smrkového jehličí a šípku. MIC byla stanovena u všech

testovaných zástupců rodu *Arcobacter* a *C. sakazakii* CCM 3461. V případě arkobakterů byla zjištěna vždy vyšší účinnost extraktu rozpuštěného v ethanolu, než extraktů rozpuštěných v DMSO. Nejvyšší schopnost inhibovat růst daných arkobakterů měly opět extrakty ze skořice a hřebíčku rozpuštěné v ethanolu a to především u kmene *A. buzleri* CCUG 30484 (MIC hřebíčkového extraktu 0,019 mg/ml, skořicového extraktu 0,156 - 0,039 mg/ml). Dalšími extrakty, které byly schopné potlačit růst arkobakterů byly extrakty z anýzu, badyánu, jalovce a muškátového oříšku a to jak rozpuštěné v DMSO tak v ethanolu. U těchto extraktů byla zjištěna MIC kolem 0,625 mg/ml. Nejnižší schopnost inhibovat růst těchto bakterií měly extrakty z šípku a smrkového jehličí.

V případě *C. sakazakii* CCM 3461 byl zjištěn větší rozdíl mezi MIC extraktů rozpuštěných v ethanolu a DMSO. Extrakty rozpuštěné v DMSO měli značně nižší schopnost potlačit růst testovaného kronobaktera. Nejvyšší schopnost inhibice měl extrakt z hřebíčku rozpuštěný v ethanolu (MIC 1,25 mg/ml), ale také extrakty z badyánu, jalovce, smrkového jehličí a šípku také rozpuštěné v ethanolu, u kterých byla zjištěna MIC 1,56 mg/ml.

Závěrem lze říci, že všechny testované extrakty měly proti vybraným mikroorganismům antimikrobiální aktivitu, což by mohlo mít potencionální využití v potravinářství, ale i medicíně.

6 SEZNAM LITERATURY

ADESIJI, Y. O., R. A. AKANNI, O. A. ADEFIOYE a S. S. TAIWO. In vitro antimicrobial activity of some plant extracts against *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*. *Acta Medica Lituanica*. 2012, **19**(1), 23 - 29.

ALISPAHIC, M., K. HUMMEL, D. JANDRESKI - CVETKOVIC, K. NÖBAUER, E. RAZZAZI - FAZELI, M. HESS a C. HESS. Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ ionization time of flight mass spectrometry analysis. *Journal of Medical Microbiology*. 2010, **59**(3), 295 - 301.

ALMAJANO, M. P., R. CARBÓ, A. LÓPEZ JIMÉNEZ a M. H. GORDON. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*. 2008, **108**(1), 55 - 63.

AL-MARIRI, A. a M. SAFI. In Vitro Antibacterial Activity of Several Plant Extracts and Oils against Some Gram-Negative Bacteria. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2014, **39**(1), 36 - 43.

AL-NABULSI, A. A., S. S. AWAISHEH, T. M. OSAILI, A. N. OLAIMAT, R. J. RAHAHALEH, F. M. AL-DABBAS, L. A. KHARABSHEH, R. GYAWALI, S. A. IBRAHIM. Inactivation of *Cronobacter sakazakii* in reconstituted infant milk formula by plant essential oils. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2015, **88**(2015), 97 - 101.

AL-TALIB, H., N. D. M. ALI, M. H. SUHAIMI, S. S. N. ROSLI, N. H. OTHMAN, N. A. S. MANSOR, A. K. S. SHAH, N. S. ARIFFIN, A. AL-KHATEEB. Antimicrobial effect of Malaysian vegetables against enteric bacteria. *Asian Pacific journal of Tropical Biomedicine*. 2016, **6**(3), 211 - 215.

APETREI, C. L., C. TUCHILUS, A. C. APROTOSOAIE, A. OPREA, K. E. MALTERUD a A. MIRON. Chemical, Antioxidant and Antimicrobial Investigations of *Pinus cembra* L. Bark and Needles. *Molecules*. 2011, **16**(9), 7773 - 7788.

ATABAY, H. I., J. E. L. CORRY a C. CEYLAN. *Encyclopedia of food safety*. Boston: Elsevier, Academic Press, 2014, 344 - 347. ISBN 9780124200326.

BARROS - VELÁZQUEZ, J. *Antimicrobial Food Packaging* [online]. Academic Press: Elsevier, 2016 [cit. 2017-02-02]. ISBN 01-280-0723-0.

BHANDARI, A., R. Y. SURAMPALLI, C. D. ADAMS, P. CHAMPAGNE, S. K. ONG, R. D. TYAGI a T. C. ZHANG. *Contaminants of Emerging Environmental Concern* [online]. Reston, Va.: American Society of Civil Engineers, 2009 [cit. 2017-01-25]. ISBN 07-844-1014-3.

BISSA, S. a A. BOHRA. Antibacterial potential of three naked-seeded (*Gymnosperm*) plants. *Natural Product Radiance*. 2008, **7**(5), 420-425.

BLAŽKOVÁ, M., B. JAVŮRKOVÁ, L. FUKAL a P. RAUCH. Immunochromatographic strip test for detection of genus *Cronobacter*. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011, **26**(6), 2828 - 2834.

BOO, H.-O., S.-J. HWANG, C.-S. BAE, S.-H. PARK, B.-G. HEO a S. GORINSTEIN. Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Industrial Crops and Products*. 2012, **40**(1), 129 - 135.

BÖHME, K., I. C. FERNÁNDEZ - NO, J. BARROS - VELÁZQUEZ, J. M. GALLARDO, P. CALO - MATA a B. CANAS. Species Differentiation of Seafood Spoilage and Pathogenic Gram-Negative Bacteria by MALDI-TOF Mass Fingerprinting. *Journal of Proteome Research*. 2010, **9**(6), 3169 - 3183.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, **94**(3), 223 - 253.

CAMMACK, R., T. K. ATTWOOD, P. N. CAMPBELL, J. H. PARISH, A. D. SMITH, J. L. STIRLING a F. VELLA. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2nd edition. Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology: Oxford University Press, 2006 [cit. 2017-01-31]. ISBN 978-0-19-852917-0.

CAI, Y., Q. LUO, M. SUN a H. CORKE. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*. 2004, **74**(2004), 2157 - 2184.

CLIFFORD, T., G. HOWATSON, D. J. WEST a E. J. STEVENSON. The Potential Benefits of Red Beetroot Supplementation in Health and Disease. *Nutrients*. 2015, **7**(4), 2801-2822.

