

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

VÝSKYT MIKROORGANISMŮ VE SPERMATU KANCŮ
A ZAMEZENÍ JEJICH RŮSTU POMOCÍ PŘÍRODNÍCH EXTRAKTŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Kateřina Gančarčíková

VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Iveta Brožková, Ph.D.

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Gančarčíková**
Osobní číslo: **C17437**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Výskyt mikroorganismů ve spermatu kanců a zamezení jejich růstu pomocí přírodních extraktů**
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. Vypracujte literární rešerši cílenou na uvedenou problematiku, zaměřte se na výskyt mikroorganismů a uveďte nejčastější mikroorganismy vyskytující se v kančím spermatu.
2. Dále popište odběr spermatu, jak se sperma uchovává, skladuje a jaká ředidla se používají pro jeho stabilizaci.
3. V další části uveďte přírodní extrakty, které se využívají k inhibici mikroorganismů.

Experimentální část:

1. Proveďte mikrobiologický rozbor kančího spermatu naředěného různými ředidly.
2. Mikroorganismy izolujte a proveďte jejich identifikaci.
3. Vyroberte si extrakty z různých rostlin a bylin a zjistěte u nich antimikrobiální působení na nejčastěji izolované bakterie.
4. Vyhodnoťte působení ředících látek a extraktů a výsledky porovnejte s dostupnou literaturou.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Iveta Brožková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Ing. Petra Mořková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 1. 5. 2019

Bc. Kateřina Gančarčíková

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí diplomové práce Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za věnovaný čas mé práci, cenné rady, odborné vedení, vstřícnost a lidský přístup. Dále bych ráda poděkovala konzultantce Ing. Petře Mořkové, Ph.D., Dr. Ing. Zoře Nývltové, paní Janě Halákové, paní Drahomíře Hofmanové, paní Ing. Soně Frydrychové, Ph. D. a Výzkumnému ústavu živočišné výroby v Kostelci nad Orlicí.

Anotace

Diplomová práce se zaměřuje na mikroorganismy vyskytující se ve spermatu chovných kanců a zamezení jejich růstu pomocí přírodních extraktů. Nejdříve se zabývám kontaminací a výskytem mikroorganismů ve spermatu. Dále je v práci popsáno, jak se sperma odebírá, skladuje a jakými plnidly se sperma ředí a uchovává. V další části jsou shrnuty přírodní extrakty, které byly využity k inhibici mikroorganismů a k testování jejich toxicity na spermie. Mimo to je dále v praktické části zhodnocena i citlivost vybraných bakterií izolovaných z kančího spermatu na antibiotika.

Klíčová slova

bakterie, kančí sperma, plnidla, kontaminace, přírodní extrakty

Title

The occurrence of microorganisms in boar semen and the prevention of their growth by natural extracts

Annotation

This diploma thesis focuses on microorganisms living in sperm of breeding boars and hindering their growth by the use of natural extracts. In the first part I focus on contamination and presence of microorganisms in the sperm. The second part of the thesis describes the process of sperm extraction, storage and types of extenders used for dilution and storage. The next part summarises natural extracts which were used to inhibit the microorganisms and for testing of their toxicity to sperms. Furthermore, the practical part of the thesis evaluates the sensitivity of selected bacteria extracted from boar sperm to antibiotics.

Keywords

bacteria, boar sperm, extenders, contamination, natural extracts

Obsah

Anotace	6
Seznam ilustrací	10
Seznam tabulek	11
Seznam grafů.....	12
Seznam zkratk	13
1 Teoretická část	16
1.1 Ejakulát.....	16
1.2 Kvalita spermatu	17
1.3 Kontaminace.....	17
1.4 Výskyt mikroorganismů	19
1.4.1 Izolace a identifikace bakterií	19
1.4.2 Počet bakterií	20
1.5 Skladování a plnidla spermatu	20
1.5.1 Skladování	20
1.5.2 Přídavné látky	20
1.6 Mikroorganismy v kančím spermatu.....	21
1.6.1 <i>Escherichia coli</i>	21
1.6.2 <i>Pseudomonas</i>	23
1.6.3 <i>Enterobacter</i>	24
1.7 Přírodní extrakty.....	25
1.7.1 Celer.....	28
1.7.2 Máta	29
1.7.3 Petržel	30
1.7.4 Zázvor	30
1.7.5 Rozmarýn.....	31

1.7.6	Galgán.....	31
1.7.7	Majoránka.....	33
1.7.8	Astaxanthin.....	34
1.7.9	Červená řepa.....	35
1.7.10	Rakytník.....	36
2	Experimentální část.....	37
2.1	Chemikálie, testované látky, přístroje a další pomůcky.....	37
2.1.1	Chemikálie, testované látky.....	37
2.1.2	Přístroje.....	37
2.1.3	Další pomůcky.....	38
2.2	Příprava médií a kultivačních roztoků.....	38
2.2.1	Fyziologický roztok.....	38
2.2.2	Krevní agar.....	38
2.2.3	Mueller Hintonův agar s krví.....	38
2.3	Stanovení citlivosti bakterií na testované látky.....	39
2.4	Identifikace bakterií.....	40
2.5	Příprava přírodních extraktů.....	40
2.6	Stanovení citlivosti mikroorganismů na přírodní látky.....	41
2.7	Stanovení citlivosti mikroorganismů na antibiotika.....	41
3	Výsledky.....	42
3.1	Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 1.....	42
3.2	Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 2.....	44
3.3	Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 3.....	46
3.4	Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 4.....	48

3.5	Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 5.....	50
3.6	Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 6.....	51
3.7	Výsledky identifikace bakterií pomocí MALDI-TOF	53
3.8	Přírodní extrakty.....	54
3.8.1	<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>	57
3.8.2	<i>Corynebacterium confusum</i>	58
3.8.3	<i>Corynebacterium</i> sp.....	58
3.8.4	<i>Rothia nasimurium</i>	59
3.8.5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	59
3.8.6	<i>Bacillus</i> sp.....	59
3.8.7	<i>E. coli</i>	59
3.8.8	<i>Proteus</i> sp.	59
3.8.9	<i>E. coli</i> CCM 3954.....	59
3.8.10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	59
3.8.11	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953.....	60
3.9	Počty mikroorganismů ve spermatu za použití přírodních extraktů soubor 7...62	
3.10	Test toxicity přírodních extraktů na motilitu spermií	65
3.11	Antimikrobiální citlivost vybraných bakterií na antibiotika	66
4	Diskuze	68
5	Závěr	75
6	Zdroje.....	76
7	Příloha	89

Seznam ilustrací

Obrázek 1: Vzorky kančího spermatu ředěné BTS bez ATB (foto autor)	16
Obrázek 2: Buňky <i>Escherichia coli</i> rastrovací elektronový mikroskop (Ciociola <i>et al.</i> , 2018)	22
Obrázek 3: Biofilm <i>Pseudomonas aeruginosa</i> rastrovací elektronový mikroskop (Deligianni <i>et al.</i> , 2010)	23
Obrázek 4: <i>Enterobacter</i> sp. rastrovací elektronový mikroskop (Feng <i>et al.</i> , 2014)	24
Obrázek 5: Chemická struktura 1,8 - cineolu (Mayachiew a Devahastin, 2008).....	32
Obrázek 6: (A) <i>Staphylococcus aureus</i> ošetřený ethanolem, (B) destilovanou vodou, (C - F) ethanolovým extraktem z galgánu (Oonmetta-aree <i>et al.</i> , 2006)	33
Obrázek 7: Struktura astaxanthinu (Weintraub <i>et al.</i> , 2017).....	35
Obrázek 8: 60% ethanol, 10x, 100x, 1000x a 10 000x ředěný astaxanthin, neředěná směs s 5% astaxanthinu, M-H agar, <i>Bacillus</i> sp., kultivace při 37 °C, 24 h (foto autor).....	56
Obrázek 9: 60% ethanol, 10x, 100x, 1000x a 10 000x ředěný astaxanthin, neředěná směs s 11 % astaxanthinu, M-H agar, <i>Bacillus</i> sp., kultivace při 37 °C, 24 h (foto autor).....	57
Obrázek 10: 60% ethanol, extrakt z máty, rozmarýnu, majoránky, rakytníku, M-H agar, <i>Corynebacterium confusum</i> , kultivace při 37 °C, 24 h (foto autor).....	58
Obrázek 11: 60% ethanol, extrakt z máty, rozmarýnu, majoránky, rakytníku, M-H agar, <i>Corynebacterium</i> sp., kultivace při 37 °C, 24 h (foto autor).....	58
Obrázek 12: 60% ethanol, extrakt z máty, rozmarýnu, majoránky, rakytníku, M-H agar, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955, kultivace při 37 °C, 24 h (foto autor)	60
Obrázek 13: 60% ethanol, extrakt z řepy, zázvoru, galgánu, petržele, celeru, M-H agar, <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953, kultivace při 37 °C, 24 h (foto autor)	60
Obrázek 14: 60% ethanol, 10x, 100x, 1000x a 10 000x ředěný astaxanthin, neředěná směs s 11 % astaxanthinu, M-H agar, <i>Staphylococcus aureus</i> CCM3953 kultivace při 37 °C, 24 h (foto autor)	61
Obrázek 15: Testování antimikrobiální citlivosti u bakterie <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953, FOX, CLI, ERY, SXT, TE, CIP, M-H agar, 37 °C, 24 h (foto autor)	67

Seznam tabulek

Tabulka 1: Příklady složení přídatných látek komerčně používaných pro kapalné uchování kančího spermatu, všechna plnidla jsou doplněna o antibiotika (300 mg gentamycinu nebo 1 g neomycinsulfátu na 1 l plnidla) (Johnson <i>et al.</i> , 2000).....	21
Tabulka 2: Čtyři příklady běžné bakteriální flory izolované z kančího spermatu (Althouse a Lu, 2005)	25
Tabulka 3: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 1.....	42
Tabulka 4: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 2.....	44
Tabulka 5: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 3.....	46
Tabulka 6: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 4.....	48
Tabulka 7: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 5.....	50
Tabulka 8: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 6.....	51
Tabulka 9: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů	54
Tabulka 10: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů	55
Tabulka 11: Vyhodnocení difúzní diskové metody u směsi s 5 % astaxanthinu	56
Tabulka 12: Vyhodnocení difúzní diskové metody u směsi s 11 % astaxanthinu ...	57
Tabulka 13: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití přírodních extraktů soubor 7.....	62
Tabulka 14: Toxicita přírodních extraktů v čase na kančí spermie.....	65
Tabulka 15: Antimikrobiální citlivost vybraných bakterií na antibiotika	66

Seznam grafů

Graf 1: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 1.....	43
Graf 2: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 2.....	45
Graf 3: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 3.....	47
Graf 4: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 4.....	49
Graf 5: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 6., kančí sperma č. 1.....	52
Graf 6: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 6., kančí sperma č. 2.....	53
Graf 7: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití přírodních extraktů soubor 7., extrakt zázvoru a máty.....	63
Graf 8: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití přírodních extraktů soubor 7., extrakt rozmarýnu a galgánu.....	64

Seznam zkratek

A	Astaxanthin
AK	Amikacin
AMC	Aztreonam
AMP	Ampicillin
ATM	Amoxicillin/klavulanová kyselina
<i>B.</i>	rod <i>Bacillus</i>
BTS	z angl. beltsville thawing solution
C	Chloramphenicol
CCM	Czech Collection of Microorganisms (CCM), Česká sbírka mikroorganismů (CCM), Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta
CFR	Cefadroxil
CFU	z angl. colony forming units, jednotky tvořící kolonie
CIP	Ciprofloxacin
CN	Gentamicin
CXM	Cefuroxime
DA	Clindamycin
E.	Erythromycin
<i>E.</i>	rod <i>Escherichia</i>
<i>Ent.</i>	rod <i>Enterobacter</i>
FOX	Cefoxitin
FEP	Cefepime
GC-MS	Gas chromatography–mass spectrometry plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
HPLC	High-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IMP	Imipenem

<i>K.</i>	rod <i>Klebsiella</i>
<i>L.</i>	rod <i>Listeria</i>
LEV	Levofloxacin
LPS	lipopolysacharid
ME-S	ředidlo modified extender short – term
P	Penicillin G
<i>P.</i>	rod <i>Pseudomonas</i>
QS	z angl. Quorum sensing

MALDI-TOF MS Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem

M-H	Mueller-Hintonův agar
MRSA	Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S.</i>	rod <i>Staphylococcus</i>
SXT	Sulphamethoxazole/trimethoprim
TE	Tetracycline
TGC	Tigecycline
RFK	Reaktivní formy kyslíku
VA	Vancomycin
W	Trimethoprim

Úvod

Kontaminace ejakulátu bakteriemi představuje riziko pro chov prasat a to jak pro samce, tak i pro samice. Proto se prasnice inseminují uměle a díky tomu je možné kontrolovat přenos bakterií do spermatu. Jedním z možných způsobů jak zabránit kontaminaci, je přidání antibiotik do ejakulátu. Avšak vlivem rostoucí rezistence bakterií na antibiotika je snaha nahradit je jinými látkami, například přírodními extrakty.

Cílem této práce je vyhodnocení působení ředících látek a extraktů na bakterie vyskytující se v kančím spermatu. Nejdříve se zaměřím na ejakulát a jeho parametry, kterými se posuzuje kvalita. Následně se budu zabývat různými možnostmi kontaminace spermatu, analýzou mikrobů vyskytujících se v ejakulátu, jeho skladováním a plnidly. Dále budou popsány tři mikroorganismy, které se ve spermatu vyskytují, ovlivňují jeho parametry a tím pádem mají negativní vliv na chov prasat. V druhé části teorie uvedu deset vybraných přírodních extraktů z bylin. Popíši jejich výhody použití a možné inhibiční účinky na různé druhy bakterií.

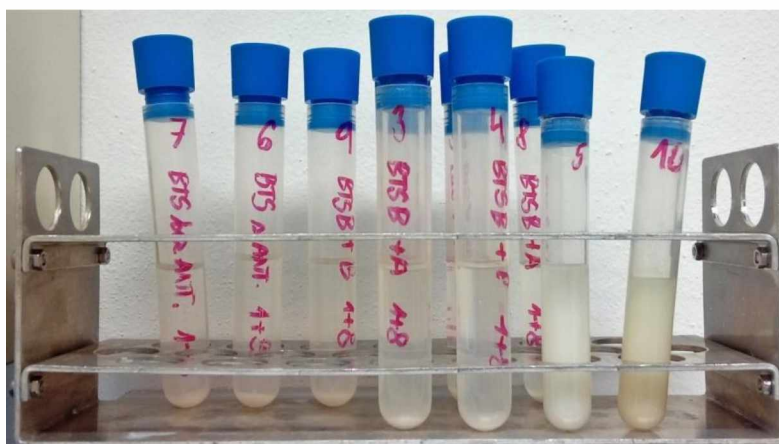
1 Teoretická část

1.1 Ejakulát

Tato tekutina se tvoří ve varlatech, nadvarlatech a v příslušných pohlavních žlázách a dělí se na buněčnou část, tedy spermie a nebuněčnou část, tedy semennou tekutinu z přídatných žláz (Bonet *et al.*, 2013; Hollandbeck a Foley, 1964). Kančí semenná tekutina slouží k pohybu spermií. Jedná se o transportní médium, které zabraňuje ztrátě spermií ze samičího rozmnožovacího traktu (Hollandbeck a Foley, 1964).

Průměrný objem kančího spermatu se udává obvykle mezi 125 - 500 ml tekutiny. Sperma je málo koncentrované, ale má velký objem (Hollandbeck a Foley, 1964), který se může měnit a to například v důsledku stáří kance (Bonet *et al.*, 2013). Sperma může být vzhledem k objemu vyčerpáno, ale do dne či do dvou dní se obnovuje (Hollandbeck a Foley, 1964). Dělí se podle složení na prespermatickou, spermatickou a postspermatickou část (Bonet *et al.*, 2013).

Pro spermie je nutný zdroj cukrů a to v podobě monosacharidů, ale i složitějších cukrů, díky nimž se spermie mohou pohybovat. Hlavní cukry, které slouží jako zdroj energie, jsou glukóza a fruktóza. V ejakulátu jsou dva energetické zdroje pro spermie, jeden se nachází přímo v nich a druhý v semenné tekutině. Jak spermie, tak mikroorganismy, které se mohou ve spermatu vyskytovat, využívají glukózu jako zdroj energie. Avšak metabolismem cukrů vznikají kyseliny, které ovlivňují pH spermatu. Fyziologická hodnota pH kančího spermatu se pohybuje mezi 7,2 – 7,5. Změna pH je pro spermie fatální, jelikož vychýlení od fyziologické hodnoty způsobí ztrátu životaschopnosti spermií, jehož následkem je snížení kvality spermatu a tudíž i plodnosti (Ciornei *et al.*, 2008).



Obrázek 1: Vzorčky kančího spermatu ředěné BTS bez ATB (foto autor)

1.2 Kvalita spermatu

Plodnost kanců je ovlivňována kvalitou spermatu (Ciornei *et al.*, 2008), která se hodnotí na základě objemu ejakulátu, aglutinace spermií, jejich koncentrace, životaschopnosti, celkového počtu spermií, jejich pohyblivosti (Goldberg *et al.*, 2013), morfologie spermií (Pinart a Puigmulé, 2013), dále také reakce a průniku akrozomu do oocyty a celistvosti plazmatické membrány. Buněčná homeostáza je zachována pomocí této plazmatické membrány. Integrita plazmatické membrány udržuje spermie uvnitř samčího rozmnožovacího traktu živé a zachovává tak fertilitu, je to jeden z hlavních faktorů v posuzování kvality ejakulátu. Ztráta buněčné homeostázy poškozením integrity membrány a ztráta motility odlišuje živé spermie od mrtvých (Sutkeviciene *et al.*, 2009).

Kančí reprodukce může být ovlivněna různými faktory, jako je například jejich stáří, chov a velikost varlat, dále také teplota okolí, strava, sociální prostředí a pravidelnost odběru ejakulátu (Pinart a Puigmulé, 2013). Při makroskopickém hodnocení ejakulátu se hodnotí jeho pach a barva. Na barvě se posuzuje čírost, příměs sraženin, krve, u pachu se sleduje, zdali je pach typický anebo s cizím pachem (Úbeda *et al.*, 2013). Fertilita kanců se hodnotí na základě počtu porodů a na počtu živě narozených selat (Pinart a Puigmulé, 2013).

Kančí sperma by se mělo pravidelně testovat, aby se mohly sledovat případné změny a odhalit příčiny těchto změn. Tyto změny mohou být způsobeny manipulací ejakulátu zaměstnanci, kvalitou vody, dodržováním správného postupu při odběru ejakulátu a dalšími vlivy (Baracaldo a Ward, 2009). Během sezóny se reprodukce kanců mění, protože se mění kvalita ejakulátu, plodnost a sexuální chování. Vysoké teploty mají nepříznivý vliv na varlata, jelikož způsobují poruchy spermatogeneze a snižují tak hladinu testosteronu. Ideálně by se sperma mělo odebírat po 2 – 5 dnech, protože pokud by se sperma odebíralo častěji, snížil by se jeho objem, koncentrace a pohyblivost spermií. U kanců je nutno zjišťovat velikost varlat a vybírat je dle velikosti do umělého chovu. Velikost varlat odpovídá tvorbě spermií, délce reprodukčního období, testosteronu a libidu (Pinart a Puigmulé, 2013).

1.3 Kontaminace

Sperma se zpracovává podle hygienických postupů, které zahrnují i přidání antibiotik. Je potřeba udržovat laboratoř a pomůcky sterilní (Baracaldo a Ward, 2009) vzhledem k možné kontaminaci, na které záleží úroveň kvality ejakulátu. Odběr spermatu

je kvůli kontaminaci rizikový, proto by se mělo sperma průběžně hodnotit, aby se odhalila slabá místa v procesu umělého oplodňování (Goldberg *et al.*, 2013). Kontaminované sperma má vliv na motilitu a vitalitu spermií, plodnost a mimo jiné vyvolává buněčnou smrt a poškozuje akrozom (Baracaldo a Ward, 2009).

Sperma je ohrožováno kromě bakterií v čerstvém spermatu také opožděným chlazením spermatu, zvýšenou teplotou při skladování a přepravě, při delším skladování a při špatně navolených plnidlech. Kombinace přídatných látek bohatých na živiny (Schulze *et al.*, 2016) a příznivé teploty 16 – 17 ° C (Bresciani *et al.*, 2014) může zvyšovat nárůst bakterií. Tyto přídatné látky udržují osmolaritu a pH v mezích 6,8 a 7,2, což bakteriím prospívá (Schulze *et al.*, 2016).

Je důležité, aby se při odběru spermatu dodržovala očista předkožky (Goldberg *et al.*, 2013). Kančí předkožka totiž obsahuje divertikl, ve kterém se může zadržovat moč, bakterie, staré buňky a ejakulát. Tento váček se tudíž může lehce stát zdrojem kontaminace. Objem divertiklu se pohybuje mezi 20 a 100 ml, ale průměrně to je 60 – 70 ml (Althouse a Evans, 1994). Riziko kontaminace ejakulátu stoupá v případě, že se tekutina z předkožky dostane do odebraného ejakulátu. Studie Goldberga *et al.* (2013) zjistila, že sperma bylo méně kontaminované, když byl divertikl řádně ošetřen a že správné držení pyje zabrání stékání tekutiny z divertiklu do odebraného ejakulátu. Při správné očištění a držení pyje bylo 37,7 % ejakulátu bez bakterií oproti ostatním odběrům, kde to bylo pouhých 7,5 %, 3,6 % a necelé 2 %. Předpokládá se, že čím je kanec starší, tím má širší předkožku a tím je větší šance kontaminovat ejakulát. Ve výzkumu bylo prokázáno, že u starších kanců je větší míra kontaminace ejakulátu kvůli kapající tekutině do spermatu až o 30 % v porovnání s mladšími kanci (16 %).

Dále je zapotřebí kvůli možné kontaminaci zkrátit ochlupení na předkožce, zaměstnanci si musí brát čisté rukavice a odebrat správnou frakci ejakulátu. Riziko kontaminace ejakulátu stoupá v případě, když samotný odběr trvá déle jak 7 minut, zaměstnanci si nemění rukavice, ochlupení je delší jak 1 cm a když jsou kanci starší víc jak 18 měsíců. Vzorky, kde byl odběr proveden špinavými rukavicemi a s kapající tekutinou do ejakulátu byly vždy kontaminovány. Vzorky odebrané správným postupem byly kontaminovány jen z 39,6 %. Při odběru vzorků, který trval méně jak 7 minut, bylo pouze 19 % ejakulátu kontaminováno, oproti více jak 7 minutovému odběru, kde bylo kontaminováno 34 % vzorků. Také když se zaměstnanci nechovají asepticky, 70 % vzorků spermatu má více jak 220 CFU/ml. Sperma bylo méně kontaminované, když byli kanci čišťeni 2 dny před odběrem, byly použity čisté rukavice a když byla správná frakce

odebrána přímo do nádoby. Nevýhodou odebírání frakce obsahující více spermií je ta, že je v této frakci obsaženo méně plazmy. Tato plazma je důležitá kvůli naředění spermatu v reprodukčním ústrojí samic. Riziko kontaminace se výrazně snižuje se zkušenostmi a poučením zaměstnanců.

Zhodnocení efektů rizik na stupeň znečištění spermatu se provádí po rozdělení spermatu na dvě části a to dle počtu jednotek tvořících kolonie pozorovaných při mikrobiologické analýze. Jedna skupina spermatu obsahuje méně jak 220 CFU/ml a druhá více jak 220 CFU/ml bakterií, v každé skupině by mělo být přibližně stejně vzorků (Goldberg *et al.*, 2013).

Kontaminace se dělí na dva typy a to na zvířecího a nezvířecího původu. Do zvířecího původu se řadí divertikl, fekálie, ochlupení, výměšky dýchacího ústrojí a pokožka. Do druhé skupiny patří špinavé rukavice, kontaminovaná voda, nesterilní nástroje, nevyhovující hygienické podmínky a lidský faktor. Vzhledem k tomu, že močová trubice u samců slouží k rozmnožování i vyměšování zároveň, může být ejakulát kontaminován snadněji některými mikroorganismy vylučovací soustavy. Zároveň je blízko močové trubice také intestinální trakt a proto sperma může být kontaminováno i mikroby střeva (Martín *et al.*, 2010). Vzhledem k těmto širokým možnostem kontaminace by mělo být dbáno na to, aby se respektovaly hygienické postupy při odběru a zpracování ejakulátu. Antimikrobiální látky nejsou na 100 % účinné (Gączarzewicz *et al.*, 2016) a to i přes jejich velké využívání. Studie potvrdila výskyt bakterií (14,7 - 31, 2 %) v ejakulátu s plnidly (Schulze *et al.*, 2015).