- COLLADO, L. a M. J. FIGUERAS. Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011, **24**(1), 174 - 192.
- CORRY, J. E.L., G.D.W. CURTIS a R. M. BAIRD. *Handbook of culture media for food and water microbiology* [online]. 3rd edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2012 [cit. 2017-01-17]. ISBN 978-184-7559-166.
- COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999, **12**(4), 564–582.
- CUSHINE, T. P. T. a A. J. LAMB. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antibacterial Agents*. 2005, **26**(2), 343 - 356.
- CWIKLA, C., K. SCHMIDT, A. MATTHIAS, K. M. BONE, R. LEHMANN a E. TIRALONGO. Investigations into the Antibacterial Activities of Phytotherapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. *Phytotherapy Research*. 2010, **24**(5), 649-656.
- ČANADANOVIĆ-BRUNET, J. M., S. S. SAVATOVIĆ, G. S. ĆETKOVIĆ, J. J. VULIĆ, S. M. DJILAS, S. L. MARKOV a D. D. CVETKOVIĆ. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Beet Root Pomace Extracts. *Czech Journal of Food Sciences*. 2011, **29**(6), 575–585.
- ČERVENKA, L., I. PEŠKOVÁ, E. FOLTÝNOVÁ, I. BROŽKOVÁ a J. VYTRÁSOVÁ. Inhibitory Effects of Some Spice and Herb Extracts Against *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus*, and *A. skirrowii*. *Current Microbiology*. 2006, **53**(5), 435 - 439.
- DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012, **23**(2), 174 - 181.
- DAINTITH, J. a E. A. MARTIN. *A Dictionary of Science* [online]. 6th ed. New York: Oxford University Press, 2010 [cit. 2017-01-24]. ISBN 978-019-9561-469.
- DAVIES, J. a D. DAVIES. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010, **74**(3), 417 - 433.
- DOSTBIL, N. An Investigation of Antimicrobial Activity of Celery (*Apium graveolensis* L.). *Asian Journal of Chemistry*. 2007, **19**(7), 5518 - 5522.

DEER, D. M., K. A. LAMPEL a N. GONZÁLEZ - ESCALONA. A versatile internal control for use as DNA in real-time PCR and as RNA in real-time reverse transcription PCR assays. *Letters in Applied Microbiology*. 2010, **50**(4), 366 - 372.

DOYLE, M. P. a R. BUCHANAN. *Food microbiology: Fundamentals and Frontiers* [online]. 4th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2013 [cit. 2017-01-20]. ISBN 978-1-55581-626-1.

DRUDY, D., N. R. MULLANE, T. QUINN, P. G. WALL a S. FANNING. *Enterobacter sakazakii*: An Emerging Pathogen in Powdered Infant Formula. *Clinical Infectious Diseases*. 2006, **42**(7), 996 - 1002.

DURRANT, T. H., D. DE RIGO a G. CAUDULLO. *Pinus sylvestris* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. *European Atlas of Forest Tree Species*. 2016, , 132-133.

ENNAJAR, M., J. BOUAJILA, A. LEBRIHI, F. MATHIEU, M. ABDERRABA, A. RAIES a M. ROMDHANE. Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils and Various Extracts of *Juniperus phoenicea* L. (*Cupressaceae*). *Journal of Food Science*. 2009, **74**(7), 364-371.

FEATHERSTONE, S. *Complete Course in Canning and Related Processes: Processing Procedures for Canned Food Products, Volume 3*. 14th Edition. Elsevier, 2016. ISBN 978-0-85709-679-1.

FERA, M. T., C. GUGLIANDOLO, V. LENTINI, A. FAVALORO, D. BONANNO, E. LA CAMERA a T. L. MAUGERI. Specific detection of *Arcobacter* spp. in estuarine waters of Southern Italy by PCR and fluorescent in situ hybridization. *Applied Microbiology*. 2010, **50**(1), 65 - 70.

FERREIRA, S., M. J. FRAQUEZA, J. A. QUEIROZ, F. C. DOMINGUES a M. OLEASTRO. Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*. 2013, **162**(1), 82 - 88.

FERNANDEZ, A. a I. E. COCK. The Therapeutic Properties of *Juniperus communis* L.: Antioxidant Capacity, Bacterial growth Inhibition, Anticancer Activity and Toxicity. *Pharmacognosy Journal*. 2016, **8**(3), 273 - 280.

- FIGUERAS, M. J., A. LEVICAN, L. COLLADO, M. I. INZA a C. YUSTES. *Arcobacter ellisii* sp. nov., isolated from mussels. *Systematic and Applied Microbiology*. 2011, **34**(6), 414 - 418. DOI: 10.1016/j.syapm.2011.04.004
- FORSYTHE, S. *Cronobacter* species. *Oxoid*. 2010, **31**(1), 1 - 8.
- FREIRE, J. M., M. G. CARDOSO, L. R. BATISTA a M. A. ANDRADE. Essential oil of *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume: chemical and antimicrobial characterization. *Revista Brasileira de Plantas Medicinaiis*. 2011, **13**(2), 209 - 214.
- FRIEDMAN, M., P. R. HENIKA a R. E. MANDRELL. Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*. 2002, **65**(10), 1545-1560.
- FRIEDEMANN, M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *International Journal of Food Microbiology*. 2007, **116**(1), 1 - 10.
- GERCZEI, T. a S. PATTISON. *Biochemistry Laboratory Manual for Undergraduates - An Inquiry: Based Approach* [online]. 1. De Gruyter, 2014 [cit. 2017-01-25]. ISBN 978-3-11-041132-4.
- GIACOMETTI, F., A. LUCCHI, A. DI FRANCESCO, M. DELOGU, E. GRILLI, I. STANCAMPIANO, G. MANFREDA, G. MERALDI, A. SERRAINO. *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* Circulation in a Dairy Farm and Sources of Milk Contamination. *Applied and Enviromental Microbiology*. 2015, **81**(15), 5055 - 5063.
- GRUMEZESCU, A. M. *Fabrication and Self Assembly of Nanobiomaterials: Applications of Nanobiomaterials* [online]. 1. Elsevier, 2016 [cit. 2017-01-25]. ISBN 978-032-3415-330.
- GYAWALI, R. a S. A. IBRAHIM. Natural products as antimicrobial agents. *Food control*. 2014, **46**(1), 412 - 429.
- GUILD, S. Investigation into Novel Antimicrobials: Could yours 5-a-day be the key to outsmarting pathogens? *Youngs Scientists Journal*. 2014, **15**, 16 - 20.

GÜLCİN, I., M. OKTAY, E. KIRECCİCİ a Ö. I. KÜFREVİOĞLU. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*. 2003, **83**(3), 371 - 382.

HAFIDH, R. R., A. S. ADBULAMIR, L. S. VERN, F. A. BAKAR, F. ABAS, F. JAHANSHIRI a Z. SEKAWI. Inhibition of Growth of Highly Resistant Bacterial and Fungal Pathogens by a Natural Product. *The Open Microbiology Journal*. 2011, **5**(1), 96 - 106.

HANSON, J. R. *Chemistry and medicines: An Introductory Text* [online]. 1. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2006 [cit. 2017-01-19]. ISBN 978-0-85404-645-4.