1.4 Výskyt mikroorganismů

1.4.1 Izolace a identifikace bakterií

Příklad postupu podle Schulze *et al.* (2015) je takový, že jak nativní sperma, tak sperma s plnidlem se očkuje na agar běžně používaný v mikrobiologické analýze. Navíc se ejakulát s plnidlem pipetuje do tekuté živné půdy. Ty se inkubují při 37 °C v aerobním prostředí. Po 24 hodinách se kontrolují, zdali na nich nenarostly kolonie bakterií a pokud ne, odpovídající živná tekutá půda se nanese na Columbia agar s ovčí krví. Pevná půda se dále inkubuje po dobu 5 dní za pokojové teploty a průběžně se kontroluje. Každý typ narostlé kolonie se přenesse na nový agar a identifikuje buď biochemickými testy, nebo komerčními sety.

Identifikace bakterie spočívá v posouzení růstu kolonií, barvením dle Grama, zkoumá se morfologie buněk, produkce enzymů a v neposlední řadě také schopnost koagulace a produkce hemolyzinu (Bresciani *et al.*, 2014).

1.4.2 Počet bakterií

K určení bakteriální kontaminace se provede série ředění vzorku (CFU/ml). Každé ředění se naočkuje v dubletu a nechá se inkubovat při 37 °C v aerobním prostředí. Po 24 a 48 hodinách se kolonie bakterií spočítají (Schulze *et al.*, 2015).

1.5 Skladování a plnidla spermatu

1.5.1 Skladování

Kvůli růstu bakterií a zhoršení kvality spermatu vlivem jeho znehodnocení se musí dbát na správný odběr, skladování a distribuování odebraného kančího spermatu před inseminací. Do spermatu se přidávají látky, které podporují růst mikrobů a které jsou rezistentní vůči antibiotikům (Kuster a Althouse, 2016). Sbírá se druhá a třetí část spermatu, protože tyto části obsahují nejvíce spermii. Takto naředěné sperma je v plastových zkumavkách převezeno do příslušné laboratoře při teplotě 17 °C v transportním boxu. Po filtraci spermatu přichází ředění a následné obohacení o antibiotika. Spermie se uchovávají při této teplotě v kapalném stavu, aby nedošlo k jejich poškození vlivem chladu (Schulze *et al.*, 2016). Testování spermatu na mikroby se obvykle provádí 2 – 3 dny po odběru (Úbeda *et al.*, 2013).

1.5.2 Přídavné látky

Přídavné látky se v živočišné výrobě prasat používají nejen pro zachování životaschopnosti spermii, ale také pro udržení jejich motility. Zároveň se od přídavných látek požaduje zamezení růstu bakterií v ejakulátu. Neméně důležitý je také požadavek na pufrování pH a tím pádem neutralizaci metabolických odpadů (Vyt *et al.*, 2004).

Látky, které se přidávají ke spermatu můžeme rozdělit podle jejich konzervační kapacity a to na krátkodobé (1 - 2 dny), střednědobé (3 - 4 dny) a dlouhodobé (7 – 10 dní). Dlouhodobé přídavné látky jsou výhodnější pro hodnocení kvality ejakulátu po třech dnech uchovávání při 17 °C. Ale pro inseminaci do dvou dnů se ejakulát ředí střednědobým plnivem, protože to vede k vyšší porodnosti a k většímu počtu živě narozených selat (Karageorgiou *et al.*, 2016). Plnidla se používají i v případě zmrazení kančího ejakulátu (Wasilewska *et al.*, 2016), protože mrazením a rozmrazováním spermatu může dojít k jeho

poškození. Nevýhodou tohoto postupu je tedy vysoká citlivost spermií na nízké teploty, avšak výhodou je zamezení přenosu bakterií. Kryokonzervace se kvůli nevýhodám běžně v praxi neprovádí, avšak při použití molekul, jako například cholesterolu, které by chránily plazmatickou membránu před chladem, by bylo možné kančí ejakulát takto uchovávat (Bailey *et al.*, 2008).

Konkrétními příklady plnidel jsou BTS (Beltsville thawing solution, rozmrazovací roztok Beltsville) (Pinart *et al.*, 2016); Androhep (Frydrychová *et al.*, 2010); ME-S (modified extender short-term, modifikované krátkodobé plnidlo) (Bresciani *et al.*, 2014).

Tabulka 1: Příklady složení přídatných látek komerčně používaných pro kapalné uchování kančího spermatu, všechna plnidla jsou doplněna o antibiotika (300 mg gentamycinu nebo 1 g neomycinsulfátu na 1 l plnidla) (Johnson *et al.*, 2000)

Složka (g/l)	Rozmrazovací roztok Beltsville	Kiev	Illinoiské ředidlo variabilní teploty	Schonow		Zorlesco	Androhep
				I	II		
glukóza	37	60	3	40	3	11,5	26
EDTA	1,25	3,7		2		2,3	2,4
citronan sodný	6	3,7	24,3	3,7	18	11,7	8
hydrogenuhličitan sodný	1,25	1,2	2,4	1,2	2,1	1,25	1,2
chlorid draselný	0,75		0,4		0,4		
TRIS						6,5	
HEPES							9
kyselina citronová						4,1	
cystein			0,05			0,1	
BSA						5	2,5

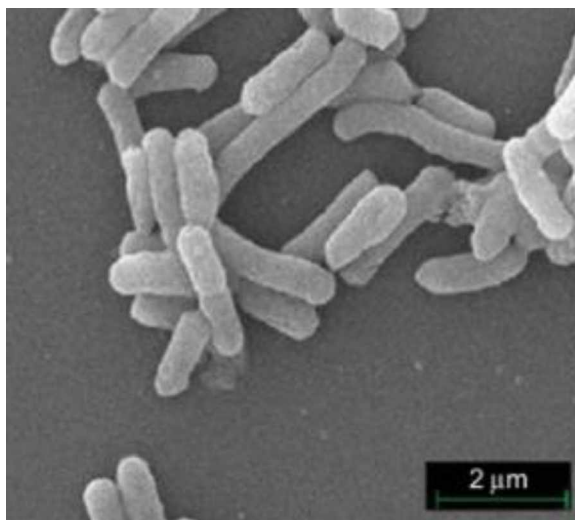
1.6 Mikroorganismy v kančím spermatu

1.6.1 *Escherichia coli*

E. coli patří do čeledi *Enterobacteriaceae*, v kančím spermatu se jedná o nejvíce se vyskytující bakterii. Objevuje se ve více jak polovině kontaminovaných vzorcích spermatu (Bresciani *et al.*, 2014; Martín *et al.*, 2010). Způsobuje průjem, mastitidu, infekce urogenitálního systému, meningitidu, artritidu. *E. coli* je důležitou bakterií, protože způsobuje ekonomické ztráty v chovech prasat (Schierack *et al.*, 2007). *E. coli* produkuje cytokiny, které spouští tvorbu RFK (reaktivní formy kyslíku) tyto kyslíkové radikály způsobují lipidovou peroxidaci plazmatické membrány (Pinart *et al.*, 2016; Murphy, 2009). *E. coli* také produkuje látky působící jako spermicid (Pinart *et al.*, 2016). Tímto způsobem se snižuje pohyblivost a vitalita spermií. Tento patogen produkuje ve své stěně lipopolysacharidy (LPS), které působí jako endotoxiny a tlumí pohyblivost bičíku spermií

(Pinart *et al.*, 2016). Další látky, které mají negativní vliv na spermie jsou hemolyziny, peptidoglykanové fragmenty, shiga-like toxiny (Bussalleu *et al.*, 2011). Ekonomické ztráty způsobují enterotoxigenní a verotoxigenní kmeny, které vyvolávají průjmy a tím pádem úmrtí selat. Enterotoxinogenní kmen produkuje fimbriální adheziny a enterotoxiny, verotoxigenní kmen produkuje verotoxiny (Bussalleu *et al.*, 2012).

Kolonie se testují pomocí biochemických testů a Gramova barvení. Do biochemických testů patří oxidázový test, test na tvorbu sulfanu, indolu, hydrolyza lyzinu a močoviny, utilizace citrátu, methylová červeň a Voges – Proskauer test (Martín *et al.*, 2010).



Obrázek 2: Buňky *Escherichia coli* rastrovací elektronový mikroskop (Ciociola *et al.*, 2018)

1.6.1.1 *E. coli* a spermie

E. coli má vliv na různé parametry spermií. Jedním z těchto parametrů je aglutinace. Interakce mezi bakterií a spermii probíhá ve dvou fázích a to přilnutím *E. coli* na spermii a poškozením plazmatické membrány (Pinart *et al.*, 2016). Adheze může být způsobena manózou (Althouse *et al.*, 2000), nebo přítomností fimbrií 1 a P – fimbrií na povrchu bakterie (Pinart *et al.*, 2016). Touto aglutinací dochází k poškození plazmatické membrány a k samčí neplodnosti (Althouse *et al.*, 2000).

Při skladování kontaminovaného spermatu s *E. coli* se od 4. dne značně snižuje životnost spermií (Pinart *et al.*, 2016).

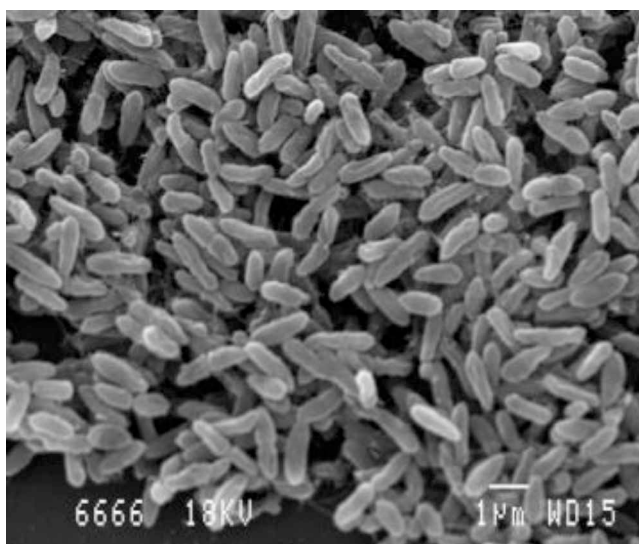
Vliv *E. coli* na pH je pozorováno především u velmi kontaminovaných vzorků (10^7 CFU/ml) (Pinart *et al.*, 2016). Vlivem snížení pH dochází ke snížení metabolismu spermií a tudíž i ke snížení jejich motility (Sepúlveda *et al.*, 2014).

Výzkum Martína *et al.* (2010) také dokázal souvislost mezi zvyšující se koncentrací *E. coli* v ejakulátu a snižujícím se počtu živě narozených selat.

1.6.2 *Pseudomonas*

Pseudomonas patří do skupiny gramnegativních bakterií, čeleď *Pseudomonadaceae*. Vyskytuje se běžně v přírodě, konkrétně ve vodě a půdě a jedná se o podmíněně patogenní mikroorganismus (Sepúlveda *et al.*, 2014). V přírodě může přežívat až měsíce (Smole *et al.*, 2010). Tato bakterie využívá různorodé přírodní zdroje a dokáže kolonizovat různé environmentální prostředí, to jsou hlavní příčiny jejího značného výskytu v přírodě (Lyczak *et al.*, 2000). Pseudomonády mají na svém povrchu fimbrie a bičík. Bičíkem dokážou uniknout imunitnímu systému a díky fimbriím adherují k okolním buňkám (Barbieri, 2000).

Virulenční faktory produkované *Pseudomonas aeruginosa* jsou sekretovány nebo jsou umístěny na povrchu bakterie. Faktory virulence disponují specifickými i nespecifickými účinky. Může se stát, že mají negativní dopad na místo vzdálené od místa infekce. Virulenční faktory vylučované bakterií ničí buňky hostitele a zajišťuje zdroje živin. Bakterie je díky těmto faktorům invazivnější. Pseudomonády se dokáží množit v hostiteli, negativně ovlivnit jeho imunitní systém a to díky látkám vyskytujícím se na povrchu bakterie. *Pseudomonas aeruginosa* způsobuje záněty pomocí endotoxinu umístěného na vnější membráně. Tato bakterie produkuje pyocyanin, exotoxin A, siderofory, proteázy, alginát (Lyczak *et al.*, 2000), fosfolipázy C (Barker *et al.*, 2004), elastázu a Quorum sensing (QS). QS poškozují spermie a vyvolávají exocytózu akrozomů (Sepúlveda *et al.*, 2014).



Obrázek 3: Biofilm *Pseudomonas aeruginosa* rastrovací elektronový mikroskop (Deligianni *et al.*, 2010)

1.6.2.1 *Pseudomonas aeruginosa* a spermie

Pseudomonas má účinky na spermie především ve vysokých koncentracích 10^7 a 10^8 CFU/ml. Tyto koncentrace mají vliv na životaschopnost spermií, která se

projevuje již po 1 až 2 dnech skladování při teplotě 15 – 17 °C (Sepúlveda *et al.*, 2014). Tyto koncentrace mají ještě významnější účinek na spermie po *in vitro* kapacitaci (Sepúlveda *et al.*, 2016). Negativní vliv těchto koncentrací platí i v případě motility spermií (Sepúlveda *et al.*, 2014).

Ve studii Sepúlvedy *et al.* (2014) se neprokázala změna pH v závislosti na přítomnosti bakterií, ale prokázal se negativní účinek vyšších koncentrací bakterií na integritu akrozomu spermií.

1.6.3 *Enterobacter*

Jedná se o bakterii vyskytující se ve střevě. Tato bakterie patří do čeledě *Enterobacteriaceae*. *Enterobacter* může být patogenní i nepatogenní. *Enterobacter cloacae* je tyčinkovitého tvaru, barví se podle Grama negativně a je to pohyblivá bakterie (Wang *et al.*, 1989). *Enterobacter* má na svém povrchu fimbrie (Prieto-Martínez *et al.*, 2014). Z biochemických testů prokazuje negativní oxidázu a je pozitivní na nitrát reduktázu (Wang *et al.*, 1989). Tato bakterie kvasí některé sacharidy za produkce kyselin, plynu a aldehydu. Uhlík bakterie získává z kyseliny citrónové a jejích solí (Hormaeche a Edwards, 1960).



Obrázek 4: *Enterobacter* sp. rastovací elektronový mikroskop (Feng *et al.*, 2014)

1.6.3.1 *Enterobacter* a spermie

S rostoucí dobou skladování a s vyšší koncentrací bakterií se snižuje životaschopnost spermií. Dále vysokou koncentrací bakterií dochází k poškození akrozomu, zvýšení pH a snížení osmotické rezistence spermií. Bakterie mají vliv na aglutinaci spermií a tím pádem i snižují jejich motilitu (Prieto-Martínez *et al.*, 2014).

Obecně platí, že čím déle je bakterie ve spermatu a čím více jich je, tím má znatelnější devastiční účinky na spermie (Sepúlveda *et al.*, 2016).

Tabulka 2: Čtyři příklady běžné bakteriální flory izolované z kančoho spermatu (Althouse a Lu, 2005)

sperma 1	sperma 2	sperma 3	sperma 4
<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp.
<i>Bacillus</i> sp.	<i>E. coli</i>	<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.
<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Klebsiella</i> sp.
<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Providencia</i> sp.	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
<i>Proteus</i> sp.	<i>Neisseria</i> sp.	<i>Actinomyces</i> -like sp.	<i>Citrobacter</i> sp.
<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Proteus</i> sp.	<i>Bacteroides</i> sp.	<i>Proteus</i> sp.
<i>Pasteurella</i> sp.		<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Actinomyces</i> sp.
<i>Citrobacter</i> sp.		<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Serratia</i> sp.
		<i>Bacillus</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.
		<i>Actinobacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
		<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.
		<i>Flavobacterium</i> sp.	
		<i>Klebsiella</i> sp.	
		<i>Micrococcus</i> sp.	
		<i>Proteus</i> sp.	

1.7 Přírodní extrakty

V oblasti chovu prasat je velmi rozšířené umělé oplodňování. Mezi nevýhody patří to, že je kančí sperma často různými způsoby kontaminováno mikroorganismy a to je jeden z nejdůležitějších faktorů, který negativně ovlivňuje biologickou kvalitu spermií (Lustyková *et al.*, 2012). Většina bakterií vyskytující se ve spermatu kanců jsou oportunní, metabolicky aktivní patogeny (Mazurová *et al.*, 2015), kteří svou silnou biologickou aktivitou způsobují snížení energetických zdrojů spermiím a také produkují toxické metabolity (Lustyková *et al.*, 2012). Mikroorganismy se mohou podílet i na indukci zánětlivých procesů v děložní sliznici inseminovaných prasnic (Mazurová *et al.*, 2015). Inseminace spermiemi s vysokým počtem bakterií může oplodnění negativně ovlivnit různými způsoby (Lustyková *et al.*, 2012).

Aby se eliminovaly nepříznivé vlivy bakterií, přidávají se ke spermatu antibiotika. Používání antimikrobiálních látek do plniv je vyžadováno jak vnitrostátními tak mezinárodními předpisy pro kontrolu mikrobiálního obsahu (Morrell a Wallgren, 2014). Důvěra v antibiotika a jejich vysoká spotřeba vedly k postupné rezistenci mikroorganismů na tyto léky (Kukla, 2017). Výskyt multirezistentních kmenů *Salmonella* Typhimurium

izolovaných z prasat může sloužit jako dobrý příklad rezistentní bakterie v hospodářském zvířeti. Kvůli této zvýšené odolnosti bakterií na antibiotika je snahou spotřebu antibiotik snížit. Jednou z možných alternativ je využití přírodních látek s antimikrobiálními vlastnostmi (Mazurová *et al.*, 2015). Dalšími možnostmi jsou fyzické odstranění bakterií a to pomocí koloidní centrifugace, zvláště jednovrstvé centrifugace (Morrell a Wallgren, 2014), automatizovaný odběr spermatu, podchlazený ejakulát pod 15 °C a přidání kationtových antimikrobiálních peptidů (Schulze *et al.*, 2016).

Rostliny a přírodní extrakty z nich jsou důležitým zdrojem přirozených aktivních produktů, které se liší svým mechanismem působení a přirozenými vlastnostmi (Kooti a Daraei, 2017). Rostliny jsou bohaté na širokou škálu sekundárních metabolitů (Samy a Gopalakrishnakone, 2010), kterými se rostlina chrání například i před UV zářením (Michel *et al.*, 2012). Takové rostliny obsahují například alkaloidy, steroidy/triterpenoidy, saponiny. Tradiční léčivé rostliny jsou také schopné syntetizovat aromatické látky, z nichž většina jsou fenoly nebo jejich deriváty substituované kyslíkem. Mnohé z těchto látek slouží jako obrana rostlin proti mikroorganismům, hmyzu, býložravcům. Hlavní skupiny antimikrobiálních fytochemikálií lze rozdělit do několika kategorií, které zahrnují alkaloidy, flavonoidy (flavony, flavonoly), éterické oleje, lektiny, polypeptidy, fenoly, polyfenoly (taniny). Alkaloidy jsou heterocyklické dusíkaté sloučeniny, mezi které patří například diterpenoidní alkaloidy, lanuginosin, liriodenin, indolin, berberin a další. Všechny vykazují antimikrobiální aktivitu. Flavony jsou fenolové struktury obsahující jednu karbonylovou skupinu. Jedná se o hydroxylované fenolické látky, které se vyskytují jako C6 – C3 jednotky spojené s aromatickým kruhem. Je známo, že flavonoidy jsou syntetizovány rostlinami v reakci na mikrobiální infekci a jsou účinnými antimikrobiálními látkami proti širokému spektru mikroorganismů. Aktivita je pravděpodobně způsobena jejich schopností tvořit komplex s extracelulárními a rozpustnými proteiny, které se pak váží na stěnu bakteriálních buněk. Více lipofilních flavonoidů může také narušit mikrobiální membrány. Flavonoidy postrádající hydroxylové skupiny na svých β -kruzích jsou aktivnější proti mikroorganismům a jejich mikrobiální cíl je membrána s -OH skupinami. Mezi takové látky patří například quercetin, bonducellin, dimethoxyflavon a další. Esenciální olej má široké spektrum antimikrobiálních aktivit, které jsou připisovány vysokému obsahu fenolových derivátů, jako je karvakrol a thymol. Téměř 60 % všech derivátů esenciálních olejů má inhibiční účinky na houby, zatímco 39 % inhibuje bakterie. Do skupiny antimikrobiálních peptidů patří například protein WjAMP-1 purifikovaný z listů *Wasabia japonica*, další antimikrobiální sloučenina je přítomná

v rozpustné frakci listů jahodníku (*Fragaria ananassa*). Mechanismem účinku těchto peptidů může být tvorba iontových kanálů v mikrobiální membráně nebo kompetitivní inhibice adheze mikrobiálních proteinů na hostitelské polysacharidové receptory. Fenoly jsou toxické pro mikroorganismy vzhledem k místům a počtu hydroxylových skupin na fenolových skupinách. Existují důkazy, že vysoce oxidované fenoly mají více inhibičního účinku. Mechanismus zodpovědný za fenolovou toxicitu vůči mikroorganismům zahrnuje inhibici enzymů oxidovanými sloučeninami, případně reakce se sulfhydrylovými skupinami nebo více nescifickými interakcemi s proteiny. Polyfenoly, které mohou tvořit těžké rozpustné komplexy s proteiny, se mohou vázat na adhezi bakterií, což narušuje dostupnost receptoru na buněčném povrchu. Pro extrakci alkaloidů se používá methanol nebo ethanol, aceton se používá pro flavonoidy a steroidy. Dále hexan, diethylether a chloroform se hodí pro rozpuštění olejů rozpustných v tucích, vosk, lipidy a estery, dichlormethan je vhodný pro terpenoidy, ethylacetát pro estery, ethanol pro steroly, polyfenoly, taniny a voda je vhodná pro složky rozpustné ve vodě, jako jsou glykosidy, polysacharidy, polypeptidy a lektiny, které jsou neúčinnější proti patogenům. Vodné médium je však nejvhodnější pro léčbu lidí i zvířat (Samy a Gopalakrishnakone, 2010).

Používá se široká škála léčivých rostlin nejen pro podporu samčí plodnosti (Tvrdá *et al.*, 2017), ale i na snižování bolesti, léčení hormonálních, neurologických, duševních poruch, anémie a dalších onemocnění (Kooti a Daraei, 2017). Jejich biologická aktivita zahrnuje antimikrobiální, antimykotické, antivirové a antiparazitické účinky. Laboratoře neustále usilují o nalezení takového rostlinného přírodního extraktu, který by jednou mohl antibiotika nahradit (Lustyková *et al.*, 2012). Jejich použití je totiž výhodné i z hlediska ceny. Léčivé byliny mají také méně vedlejších účinků, než chemické látky a jejich antioxidační vlastnosti snižují toxicitu těchto chemických léčiv (Kooti a Daraei, 2017).

Mechanismus většiny přírodních látek je založený hlavně na jejich schopnosti narušit integritu mikrobiální cytoplazmatické membrány a zasahovat tak do metabolismu bakterií. Rozrušením membrány dochází k úniku důležitých intracelulárních sloučenin a iontů, což vede ke smrti bakterie (Kukla, 2017). Extrakty působí rozdílně na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Grampozitivní bývají na extrakty citlivější, protože gramnegativní bakterie jsou obklopeny buněčnou stěnou, která zabraňuje difuzi hydrofobních sloučenin skrz lipopolysacharidovou vrstvu. Absence této bariéry umožňuje přímý kontakt hydrofobních složek esenciálního oleje s fosfolipidovou dvojvrstvou

buněčné membrány, což způsobuje zvýšení iontové propustnosti, nebo poškození bakteriálních enzymových systémů (Bhat a Al-Daihan, 2014).

Využití přírodních látek pro dekontaminaci spermii kanců může být omezeno toxicitou přírodních látek na spermie. Přírodní látky i antibiotika mohou negativně ovlivnit motilitu a životaschopnost buněk spermii, proto se musí testovat nejen vliv přírodních látek na bakterie, ale také na spermie (Mazurová *et al.*, 2015). Alternativní antimikrobiální látky by měly splňovat zachování plodnosti, neměly by být toxické vůči spermii, měly by prokazovat značné antimikrobiální působení, vysokou stabilitu, snadné použití, finanční dostupnost a neměly by vyvolávat rezistenci (Schulze *et al.*, 2015).

V tomto přehledu byly vypsány různé výsledky několika studií hodnotících antimikrobiální aktivitu, avšak existují určitá omezení, která by měla být brána v úvahu při porovnávání výsledků. Mezi studiemi existují nesrovnalosti v extrakčních procedurách (typ rozpouštědla, poměr rozpouštědla k pevné látce a doba extrakce), které by mohly ovlivnit složení specifických antioxidantů v extraktu a tím pádem mikrobiální aktivitu. Optimalizace a standardizace extrakčních parametrů by napomohla lepšímu porovnání studií a podrobná HPLC analýza extraktů ke stanovení rozdílů ve složení látek. Další faktor, který je potřeba vzít v úvahu je, že složení bioaktivních sloučenin se může lišit v závislosti na použité rostlině a že jí mohou ovlivnit zemědělské vlivy, jako jsou podmínky růstu a sklizně. Stejně tak by ke srovnání antimikrobiální aktivity pomohlo dodržovat standardizované protokoly pro posuzování mikrobiální aktivity, protože rozdíly v dávce extraktu, ve velikosti a koncentraci inokula, v teplotě a času inkubace (Kumar a Brooks, 2018), ve složení kultury, v objemu média, v extrakční metodě mohou mít vliv na výsledky (Samy a Gopalakrishnakone, 2010).

1.7.1 Celer

Celer (*Apium graveolens Linn*) je rostlina z rodu *Apiaceae*, je jednou z trvalých rostlin, které rostou po celé Evropě a také v tropických a subtropických oblastech Afriky a Asie (Kooti a Daraei, 2017). Části rostliny, které se používají, jsou semena a listy. Esenciální oleje získané z uvedených částí jsou nerozpustné ve vodném prostředí, jejich nerozpustnost tedy znesnadňuje jejich použití (Samy a Gopalakrishnakone, 2010). Do fytochemických složek celeru patří sacharidy, fenoly (jako jsou flavonoidy), alkaloidy a steroidy. Celer kvůli svým sloučeninám jako kyselina kávová, p-kumarová, ferulová, apigenin, luteolin, tanin, saponin, kaemferolu má silné antioxidační vlastnosti, které

odstraňují volné radikály. Přítomnost látek, jako jsou limonen, selinen, glykosidy, flavonoidy a vitamíny A a C, je důvodem, že celer je nejrozšířenější rostlinou v tradiční medicíně.

Výzkum na potkanech dokázal, že ethanolové extrakty z listů celeru zvýšily spermatogenezi a tak zlepšily jejich plodnost. Jiné experimentální studie také ukazují, že celer má antifungální, protizánětlivé vlastnosti a jeho éterické oleje mají antibakteriální účinky (Kooti a Daraei, 2017). Na druhou stranu jiný výzkum dokázal, že například oproti česneku nemá inhibiční účinky vůči *Salmonella* Potsdam, *Shigella flexneri*, *E. coli* a *Enterobacter cloacae*, stejně tak jako petržel a máta. Avšak tento jev mohl být způsobený nízkou koncentrací extraktu nebo použitím vysoce koncentrované suspenze bakterií (Al-talib *et al.*, 2016). Protože jiná studie dokázala, že sloučenina izolovaná ze semen celeru měla silné antimikrobiální účinky vůči *Helicobacter pylori* a to srovnatelné s tetracyklinem (Zhou *et al.*, 2009). Esenciální olej z celeru je také silně inhibující a to především pro *Yersinia enterocolitica*, *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula* (Elgayyar *et al.*, 2001), *Campylobacter jejuni* (Friedman *et al.*, 2002). Částečně inhibuje bakterie *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* a pouze slabě inhibuje *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa* a *Aspergillus niger* (Elgayyar *et al.*, 2001).

1.7.2 Máta

Máta roste v mírných oblastech Eurasie, Austrálie a jižní Afriky (Elansary a Ashmawy, 2013). Listy této rostliny se tradičně používají v lidové medicíně (Hassanen *et al.*, 2015). Esenciální oleje izolované z máty se používají nejčastěji, protože mají antifungální, antimikrobiální, insekticidní a antioxidační vlastnosti (Elansary a Ashmawy, 2013). Mentol je jedna z aktivních složek listů máty a o jeho dezinfekčních a antimikrobiálních účincích se nepochybuje. Výzkum potvrzuje antimikrobiální účinky proti *Staphylococcus aureus* a *E. coli* (Hassanen *et al.*, 2015), *Salmonella* Enteritidis a *Bacillus subtilis* (Elansary a Ashmawy, 2013), *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Anatum (Shan *et al.*, 2007). Například v jedné studii se osvědčila Máta vonná, měla větší inhibiční účinek na *Staphylococcus aureus* než pozitivní kontrola, což byl Tetracyklin v koncentraci 20 µg/disc. Silný účinek měla také Máta peprná zejména vůči multizeristenstnímu kmeni *Shigella sonnei* a *Micrococcus flavus*. Antimikrobiální účinky se připisují linalonu a karvonu. Další důležité složky jsou menthofuran, menthon, piperiton

a pulegon (Elansary a Ashmawy, 2013). V methanolovém extraktu máty byly dokázány alkaloidy, glykosidy, steroidy, flavonoidy, fenolické sloučeniny. Máta v testu stanovení antioxidační aktivity prokázala největší aktivitu v porovnání s kyselinou askorbovou a také obsahovala nejvíce fenolových a flavonoidových sloučenin z dalších 5 bylin (Raghavendra *et al.*, 2013).

1.7.3 Petržel

Petržel je bohatým zdrojem určitých vitamínů a minerálů. Vykazuje antimikrobiální účinky proti některým gramnegativním bakteriím a má také adhezivní účinky na *Helicobacter pylori* (Hassanen *et al.*, 2015). Esenciální olej z petržele silně inhibuje *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* a houby, mírně inhibuje *Salmonella Typhimurium* a pouze slabě, nebo neinhibuje vůbec *Lactobacillus plantarum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* a *Rhodotorula* (Elgayyar *et al.*, 2001). Petržel obsahuje fenolické sloučeniny a flavonoidy, zejména apigenin, apiin a 6"-acetylapiin, dále esenciální oleje, zejména myristin a apiol, které jsou odpovědné za jeho antioxidační aktivitu, dále obsahuje kumariny. Ethanolový extrakt prokázal inhibici *Lactobacillus plantarum* a *Leuconostoc mesenteroides* (Farzaei *et al.*, 2013).

1.7.4 Zázvor

Zázvor má antifungální účinky a také dobře působí proti lidským patogenům (Samy a Gopalakrishnakone, 2010). Chloroformový extrakt ze zázvoru prokázal dobrý inhibiční účinek vůči *Staphylococcus aureus* a to i vůči rezistentním kmenům (Voravuthikunchai *et al.*, 2006). Esenciální olej z kořene zázvoru je účinný proti *Campylobacter jejuni* (Friedman *et al.*, 2002). Výsledky dalšího výzkumu prokázaly, že methanolové a ethanolové extrakty zázvoru jsou silnější, než extrakty vodné a to proti všem testovaným bakteriálním kmenům (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella Typhi*). Nejvíce citlivá k ethanolovému extraktu zázvoru byla *Escherichia coli*. Hlavní složky odpovědné za antimikrobiální aktivitu jsou flavonoidy a sekviterpenoidy. Obecně bylo také prokázáno, že grampozitivní bakterie byly citlivější, než gramnegativní (Gull *et al.*, 2012).

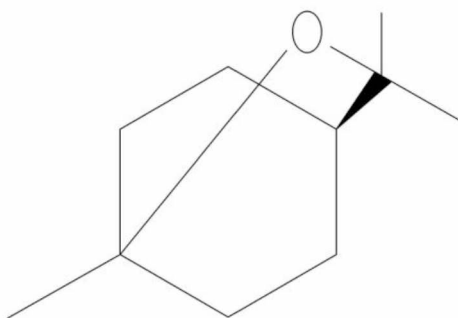
1.7.5 Rozmarýn

Esenciální olej z rozmarýnu je důležitý pro jeho silný antibakteriální, cytotoxický, antimutagenní, antioxidační a další vlastnosti (Hussain *et al.*, 2010). Rozmarýn má velmi dobré výsledky na inhibici *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 a *Listeria monocytogenes* (Kim *et al.*, 2011). Esenciální olej rozmarýnu je slabě inhibiční vůči *Pseudomonas auruginosa* (Elgayyar *et al.*, 2001). Jiná studie dokázala inhibici methanolovým extraktem *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Anatum (Shan *et al.*, 2007). Kombinací ethanolových extraktů z rozmarýnu a galgánu lze dosáhnout antimikrobiálního účinku vůči *S. aureus* a *L. monocytogenes*. Hlavní složky ethanolového extraktu jsou 1,8-cineol (26,3%), následovaný kafrem, p-menth-1-en-8-olem, borneolem a bicyklo [7.2.0] undec-4-en, 4,11,11-trimethyl-8-methylen, tyto látky byly zjištěny metodou GC-MS. Při analýze pomocí HPLC byla ještě zjištěna kyselina rozmarýnová, kyselina karnosová a karnosol. Tyto rozdíly mohou být způsobeny různými metodami analýzy (GC-MS vs HPLC). Dominantní složkou rozmarýnu je 1,8-cineol, který je schopen vázat a poškodit buněčnou membránu, což má za následek zvýšenou propustnost buňky (Weerakkody *et al.*, 2011).

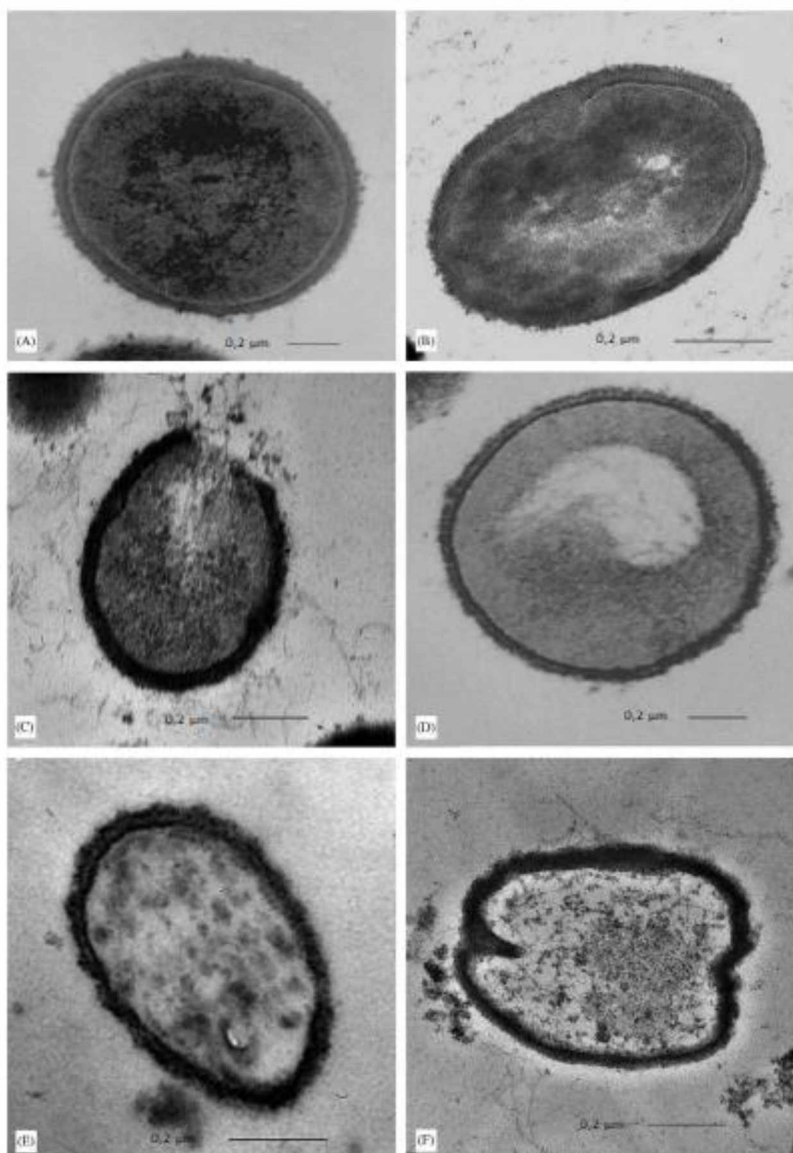
1.7.6 Galgán

Galgán pocházející z Indonésie (Ravindran *et al.*, 2012), je víceletá rostlina, široce rozšířená v subtropických a tropických oblastech. Její listy, květy, oddenky a esenciální oleje z těchto částí obsahují značné množství monoterpenů, sesquiterpenů, které souvisejí s antimikrobiální aktivitou. (Victório *et al.*, 2009). Dále obsahuje methylcinamát, 1'-aceto-xychavikol-acetát, 1'-aceto-xyeugenol-acetát a 1'-hydroxy-chavikol-acetát a právě 1'-aceto-xychavikol-acetát vykazoval antimikrobiální efekt vůči grampozitivním bakteriím, kvasinkám a některým dermatofytům (Ravindran *et al.*, 2012). Galgán je bohatý na fenolické sloučeniny, především na flavonoidy a fenolové kyseliny (Mayachiew a Devahastin, 2008). Autoři tohoto výzkumu dokázali, že esenciální olej z listu inhiboval všechny jejich testované bakterie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Staphylococcus epidermidis* (Victório *et al.*, 2009). V jiné studii byl galgán dobrým inhibitorem též proti MRSA, avšak jednalo se o chloroformový extrakt (Voravuthikunchai *et al.*, 2008). Ethanolový extrakt také potlačoval *S. aureus*, autoři se domnívají, že to je kvůli sloučenině 1,8 – cineol, což je hlavní složka galgánu a již dříve byla popsána jako antimikrobiální (Mayachiew a Devahastin, 2008). Na tyto výsledky navazuje i další

výzkum, který potvrzuje silnou inhibici *S. aureus*, také *S. epidermidis* a *Saccharomyces cerevisiae* se ukázaly jako citlivé mikroorganismy vůči ethanolovému extraktu z galgánu. Extrakt měl méně antibakteriální účinek na *B. cereus* a *B. megaterium* a proti některým gramnegativním bakteriím jako *Salmonella* sp., *Enterobacter aerogenes* a u *Pseudomonas aeruginosa* a *E. coli* nedošlo k žádné antimikrobiální aktivitě. Autoři se domnívají, že klíčová složka pro inhibici je acetát acetoxychavikolu a mechanismus působení spočívá v tom, že extrakt způsobí změnu pH v buňce, tím pádem se zdenaturují bílkoviny uvnitř buňky a také se naruší cytoplazmatická membrána (Oonmetta-aree *et al.*, 2006).



Obrázek 5: Chemická struktura 1,8 - cineolu (Mayachiew a Devahastin, 2008)



Obrázek 6: (A) *Staphylococcus aureus* ošetřený ethanolem, (B) destilovanou vodou, (C - F) ethanolovým extraktem z galgánu (Oonmetta-aree *et al.*, 2006)

1.7.7 Majoránka

Majoránka patří do čeledi hluchavkovité, stejně jako rozmarýn, bazalka, šalvěj, oregano, levandule, tymián a máta. Tato čeleď ve farmakologických zkouškách prokázala antibakteriální, antifungální, antioxidantní, antispasmodické, antimutagenní, protinádorové a další účinky. Vůči jak vodným, tak ethanolovým extraktům z majoránky byly v této studii citlivé kmeny grampozitivních bakterií (*Bacillus subtilis* a *Listeria innocua*). Na druhou stranu, Duletić-Laušević *et al.* (2018) nedokázali vliv extraktů z majoránky na gramnegativní bakterie, kromě *Shigella flexneri*. Na tuto bakterii působil bakteriostaticky i baktericidně vodný extrakt z libyjské majoránky. V tomto výzkumu zmiňují lepší účinky

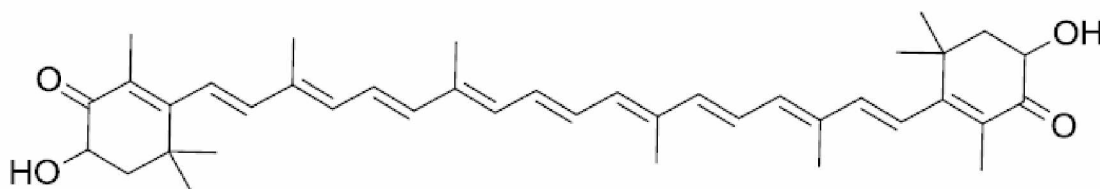
vodného extraktu, vůči ethanolovému. V jiné studii byl 65% ethanolový extrakt účinný proti *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Typhimurium a *Pseudomonas aeruginosa*. V tomto extraktu byl pomocí HPLC nalezen myricetin, luteolin, naringenin, katechin, rutin a apigenin (Şener *et al.*, 2017)

Esenciální olej z majoránky byl účinný vůči bakteriím *Salmonella* sp. (Friedman *et al.*, 2002) *S. aureus*, *E. coli* (Ahmed *et al.*, 2018), *Streptococcus pyogenes*. Hlavními složkami esenciálního oleje jsou thymol a terpinen-4-ol (Guerra-Boone *et al.*, 2015), γ -terpineny, linalool a karvakrol, které jsou základem pro jejich antimikrobiální vlastnosti (Kozłowska *et al.*, 2010). Majoránka má ale i antifungální vlastnosti a to proti *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* (Ahmed *et al.*, 2018). Další studie tvrdí, že neúčinnější je n-hexanový extrakt a vodno/ethanolový extrakt proti různým kmenům *Staphylococcus aureus* a *Acinetobacter baumannii*, další bakterie nevykazovaly zvláštní citlivost (Kozłowska *et al.*, 2010).

1.7.8 Astaxanthin

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β -karoten-4,4'-dion, empirický vzorec $C_{40}H_{52}O_4$) je běžný, organický, červený pigment (Weintraub *et al.*, 2017), získaný například z vodní řasy *Haematococcus pluvialis* (Michalak *et al.*, 2017), ale je produkován i dalšími mikroorganismy jako houby (*Phaffia rhodozyma*) (Weintraub *et al.*, 2017) a jiné řasy (*Chlorella zofingiensis*, *Chlorococcum*) (Ambati *et al.*, 2014). Tento karotenoid se vyskytuje také u mořských živočichů (např. lososi, koryši) a poskytuje jim zřetelně červenou barvu (Weintraub *et al.*, 2017). Substance, které jsou obsaženy v řasách, jako polysacharidy, pigmenty, polyfenoly, lipidy, látky podporující růst rostlin, peptidy, bílkoviny, vitamíny a minerály, jsou považovány za antioxidační, protirakovinné, antivirové, antikoagulační, antidiabetické, antialergické, protizánětlivé, antihypertenzní a antibakteriální látky (Michalak *et al.*, 2017). Za jeho vysokou antioxidační aktivitu je zodpovědná přítomnost hydroxylových a keto skupin na každém jononu (Suganya a Asheeba, 2015). Irna *et al.* (2017) dokázali inhibici *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis* paskalizovaným astaxanthinem, v případě chemicky extrahovaného astaxanthinu, se jednalo o inhibici pouze *Escherichia coli* a *Enterobacter aerogenes*. Jiný výzkum dokázal inhibici *Pseudomonas aeruginosa* (Ushakumari a Ramanujan, 2013). Antimikrobiální aktivita astaxanthinu z paskalizace se přičítá obsahu fytochemikálií (Irna *et al.*, 2017). Na druhou stranu některé bakterie žijící

v extrémních podmínkách si tuto látku dokáží vyprodukovat samy. Astaxanthin hraje klíčovou roli při ochraně těchto bakterií proti UV-fotooxidaci, při ochraně proteinů a DNA před oxidačním poškozením, také přispívá k rezistenci buněk (Sajjad *et al.*, 2017).



Obrázek 7: Struktura astaxanthinu (Weintraub *et al.*, 2017)

1.7.9 Červená řepa

Kořen červené řepy patří mezi jednu z nejsilnějších zelenin z pohledu antioxidační kapacity. V řepě byly nalezeny fenoly, flavonoidy (Čanadanović-Brunet *et al.*, 2011), vitamín C (Kumar a Brooks, 2018), betalainy. Fenolické sloučeniny prokazují vysokou míru antibakteriální aktivity, např. karvakrol. Betalainy jsou dusíkaté pigmenty, které se skládají ze dvou hlavních skupin betacyaniny a betaxanthiny, což jsou silné antioxidanty. Co se týče antibakteriální aktivity, vyšší citlivost vykazovali *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* (Čanadanović-Brunet *et al.*, 2011), *Micrococcus* a *Streptococcus* (Kumar a Brooks, 2018), oproti *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*, na které v jiné studii působil extrakt mírně (Čanadanović-Brunet *et al.*, 2011). Vysvětluje se to jednoduchou strukturou stěny grampozitivních bakterií a její náchylností na polyfenolické sloučeniny. Vyšší rezistence gramnegativních bakterií je připisována vnější membráně, sestávající z dvouvrstvého vysoce hydrofilního lipopolysacharidu a jedinečnému periplazmatickému prostoru (Kumar a Brooks, 2018). Opačného výsledku dosáhli Bucur *et al.* (2015) s použitím přírodních sloučenin z řepy. *Escherichia coli* byla citlivější, než *Staphylococcus aureus*. To si vědci vysvětlovali tím, že stěna gramnegativní *E. coli* obsahuje velké množství lipidů a ty mohou být přírodními látkami z řepy rozpuštěny. Tudíž tyto látky mohou lépe narušit strukturu bakteriální buňky, než tomu tak bylo u *Staphylococcus aureus*. Další studie neprokázala inhibiční aktivitu vůči houbám a kvasinkám. Tyto rozdíly mezi výzkumy jsou pravděpodobně způsobeny rozdílnými metodami k testování citlivosti a také v celkové dávce řepného extraktu (Kumar a Brooks, 2018).

1.7.10 Rakytník

Rakytník (*Hippophae rhamnoides* L.) z rodiny *Elaeagnaceae* je znám hlavně kvůli pozitivním účinkům na zdraví lidí a zvířat. Celá rostlina a zejména plody jsou zdrojem velkého množství bioaktivních látek, například vitamínů (C, B, E, A, K), minerálů (Ca, P, Fe, K), přírodních antioxidantů, n-3 a n-6 mastných kyselin, proteinů (albuminy, globuliny). Dále rakytník obsahuje karotenoidy (β -karoten, lykopen, lutein, zeaxanthin, sacharidy (glukóza, fruktóza, xylóza), organické kyseliny (kyselina jablečná, chinová, šťavelová, citronová, vinná), flavonoidy (kvercetin, kaempferol, myricetin, isorhamnetin) a tokoferoly. Rakytník je ceněn pro své antioxidační, antivirové, antibakteriální, protizánětlivé, imunomodulační, antikancerogenní a další účinky. Chemické složení plodů je závislé na odrůdě, klimatických podmínkách, velikosti rostliny, zralosti a způsobu zpracování plodů. Fenolické sloučeniny rakytníku představují hlavní skupinu fotochemikálií, které vykazují antibakteriální a antivirové účinky. Tyto sloučeniny potlačují jak gramnegativní, tak grampozitivní bakterie. Tato studie tvrdí, že látky obsažené v rakytníku, především v listech, inhibují *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* a *Enterococcus faecalis*. Esenciální olej byl účinný proti *Escherichia coli* (Krejcarová *et al.*, 2015). Michel *et al.* 2012 dosáhli maximální inhibice *S. aureus* pomocí extraktu z listů, *Bacillus cereus* s extraktem ze semen a extrakt z kořenů inhiboval *Enterococcus durans*. Minimální inhibici měli u *Pseudomonas aeruginosa*, což bylo vysvětleno tak, že je to kmen, který snadno získává rezistenci. V další studii připravovali methanolvý extrakt ze semen rostliny, který byl nejvíce účinný vůči *Bacillus cereus* a nejméně odolný byl chloroformový extrakt vůči *Yersinia enterocolitica*. Obecně gramnegativní bakterie byly odolnější (Negi *et al.*, 2005). Jiný výzkum také dokázal, že n-hexanový a chloroformový extrakt z plodů rakytníku má antibakteriální účinky proti *Staphylococcus* rezistentnímu na methicilin (Qadir *et al.*, 2016). Ethanolový extrakt z rakytníku prokazuje inhibici *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* a *P. aeruginosa* (Yoon *et al.*, 2012).