HOUF, K., L. A. DEVRIESE, L. DE ZUTTER, J. VAN HOOF a P. VANDAMME. Susceptibility of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* to Antimicrobial Agents Used in Selective Media. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001, **39**(4), 1654 - 1656.

CHARLES, D. J. *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*. New York: Springer, 2013. ISBN 978-146-1443-094.

CHAUHAN, N. P. S. *Biocidal Polymers* [online]. 1st Edition. India: Smithers Rapra Technology, 2016 [cit. 2017-02-16]. ISBN 978-1-91024-225-4.

CHOPRA, I. a M. ROBERTS. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001, **65**(2), 232 - 260.

IBRAHIM, M. K., Z. A. MATTAR, H. H. ADBEL-KHALEK a Y. M. AZZAM. Evaluation of antibacterial efficacy of anise wastes against some multidrug resistant bacterial isolates. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017, **10**(1), 34 - 43.

INDU, M. N., A. A. M. HATHA, C. ABIROSH, U. HARSHA a G. VIVEKANANDAN. Antimicrobial activity of some of the South-Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006, **37**(2), 153 - 158.

IRKIN, R., S. ABAY a F. AYDIN. Inhibitory Effects of Some Plant Essential Oils Against *Arcobacter butzleri* and Potential for Rosemary Oil as a Natural Food Preservative. *Journal of Medicinal Food*. 2010, **14**(1/2), 1 - 6.

IVERSEN, C., A. LEHNER, N. MULLANE, J. MARUGG, S. FANNING, R. STEPHAN a H. JOOSTEN. Identification of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Journal of Clinical Microbiology*. 2007, **45**(11), 3814–3816.

JENNINGS, J. A., J. D. BUMGARDNER. *Chitosan Based Biomaterials: Volume 2 - Tissue Engineering and Therapeutics* [online]. 1st Edition Elsevier, 2017 [cit. 2017-01-19]. ISBN 978-0-08-100228-5.

JYOTHSNA, T. S. S., E. V. V. RAMAPRASAD, C. SASIKALA a C. V. RAMANA. *Arcobacter anaerophilus* sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013, **63**(12), 4619 - 4625.

JOSEPH, S., E. CETINKAYA, H. DRAHOVSKA, A. LEVICAN, M. J. FIGUERAS a S. J. FORSYTHE. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. *genomospecies 1*, recovered from a leg infection, water and food ingredients. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2012, **62**(6), 1277 - 1283.

JORGENSEN, J. H. a M. J. FERRARO. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Medical Microbiology*. 2009, **49**(11), 1749 - 1755.

KRISCH, J., R. TSERENNADMID a Cs. VÁGVÖLGYI. Essential oils against yeasts and moulds causing food spoilage. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. 2011, , 1135 - 1142.

KLANČNÍK, A., S. PISKERNIK, B. JERŠEK a S. SMOLE MOŽINA. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*. 2010, **81**(2), 121 - 126.

KOTRA, L. P., J. HODDAD a S. MOBASHERY. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000, **44**(12), 3249 - 3256.

KOVÁCS, J. K., G. HORVÁTH, M. KERÉNYI, B. KOCSIS, L. EMÖDY a G. SCHNEIDER. A modified bioautographic method for antibacterial component screening

against anaerobic and microaerophilic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 2016, **123**(2016), 13-17.

KOZŁOWSKA, M., E. GRUCZYŃSKA, I. ŚCIBISZ a M. RUDZIŃSKA. Fatty acids and sterols composition, and antioxidant activity of oils extracted from plant seeds. *Food Chemistry*. 2016, **2016**(213), 450-456.

KRÁSA, P. *PICEA ABIES* (L.) H. Karst. – smrk ztepilý / smrek obyčejný. In: *BOTANY.cz* [online]. 2007 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/picea-abies/>

LAWLEY, R., L. CURTIS a J. DAVIS. *Food Safety Hazard Guidebook* [online]. 2. Cambridge, U.K.: Royal Society of Chemistry, 2012 [cit. 2016-11-19]. ISBN 978-1-84973-381-6.

LEE, J.-H., H.-Y. YANG, H.-S. LEE a S.-K. HONG. Chemical Composition and Antimicrobial activity of Essential Oil from Cones of *Pinus koraiensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008, **18**(3), 497 - 502.

LEE, K.-G. a T. SHIBAMOTO. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chemistry*. 2001, **74**(4), 443-448.

LEE, Y. - D., R. TAE - WHA, CH. HYO - IHI a P. JOUNG - HYUN. Identification and Classification of *Cronobacter* spp. Isolated from Powdered Food in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010, **20**(4), 757 - 762.

LEE, Y. D., J. H. PARK a H. CHANG. Detection, antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Cronobacter* spp. from various foods in Korea. *Food Control*. 2012, **24**(1), 225 - 230.

LEHNER, A., T. TASARA a R. STEPHAN. Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. *International Journal of Food Microbiology*. 2005, **102**(2), 127 - 135.

LEHNER, A., C. FRICKER-FEER a R. STEPHAN. *Cronobacter: Taxonomie, Eigenschaften und Präventionsmaßnahmen*. Hamburg: Behr, 2013. ISBN 978-395-4680-405.

LEUGNEROVÁ, G. *Pinis sylvestris* L. – borovice lesní (sosna) / borovica lesná. *Botany.cz* [online]. 2007, [cit. 2017-02-22]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/pinus-sylvestris/>

LEVICAN, A., L. COLLADO, C. AGUILAR, C. YUSTES, A. L. DIÉGUEZ, J. L. ROMALDE a M. J. FIGUERAS. *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Systematic and Applied Microbiology*. 2012, **35**(3), 133 - 138.

LEVICAN, A., L. COLLADO a M. J. FIGUERAS. *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Systematic and Applied Microbiology*. 2013, **36**(1), 22 - 27.

LEVICAN, A., S. RUBIO - ARCOS, A. MARTINEZ - MURCIA, L. COLLADO a M. J. FIGUERAS. *Arcobacter ebronensis* sp. nov. and *Arcobacter aquimarinus* sp. nov., two new species isolated from marine environment. *Systematic and Applied Microbiology*. 2014, **38**(1), 30 - 35.

LI, Y., Q. CHEN, J. ZHAO, H. JIANG, F. LU, X. BIE a Z. LU. Isolation, identification and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. isolated from various foods in China. *Food Control*. 2014, **37**(1), 109 - 114.

MÉNDEZ-VILAS, A. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. 1st edition. Badajoz: Formatex Research Center, 2011. ISBN 978-849-3984-311.

MÉNDEZ - VILAS, A. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them Science, Technology and Education*. 3rd edition. Badajoz: Formatex Research Center, 2013. ISBN 978-849-4213-403.