2 Experimentální část

Vyšetřovaným materiálem bylo kančí sperma získané z chovu prasat Výzkumného ústavu živočišné výroby, v.v.i. v Kostelci nad Orlicí. Sperma bylo ředěné krátkodobými i dlouhodobými plnidly a testovanými látkami v různém poměru. Testované látky měly chemický, či přírodní původ a testovala se jejich inhibice mikroorganismů a jejich účinek na samotné spermie.

2.1 Chemikálie, testované látky, přístroje a další pomůcky

2.1.1 Chemikálie, testované látky

Destilovaná voda, fyziologický roztok, 96% ethanol (Lach-Ner s.r.o., ČR), peroxid vodíku 3%, oxidázový test, krystalová violet, Lugolův roztok, karbolfuchsin, imerzní olej, parafinový olej, biochemické testy Mikrolatest (Erba Lachema, s.r.o.), činidla pro biochemické testy, disky pro testování antimikrobiální účinnosti (č. šarže 1944641, OXOID), BTS bez antibiotik (Minitube, Německo, č. šarže 13525/0100), kyselina salicylová (Lachema Brno, č. šarže 479831075, kyselina sorbová (VIA-REK a.s., č. šarže 110-44-1), kyselina benzoová (Lachema Brno, č. šarže 216550870), propolis (18-21%, Jankar Profi s.r.o), BIO PIG (Magapor, Španělsko), VIP 3 (Hema Malšice ČR), DICOL (Magapor, Španělsko), celer, petržel, řepa, zázvor, máta (vlastní zdroj), rakytník (FRUWE s.r.o.), rozmarýn (Bylinky s.r.o.), majoránka, galgán (F-DENTAL Hodonín s.r.o.), astaxanthin (Algamo s.r.o.)

2.1.2 Přístroje

Sterilizátor skla (Sterimat HS202A, BMT Medical Technology s.r.o, ČR (173 °C, 30 min)), parní sterilizátor (PS20A, Chirana, ČR (110 °C, 15 min)) a parní sterilizátor (Sterilab, BMT Medical Technology s.r.o., ČR (121 °C, 20 min)), digitální váhy (440-43, KERN; Německo), plynový kahan (Bunsen Z1), třepačka Vortex (V1-plus bioSan, No. 010203-1204-0766, EU), zákaloměr (McFarland densitometer MG-Units bioSan, Lotyšsko), světelný mikroskop (Nikon Eclipse H600L 80i; Japonsko), počítadlo kolonií (Start Count STC-1000; VWR International BVBA Švýcarsko), chladnička, mraznička (4 °C a -20 °C; AEG Santo 70402 KG8, Španělsko), termostat skříňový (17 °C; Lovibond TC135S), biologický termostat (37 °C, O2; inkubátor Memmert INE 500), termostat na

CO₂ (SalvisLAB Biocenter), reader a analyzátor inhibičních zón BACMED (Aspiag s.r.o., ČR), termostat (Lovibond), ultrazvuk (Bandelin Sonorex)

2.1.3 Další pomůcky

Sterilní plastové Petriho misky (Ø 9 cm), skleněné Petriho misky (Ø 10 cm), skleněné zkumavky, kovové zátky, stojany na zkumavky, bakteriologické kličky, skleněné L-hokejky, plastové L-hokejky (č. šarže E4V200), jednokanálové pipety (0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl a 500-5000 µl; Santorius family Biohit, Německo), špičky (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl a 5000 µl) a filtry (Santorius family Biohit, Německo), skleněné lahve se šroubovacím závitem 500 a 100 ml (Fisher Scientific, spol. s.r.o., ČR), Erlenmayerovy baňky 500 ml (Scientific, spol. s.r.o., ČR), skleněná podložní sklíčka, raznice (OXOID), exsikátor

2.2 Příprava médií a kultivačních roztoků

2.2.1 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl připraven navážením 4, 25 g NaCl (Lach-ner s.r.o., ČR) do 500 ml destilované vody, sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Fyziologický roztok se po sterilizaci skladoval v chladničce (4 °C).

2.2.2 Krevní agar

Krevní agar byl připraven navážením 17 g agaru (HiMedia, Indie) do 400 ml destilované vody, sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 20 min. Po vychladnutí agaru na 40 – 60 °C bylo přilito 5 % (25 ml) defibrilované beraní krve pokojové teploty. Po vychladnutí agaru byly misky skladovány v chladničce (4 °C).

2.2.3 Mueller Hintonův agar s krví

Mueller Hintonův agar s krví byl připraven navážením 19 g agaru (HiMedia, Indie) do 400 ml destilované vody, sterilizován při 121 °C po dobu 20 min. Po vychladnutí agaru na 40 – 60 °C bylo přilito 5 % (25 ml) defibrilované beraní krve (LabMedia, ČR) pokojové teploty. Po vychladnutí agaru byly misky skladovány v chladničce (4 °C).

2.3 Stanovení citlivosti bakterií na testované látky

V polystyrenovém boxu byl přivezen vyšetřovaný materiál o teplotě cca 17 °C. Většina vzorků kančího spermatu byla ředěna plnidly. V případě užití krátkodobého ředidla byly vzorky vyočkovány na krevní agary v den dodání a dále po 24 a 48 hodinách. Nejdříve byla připravena ředící řada spermatu (10krát a 100krát naředěné sperma). Z jednoho vzorku spermatu byl odebrán 1 ml a naředěn 9 ml fyziologického roztoku. Z tohoto ředění byl odebrán 1 ml a znovu naředěn 9 ml fyziologického roztoku.

Z každého ředění bylo pipetováno 100 µl na krevní agar. Vzorky byly testovány v dubletu. Pipetovaný objem byl rozetřen L-hokejkou.

Petriho misky byly vloženy do termostatu na 24 hodin při 37 °C. Po 24 hodinách inkubace byly počítány kolonie bakterií na počítače. Podle vzorce byl stanoven celkový počet mikroorganismů (CFU/ml).

Počet kolonie tvořících jednotek na 1 ml vzorku

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot (n_1 + 0,1n_2) \cdot d}$$

- N - počet kolonie tvořících jednotek (CFU) na 1 ml vzorku
- $\sum C$ - součet všech kolonií spočítaných na vybraných miskách
- V - objem inokula v ml
- n_1 - počet misek použitých pro výpočet z prvního použitého ředění
- n_2 - počet misek použitých pro výpočet z druhého použitého ředění
- d - faktor prvního pro výpočet použitého ředění

Ve vzorcích byla testována jako první kyselina benzoová o různých navážkách (kyselina benzoová A 0,34 g/l; kyselina benzoová B 0,5 g/l; kyselina benzoová C 0,66 g/l) a krátkodobé ředidlo BTS bez antibiotik v ředícím poměru 1 díl spermatu na 2, 4 nebo 8 dílů ředidla.

Další testovanou látkou byla kyselina salicylová (kyselina salicylová A 0,015 g/l; kyselina salicylová B 0,03 g/l; kyselina salicylová C 0,15 g/l) a plnidlo BTS bez antibiotik v ředícím poměru 1 díl spermatu a 2, 4 nebo 8 dílů ředidla.

Kyselina sorbová byla testována v těchto koncentracích kyselina sorbová A 0,015 g/l; kyselina sorbová B 0,03 g/l; kyselina sorbová C 0,15 g/l. Dále byl testován propolis a plnidlo BTS bez antibiotik v ředícím poměru 1 díl spermatu a 2, 4 nebo 8 dílů ředidla.

Dále byly testovány látky jako například BIO PIG, VIP 3, DICOL a přírodní extrakty z celeru, petržele, řepy, zázvoru, máty, rakytníku, rozmarýnu, majoránky, galgánu a astaxanthinu.

2.4 Identifikace bakterií

Z Petriho misky byla vyizolována jedna kolonie určená k identifikaci. Byla přenesena na krevní agar a inkubovaná 24 h při 37 °C. V případě špatného růstu byla přenesena na krevní agar a inkubovaná v termostatu s příměsí CO₂, 24 hodin při 37 °C. Takto byla připravena 24 hodinová kultura, která se použila na biochemické testy. Tyto testy byly vybrány na základě určení Gramova barvení, katalázy a oxidázy a vzhledu kolonií na agaru. Kmeny, které se nepodařilo identifikovat klasickými biochemickými testy, byly analyzovány metodou MALDI-TOF MS v Nemocnici Pardubického kraje, v Pardubické nemocnici, na oddělení mikrobiologie.

2.5 Příprava přírodních extraktů

Extrakce z rostlinného materiálu byla provedena 60% ethanolem. Do dvou 100ml skleněných lahví se závitkem bylo naváženo po 10 g přírodní látky. K navážce bylo napipetováno 20 ml roztoku 60% ethanolu. Tyto dvě stejné lahve se vložily na 10 minut do ultrazvuku. Po uplynutí času byl z každé lahve odpipetován roztok do dvou plastových 50ml zkumavek a k navážkám se napipetovalo 15 ml 60% ethanolu a opět se vložily na 10 minut do ultrazvuku. Po uplynutí doby v ultrazvuku se odpipetoval roztok do 50 ml zkumavky a proces se opakoval s posledním přidáním 15 ml do lahve s navážkou. Byly nasbírány 3 frakce z každé navážky do 50 ml zkumavky. Tyto zkumavky se poté nechaly centrifugovat 5 minut při otáčkách 5000/min, aby usedly menší nečistoty a do čisté zkumavky se napipetoval supernatant.

Obsah každé zkumavky extraktu byl pipetován na skleněnou Petriho misku, která byla zvážena a poté vložena na 24 hodin do termostatu, dokud se nevypařil ethanol. Po vysušení byla Petriho miska opět zvážena a z rozdílu navážek a objemu použitého 60%

ethanolu na rozpuštění vysušeného extraktu byla vypočítána koncentrace extraktu. Pro zjištění antimikrobiální účinnosti byl ještě extrakt filtrován přes bakteriologický filtr o velikosti porů 0,22 μm .

Astaxanthin ve směsi byl získán jako oleoresin superkritickou CO_2 extrakcí z červené řasy *Haematococcus Pluvialis* ve Výzkumném ústavu organických syntéz a.s., Pardubice. Volný astaxanthin byl v první směsi zastoupen 5 % a ve druhé 11 %. Další látky obsažené ve směsi jsou například monoester astaxanthinu, diester astaxanthinu, β -karoteny, kantaxantin, lutein. Vzorek byl zpracováván tak, že se vytvořila koncentrační řada 10x, 100x, 1000x a 10 000x naředěného astaxanthinu v 60% ethanolu. Jelikož se směs špatně rozpouští v polárních sloučeninách, koncentrační řada byla na 10 minut umístěna do ultrazvuku.

2.6 Stanovení citlivosti mikroorganismů na přírodní látky

Z vybraných mikroorganismů byla ve fyziologickém roztoku vytvořena suspenze buněk o zákalu 0,5 McFarlanda. Vatovým tampónem byla suspenze rovnoměrně nanášena na Petriho misku s Mueller Hintonovým agarem s krví. Následně byly na Petriho misku raznicí dosazeny blankové disky a na disky napipetováno 16 μl příslušného extraktu z přírodních látek. Na každé misce bylo 5 přírodních extraktů a 6. disk byl 60% ethanol sloužící pro porovnání. Podle testované bakterie byl agar inkubován 24 hodin při 37 °C mikroaerofilně nebo aerobně. Po uplynutí této doby byly změřeny inhibiční zóny a vyhodnocena citlivost dané bakterie.

2.7 Stanovení citlivosti mikroorganismů na antibiotika

Z vybraných mikroorganismů byla ve fyziologickém roztoku vytvořena suspenze buněk o zákalu 0,5 McFarlanda. Vatovým tampónem byla suspenze rovnoměrně nanášena na Petriho misku s Mueller Hintonovým agarem s krví. Následně byly na Petriho misku nanášeny disky obsahující vybraná antibiotika. Podle testované bakterie byl agar inkubován 24 hodin při 37 °C mikroaerofilně nebo aerobně. Po uplynutí této doby byly změřeny inhibiční zóny a vyhodnocena citlivost dané bakterie dle limitů stanovených EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 9.0, 2019, <http://www.eucast.org>).

3 Výsledky

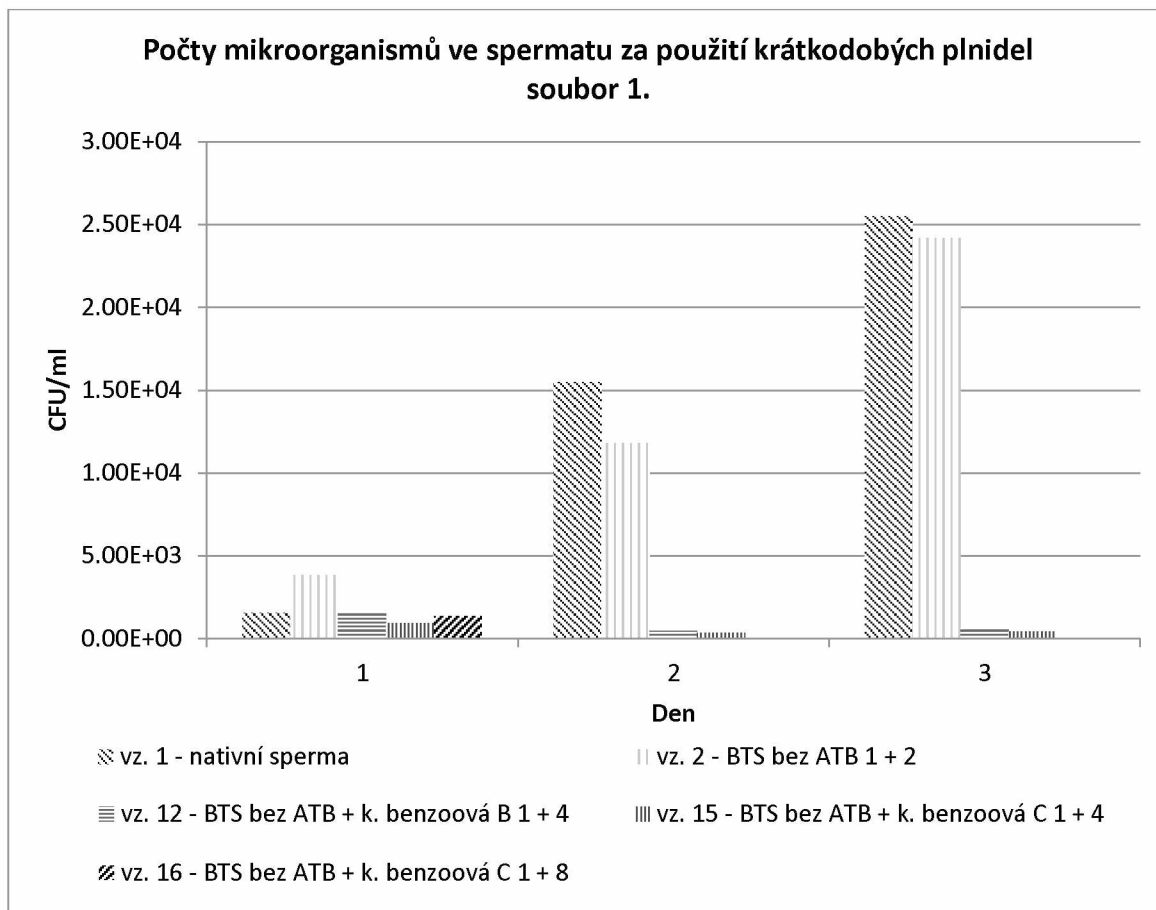
3.1 Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 1.

Tabulka 3: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 1.

Vzorek	složení	ředění	CFU/ml		
			1. den	2. den	3. den
vz. 1	nativní semeno		1,55E+03	>3,00E+04	>3,00E+04
vz. 2	BTS bez ATB	1 + 2	1,91E+03	>3,00E+04	>3,00E+04
vz. 3	BTS bez ATB	1 + 4	1,86E+03	1,38E+03	>3,00E+04
vz. 4	BTS bez ATB	1 + 8	1,37E+03	5,15E+02	>3,00E+03
vz. 5	BTS bez ATB 2	1 + 2	6,82E+02	4,10E+02	7,40E+02
vz. 6	BTS bez ATB 2	1 + 4	8,68E+02	1,25E+02	7,50E+02
vz. 7	BTS bez ATB 2	1 + 8	4,25E+02	<1,50E+01	<1,50E+01
vz. 8	BTS bez ATB + k. benzoová A	1 + 2	8,95E+02	3,70E+02	9,65E+02
vz. 9	BTS bez ATB + k. benzoová A	1 + 4	3,77E+02	1,35E+02	1,01E+03
vz. 10	BTS bez ATB + k. benzoová A	1 + 8	2,55E+02	<1,50E+01	3,90E+02
vz. 11	BTS bez ATB + k. benzoová B	1 + 2	1,50E+03	1,64E+03	>3,00E+04
vz. 12	BTS bez ATB + k. benzoová B	1 + 4	7,91E+02	2,45E+02	3,10E+02
vz. 13	BTS bez ATB + k. benzoová B	1 + 8	2,55E+02	<1,50E+01	2,30E+02
vz. 14	BTS bez ATB + k. benzoová C	1 + 2	7,00E+02	3,27E+02	5,55E+02
vz. 15	BTS bez ATB + k. benzoová C	1 + 4	4,68E+02	1,80E+02	2,25E+02
vz. 16	BTS bez ATB + k. benzoová C	1 + 8	3,36E+02	<1,50E+01	<1,50E+01

Vzhledem k použití krátkodobého ředidla BTS se vzorky testovaly v den dodání a dále po 24 a 48 hodinách. Včetně započítání ředění jednotlivých vzorků byly neúčinnější vzorky číslo 12, 15 a 16. Tedy BTS bez antibiotik s kyselinou benzoovou (1 + 4) o navážce 0,5 g/l a dále ředění (1 + 4, 1 + 8) spermatu pomocí BTS bez antibiotik s kyselinou benzoovou o navážce 0,66 g/l.

V grafu č. 1 a tabulce č. 3 jsou porovnány počty bakterií ve vzorcích s jistým účinkem a pro srovnání také s nativním spermatem a se spermatem ředěným BTS (1 + 2). Je znatelný rychlý nárůst bakterií v nativním spermatu. Obecně ředění 1 + 4 má lepší inhibiční výsledky než 1 + 2. Nejnižší koncentrace kyseliny benzoové (vzorek A) neměla inhibiční účinky v žádném ředění. Tento druh konzervace spermatu nebyl účinný. Koncentrace kyseliny benzoové A byla příliš nízká na to, aby byla schopná inhibovat přítomné mikroorganismy.



Graf 1: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 1.

V těchto vzorcích se vyskytovaly kolonie jak s úplnou hemolýzou, bez hemolýzy, tak viridující bakterie, které převažovaly. Ze souboru vzorků jsem izolovala a pomocí biochemických testů určila nejvíce se vyskytující bakterie, jak grampozitivní, tak gramnegativní. Z grampozitivních to byl *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus cohnii subsp. urealyticum*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus raffinosus*, *Aerococcus viridans*, *Streptococcus porcinius*, *Bacillus* sp. Mezi gramnegativní bakterie z těchto vzorků patří *Eikenella corrodens*, *Klebsiella pneumoniae*.

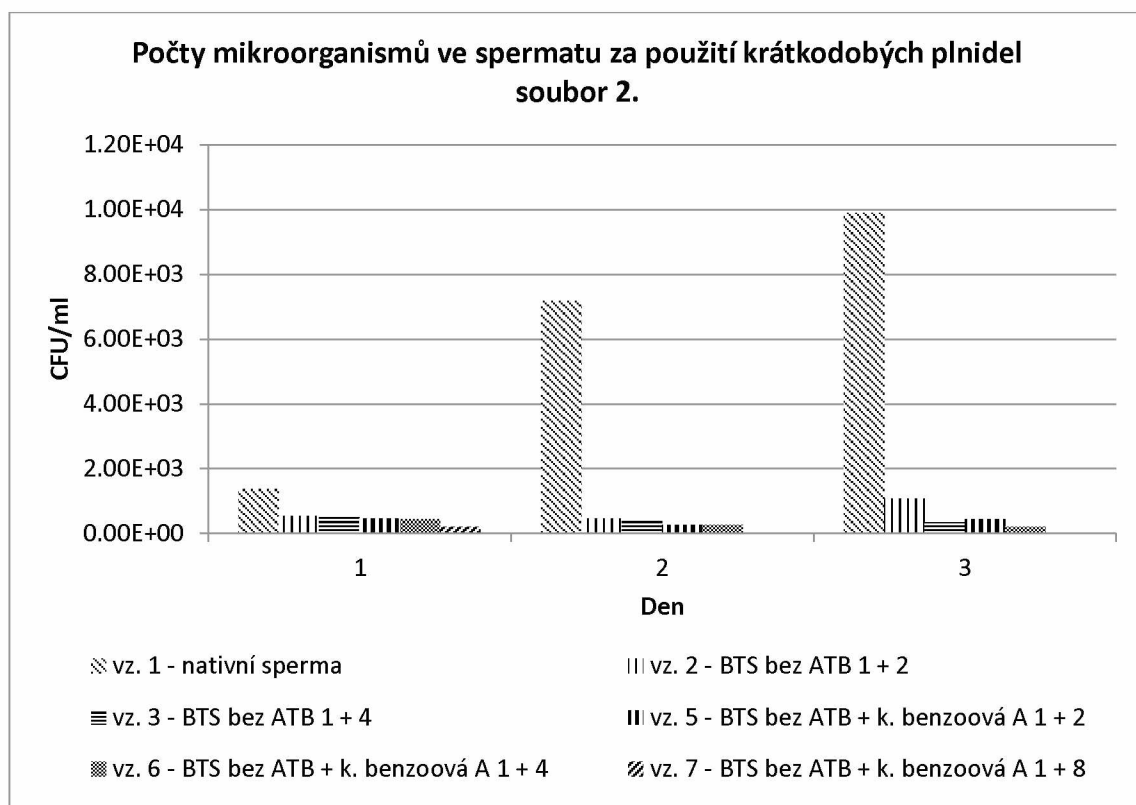
3.2 Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 2.

Tabulka 4: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 2.

Vzorek	složení	ředění	CFU/ml		
			1. den	2. den	3. den
vz. 1	nativní semeno		1,37E+03	>3,00E+03	>3,00E+04
vz. 2	BTS bez ATB	1 + 2	2,68E+02	2,30E+02	5,40E+02
vz. 3	BTS bez ATB	1 + 4	2,55E+02	1,95E+02	1,70E+02
vz. 4	BTS bez ATB	1 + 8	9,00E+01	1,25E+02	1,30E+02
vz. 5	BTS bez ATB + k. benzoová A	1 + 2	4,68E+02	2,68E+02	4,45E+02
vz. 6	BTS bez ATB + k. benzoová A	1 + 4	4,45E+02	2,70E+02	2,00E+02
vz. 7	BTS bez ATB + k. benzoová A	1 + 8	2,05E+02	<1,5E+01	>3,0E+04
vz. 8	BTS bez ATB + k. benzoová B	1 + 2	6,65E+02	2,50E+02	3,68E+02
vz. 9	BTS bez ATB + k. benzoová B	1 + 4	2,70E+02	9,50E+01	1,30E+02
vz. 10	BTS bez ATB + k. benzoová B	1 + 8	1,10E+02	<1,5E+01	7,50E+01
vz. 11	BTS bez ATB + k. benzoová C	1 + 2	2,77E+02	1,05E+02	4,95E+02
vz. 12	BTS bez ATB + k. benzoová C	1 + 4	4,40E+02	<1,5E+01	1,95E+02
vz. 13	BTS bez ATB + k. benzoová C	1 + 8	2,36E+02	<1,5E+01	1,25E+02

Vzhledem k použití krátkodobého ředidla BTS se vzorky testovaly v den dodání a dále po 24 a 48 hodinách. Se započítáním ředění jednotlivých vzorků byly nejúčinnější vzorky číslo 3 a 6. Došlo k inhibici bakterií pomocí BTS (1 + 4) a kyseliny benzoové A (1 + 4).