MERGA, J. Y, A. J. H. LEATHERBARROW, C. WINSTANLEY, M. BENNETT, C. A. HART, W. G. MILLER a N. J. WILLIAMS. Comparison of *Arcobacter* Isolation Methods, and Diversity of *Arcobacter* spp. in Cheshire, United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, **77**(5), 1646 - 1650.

MIRANDA, I., J. GOMINHO, I. MIRRA a H. PEREIRA. Chemical characterization of barks from *Picea abies* and *Pinus sylvestris* after fractioning into different particle sizes. *Industrial Crops and Products*. 2012, **36**(1), 395-400.

MORENO, Y., S. BOTELLA, J. L. ALONSO, M. A. FERRÚS, M. HERNÁNDEZ a J. HERNÁNDEZ. Specific Detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* Strains in Water and

Sewage by PCR and Fluorescent In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, **69**(2), 1181 - 1186.

MOTARJEMI, Y., G. MOY, E. TODD. *Encyclopedia of Food Safety* [online]. 1. Academic Press: Elsevier, 2014 [cit. 2016-11-19]. ISBN 978-0-12-378612-8.

MOUSTAFA, M. F. a S. A. ALRUMMAN. First report about pharmaceutical properties and phytochemicals analysis of *Rosa abyssinica* R. Br. ex Lindl. (*Rosaceae*). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015, **28**(6), 2009 - 2017.

NANASOMBAT, S. a P. LOHASUPTHAWEE. Antimicrobial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against *Salmonellae* and other *Enterobacteria*. *Kmitl Science & Technology Journal*. 2005, **5**(3), 527-538.

OTHMAN, M., H. S. LOH, C. WIART, T. J. KHOO, K. H. LIM a K. N. TING. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*. 2011, **84**(2), 161 - 166.

ORHAN, D. D., B. ÖZCELİK, S. ÖZGEN a F. ERGUN. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*. 2010, **165**(6), 496 - 504.

OZTURK YILMAZ, S. a S. ERCISLLI. Antibacterial and antioxidant activity of fruits of some rose species from Turkey. *Romanian Biotechnological Letters*. 2011, **16**(4), 6407 - 6411.

PARTHASARATHY, V. A., B. CHEMPAKAM a T. J. ZACHARIAH. *Chemistry of Spices*. Wallingford: CABI, 2008. ISBN 978-184-5934-200.

PEKÁRKOVÁ, E. Nejnovější směry ve šlechtění zelenin (2): Kořenové zeleniny I. *Živa*. 2005, **2005**(1), 19-21.

PEPELJNJAK, S., I. KOSALEC, Z. KALODERA a N. BLAŽEVIĆ. Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., *Cupressaceae*). *Acta Pharmaceutica*. 2005, **55**(4), 417 - 422.

PETER, K.V. *Handbook of Herbs and Spices*. 2nd ed. Cambridge: Woodhead Pub, 2004. ISBN 978-185-5737-211.

- POATY, B., J. LAHLAH, F. PORQUERES a H. BOUAFIF. Composition, antimicrobial and antioxidant activities of seven essential oils from the North American boreal forest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015, **31**(6), 907 - 919.
- PRABUSEENIVASAN, S., M. JAYAKUMAR a S. IGNACIMITHU. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2006, **39**(6), 2 - 8.
- PROUZET-MAULÉON, V., L. LABADI, N. BOUGES, A. MÉNARD a F. MÉGRAUD. *Arcobacter butzleri*: Underestimated Enteropathogen. *Emerging Infectious Diseases*. 2006, **12**(2), 307 - 309.
- QIU, S., H. SUN, A. - H. ZHANG, H. Y. XU, G. - L. YAN, Y. HAN a X. - J. WANG. Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chines Journal of Natural Medicines*. 2014, **12**(6), 401 - 406.
- RAO, P. V. a S. H. GAN. Cinnamon: A Multifaceted Medicinal Plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014, **2014**(12), 1 - 12.
- REYES - JURADO, F., A. FRANCO - VEGA, N. RAMÍREZ - CORONA, E. PALOU a A. LÓPEZ - MALO. Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Engineering Reviews*. 2014, **3**(7), 275 - 297.
- RICKE, S. C., J. R. DONALDSON a C. A. PHILIPS. *Food Safety - Emerging Issues, Technologies, and Systems* [online]. 1st edition. Academic Press: Elsevier, 2015 [cit. 2016-11-19]. ISBN 978-0-12-800245-2.
- ROBINSON, R. K. *Encyclopedia of food microbiology* [online]. Volumes 1-3. San Diego: Elsevier, 2000 [cit. 2017-01-20]. ISBN 01-222-7073-8.
- ROBINSON, A. A., J. B. BELDEN a M. J. LYDY. Toxicity of Fluoroquinolone Antibiotics to Aquatic Organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2004, **24**(2), 423 - 430.
- ROMAN, I., A. STĂNILĂ a S. STĂNILĂ. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania. *Chemistry Central*. 2013, **7**(1), 1-10.

- ROVNÁ, K., J. PETROVÁ, M. TERENTJEVA, J. ČERNÁ a M. KAČÁNIOVÁ. Antimicrobial activity of *Rosa canina* flowers against selected microorganisms. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2015, **4**(1), 62-64.
- ROŽEK, E. Yielding of leaf celery *Apium graveolens* L. var. *secalinum* Alef. depending on the number of harvests and irrigation. *Modern Phytomorphology*. 2013, **53**(3), 83–86.
- SANDLER, T. *Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control* [online]. 1st Edition. Elsevier, 2016 [cit. 2017-02-13]. ISBN 978-0-08-100022-9.
- SELA, F., M. KARAPANDZOVA, G. STEFKOV, I. CVETKOVIKJ a E. TRAJKOVSKA-DOKIKJ. Antimicrobial activity of berries and leaves essential oils of Macedonian *Juniperus foetidissima* Willd. (*Cupressaceae*). *Macedonian pharmaceutical bulletin*. 2015, **61**(1), 3-11.
- SHAH, A. H., A. A. SALEHA, Z. ZUNITA, M. MURUGAIYAH, A. B. ALIYU a N. JAFRI. Prevalence, Distribution and Antibiotic Resistance of Emergent *Arcobacter* spp. from Clinically Healthy Cattle and Goats. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2013, **60**(1), 9 - 16.
- SHEELADEVI, A. a N. RAMANATHAN. Antibacterial Activity of Plant Essential Oils against Food Borne Bacteria. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. 2012, **3**(5), 1106 - 1109.
- SHOJAIL, A. a M. A. FARD. Review of Pharmacological Properties and Chemical Constituents of *Pimpinella anisum*. *ISRN Pharmaceutics*. 2012, **2012**(510795), 1 - 9.
- SINGH BHARAT, C. a D. PRAVEEN. Evaluation of in vitro antimicrobial potential and phytochemical analysis of spruce, cajeput and jamrosa essential oil against clinical isolates. *International Journal of Green Pharmacy*. 2016, **10**(1), 29-32.
- SINGH, G., S. M. MP DELAMPASONA a C. CATALAN. Chemical constituents, antimicrobial investigations and antioxidative potential of volatile oil and acetone extract of star anise fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006, **86**(1), 111-121.
- SIPAILIENE, A., P. R. VENSKUTONIS, A. SARKINAS a V. CYPIENE. Composition and Antimicrobial Activity of Celery (*Apium graveolens*) Leaf and Root Extracts Obtained with Liquid Carbon Dioxide. *Perspectives in Natural Product Chemistry*. 2005, (3), 71-77.