Na rozdíl od předchozího testování, byla kyselina benzoová A nejúčinnější. V grafu č. 2 a tabulce č. 4 je opět viditelný rostoucí počet bakterií v nativním spermatu a ve spermatu naředěném BTS (1 + 2). Nejvýznamnější inhibice bakterií byla zaznamenána u plnidla BTS bez antibiotik s kyselinou benzoovou A (1 + 4). U ostatních vzorků, včetně vzorku č. 7, se opakuje inhibice bakterií do 2. dne a následný vyšší nárůst u 3. dne. To může být způsobeno delší generační dobou některých bakterií.



Graf 2: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 2.

V těchto vzorcích převažoval viridující typ bakterie a bakterie bez hemolýzy, hemolyzující bakterie se vyskytly ojediněle. Nejčastější kolonie patřily *Bacillus* sp. a *Streptococcus* sp.

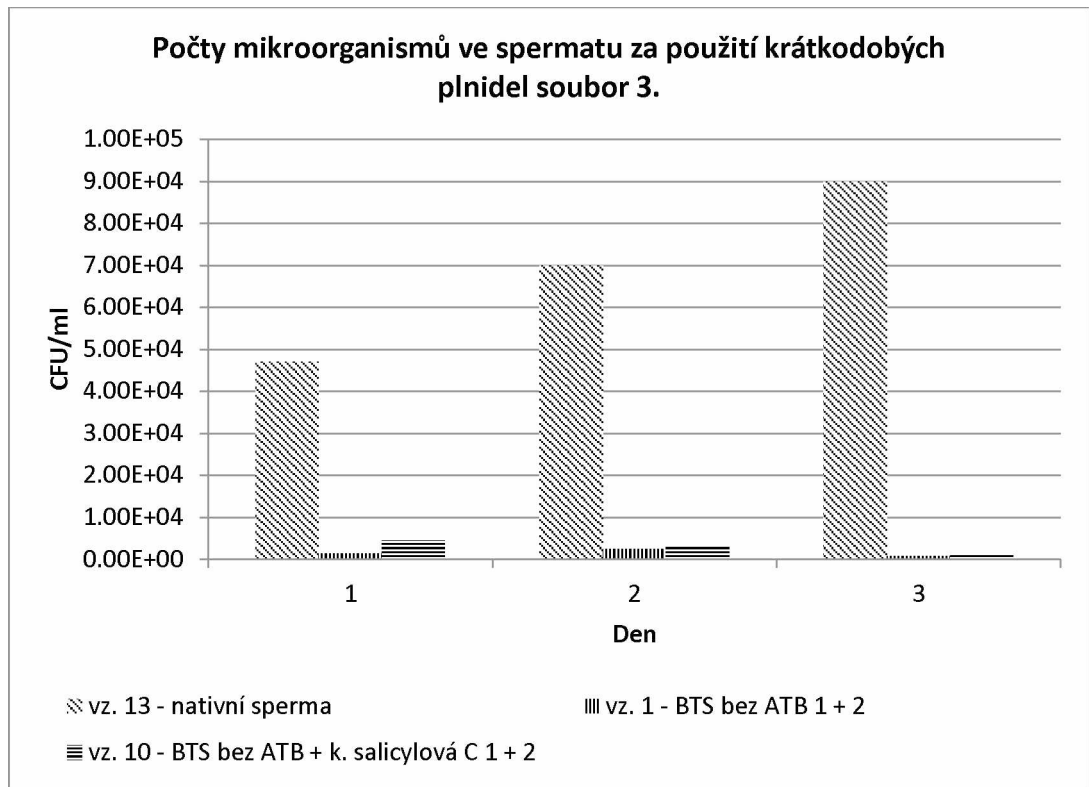
3.3 Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 3.

Tabulka 5: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 3.

Vzorek	složení	ředění	CFU/ml		
			1. den	2. den	3. den
vz. 1	BTS bez ATB	1 + 2	7,27E+02	1,24E+03	4,09E+02
vz. 2	BTS bez ATB	1 + 4	4,82E+02	1,05E+03	7,35E+02
vz. 3	BTS bez ATB	1 + 8	3,90E+02	7,20E+02	4,75E+02
vz. 4	BTS bez ATB + k. salicylová A	1 + 2	1,23E+03	1,72E+03	7,20E+02
vz. 5	BTS bez ATB + k. salicylová A	1 + 4	4,82E+02	7,55E+02	6,36E+02
vz. 6	BTS bez ATB + k. salicylová A	1 + 8	3,90E+02	8,95E+02	3,95E+02
vz. 7	BTS bez ATB + k. salicylová B	1 + 2	9,68E+02	1,35E+03	1,25E+03
vz. 8	BTS bez ATB + k. salicylová B	1 + 4	3,23E+02	7,50E+02	3,45E+02
vz. 9	BTS bez ATB + k. salicylová B	1 + 8	4,05E+02	9,36E+02	4,45E+02
vz. 10	BTS bez ATB + k. salicylová C	1 + 2	2,25E+03	1,50E+03	5,70E+02
vz. 11	BTS bez ATB + k. salicylová C	1 + 4	6,50E+02	1,30E+03	5,09E+02
vz. 12	BTS bez ATB + k. salicylová C	1 + 8	2,50E+02	3,05E+02	2,95E+02
vz. 13	nativní semeno		>3,00E+03	>3,00E+04	>3,00E+04

Vzhledem k použití krátkodobého ředidla BTS se vzorky testovaly v den dodání a dále po 24 a 48 hodinách. Jednoznačně nejúčinnější byl poměr 1 díl spermatu ku 2 dílům BTS bez antibiotik s kyselinou salicylovou C (0,15 g/l).

V grafu č. 3 a tabulce č. 5 jsou porovnány počty bakterií ve vzorcích s jistým účinkem a pro srovnání také s nativním spermatem a se spermatem ředěným BTS (1 + 2). Je znatelný rychlý růst bakterií v nativním spermatu. Vzorek č. 10 snížil počet bakterií ve vzorku spermatu téměř o jeden řád.



Graf 3: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 3.

V prvním testovacím dnu převažovaly mikroorganismy bez hemolýzy, ale ve vzorcích se v menším počtu vyskytly i bakterie s úplnou hemolýzou a viridující bakterie. V dalších dnech se však počty viridujících a bakterií bez hemolýzy vyrovnaly, oproti bakteriím s úplnou hemolýzou, které se téměř vytratily. Z těchto kolonií byl pomocí biochemických testů identifikován *Staphylococcus simulans*, *Proteus vulgaris* a *Streptococcus mitis/oralis*, *Bacillus* sp.

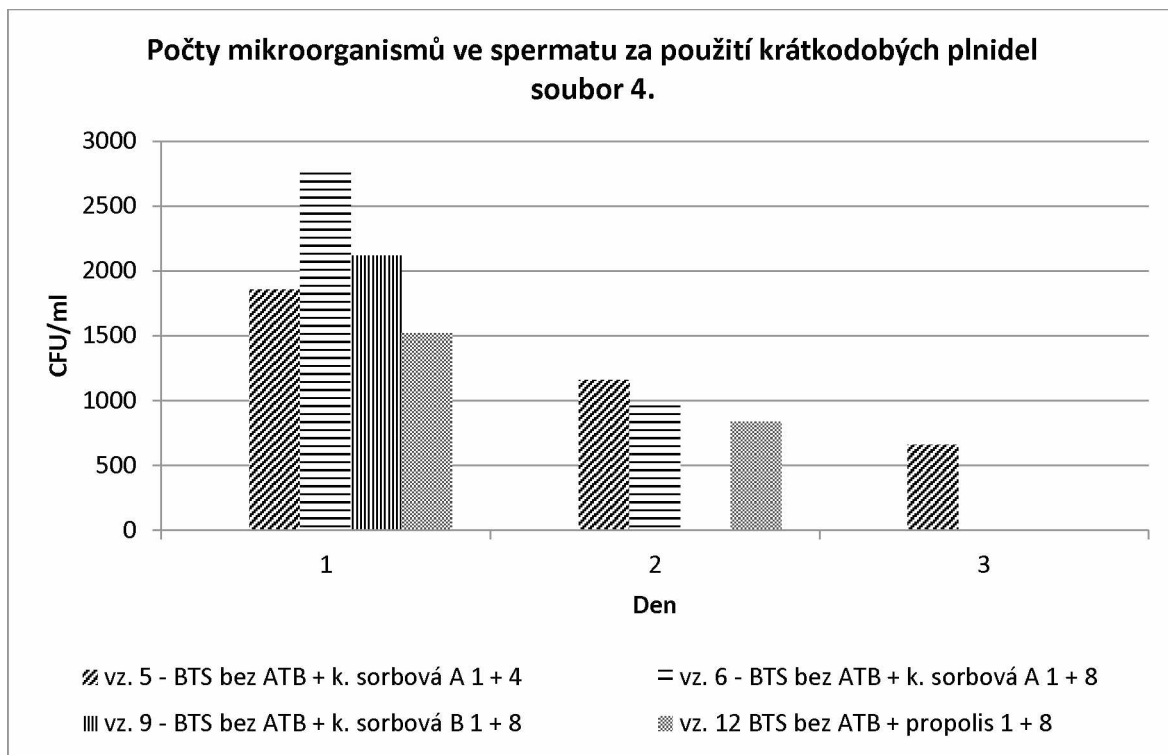
3.4 Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 4.

Tabulka 6: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 4.

Vzorek	složení	ředění	CFU/ml					
			1. den		2. den		3. den	
vz. 1	BTS bez ATB	1 + 2	6,09E+02	P	2,32E+02	P	2,60E+02	P
vz. 2	BTS bez ATB	1 + 4	3,25E+02	P	1,65E+02	P	1,35E+02	
vz. 3	BTS bez ATB	1 + 8	5,50E+02		2,00E+02	P	3,20E+02	
vz. 4	BTS bez ATB + k. sorbová A	1 + 2	4,15E+02	P	3,25E+02	P	1,65E+02	P
vz. 5	BTS bez ATB + k. sorbová A	1 + 4	4,65E+02		2,90E+02		1,65E+02	
vz. 6	BTS bez ATB + k. sorbová A	1 + 8	3,45E+02		1,20E+02		<1,50E+01	
vz. 7	BTS bez ATB + k. sorbová B	1 + 2	5,36E+02	P	1,90E+02	P	2,75E+02	P
vz. 8	BTS bez ATB + k. sorbová B	1 + 4	5,10E+02		2,60E+02		8,50E+01	P
vz. 9	BTS bez ATB + k. sorbová B	1 + 8	2,65E+02		<1,50E+01		<1,50E+01	
vz. 10	BTS bez ATB + propolis	1 + 2	8,14E+02	P	1,05E+02	P	1,75E+02	P
vz. 11	BTS bez ATB + propolis	1 + 4	4,90E+02		1,75E+02	P	1,70E+02	P
vz. 12	BTS bez ATB + propolis	1 + 8	1,90E+02		1,05E+02		<1,50E+01	
vz. 13	nativní semeno		1,86E+03	P	>3,00E+03	P	>3,0E+04	P

V tomto souboru plnidel (tabulka č. 6 a graf č. 4) se vyskytl *Proteus* sp. (P), který přerostl krevní agary a proto misky musely být vyřazeny z testování. Hodnoceny byly tedy pouze takové vzorky, které neobsahovaly bakterii *Proteus* sp.

Vzhledem k použití krátkodobého ředidla BTS se vzorky testovaly v den dodání a dále po 24 a 48 hodinách. Ze vzorků, které se daly hodnotit, všechny vykazovaly inhibiční aktivitu. Nejvíce inhibovaly vzorky č. 6, 9 a 12, tedy kyselina sorbová A (0,015 g/l) s BTS bez antibiotik (1 + 8), kyselina sorbová B (0,03 g/l) s BTS bez antibiotik (1 + 8) a propolis s BTS bez ATB (1 + 8). Z důvodu nárůstu rodu *Proteus* sp. byly půdy zpracované pouze orientačně, proto bych doporučila toto testování opakovat.



Graf 4: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 4.

Ve vzorcích převažovaly viridující bakterie a bakterie bez hemolýzy, bakterie s úplnou hemolýzou se vyskytovaly ojediněle.

3.5 Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 5.

Tabulka 7: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 5.

Vzorek	složení	ředění	CFU/ml		
			1. den	2. den	3. den
vz. 1	BIO PIG	1 + 2	<1,50E+01	<1,50E+01	<1,50E+01
vz. 2	BIO PIG	1 + 4	<1,50E+01	<1,50E+01	<1,50E+01
vz. 3	BIO PIG	1 + 8	<1,50E+01	<1,50E+01	<1,50E+01
vz. 4	BIO PIG + DICOL	1 + 2	<1,50E+01	<1,50E+01	<1,50E+01
vz. 5	BIO PIG + DICOL	1 + 4	<1,50E+01	<1,50E+01	<1,50E+01
vz. 6	BIO PIG + DICOL	1 + 8	<1,50E+01	<1,50E+01	<1,50E+01
vz. 7	VIP 3	1 + 2	<1,50E+01	<1,50E+01	<1,50E+01
vz. 8	VIP 3	1 + 4	<1,50E+01	<1,50E+01	<1,50E+01
vz. 9	VIP 3	1 + 8	<1,50E+01	<1,50E+01	<1,50E+01
vz. 10	VIP 3 + DICOL	1 + 2	<1,50E+01	<1,50E+01	<1,50E+01
vz. 11	VIP 3 + DICOL	1 + 4	<1,50E+01	<1,50E+01	<1,50E+01
vz. 12	VIP 3 + DICOL	1 + 8	<1,50E+01	<1,50E+01	<1,50E+01
vz. 13	nativní semeno		>3,00E+03	>3,00E+03	>3,00E+04

V tabulce č. 7 jsou uvedeny výsledky pro testování komerčně dodávaných ředidel BIO PIG, BIO PIG + DICOL, VIP 3 a VIP 3 + DICOL. Vzhledem k použití krátkodobých ředidel se vzorky testovaly v den dodání a dále po 24 a 48 hodinách. Jelikož jak BIO PIG, tak VIP 3 obsahuje antibiotika, nebylo možné porovnat rozdíl antibakteriální účinnosti mezi BIO PIG a BIO PIG + DICOL, stejně tak mezi VIP 3 a VIP 3 + DICOL. Doporučila bych DICOL otestovat s takovým ředidlem, který neobsahuje antibiotikum.

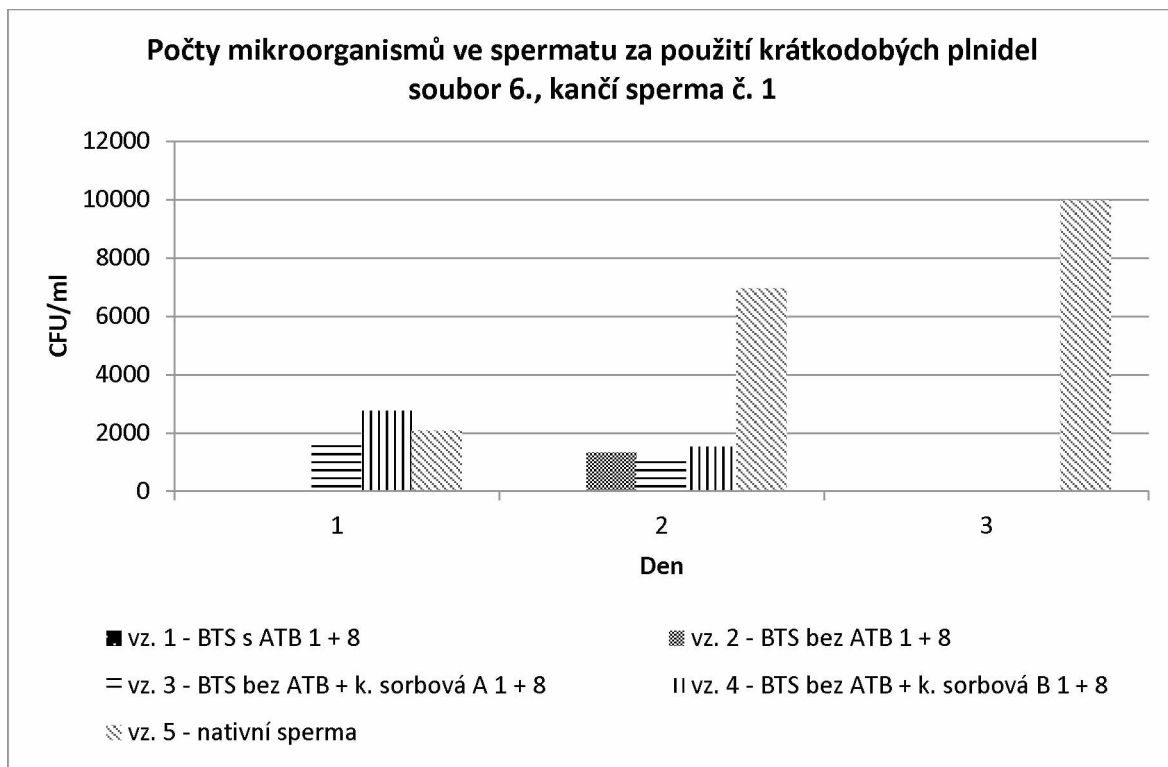
V tabulce č. 7 jsou vyobrazeny zvyšující se počty kolonií bakterií v nativním neředěném spermatu. V nativním spermatu byla směs bakterií s úplnou hemolýzou, bez hemolýzy a s neúplnou hemolýzou.

3.6 Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 6.

Tabulka 8: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 6.

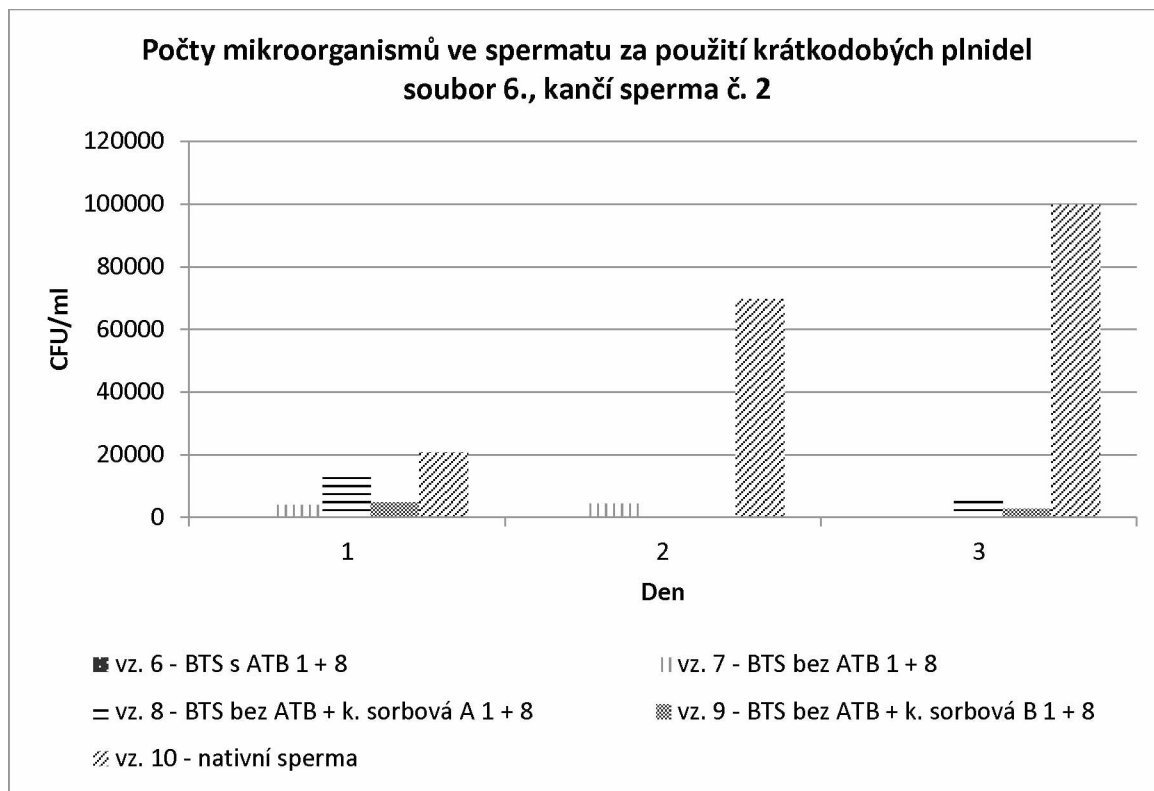
Vzorek	Kanec	složení	ředění	množství	CFU/ml		
					1. den	2. den	3. den
1	1	BTS s ATB	1 + 8	10 ml	<1,5E+01	<1,5E+01	<1,5E+01
2	1	BTS bez ATB	1 + 8	10 ml	<1,5E+01	1,65E+02	<1,5E+01
3	1	BTS bez ATB + k. sorbová A	1 + 8	10 ml	2,20E+02	1,45E+02	<1,5E+01
4	1	BTS bez ATB + k. sorbová B	1 + 8	10 ml	3,45E+02	1,90E+02	<1,5E+01
5	1	nativní semeno		8 ml	2,07E+03	>3,0E+03	>3,0E+04
Vzorek	Kanec	složení	ředění	množství	1. den	2. den	3. den
6	2	BTS s ATB	1 + 8	10 ml	<1,5E+01	<1,5E+01	<1,5E+01
7	2	BTS bez ATB	1 + 8	10 ml	5,09E+02	5,50E+02	<1,5E+01
8	2	BTS bez ATB + k. sorbová A	1 + 8	10 ml	1,68E+03	<1,5E+01	7,65E+02
9	2	BTS bez ATB + k. sorbová B	1 + 8	10 ml	6,15E+02	<1,5E+01	3,60E+02
10	2	nativní semeno		8 ml	>3,0E+04	>3,0E+04	>3,0E+04

V tomto souboru vzorků (tabulka č. 8) se testovaly dva druhy kančího spermatu. Byly na nich testovány látky, které se v předešlém testování projeví jako účinné. U obou vzorků se testovala kyselina sorbová A (0,015 g/l) a B (0,03 g/l) s BTS bez antibiotik, i s antibiotiky jako pozitivní kontrolou. Ředění bylo v poměru 1 díl spermatu ku 8 dílům testované látky. Vzhledem k použití krátkodobého ředidla BTS se vzorky testovaly v den dodání a dále po 24 a 48 hodinách. Pro vzorek spermatu kance č. 1 (graf č. 5) se obě navážky kyselin sorbových projeví jako účinné. Jak je z grafu patrné, kyselina sorbová B inhibovala bakteriální mikroflóru výrazněji. Vzorek s antibiotiky sloužil jako pozitivní kontrola, bakterie nebyly ve vzorku přítomny v koncentraci menší než 10^1 /ml spermatu. Toto ověření kyseliny sorbové A i B s BTS bez antibiotik (1 + 8) potvrdil výsledky ze souboru vzorků č. 4.



Graf 5: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 6., kančí sperma č. 1

U vzorků kančího spermatu č. 2 (graf č. 6) kyselina sorbová A i B fungovala také, ale ne tak výrazně, jako v předešlém testování. U obou kanců je znatelný nárůst bakterií v nativním spermatu.



Graf 6: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití krátkodobých plnidel soubor 6., kančí sperma č. 2

U obou kanců se vyskytovaly kolonie jak s úplnou tak neúplnou hemolýzou, i bez ní. Podle morfologie kolonií se nevyskytly žádné nové kolonie, proto již nedošlo k jejich izolaci.

3.7 Výsledky identifikace bakterií pomocí MALDI-TOF

Bakterie izolované ze vzorku spermatu, které se nepodařilo identifikovat pomocí biochemických testů, se odeslaly na vyšetření pomocí MALDI-TOF do Nemocnice Pardubického kraje, Pardubické nemocnice, Oddělení klinické mikrobiologie. Identifikovány byly *Corynebacterium glucuronolyticum*, *Corynebacterium confusum*, *Corynebacterium* sp., *Rothia nasimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus* sp., *E. coli*, *Aerococcus viridans* a *Bacillus infantis*.

Počty kolonií tvořících jednotky se ve vzorcích pohybovaly v řádech od 10^2 do 10^4 CFU/ml. Objevily se i vzorky s větším nebo menším počtem kolonií tvořících jednotky, ty byly ale nepočitatelné. Nejčastěji vyskytující se bakterie ve vzorcích kančího spermatu byly viridující bakterie, nebo bakterie bez hemolýzy. Bakterie s úplnou hemolýzou se vyskytovaly nejméně. Mezi často vyskytující se bakterie patřil

Streptococcus sp., *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium* sp.

3.8 Přírodní extrakty

Přírodní látky byly získány extrakcí o těchto koncentracích galgánu (0,096 g/ml), celeru (0,055 g/ml), petržele (0,069 g/ml), řepy (0,082 g/ml), zázvoru (0,025 g/ml), rakytníku (0,067 g/ml), rozmarýnu (0,046 g/ml), majoránky (0,068 g/ml), máty (0,057 g/ml).

Aplikováním přírodního extraktu na disk a následné změření jeho inhibiční zóny vůči bakterii byla zjištěna její citlivost na dané přírodní látky. Pomocí biochemických testů a MALDI-TOF byly identifikovány následující bakterie *Corynebacterium glucuronolyticum*, *Corynebacterium confusum*, *Corynebacterium* sp., *Rothia nasimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus* sp., *E. coli*, *Proteus* sp. Pro tyto bakterie byla sledována jejich citlivost vůči testovaným přírodním extraktům. Kromě přírodních extraktů se na disky aplikoval také 60% ethanol, ve kterém byl extrakt rozpuštěn a sloužil tak pro srovnání účinnosti.

K bakteriím izolovaným ze vzorků ejakulátu byla navíc použita sbírková *E. coli* CCM 3954, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Staphylococcus aureus* CCM 3953.

Tabulka 9: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů

Testovaný kmen	Inhibiční zóna (mm)					
	60% ethanol	galgán	petržel	celer	zázvor	řepa
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>	12	13,5	9	9,25	12	9
<i>Corynebacterium confusum</i>	10,5	12,25	9,25	9	11	9,75
<i>Corynebacterium</i> sp.	12	12	9,25	9,5	10,5	9,75
<i>Rothia nasimurium</i>	12,25	12,5	9	9,75	10,5	9,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11,5	10	9,25	8,75	10	9,25
<i>E. coli</i>	11	11	8,5	7,5	9,75	9,25
<i>Bacillus</i> sp.	14	17,5	11,5	11,25	11,25	9,75
<i>Proteus</i> sp.	6	9	8,25	6	6	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	11	11	10,25	9,75	9,75	9
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	9,75	16,5	15,25	7,25	11,5	7,25
<i>E. coli</i> CCM 3954	11	11	7,25	7,25	9	7

Poznámka: velikost disku se rovná 6 mm.

Z této sady extraktů (tabulka č. 9) měl nejlepší účinky galgán, který byl téměř u všech bakterií účinnější než 60% ethanol. Pouze u *Klebsiella pneumoniae* měl menší inhibiční účinnost.

Většina bakterií byla vůči extraktu z petržele málo citlivá, kromě *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Proteus* sp., tyto bakterie byly vůči extraktu z petržele citlivé. Obzvláště důležité je to u *Proteus* sp., protože ten byl z této sady extraktů citlivý pouze na petrželový a galgánový extrakt. *Pseudomonas aeruginosa* je slabě inhibována.

Zázvor měl inhibiční účinek na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* CCM 3953. Zázvorový extrakt byl celkově vůči bakteriím méně nebo srovnatelně účinný jak 60% ethanol.

Extrakt z celeru a řepy byly méně citlivé, než ethanol 60 %.

Tabulka 10: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů

Testovaný kmen	Inhibiční zóna (mm)				
	60% ethanol	máta	rakytník	rozmarýn	majoránka
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>	11	12,5	10,75	18	11,5
<i>Corynebacterium confusum</i>	11,25	11,5	9,75	14,5	10
<i>Corynebacterium</i> sp.	10,25	11	9,25	13,5	9,5
<i>Rothia nasimurium</i>	12	13	10	16,75	10,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11,5	10,25	9	13,5	9,5
<i>E. coli</i>	10,5	9,25	8,25	11,25	9,25
<i>Bacillus</i> sp.	11,5	14,5	13,25	16,75	12
<i>Proteus</i> sp.	6	6	6	7,75	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	10,75	10,25	11,25	12	10,25
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	10	8	8,5	15,75	10,25
<i>E. coli</i> CCM 3954	10	9,5	11	13,25	7,75

Poznámka: velikost disku se rovná 6 mm.

Extrakt z rozmarýnu (tabulka č. 10) je neúčinnější nejen z extraktů uvedených v tabulce č. 9, ale i celkově ze všech testovaných. V různém rozmezí inhibuje všechny bakterie, včetně *Proteus* sp.

Extrakt z máty některé bakterie inhibuje silněji než 60% ethanol, některé slaběji, celkově jsou účinky ethanolu a extraktu z máty vyrovnané. Silněji inhibuje například *Bacillus* sp. a slaběji *S. aureus* CCM 3953 a *E. coli*.

Extrakt z rakytníku inhiboval 3 bakterie silněji než 60% ethanol, jsou jimi *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 a *E. coli* CCM 3954.

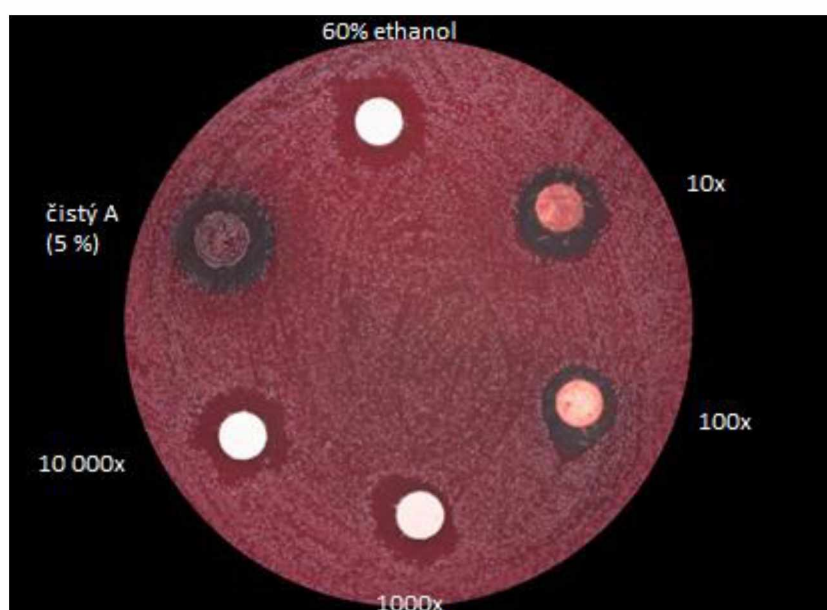
Majoránka obecně inhibovala bakterie slaběji, nebo srovnatelně s 60% ethanolem.

Tabulka 11: Vyhodnocení difúzní diskové metody u směsi s 5 % astaxanthinu

Testovaný kmen	Inhibiční zóna (mm)					
	60% ethanol	10x	100x	1000x	10000x	čistá směs
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>	10,5	10	11,5	9,5	9,5	9
<i>Corynebacterium confusum</i>	11,5	11,5	11,5	10	9,5	8,5
<i>Corynebacterium</i> sp.	10	9,5	10	10	10	6
<i>Rothia nasimurium</i>	12	10	9	10	11	11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12,5	9	10,5	10	11	7
<i>E. coli</i>	11,5	9	9	9,5	10,5	6
<i>Bacillus</i> sp.	12	12,5	11	11,5	11	13,5
<i>Proteus</i> sp.	6	8	6	6	6	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	12	9	10	10,5	11,5	10,5
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	11	11	9	6	6	12,5
<i>E. coli</i> CCM 3954	10,5	9	10	10	11	9,5

Poznámka: velikost disku se rovná 6 mm.

Směs obsahující 5 % astaxanthinu (tabulka č. 11 a obrázek č. 8) měla nejlepší inhibiční účinky, když byla zředěna 10x, i tak měla ale obecně slabší účinek, než 60% ethanol. Nejvíce citlivý byl na směs s 5 % astaxanthinu *Bacillus* sp., nejméně citlivý byl *Proteus* sp.



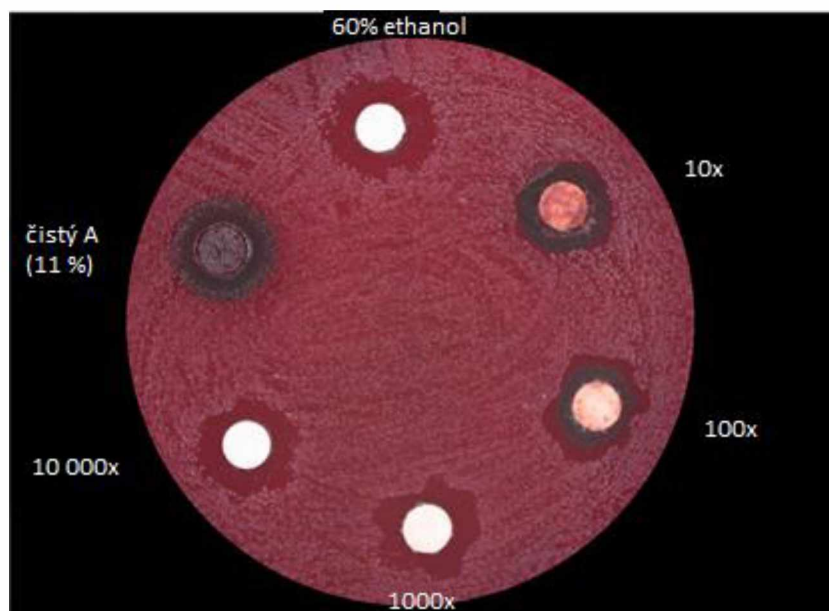
Obrázek 8: 60% ethanol, 10x, 100x, 1000x a 10 000x ředěný astaxanthin, neředěná směs s 5% astaxanthinu, M-H agar, *Bacillus* sp., kultivace při 37 °C, 24 h (foto autor)

Tabulka 12: Vyhodnocení difúzní diskové metody u směsi s 11 % astaxanthinu

Testovaný kmen	Inhibiční zóna (mm)					
	60% ethanol	10x	100x	1000x	10000x	čistá směs
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>	10,5	10	10	11,5	10,5	9
<i>Corynebacterium confusum</i>	10	12,5	10,5	9	14	6,5
<i>Corynebacterium sp.</i>	10,5	10,5	10	10,5	9,5	6
<i>Rothia nasimurium</i>	12	12	12	10,5	11	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11	9,5	8,5	8,5	11	7
<i>E. coli</i>	11	8,5	9,5	10	11,5	6
<i>Bacillus sp.</i>	12,5	12	12,5	13	12	11,5
<i>Proteus sp.</i>	6	7	8,5	6	6	10,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	12	9,5	10	10,5	11,5	10,5
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	7,5	9,5	9	9,5	7	17
<i>E. coli</i> CCM 3954	10,5	9,5	10,5	10	11	10

Poznámka: velikost disku se rovná 6 mm.

U směsi obsahující 11 % astaxanthinu (tabulka č. 12 a obrázek č. 9) bylo nejvíce účinné ředění 10x a 100x. Tato ředění měla obecně lepší inhibiční vlastnosti, než 60 % ethanol, ale ne výrazně. Nejvíce citlivý byl *Bacillus sp.* a *Rothia nasimurium* a nejméně citlivý byl opět *Proteus sp.* Všechny bakterie byly citlivější na směs obsahující 11 % astaxanthinu, má tedy lepší inhibiční účinky.



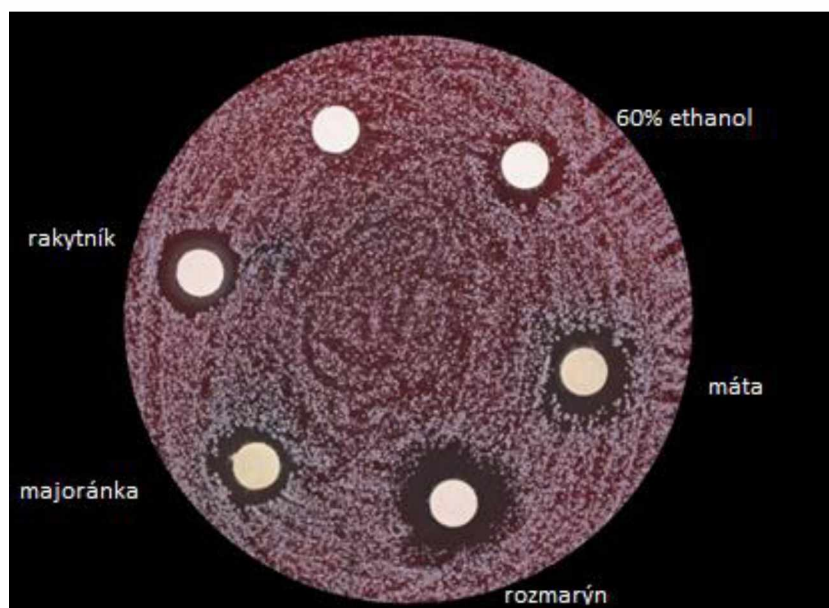
Obrázek 9: 60% ethanol, 10x, 100x, 1000x a 10 000x ředění astaxanthin, neředěná směs s 11 % astaxanthinu, M-H agar, *Bacillus sp.*, kultivace při 37 °C, 24 h (foto autor)

3.8.1 *Corynebacterium glucuronolyticum*

Tuto bakterii nejvíce inhiboval rozmarýn, galgán a zázvor (viz příloha tabulka č. 16).

3.8.2 *Corynebacterium confusum*

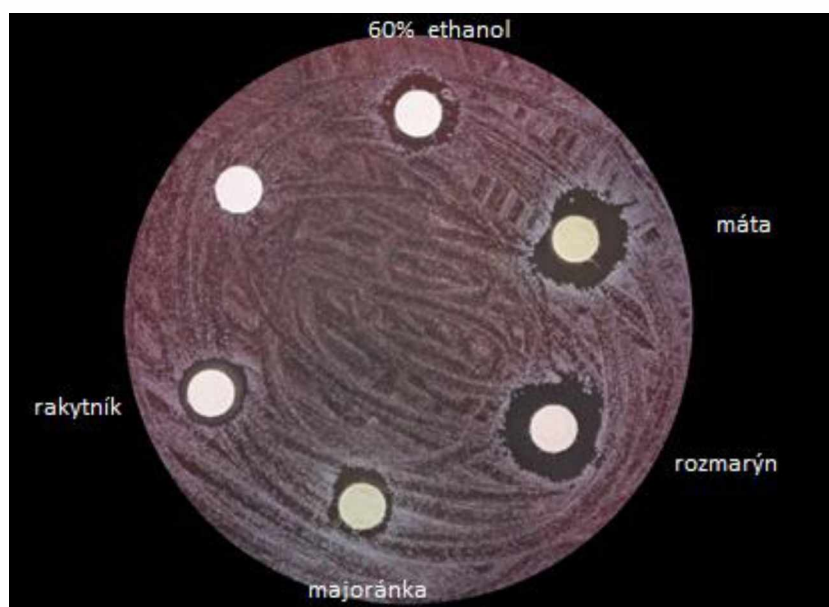
Corynebacterium confusum byla nejvíce inhibována rozmarýnem, galgánem a zázvorem (viz příloha tabulka č. 17 a obrázek č. 10).



Obrázek 10: 60% ethanol, extrakt z máty, rozmarýnu, majoránky, rakytníku, M-H agar, *Corynebacterium confusum*, kultivace při 37 °C, 24 h (foto autor)

3.8.3 *Corynebacterium* sp.

Rozmarýn byl pro tuto bakterii nejsilnějším inhibičním přírodním extraktem (viz příloha tabulka č. 18 a obrázek č. 11).



Obrázek 11: 60% ethanol, extrakt z máty, rozmarýnu, majoránky, rakytníku, M-H agar, *Corynebacterium* sp., kultivace při 37 °C, 24 h (foto autor)

3.8.4 *Rothia nasimurium*

Pro tuto bakterii měl nejsilnější inhibiční účinek rozmarýn, galgán a máta (viz příloha tabulka č. 19).

3.8.5 *Klebsiella pneumoniae*

Bakterie *Klebsiella pneumoniae* je citlivá pouze vůči rozmarýnovému extraktu (viz příloha tabulka č. 20).

3.8.6 *Bacillus* sp.

Bacillus sp. je citlivý na extrakt z galgánu, rozmarýnu a rakytníku (viz příloha tabulka č. 21).

3.8.7 *E. coli*

U této bakterie se žádný přírodní extrakt neprojevil jako účinnější než 60% ethanol (viz příloha tabulka č. 22).

3.8.8 *Proteus* sp.

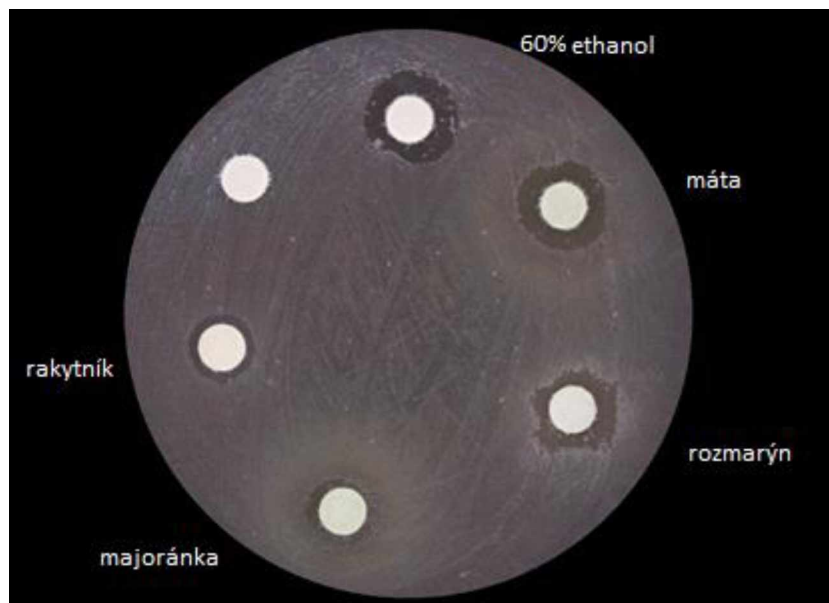
Na *proteus* sp. měla největší vliv neředěná směs s astaxanthinem. Celkově byl *Proteus* sp. málo citlivý vůči extraktům. Nižší citlivost projevil ještě vůči galgánu, rozmarýnu, petrželi a 100x naředěné směsi s astaxanthinem (viz příloha tabulka č. 23).

3.8.9 *E. coli* CCM 3954

Pro tuto *E. coli* byl nejúčinnější extrakt z rozmarýnu (viz příloha tabulka č. 24).

3.8.10 *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

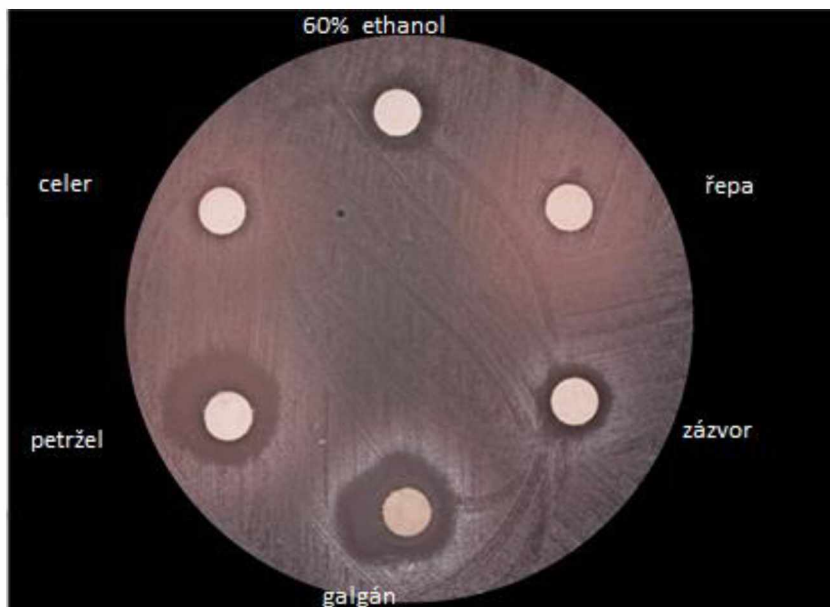
Tato bakterie nebyla výrazně citlivá na žádný extrakt (viz příloha tabulka č. 25 a obrázek č. 12).



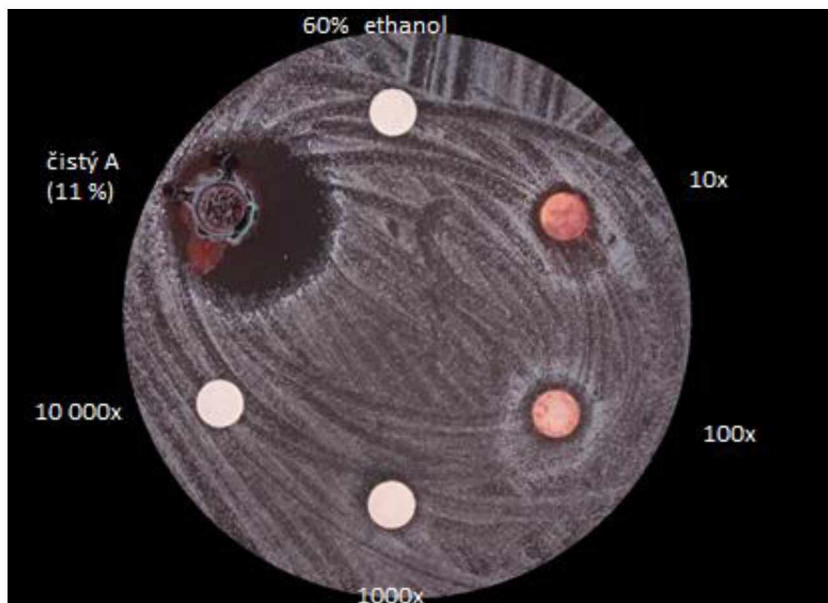
Obrázek 12: 60% ethanol, extrakt z máty, rozmarýnu, majoránky, rakytníku, M-H agar, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, kultivace při 37 °C, 24 h (foto autor)

3.8.11 *Staphylococcus aureus* CCM 3953

Staphylococcus je citlivý na galgán, petržel a rozmarýn. Projevil také citlivost na směs s 11 % astaxanthinu (viz příloha tabulka č. 26 a obrázek č. 13 a 14).



Obrázek 13: 60% ethanol, extrakt z řepy, zázvoru, galgánu, petržele, celeru, M-H agar, *Staphylococcus aureus* CCM 3953, kultivace při 37 °C, 24 h (foto autor)



Obrázek 14: 60% ethanol, 10x, 100x, 1000x a 10 000x ředěný astaxanthin, neředěná směs s 11 % astaxanthinu, M-H agar, *Staphylococcus aureus* CCM3953 kultivace při 37 °C, 24 h (foto autor)

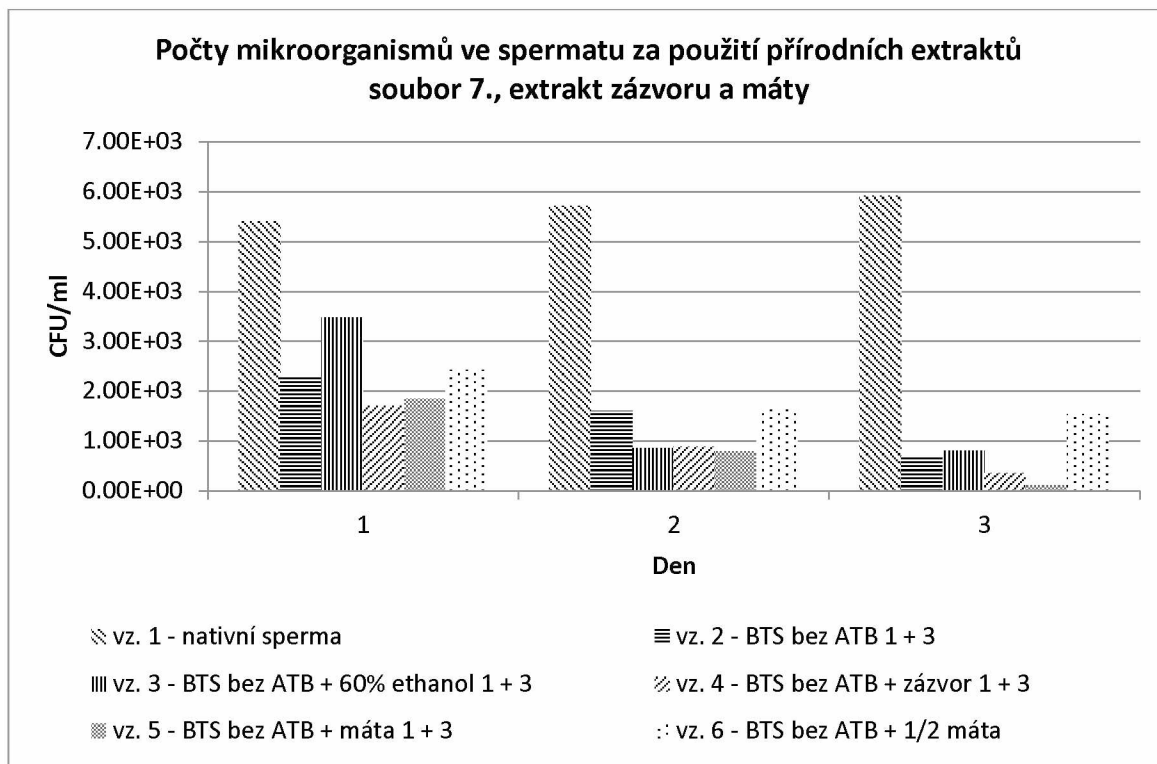
Co se týče porovnání citlivosti mezi jednotlivými bakteriemi, citlivost stoupá zleva doprava *Proteus* sp. < *E. coli* < *E. coli* CCM 3954 < *Klebsiella pneumoniae* < *Corynebacterium* sp. < *Staphylococcus aureus* CCM 3953 < *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 < *Corynebacterium confusum* < *Corynebacterium glucuronolyticum* < *Rothia nasimurium* < *Bacillus* sp. Necitlivé bakterie jsou většinou gramnegativní a citlivější bakterie jsou grampozitivní.