- SMITH-PALMER, A., J. STEWART a L. FYFE. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 1998, **26**(2), 118 - 122.
- SON, I., M. D. ENGLER, M. E. DERRANG, P. J. FEDORKA - CRAY a M. A. HARRISON. Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007, **29**(4), 451 - 455.
- STEGLICH, W., B. FUGMANN a S. LANG - FUGMANN. *Römpp Encyclopedia Natural Products* [online]. Stuttgart: Thieme, 2000 [cit. 2017-01-24]. ISBN 978-313-1177-117.
- STOLL, B. J., N. HANSEN, A. A. FANAROFF a J. A. LEMONS. *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants. *The Journal of Pediatrics*. 2004, **144**(6), 821 - 823.
- ŠKRINJAR, M. M. a N. T. NEMET. Antimicrobial effects of spices and herbs essential oils. *Acta periodica technologica*. 2009, **40**(40), 195 - 209.
- TAJKARIMI, M. M., S. A. IBRAHIM a D. O. CLIVER. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 2010, 21(9), 1199 - 1218.
- TALEB-CONTINI, S. H., M. J. SALVADOR, E. WATANABE, I. Y. ITO a D. C. R. DE OLIVEIRA. Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena* species. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas*. 2003, **39**(4), 403 - 408.
- TAREK, N., H. M. HASSAN, S. M. M. ABDELGHANI, I. A. RADWAN, O. HAMMOUDA a A. O. EL-GENDY. Comparative chemical and antimicrobial study of nine essential oils obtained from medicinal plants growing in Egypt. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2014, **3**(2), 149-156.
- TAYLOR, D. N., J. A. KIEHLBAUCH, C. PITARANGSI a P. ECHEVERRIA. Isolation of group 2 aerotolerant *Campylobacter* species from Thai children with diarrhea. *Journal Infectious Disease*. 1991, **163**(5), 1062 - 1067.
- TAYLOR, T. M. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality* [online]. 1st edition. Academic Press: Elsevier, 2015 [cit. 2016-11-19]. ISBN 978-1-78242-034-7.

- THANISSERY, R., S. KATHARIOU a D. P. SMITH. Rosemary oil, clove oil, and a mix of thyme-orange essential oils inhibit *Salmonella* and *Campylobacter* in vitro. *Journal of Applied Poultry Research*. 2014, **23**(2), 221-227.
- TIWARI, B. K., V. P. VALDRAMIDIS, C. P. O'DONNELL, K. MUTHUKUMARAPPAN, P. BOURKE a P. J. CULLEN. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, **57**(14), 5987–6000.
- TURKBEN, C., V. UYLASER a B. INCEDAYI. Influence of Traditional Processing on Some Compounds of Rose Hip (*Rosa canina* L.) Fruits Collected From Habitat in Bursa, Turkey. *Asian Journal of Chemistry*. 2010, **22**(3), 2309-2318.
- ULLAH, H., A. MAHMOOD, M. IJAZ, B. TADESSE a B. HONERMEIER. Evaluation of anise (*Pimpinella anisum* L.) accessions with regard to morphological characteristics, fruit yield, oil contents and composition. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2013, **7**(29), 2177-2186.
- ÜNVER, A., H. I. ATABAY, M. SAHİN a Ö. CELEBİ. Antimicrobial susceptibilities of various *Arcobacter* species. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2013, **43**(4), 548 - 552.
- VAN DEN ABEELE, A. - M., D. VOGELAERS, J. VAN HENDE a K. HOUF. Prevalence of *Arcobacter* Species among Humans, Belgium, 2008–2013. *Emerging Infectious Diseases*. 2014, **20**(10), 1731 - 1734.
- VARDANYAN, R. a V. HRUBY. *Synthesis of Best: Seller Drugs* [online]. Academic Press: Elsevier, 2016 [cit. 2017-01-31]. ISBN 978-0-12-411492-0.
- VELIĆANSKI, A. S., D. D. CVETKOVIĆ, S. L. MARKOV, J. J. VULIĆ a S. M. DJILAS. Antimicrobial activity of *Beta vulgaris* L. Potence Extract. *Acta Periodica Technologica*. 2011, **42**, 263 - 269.
- VULIĆ, J. J., E. KIRECCIC, T. N. CEBOVIĆ, G. S. ČETKOVIĆ, S. M. DJILAS, J. M. ČALADANOVIĆ-BRUNET, A. S. VELIĆANSKI, D. D. CVETKOVIĆ a V. T. TIMBAS. Antiradical, antimicrobial and cytotoxic activities of commercial beetroot pomace. *Food & Function*. 2013, **4**(5), 713 - 721.

- WANG, G. W., W. T. HU, B. K. HUANG a L. P. QIN. *Illicium verum*: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011, **136**(1), 10-20.
- WANG, Q., Z. OU, H. LEI, X. ZEING, Y. YING a W. BAI. Antimicrobial activities of a new formula of spice water extracts against foodborne bacteria. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2012, **36**(4), 374–381.
- WARE, M. Nutrition / Diet Cabbage: Health Benefits, Facts, Research. *MediLexicon* [online]. 2016 [cit. 2017-02-23]. Dostupné z: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/284823.php>
- WEERAKKODY, N. S., N. CAFFIN, M. S. TRUNER a G. A. DYKES. In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control*. 2010, **21**(10), 1408 - 1414.
- WHEAT, P. F. History and Development of Antimicrobial Susceptibility Testing Methodology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001, **48**(1), 1 - 7.
- WOJDYŁO, A., J. OSZMIĄŃSKI a R. CZEMERYYS. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*. 2007, **105**(3), 940 - 949.
- YE, Y., H. LI, N. LING, Y. HAN, X. XIAOKE, G. JINA, Q. WU a J. GAO. Identification of potential virulence factors of *Cronobacter sakazakii* isolates by comparative proteomic analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 2015, **217**, 182 - 188.
- YATES, M. V., C. H. NAKATSU, R. V. MILLER a S. D. PILLAI. *Manual of environmental microbiology* [online]. 4th Edition. Electronic: American Society for Microbiology (ASM), 2016, 2.1.1.1 - 4 [cit. 2017-1-17]. ISBN 1555816029.
- ZANKARI, E., H. HASMAN, S. COSENTINO, M. VESTERGAARD, S. RASMUSSEN, O. LUND, F. M. AARESRUP a M. VOLDBY LARSEN. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012, **67**(1), 2640 - 2644.