3.9 Počty mikroorganismů ve spermatu za použití přírodních extraktů soubor 7.

Tabulka 13: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití přírodních extraktů soubor 7.

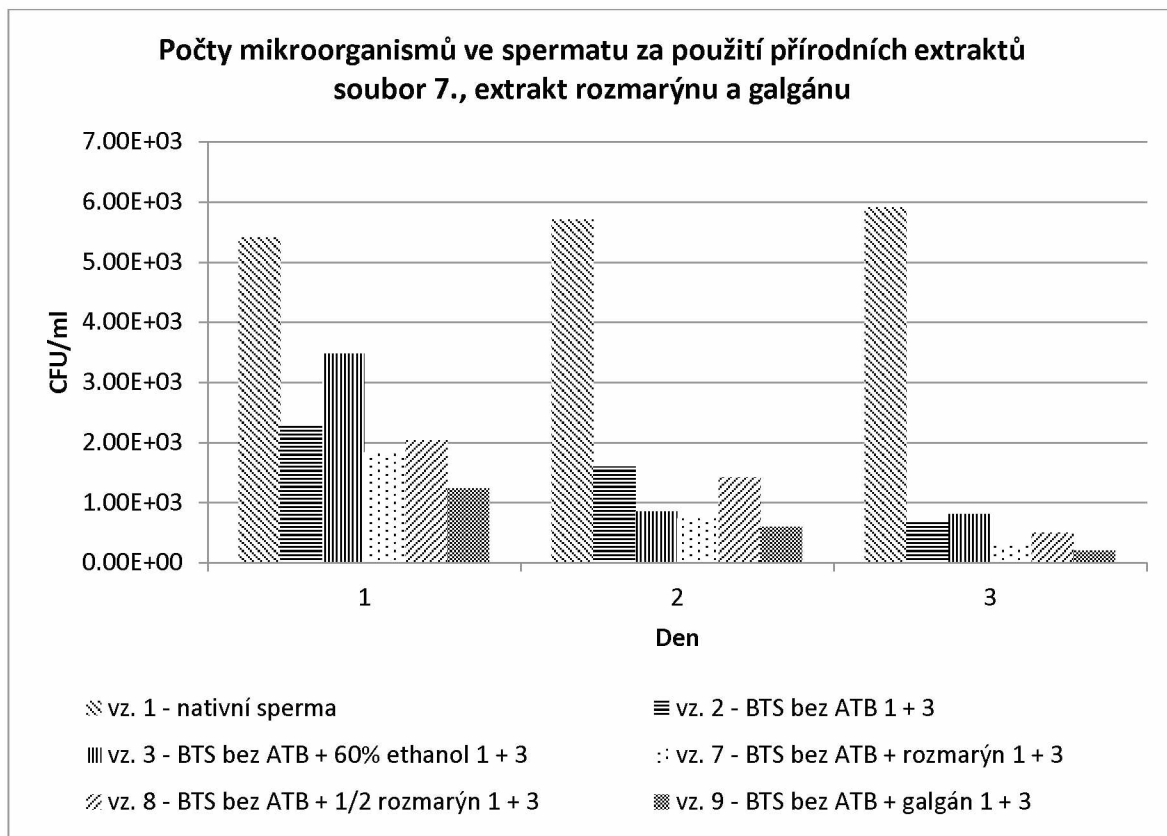
vzorek	složení	ředění	CFU/ml		
			1. den	2. den	3. den
vz. 1	nativní semeno		>3,0E+03	>3,0E+03	>3,0E+04
vz. 2	BTS bez antibiotik	1 + 3	7,64E+02	5,35E+02	2,30E+02
vz. 3	BTS bez antibiotik + 60% ethanol	1 + 3	1,16E+03	2,85E+02	2,70E+02
vz. 4	BTS bez antibiotik + zázvor	1 + 3	5,70E+02	2,95E+02	1,20E+02
vz. 5	BTS bez antibiotik + máta	1 + 3	6,15E+02	2,65E+02	<1,50E+01
vz. 6	BTS bez antibiotik + 1/2 máta	1 + 3	8,09E+02	5,55E+02	5,15E+02
vz. 7	BTS bez antibiotik + rozmarýn	1 + 3	6,09E+02	2,45E+02	<1,50E+01
vz. 8	BTS bez antibiotik + 1/2 rozmarýn	1 + 3	6,80E+02	4,75E+02	1,65E+02
vz. 9	BTS bez antibiotik + galgán	1 + 3	4,10E+02	2,00E+02	<1,50E+01

Nativní semeno se naředilo BTS bez antibiotik s přírodními extrakty v poměru 1:3. Testovaly se takové extrakty (tabulka č. 13), které měly nejvyšší inhibiční účinnost vůči jednotlivým bakteriím. Pro porovnání sloužily vzorky č. 2 a 3, které jsou zobrazeny v obou grafech. Vzhledem k použití krátkodobého ředidla BTS se vzorky testovaly v den dodání a dále po 24 a 48 hodinách. V grafu č. 7 je znatelná klesající tendence všech testovaných extraktů, včetně kontrolních vzorků. V nativním spermatu se podle očekávání zvyšují počty mikroorganismů. Z grafu č. 7 je patrné, že přírodní extrakty rozpuštěné v ethanolu mají lepší inhibiční účinky, než ethanol samotný. Toto tvrzení neplatí pro vzorek 6, protože máta byla 2x zředěná, tudíž její účinek je menší, než vzorek 5, tedy extrakt z máty nezředěný.



Graf 7: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití přírodních extraktů soubor 7., extrakt zázvoru a máty

V grafu č. 8 je opět znatelný inhibiční vliv všech extraktů na bakterie a také to, že naředěný rozmarýn má menší inhibiční účinek, než nenaředěný. Dvakrát naředěný rozmarýn má kromě prvního dne menší inhibiční vliv na bakterie, než kontrolní vzorek s nativním spermatem naředěným BTS a ethanolem.



Graf 8: Počty mikroorganismů ve spermatu za použití přírodních extraktů soubor 7., extrakt rozmarýnu a galgánu

Všechny neředěné přírodní extrakty prokázaly dobré inhibiční účinky proti bakteriím kančího spermatu a potvrdily se tedy inhibiční účinky, které byly testovány diskovým difúzním testem.

3.10 Test toxicity přírodních extraktů na motilitu spermií

Byla testována toxicita přírodních extraktů na spermie smícháním nativního spermatu s BTS bez antibiotik a s příslušným extraktem. Hodnotila se procentuální motilita spermií v časech 0 h, 1, 4, 24, 48 a 72 h po smísení těchto 3 složek. Pro kontrolu sloužil vzorek 1, nativní sperma s BTS bez antibiotik.

Tabulka 14: Toxicita přírodních extraktů v čase na kančí spermie [%]

č. vz.		0h	1 h	4h	24h	48h	72h
1	BTS bez ATB	90	90	90	80	75	65
2	BTS + ethanol	80	80	80	75	60	30
3	BTS + zázvor 1	70	75	75	75	5	0
4	BTS + zázvor 2	60	75	75	55	5	< 5
5	BTS + galgán 1	0	0	0	0	0	0
6	BTS + galgán 2	0	0	0	0	0	0
7	BTS + rozmarýn 1	5	10	< 5	< 5	0	0
8	BTS + rozmarýn 2	5	10	0	< 5	0	0
9	BTS + máta 1	5	5	0	0	0	0
10	BTS + máta 2	15	5	0	0	0	0
11	BTS + 1/2 rozmarýn 1	35	30	30	15	10	10
12	BTS + 1/2 rozmarýn 2	25	30	30	10	5	5
13	BTS + 1/2 máta 2	50	60	55	< 5	0	0
14	BTSA + 1/2 máta 1	40	25	5	0	0	0

V tabulce 14. měly všechny přírodní extrakty negativní vliv na spermie a to i přes to, že některé byly 2krát naředěné. Nejlepší výsledky měl v prvních hodinách zázvor, nejhorší měl galgán, který usmrtil všechny spermie ihned po jeho přidání do směsi nativního spermatu s BTS bez antibiotik.

3.11 Antimikrobiální citlivost vybraných bakterií na antibiotika

V tabulce č. 15 jsou uvedeny průměrné inhibiční zóny (v mm) jednotlivých antibiotik na vybrané bakterie. Citlivost byla určena dle tabulky breakpointů EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 9.0, 2019, <http://www.eucast.org>).

Tabulka 15: Antimikrobiální citlivost vybraných bakterií na antibiotika

	P	CIP	TE	CN	VA	SXT
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>	40 +	34,5	24	35,5	23,5	22
<i>Corynebacterium confusum</i>	40 +	38,5	30	36	19	16
<i>Corynebacterium sp.</i>	33	34,5	32,5	30,5	17,5	19
	AK	CIP	C	FEP	CN	W
<i>Rothia nasimurium</i>	21	20,5	30	24,5	22	24,5
	TZP	IMP	ATM	AK	CN	LEV
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	23,5	25,5	24,5	23	23,5	26
	FOX	DA	E	SXT	TE	CIP
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	29	27,5	28	25	27	27
	AMP	AMC	CXM	SXT	CFR	TGC
<i>E. coli</i> CCM 3954	20,5	22	24	24	19	24,5

Poznámka: inhibiční zóny v mm.

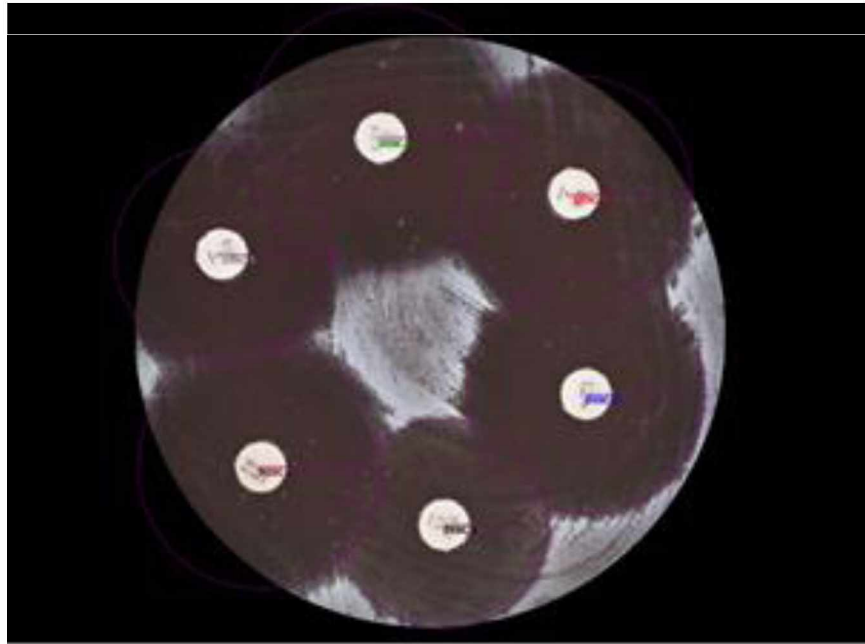
Kmeny bakterie rodu *Corynebacterium* jsou citlivé na použitá antibiotika.

Pseudomonas aeruginosa CCM 3955 je citlivá ke všem vybraným antibiotikům.

Staphylococcus aureus CCM 3953 je citlivý vůči všem antibiotikům (obrázek č. 19).

Z čeledi *Enterobacteriaceae* je na Ampicilin rezistentní *E. coli* a *Klebsiella pneumoniae*. Na antibiotikum Sulphamethoxazole/trimethoprim je rezistentní *E. coli* a *Klebsiella pneumoniae*, obě bakterie jsou izolované z kančího spermatu.

Nejcitlivější bakterie jsou *Corynebacterium sp.* a nejméně citlivá je *E. coli* izolovaná z kančího spermatu.



Obrázek 15: Testování antimikrobiální citlivosti u bakterie *Staphylococcus aureus* CCM 3953, FOX, CLI, ERY, SXT, TE, CIP, M-H agar, 37 °C, 24 h (foto autor)

4 Diskuze

Celkové počty kolonií tvořících jednotky se ve vzorcích pohybovaly v řádech $10^2 - 10^4$ CFU/ml. Objevily se i vzorky s větším ($1,50E+01$ CFU/ml) nebo menším počtem kolonií tvořících jednotky ($3,0E+04$ CFU/ml). Tyto hodnoty odpovídají výsledkům výzkumu Sepúlvedy *et al.* (2014) kde uvádí, že průměrné hodnoty v nativním spermatu se pohybují řádově mezi $10^3 - 10^5$ CFU/ml, ale můžou dosáhnout hodnoty až 10^9 CFU/ml. Vzorky studie Pinarta *et al.* (2016) dosáhly hodnot 10^7 CFU/ml.

Nejčastěji se vyskytující bakterie ve vzorcích kančího spermatu byly viridující bakterie, nebo bakterie bez hemolýzy. Bakterie s úplnou hemolýzou se vyskytovaly nejméně. Mezi často se vyskytující bakterie patřil *Streptococcus* sp., *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium* sp. Studie Brescianiho *et al.* (2014) prokázala nejčastější výskyt bakterií *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia marcescens*, *Proteus* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Spahylococcus aureus*. Přizemž *E. coli* byla nejhojněji se vyskytující bakterie a *Pseudomonas aeruginosa* byla nalezena pouze v jednom vzorku. Na rozdíl od této studie se v mých vzorcích velmi často vyskytovala *Klebsiella pneumoniae* a *Bacillus* sp.

V následujících odstavcích se budu zabývat přírodními látkami s antimikrobiálními účinky. Kyselina benzoová byla jako inhibiční látka testována dvakrát v několika navážkách a v různých poměrech ředění. Jde o organickou kyselinu, jejíž funkční vzorec je C_6H_5COOH (Shaffique a Ahmad, 2017). Její použití je možné právě v procesu rozmnožování kanců (Alborzi *et al.*, 2018). Kyselina benzoová má antifungální a antibakteriální vlastnosti (Shaffique a Ahmad, 2017). Její antimikrobiální aktivita je nepřímo úměrná s pH média. Nedisociovaná forma kyseliny benzoové při nízkém pH může procházet buněčnou membránou účinněji, než její disociovaná forma při vyšším pH. Autoři této studie dokázali inhibiční účinek kyseliny benzoové vůči *E. coli* (Alborzi *et al.*, 2018). V jiném výzkumu byla kyselina benzoová vyhodnocena jako nejúčinnější monokarboxylová kyselina z dalších kyselin jako například mravenčí, propionová, máselná, mléčná a dikarboxylová fumarová kyselina. Byla testována vůči koliformním bakteriím a bakteriím mléčného kvašení (Knarreborg *et al.*, 2002). S těmito výsledky koresponduje také studie Papatsiros *et al.* (2011) a tvrdí, že kyselina benzoová má antibakteriální účinky především vůči koliformním bakteriím. Tato skutečnost byla

ověřena přidavkem kyseliny benzoové do krmiva selat a následně se sledoval úbytek *E. coli*. Kyselina benzoová způsobuje výrazné snížení denzity a aktivity gastrointestinálních bakterií, které mohou snadno kontaminovat také kančí sperma. Ve studii Friedmana *et al.* (2003) naopak k žádné inhibici bakterií pomocí kyseliny benzoové nedošlo. V mých výsledcích se v prvním testování (tabulka č. 3) potvrdily inhibiční účinky kyseliny benzoové B a C a to především s ředěním 1 + 4. Z druhého testování (tabulka č. 4) to naopak byla kyselina benzoová A s ředěním také 1 + 4. Tato testovaná látka je nejlépe funkční do 2. dne konzervace.

Kyselina salicylová je fenolická sloučenina a jedná se o derivát kyseliny benzoové. Takové sloučeniny vykazují antibakteriální aktivitu vůči bakteriálním patogenům. Ve studii Joshi *et al.* (2015) kyselina salicylová prokázala vyšší antibakteriální účinek, než ostatní vybrané fenolické sloučeniny. Tato kyselina se prokázala jako inhibiční vůči *Escherichia coli* a *Pectobacterium* sp. Zároveň bylo zjištěno, že i když kyselina salicylová znatelně snižuje růst bakterií, tak také trvale zvyšuje motilitu většiny kmenů. Autoři díky kyselině prokázali snížení tvorby biofilmu a také redukci bakteriálních exoenzymů, které přispívají k virulenci mikroorganismu, tudíž se zmenšuje pravděpodobnost propuknutí infekce. V článku autorů Li *et al.* (2015) kyselina salicylová inhibuje pouze některé gramnegativní bakterie a na grampozitivní nemá vliv. V mé práci jsem dosáhla obdobných výsledků, zvyšovaly se počty kolonií viridujících bakterií (*Streptococcus mitis/oralis*) a počty většiny ostatních gramnegativních kolonií se zmenšovaly. Nejúčinnější inhibice bakterií byla zaznamenána ve vzorku 10, kde byla kyselina salicylová C ředěná 1 + 2. Z výsledků další studie vyplývá, že kyselina salicylová inhibuje další bakterie jako například *Campylobacter pylori*, *Helicobacter pylori* a *Klebsiella pneumoniae* (Zimmermann a Curtis, 2017).

Kyselina sorbová a její draselná sůl (sorban draselný) jsou široce používané antimikrobiální látky (Sofos a Busta, 1981). Tyto látky inhibují růst bakterií různými mechanismy, jako například změnou buněčných membrán, inhibicí transportních systémů a klíčových enzymů, vytvořením protonového toku do buňky nebo kombinací několika těchto účinků najednou. Bylo také dokázáno, že je schopná ničit i spory. V této studii potvrdili inhibici bakterií jako například různých kmenů *Bacillus*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* a kmenů *Pseudomonas*, včetně *Pseudomonas aeruginosa* (Sofos *et al.*, 1986). Výsledek týkající se *Proteus vulgaris* se neshoduje s mým, jelikož mé vzorky byly často kontaminované *Proteus* sp., tudíž nedošlo k jeho inhibici kyselinou sorbovou. Z krevních agarů, které nebyly porostlé *Proteus* sp., nejlépe vyšlo ředění kyseliny

sorbové B 1 + 8, kde klesly počty kolonií o 2 řády. Dle studie Zare *et al.* (2014) inhibovala kyselina sorbová a sorbát draselný *S. aureus* a nebyl pozorován žádný inhibiční účinek na *E. coli*. Dále bylo zjištěno, že použitím NaCl a snížením hodnoty pH mohou být posíleny jejich bakteriostatické účinky, což by ale mohlo být kontraproduktivní vůči spermii. Kvůli nárůstu *Proteus* sp. na krevních agarrech (tabulka č. 6) se testování kyseliny sorbové opakovalo a tentokrát vzorky tuto bakterii neobsahovaly. U obou kanců se při tomto testování (tabulka č. 8) projevila jako účinná kyselina sorbová A i B ředění 1 + 8. Ve spermatu kance č. 1 byla větší inhibice bakteriální mikroflóry potvrzena, stejně jako v předchozím testování (tabulka č. 6), u kyseliny sorbové B. U vzorku spermatu kance č. 2 byla nepatrně účinnější kyselina sorbová A, avšak celkově ve spermatu kance č. 2 byla kyselina sorbová méně účinná. Z výsledků je patrné, že kyselina sorbová má antimikrobiální účinky a ve výzkumu Weia *et al.* (2018) tuto účinnost dokázali znásobit. Kyselinu sorbovou syntetizovali s estery aminokyselin a dosáhli tak inhibice *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Aspergillus niger*. Tato studie by mohla sloužit jako podklad k dalšímu testování.

Propolis je včelami produkovaná pryskyřičná látka (Campos *et al.*, 2015), která se testovala ve třech ředěních. Dvě ředění byly kontaminovány *Proteus* sp., proto se hodnotilo pouze jedno ředění (1 + 8) a to bylo proti bakteriím účinné. Za 3 dny klesl počet kolonií tvořících jednotky téměř o dva řády. Na začátku testování se ve vzorcích vyskytovaly nejvíce viridující bakterie. Autoři Campos *et al.* (2015) zjistili, že ethanolový extrakt z propolisu prokazuje antimikrobiální účinnost proti všem hodnoceným bakteriím, mezi kterými byl například *S. aureus*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. Jiná studie tvrdí, že citlivější jsou grampozitivní bakterie jako například *Enterococcus faecalis* a odolnější jsou gramnegativní bakterie, jako například *Salmonella* sp. (Stepanović *et al.*, 2003). V další studii dosáhli obdobných výsledků, kdy propolis zcela inhiboval *S. aureus*, včetně kmenů MRSA. Dále zcela inhiboval *S. epidermis*, *Corynebacterium* sp., *Bacillus cereus* a další. Částečně inhiboval *P. aeruginosa*, *E. coli*, nicméně neměl žádný vliv na *Klebsiella pneumoniae* (Grange a Davey, 1990).

Další z testovaných látek byl BIO PIG, BIO PIG + DICOL, VIP 3 a VIP 3 + DICOL. Jelikož jak BIO PIG, tak VIP 3 obsahuje antibiotika, nebylo možné porovnat rozdíl antibakteriální účinnosti mezi BIO PIG a BIO PIG + DICOL, stejně tak mezi VIP 3 a VIP 3 + DICOL. Doporučila bych DICOL otestovat s takovým ředidlem, který neobsahuje antibiotikum. Karageorgiou *et al.*, (2016) porovnávali krátkodobé ředidlo BIO PIG, střednědobé OPTIM-I-A a dlouhodobé ředidlo DURAGEN. Autoři vyhodnotili, že pro

uchování kvality kančího spermatu po dobu 3 dní při 17 °C je nevhodnější použít dlouhodobé ředidlo oproti ostatním.

Dále byla testována antibakteriální aktivita přírodních extraktů diskovou difuzní metodou. Výsledky jsem porovnávala ve dvou sadách extraktů, v první sadě byl galgán, petržel, celer, zázvor, řepa a ve druhé sadě byla máta, rakytník, rozmarýn, majoránka. Poté jsem zvlášť porovnávala výsledky mezi směsí obsahující 5 a 11 % astaxanthinu. Z první sady (tabulka č. 9) extraktů měl nejlepší účinky galgán, který byl téměř u všech bakterií účinnější než 60% ethanol. Pouze u *Klebsiella pneumoniae* měl menší inhibiční účinnost. Dle autorů Mayachiew a Devahastin (2008) je ethanolový extrakt galgánu účinný proti *Staphylococcus aureus* hlavně díky 1,8 – cineolu. Na tento výsledek navazuje i Oonmetta-aree *et al.* (2006), který potvrzuje silnou inhibici ethanolového extraktu galgánu proti *S. aureus* a navíc i proti *S. epidermidis* a *Sacharomyces cerevisiae*. Tyto výsledky korespondují s mými výsledky, kdy extrakt galgánu byl vůči *S. aureus* druhý nejúčinnější. Výsledky Oonmetta-aree *et al.* (2006) také udávají menší antibakteriální účinek na *Bacillus cereus* a *B. megaterium* a žádný antibakteriální účinek vůči *Pseudomonas aeruginosa* a *E. coli*. Tyto výsledky téměř odpovídají i mým výsledkům, jelikož měl extrakt z galgánu stejnou inhibiční účinnost jako samotný ethanol. Avšak na *Bacillus* sp. měl extrakt inhibiční účinek nejsilnější. Dle Voravuthikunchai *et al.* (2008) je účinný také chloroformový extrakt a to proti MRSA. Studie Victório *et al.* (2009) dokázala, že esenciální olej z listu galgánu inhiboval všechny testované bakterie, mezi které patřila *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Staphylococcus epidermidis*.