Zdroje použitých obrázků

Obrázek 1: ROALKVAM, I., K. DRØNEN, R. STOKKE, F. L. DAAE, H. DAHL a I. H. STEEN. Physiological and genomic characterization of *Arcobacter anaerophilus* IR-1 reveals new metabolic features in *Epsilonproteobacteria*. *Frontiers in Microbiology*. 2015, **6**(987), 1 - 12.

Obrázek 2: COLLADO, L. a M. J. FIGUERAS. Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011, **24**(1), 174 - 192.

Obrázek 3: *Cronobacter sakazakii* - fluorescenční snímek, dostupné z: http://www.vermicon.com/de/de/products/VIT_Enterobacter_sakazakii_Cronobacter-53, cit. 18. 11. 2016.

Obrázek 4: BLAŽKOVÁ, M., B. JAVŮRKOVÁ, L. FUKAL a P. RAUCH. Immunochromatographic strip test for detection of genus *Cronobacter*. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011, **26**(6), 2828 - 2834.

Obrázek 5: CUSHINE, T. P. T. a A. J. LAMB. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antibicrobial Agents*. 2005, **26**(2), 343 - 356.

Obrázek 6: JORGENSEN, J. H. a M. J. FERRARO. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Medical Microbiology*. 2009, **49**(11), 1749 - 1755.

Obrázek 7: Semena anýzu [online]. Dostupné z: www.davidkovokoreni.cz/jednodruhovekoreni/badyancely?id=100&vista=3(cit. 2017-02-14).

Obrázek 8: Badyán [online]. Dostupné z: <http://www.wday.ru/dom-eda/soh/badyan-priprava-s-tonkim-vkusom-i-stoykim-aromatom> (cit. 2017-02-15).

Obrázek 9: Borovice [online]. Dostupné z: <http://www.stenata.g6.cz/nase-znalosti?pod-rubrika=33> (cit. 2017-02-15).

Obrázek 10: Hřebíček [online]. Dostupné z: <https://www.webareal.cz/e-cigarko/eshop/6-1-Vlastni-michani/24-3-Koreni-12ml/5/173-HREBICEK> (cit. 2017-02-15).

Obrázek 11: Plody jalovce [online]. Dostupné z: <http://www.koreni.cz/obchod/jednodruhove-koreni/jalovec-cely> (cit. 2017-04-10).

Obrázek 12: Muškátový ořech [online]. Dostupné z: <http://www.koreni.cz/obchod/jednodruhove-koreni/muskatovy-orech-cely> (cit. 2017-02-15).

Obrázek 13: Skořice celá [online]. Dostupné z: <http://www.mydlovysvet.cz/cs/bylinky/2635-skorice-cela-tycinky-20-cm-6-ks.html> (cit. 2017-02-16).

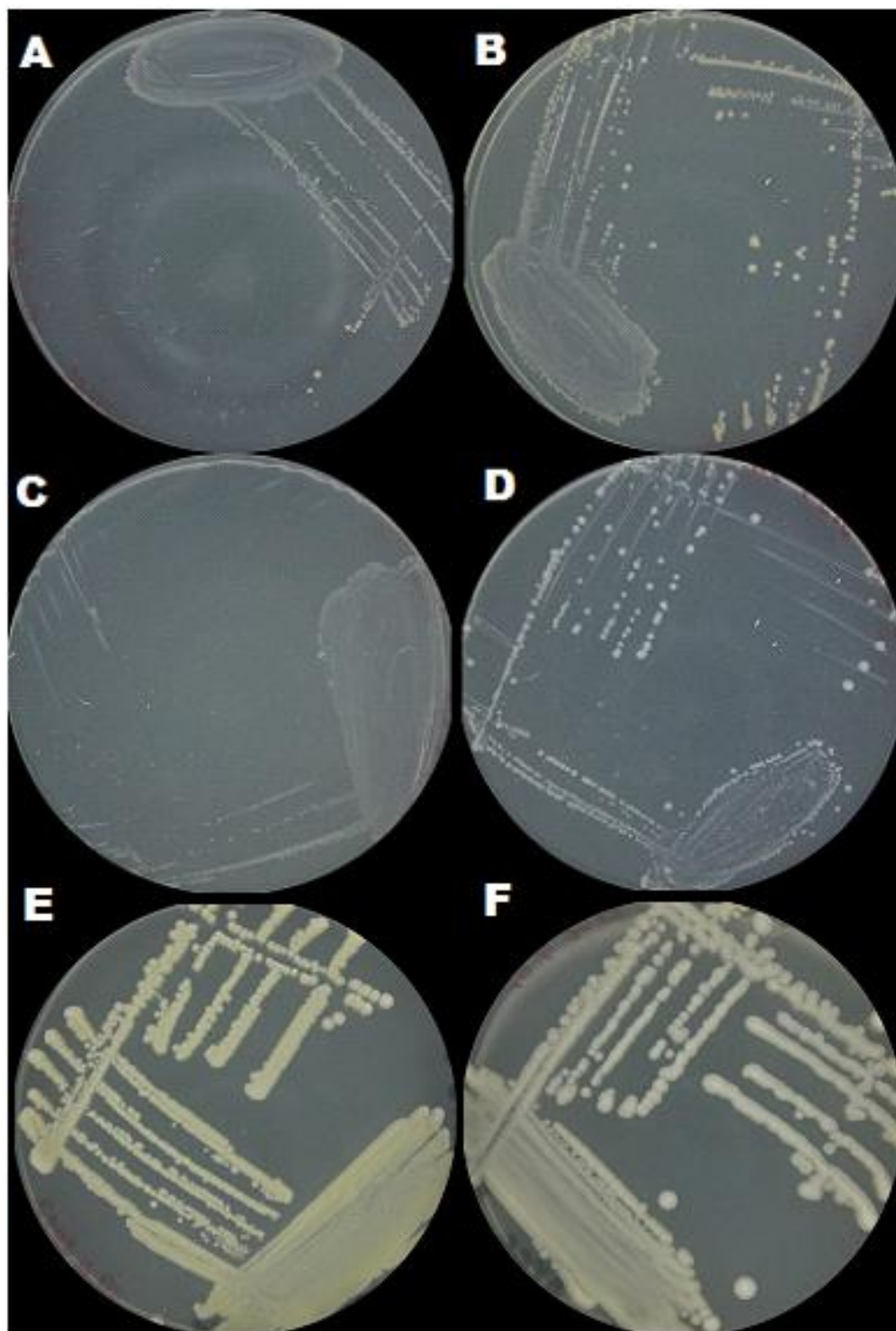
Obrázek 14: Smrkové jehličí [online]. Dostupné z: http://www.dumabyt.cz/rubriky/zahrada/pece-o-zahradu/smrk-jedli-nebo-borovici_13448.html (cit. 2017-02-16).

Obrázek 15: Šípek [online]. Dostupné z: <http://www.womanandstyle.cz/?p=3673> (cit. 2017-02-16).

7 PŘÍLOHY

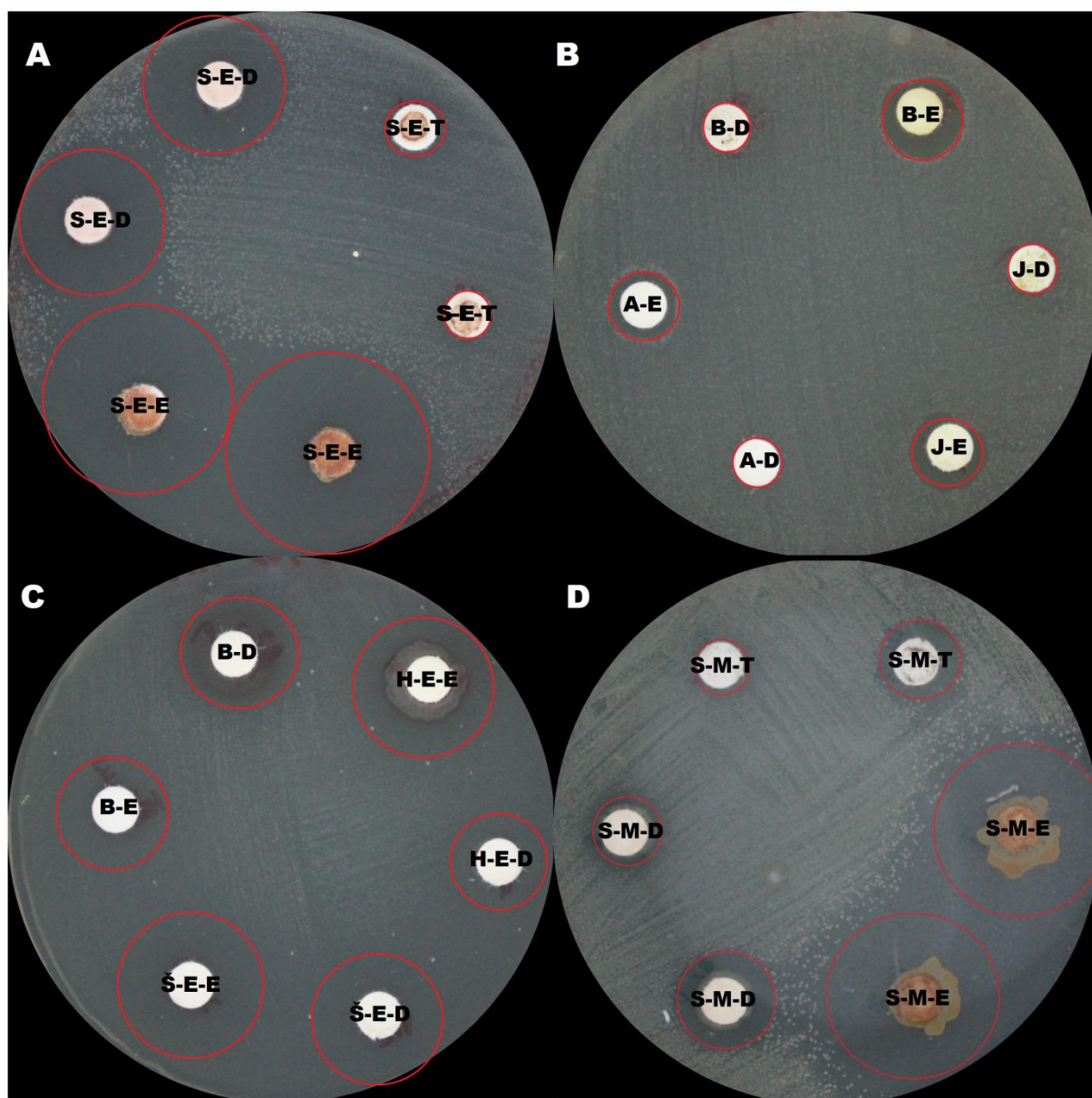
Příloha A Čisté kultury kmenů rodu <i>Arcobacter</i> a <i>Cronobacter</i> použitých k testování antimikrobiální účinnosti extraktů z přírodních matric	115
Příloha B Antimikrobiální účinnost vybraných extraktů proti testovaným arkobakterům....	116
Příloha C Antimikrobiální aktivita vybraných extraktů proti <i>C. sakazakii</i> CCM 3461 stanovených diskovou difúzní metodou	117

Příloha A Čisté kultury kmenů rodu *Arcobacter* a *Cronobacter* použitých k testování antimikrobiální účinnosti extraktů z přírodních matric



A ... 24 - 48 hodinová kultura *A. cryaerophilus* UPa 2013/13; B ... 24 - 48 hodinová kultura *A. cryaerophilus* 7050; C ... 24 - 48 hodinová kultura *A. buzleri* CCUG 30484; D ... 24 - 48 hodinová kultura *A. buzleri* LMG 10828; E ... *C. sakazakii* CCM 3461; F ... 24 hodinová kultura *C. mustjensii* ATCC 51329.

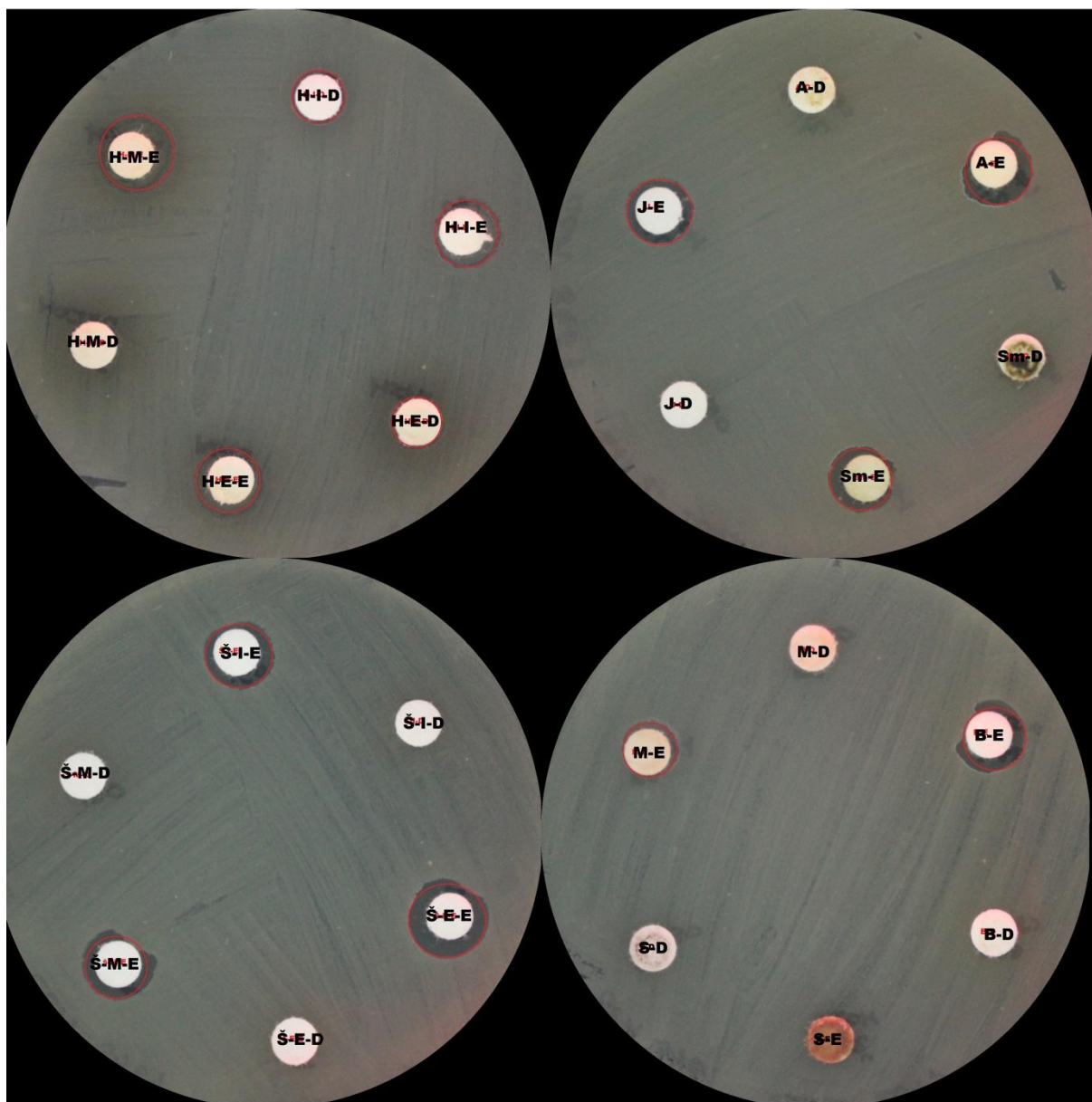
Příloha B Antimikrobiální účinnost vybraných extraktů proti testovaným arko bakterům



A ... *A. cryaerophilus* CCM 7050; **B** ... *A. buzleri* 10828; **C** ... *A. buzleri* CCUG 30484; **D** ... *A. cryaerophilus* UPa 2013/13; **S-E-E** ... ethanolový extrakt ze skořice rozpuštěný v ethanolu; **S-E-D** ... ethanolový extrakt ze skořice rozpuštěný ve 20% DMSO; **S-E-T** ... ethanolový extrakt ze skořice rozpuštěný v 1M Tris/HCl; ; **A-D** ... extrakt z anýzu rozpuštěný ve 20% DMSO; **A-E** ... extrakt z anýzu rozpuštěný v 96% ethanolu; **B-E** ... extrakt z badyánu rozpuštěný v 96% ethanolu; **B-D** ... extrakt z badyánu rozpuštěný ve 20% DMSO; **J-E** ... extrakt z jalovce rozpuštěný v 96% ethanolu; **J-D** ... extrakt z jalovce rozpuštěný ve 20% DMSO; **H-E-D** ... ethanolový extrakt z hřebíčku rozpuštěný ve 20% DMSO; **H-E-E** ... ethanolový extrakt z hřebíčku rozpuštěný v 96% ethanolu; **Š-E-E** ... ethanolový extrakt z šípku rozpuštěný v 96% ethanolu; **Š-E-D** ... ethanolový extrakt z šípku rozpuštěný ve 20% DMSO; **S-M-T** ... methanolvý extrakt ze skořice rozpuštěný v 1M Tris/HCl; **S-M-E** ... methanolvý extrakt ze skořice rozpuštěný v 96% ethanolu; **S-M-D** ... methanolvý extrakt ze skořice rozpuštěný ve 20% DMSO.

Pozn.: červené ohraničení ... průměr zóny inhibice.

Příloha C Antimikrobiální aktivita vybraných extraktů
proti *C. sakazakii* CCM 3461 stanovených diskovou difúzní metodou



H-I-D ... isopropanolový extrakt z hřebíčku rozpuštěný ve 20% DMSO; **H-I-E** ... isopropanolový extrakt z hřebíčku rozpuštěný v 96% ethanolu; **H-E-D** ... ethanolový extrakt z hřebíčku rozpuštěný ve 20% DMSO; **H-E-E** ... ethanolový extrakt z hřebíčku rozpuštěný v 96% ethanolu; **H-M-D** ... methanolový extrakt z hřebíčku rozpuštěný ve 20% DMSO; **H-M-E** ... methanolový extrakt z hřebíčku rozpuštěný v ethanolu; **A-D** ... extrakt z anýzu rozpuštěný ve 20% DMSO; **A-E** ... extrakt z anýzu rozpuštěný v 96% ethanolu; **Sm-D** ... ethanolový extrakt ze smrkového jehličí rozpuštěný ve 20% DMSO; **Sm-E** ... ethanolový extrakt ze smrkového jehličí rozpuštěný v 96% ethanolu; **J-D** ... extrakt z jalovce rozpuštěný ve 20% DMSO; **J-E** ... extrakt z jalovce rozpuštěný v 96% ethanolu; **Š-I-E** ... isopropanolový extrakt z šípku rozpuštěný v 96% ethanolu; **Š-I-D** ... isopropanolový extrakt z šípku rozpuštěný ve 20% DMSO; **Š-E-E** ... ethanolový extrakt z šípku rozpuštěný v 96% ethanolu; **Š-E-D** ... ethanolový extrakt z šípku rozpuštěný ve 20% DMSO; **Š-M-E** ... methanolový extrakt z šípku rozpuštěný v 96% ethanolu; **Š-M-D** ... methanolový extrakt z šípku rozpuštěný ve 20% DMSO; **M-E** ... extrakt z muškátového oříšku rozpuštěný v 96% ethanolu; **M-D** ... extrakt z muškátového oříšku rozpuštěný ve 20% DMSO; **B-E** ... extrakt z badyánu rozpuštěný v 96% ethanolu; **B-D** ... extrakt z badyánu rozpuštěný ve 20% DMSO; **S-E** ... ethanolový extrakt ze skořice rozpuštěný v ethanolu; **S-D** ... ethanolový extrakt ze skořice rozpuštěný ve 20% DMSO.
Pozn.: červené ohraničení ... průměr zóny inhibice.