Většina bakterií byla vůči extraktu z petržele málo citlivá, kromě *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Proteus* sp. Obzvlášť důležité je to u *Proteus* sp., protože ten byl z první sady extraktů citlivý pouze na petrželový a galgánový extrakt (tabulka č. 9). Značná citlivost *Staphylococcus aureus* na petrželový extrakt je doložena výsledky studie Elgayyar *et al.* (2001), kromě *Staphylococcus aureus* extrakt silně inhibuje ještě *Yersinia enterocolitica*. Mezi dalšími autorovými výsledky a mými výsledky existuje i shoda u *Pseudomonas aeruginosa*. Na rozdíl od mé bakterie, která patří do sbírky na testování citlivosti, autorova *Pseudomonas aeruginosa* byla izolována z vnějšího ucha. I tak byly tyto bakterie obě slabě inhibovány extraktem z petržele.

Zázvor měl inhibiční účinek na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* CCM 3953. Inhibiční účinek zázvorového extraktu byl srovnatelný nebo nižší než 60% ethanol. Inhibici bakterie *Staphylococcus aureus* potvrzuje výzkum autora Gull *et al.* (2012). Ten mimo jiné tvrdí, že ethanolový extrakt zázvoru dále také působí na *Escherichia coli*,

Pseudomonas aeruginosa, *Bacillus subtilis*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* a *Salmonella* Typhi. Konkrétně *E. coli* v jeho studii vykazovala maximální citlivost na ethanolový extrakt zázvoru. S tímto výsledkem se neshoduje výsledek z mého testování, což může být způsobeno jinou odrůdou zázvoru, jiným typem extrakce atd. Autor Voravuthikunchai *et al.* (2006) doporučuje používat chloroformový extrakt zázvoru, který v jeho výzkumu prokázal dobré inhibiční účinky vůči *Staphylococcus aureus* a i vůči jeho rezistentním kmenům.

Extrakt z celeru a řepy byly méně citlivé, než 60% ethanol. Podle autora Al-talib *et al.*, (2016) má celer slabé inhibiční účinky na enterické bakterie, mezi ně patří *Salmonella* Potsdam, *Shigella flexneri*, *E. coli* a *Enterobacter cloacae*. Z mých výsledků také vyplývá slabá inhibice jak *E. coli* CCM 3954, tak izolované *E. coli* ze spermatu. Mimo *E. coli* měl oproti ostatním bakteriím nejmenší průměry inhibičních zón ještě *Proteus* sp. a *Klebsiella pneumoniae*. Slabý účinek na *E. coli* odpovídá i výsledkům studie Elgayyar *et al.*, (2001). Vědci tvrdí, že *Escherichia coli* O157:H7 a *Pseudomonas aeruginosa* je citlivá na extrakt z celeru pouze slabě. Také tvrdí, že extrakt inhibuje *Staphylococcus aureus* částečně. Z mých výsledků vyplývá, že *Staphylococcus aureus* je také inhibován slabě. Ve výzkumu Čanadanović-Brunet *et al.* (2011) dokázali, že bakterie *S. aureus* a *B. cereus* vykazují větší citlivost a bakterie *E. coli* a *P. aeruginosa* menší citlivost vůči přírodnímu extraktu z červené řepy. Z tohoto výsledku vyplývá, že citlivější jsou grampozitivní bakterie na rozdíl od gramnegativních. Ovšem dle výsledků Bucura *et al.* (2015) byla *E. coli* citlivější, než *S. aureus*. To si vědci vysvětlovali tím, že stěna gramnegativní *E. coli* obsahuje velké množství lipidů a ty mohou být přírodními látkami z řepy rozpuštěny. Tudíž tento extrakt může lépe narušit strukturu bakteriální buňky, než tomu tak bylo u *Staphylococcus aureus*. V mé práci měl extrakt z řepy menší účinek, než ethanol, ale *E. coli* byla v mém případě také citlivější, než *S. aureus* CCM 3953.

Extrakt z rozmarýnu je neúčinnější nejen z extraktů druhé sady, ale i celkově ze všech testovaných extraktů. V různém rozmezí inhibuje všechny bakterie, včetně *Proteus* sp. Jiné studie také potvrzují silný účinek extraktu z rozmarýnu a to například vůči *E. coli* O157:H7 (Kim *et al.*, 2010). Esenciální olej z rozmarýnu je schopný inhibovat *P. aeruginosa* (Elgayyar *et al.*, 2001). Další výzkum dokázal inhibici methanolovým extraktem z rozmarýnu *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a *Salmonella* Anatum (Shan *et al.*, 2007).

Extrakt z máty některé bakterie inhibuje silněji než 60% ethanol, některé slaběji, ale celkově jsou účinky 60% ethanolu a extraktu z máty podobné. Silnější inhibiční účinky má

vůči *Bacillus* sp. Další výzkumy potvrzují antimikrobiální účinky proti *Staphylococcus aureus*, *E. coli* (Hassanen *et al.*, 2015), *Salmonella* Enteritidis, *Bacillus subtilis* (Elansary a Ashmawy, 2013), *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* a *Salmonella* Anatum (Shan *et al.*, 2007). Extrakt z máty nebyl tak účinný proti *S. aureus* a *E. coli*, jak uvádějí jiné studie.

Extrakt z rakytníku inhiboval tři bakterie silněji než 60% ethanol, jsou jimi *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 a *E. coli* CCM 3954. Podobných výsledků dosáhly i další studie. Například Krejcarová *et al.* (2015) potvrdili, že látky obsažené v rakytníku, především v listech, inhibují *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* a *Enterococcus faecalis*. Esenciální olej byl účinný proti *Escherichia coli*. Autoři Michel *et al.* (2012) dosáhli maximální inhibice *S. aureus* pomocí extraktu z listů, extrakt ze semen inhiboval *Bacillus cereus* a extrakt z kořenů vykazoval maximální inhibici vůči *Enterococcus durans*. Minimální inhibici vědci zaznamenali u *Pseudomonas aeruginosa*, což bylo vysvětleno tak, že je to kmen, který snadno získává rezistenci. Ovšem v mém případě byla *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 sbírkový kmen, tedy výrazně citlivější. Yoon *et al.* (2012) zkoumali ethanolový extrakt rakytníku a prokázal tak inhibici *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* a *P. aeruginosa*. Další studie ověřily účinnost methanolového, chloroformového a n-hexanového extraktu rakytníku. Takové extrakty byly účinné vůči *Bacillus cereus* a *Staphylococcus* rezistentnímu na methicilin (Negi *et al.*, 2005; Qadir *et al.*, 2016).

Majoránka obecně inhibovala bakterie slaběji, nebo srovnatelně s 60% ethanolem. Tento výsledek nekoresponduje s výsledky z jiných studií. Autoři Duletić-Laušević *et al.* (2018) potvrzují inhibiční účinek majoránky působící proti *B. subtilis* a *Listeria innocua*, na druhou stranu ale nedokázali vliv extraktů z majoránky na gramnegativní bakterie, kromě *Shigella flexneri*. V jiné studii byl 65% ethanolový extrakt účinný proti *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Typhimurium a *Pseudomonas aeruginosa* (Şener *et al.*, 2017). Další výzkum tvrdí, že nejúčinnější je n-hexanový extrakt a vodno/ethanolový extrakt proti různým kmenům *Staphylococcus aureus* a *Acinetobacter baumannii*, další bakterie nevykazovaly zvláštní citlivost (Kozłowska *et al.*, 2010).

Směs obsahující 5 % astaxanthinu měla nejlepší inhibiční účinky, když byla zředěna 10krát, i tak měla ale obecně slabší účinek, než 60% ethanol. Nejvíce citlivý byl na směs s 5 % astaxanthinu *Bacillus* sp., na druhou stranu *Proteus* sp. byl vůči této směsi nejméně citlivý. Směsi obsahující 11 % astaxanthinu měla nejlepší inhibiční účinky, když se naředila 10krát a 100krát. Tato ředění měla obecně lepší inhibiční vlastnosti, než 60 %

ethanol, ale ne výrazně. Nejvíce citlivý byl *Bacillus* sp. společně s *Rothia nasimurium* a nejméně citlivý byl opět *Proteus* sp. Celkově všechny bakterie byly citlivější na směs obsahující 11 % astaxanthinu. Z toho vyplývá, že má lepší inhibiční účinky. Irna *et al.* (2017) dokázali inhibici *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis* paskalizovaným astaxanthinem. V případě chemicky extrahovaného astaxanthinu se jednalo o inhibici pouze *Escherichia coli* a *Enterobacter aerogenes*. Na rozdíl od jiných studií je z tabulky zřejmá nízká účinnost astaxanthinu, to bylo způsobeno jeho neúplným rozpuštěním v ethanolu a doporučuji toto testování zopakovat v jiném rozpouštědle.

Co se týče porovnání citlivosti mezi jednotlivými bakteriemi, citlivost stoupá zleva doprava *Proteus* sp. < *E. coli* < *E. coli* CCM 3954 < *Klebsiella pneumoniae* < *Corynebacterium* sp. < *Staphylococcus aureus* CCM 3953 < *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 < *Corynebacterium confusum* < *Corynebacterium glucuronolyticum* < *Rothia nasimurium* < *Bacillus* sp.

Většina gramnegativních bakterií se projevila jako rezistentní vůči inhibičním látkám a naopak citlivé bakterie jsou grampozitivní. Toto tvrzení se shoduje i s jinými výzkumy, například s Čanadanović-Brunet *et al.* (2011). Gramnegativní *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 je citlivější z důvodu toho, že je to sbírkový kmen na testování citlivosti. *Pseudomonas aeruginosa* izolovaná ze vzorku by mohla být rezistentnější.

Klebsiella pneumoniae projevila rezistenci na Ampicilin a Sulphamethoxazole/trimethoprim a totéž se potvrdilo ve studii Stepanović *et al.* (2003) kde byla také rezistentní. Stejně tak *E. coli* byla rezistentní vůči těmto dvou antibiotikům jak v mých výsledcích, tak také ve výsledcích studie Vranic a Uzunovic (2016).

5 Závěr

Vzhledem k rostoucí rezistenci bakterií na antibiotika a velké celosvětové spotřebě, bylo mým cílem otestovat citlivost bakterií kančího spermatu na přírodní látky. Testování probíhalo dvojitým způsobem. Přírodní látky jako kyselina benzoová, sorbová, salicylová a propolis byly přidány do spermatu a sledoval se nárůst nebo pokles počtu bakterií (CFU/ml). Každá z těchto látek v některém ze svého ředění projevila vůči bakteriím kančího spermatu inhibiční účinky. Vzhledem k těmto účinkům a ke skutečnosti, že tyto látky nejsou pro spermie toxické, je vhodné jejich použití pro konzervaci spermatu. Nejúčinnějšími antimikrobiálními plnidly jsou ale stále BIO PIG a VIP 3 obsahující antibiotika.

Nejčastěji vyskytující se bakterie ve vzorcích kančího spermatu byly viridující bakterie, nebo bakterie bez hemolýzy. Bakterie s úplnou hemolýzou se vyskytovaly nejméně. Mezi často vyskytující se bakterie patřil *Streptococcus* sp., *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium* sp.

Dále jsem testovala přírodní extrakty, mezi nimi byla máta, rakytník, rozmarýn, majoránka, galgán, petržel, celer, zázvor, řepa a astaxanthin. Testování bylo provedeno diskovou difuzní metodou a přidáním extraktu do spermatu. Citlivější byly grampozitivní bakterie na rozdíl od gramnegativních a to kvůli jednoduché struktuře jejich bakteriální stěny. Nejméně citlivé byly bakterie *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*. Tyto bakterie byly rezistentní i vůči antibiotikům Ampicilin a Sulphamethoxazole/trimethoprim. Naopak *Bacillus* sp. se projevil jako nejcitlivější.

V diskové difuzní metodě měl nejlepší inhibiční účinky rozmarýn. Ve spermatu testované přírodní extrakty z galgánu, rozmarýnu, zázvoru a máty projevily antimikrobiální vlastnosti a počty bakterií se snižovaly na rozdíl od nativního spermatu. Tyto látky mají antimikrobiální potenciál a bylo by možné je v některých případech použít jako konzervační látky. Bohužel by nebylo možné tyto extrakty použít jako plnidla kančího spermatu, jelikož z výsledků testů jejich toxicity na spermie vyplývá, že kromě zázvoru byly všechny použité extrakty vůči spermii toxické již po prvních hodinách, nebo téměř okamžitě. V navazujících studiích by bylo vhodné otestovat toxicitu i dalších extraktů na spermie a najít tak přírodní extrakt, který by měl dostatečné antimikrobiální účinky a zároveň by nebyl toxický vůči spermii.

6 Zdroje

AHMED F., N. OUDA a A. ADEL. Antibacterial activity and composition of essential oils extracted from some plants belonging to family *Lamiaceae* against some multidrug resistant gram negative bacteria. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018, **5**(1), 463-475.

ALBORZI S., L. BASTARRACHEA, Q. DING a R. TIKEKAR. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria innocua* by benzoic acid, ethylenediaminetetraacetic acid and their combination in model wash water and simulated spinach washing. *Journal of Food Science*. 2018, **83**(4), 1032-1040. DOI: 10.1111/1750-3841.14077. ISSN 00221147. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1750-3841.14077>

AL-TALIB H., ALI N., SUHAIMI M., *et al.* Antimicrobial effect of Malaysian vegetables against enteric bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*[online]. 2016, **6**(3), 211-215 [cit. 2019-01-16]. DOI: 10.1016/j.apjtb.2015.12.009. ISSN 22211691. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221169115309254>

ALTHOUSE G. C., C. E. KUSTER, S. G. CLARK a R. M. WEISIGER. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*. 2000, **53**(5), 1167 - 1176.

ALTHOUSE G. C. a K. LU. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*. 2005, **63**, 573 - 584.

ALTHOUSE G. C. a L. E. EVANS. Closed resection of the preputial diverticulum in the boar. *Agri-Practise*. 1994, **15**(9), 18-21. Dostupné z doi: 10.13140/RG.2.1.3163.1526

AMBATI R., S. PHANG, S. RAVI a R. ASWATHANARAYANA. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Marine Drugs*. 2014, **12**(1), 128-152. DOI: 10.3390/md12010128. ISSN 1660-3397. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/12/1/128>

BAILEY J. L., Ch. LESSARD, J. JACQUES, Ch. BREQUE, I. DOBRINSKI, W. ZENG a H. L. GALANTINO-HOMER. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*. 2008, **70**(8), 1251-1259. Dostupné z doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.06.014

BARACALDO M. a J. WARD. Quality control of extended boar semen. *The Pig Site* [online]. 2009 [cit. 2017-06-06]. Dostupné z: <http://www.thepigsite.com/articles/2596/quality-control-of-extended-boar-semen/>

BARBIERI J. T. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a bifunctional type-III secreted cytotoxin. *International Journal of Medical Microbiology*. 2000, **290**, 381 - 387.

BARKER A. P., A. I. VASIL, A. FILLOUX, G. BALL, P. J. WILDERMAN a M. L. VASIL. A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Molecular Microbiology*. 2004, **53**(4), 1089 - 1098. Dostupné z doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04189.x

BHAT R. a AL-DAIHAN S. Phytochemical constituents and antibacterial activity of some green leafy vegetables. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [online]. 2014, **4**(3), 189-193 [cit. 2019-01-17]. DOI: 10.1016/S2221-1691(14)60230-6. ISSN 22211691. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S222116911530191X>

BONET S., E. GARCIA a L. SEPÚLVEDA. The boar reproductive system. BONET, S., I. CASAS, W. V. HOLT a M. YESTE. *Boar Reproduction*. Berlin: Springer, 2013, s. 65-107. ISBN 978-3-642-35049-8.

BRESCIANI C., C. S. CABASSI, G. MORINI, *et al.* Boar semen bacterial contamination in Italy and antibiotic efficacy in a modified extender. *Italian Journal of Animal Science*. 2014, **13**, 83 - 87.

BUCUR L., V. BADEA, V. SCHRODER, M. ARCUS a G LILIOS. Antibacterial activity of red beet - *Beta vulgaris* L. var. *canditiva* Alef.- root. *15th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2015*. 2015, **6**(1), 253-258.

BUSSALLEU E., M. YESTE, L. SEPÚLVEDA, E. TORNER, E. PINART a S. BONET. Effects of different concentrations of enterotoxigenic and verotoxigenic *E. coli* on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 2011, **127**(3-4), 176-182. Dostupné z doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.07.018

BUSSALLEU E., M. YESTE, E. TORNER, S. BONET, M. BRIZ a S. SANCHO. A PCR technique to detect enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* in boar semen samples. *Research in Veterinary Science*. 2012, **93**(1), 31-33. Dostupné z doi: 10.1016/j.rvsc.2011.07.012

CAMPOS J., U. SANTOS, P. ROCHA, *et al.* Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015, 2015, 1-

11. DOI: 10.1155/2015/296186. ISSN 1741-427X. Dostupné také z: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/296186/>

CIOCIOLA T., L. GIOVATI, A. GIOVANNELLI, S. CONTI, M. CASTAGNOLA a A. VITALI. The activity of a mammalian proline-rich peptide against Gram-negative bacteria, including drug-resistant strains, relies on a nonmembranolytic mode of action. *Infection and Drug Resistance*. 2018, 11, 969-979. DOI: 10.2147/IDR.S165179. ISSN 1178-6973. Dostupné také z: <https://www.dovepress.com/the-activity-of-a-mammalian-proline-rich-peptide-against-gram-negative-peer-reviewed-article-IDR>

CIORNEI S. G., L. RUNCEANU, D. DRUGOCIU a P. ROSCA. Research and correlation between microbiological spermogram and biological parameters value extended of boar semen. *Veterinary Medicine*. 2008, **65**(2), 114 - 118. ISSN 1843-5270.

ČANADANOVIĆ-BRUNET J., S. SAVATOVIĆ, G. ČETKOVIĆ, J. VULIĆ, S. DJILAS, S. MARKOV a D. CVETKOVIĆ. Antioxidant and antimicrobial activities of beet root pomace extracts. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2011, **29**(No. 6), 575-585 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.17221/210/2010-CJFS. ISSN 12121800. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/web/cjfs.htm?volume=29&firstPage=575&type=publishedArticle>

DELIGIANNI E., S. PATTISON, D. BERRAR, N. TERNAR, R. HAYLOCK, J. MOORE, S. ELBORN a J. DOOLEY. *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability in vitro. *Biomed Central Microbiology*. 2010, **10**(38). DOI: 10.1186/1471-2180-10-38 .

DULETIĆ-LAUŠEVIĆ S., A. ARADSKI, M. OALĐE, J. ŽIVKOVIĆ, K. ŠAVIKIN a P. MARIN. Antineurodegenerative, antioxidant and antibacterial activities and phenolic components of *Origanum majorana* L. (Lamiaceae) extracts. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2018, 126-134.

ELANSARY H. a ASHMAWY N. Essential oils of mint between benefits and hazards. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*[online]. 2013, **16**(4), 429-438 [cit. 2019-01-17]. DOI: 10.1080/0972060X.2013.813279. ISSN 0972-060X. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2013.813279>

ELGAYYAR M., F. A. DRAUGHON, D. A. GOLDEN a J. R. MOUNT. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*. 2001, **64**(7), 1019-1024. DOI: 10.4315/0362-028X-64.7.1019. ISSN 0362-028X. Dostupné také z: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-64.7.1019>

FARZAEI M., Z. ABBASABADI, M. ARDEKANI, R. RAHIMI a F. FARZAEI. Parsley: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 2013, **33**(6), 815-826. DOI: 10.1016/S0254-6272(14)60018-2. ISSN 02546272. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254627214600182>

FENG C., J. LI, D. QIN, L. CHEN, F. ZHAO, S. CHEN, H. HU, C. YU, A. HAN. Characterization of exoelectrogenic bacteria *Enterobacter* strains isolated from a microbial fuel cell exposed to copper shock load. *PLoS ONE*. 2014, 9(11). DOI: 10.1371/journal.pone.0113379. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0113379>

FRIEDMAN M., P. HENIKA a R. MANDRELL. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*. 2003, **66**(10), 1811-1821.

FRIEDMAN M., P. HENIKA a R. 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. DOI: 10.4315/0362-028X-65.10.1545. ISSN 0362-028X. Dostupné také z: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-65.10.1545>

FRYDRYCHOVÁ S., J. ČEŘOVSKÝ, A. LUSTYKOVÁ a M. ROZKOT. Effects of long-term liquid commercial semen extender and storage time on the membrane quality of boar semen. *Czech Journal of Animal Science*. 2010, **55**(4), 160-166.

GAŹCZARZEWICZ D., J. UDALA, M. PIASECKA, B. BLASZCZYK a T. STANKIEWICZ. Bacterial contamination of boar semen and its relationship to sperm quality preserved in commercial extender containing gentamicin sulfate. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2016, **19**(3), 451-459. Dostupné z doi: 10.1515/pjvs-2016-0057

GOLDBERG A. M. G., L. E. ARGENTI, J. E. FACCIN, M. SANTI, M. L. BERNARDI, L. LINCK a M. R. I. CARDOSO. Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. *Research in Veterinary Science*. 2013, **95**(2) 362-367. Dostupné z doi: 10.1016/j.rvsc.2013.06.022

GRANGE, J. a R. DAVEY. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*. 1990, **83**(3), 159-160.

GUERRA-BOONE L., R. ALVAREZ-ROMÁN, R. SALAZAR-ARANDA, A. TORRES-CIRIO, M. RIVAS-GALINDO, N. WAKSMAN DE TORRES, G. GONZÁLEZ

a A. PÉREZ-LÓPEZ. Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, and *Origanum majorana* from northeastern México. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2015, **28**(1), 363-369.

GULL I., M. SAEED, H. SHAUKAT, S. ASLAM, Z. SAMRA a A. ATHAR. Inhibitory effect of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2012, **11**(1). DOI: 10.1186/1476-0711-11-8. ISSN 1476-0711. Dostupné také z: <http://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-0711-11-8>

HASSANEN N., A. EISSA a A. HAFEZ. Antioxidant and antimicrobial activity of celery (*Apium graveolens*) and coriander (*Coriandrum sativum*) herb and seed essential oils. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2015, **4**(3), 284-296.

HOLLANDBECK R. a C. FOLEY. Reproductive organs of boar and sow. *Animal Sciences Department: Cooperative Extension Service Purdue University Lafayette, Indiana*. 1964.

HORMAECHE E. a P. EDWARDS. A proposed genus *Enterobacter*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*. 1960, **10**(2), 71-74.

HUSSAIN A., F. ANWAR, S. CHATHA, A. JABBAR, S. MAHBOOB a P. NIGAM. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010, **41**, 1070-1078.

IRNA C., I. JASWIR, R. OTHMAN a D. JIMAT. Antioxidant and antimicrobial activities of astaxanthin from *Penaeus monodon* in comparison between chemical extraction and High Pressure Processing (HPP). *International Food Research Journal*. 2017, **24**, 508-513.

JOHNSON L., K. WEITZE, P. FISER a W. MAXWELL. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*. 2000, **62**, 143 - 172.

JOSHI J., S. BURDMAN, A. LIPSKY a I. YEDIDIA. Effects of plant antimicrobial phenolic compounds on virulence of the genus *Pectobacterium*. *Research in Microbiology*. 2015, **166**(6), 535-545. DOI: 10.1016/j.resmic.2015.04.004. ISSN 09232508. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250815000753>

KARAGEORGIU M. A., G. TSOUSIS, C. M. BOSCO, P. D. TASSIS, I. A. TSAKMAKIDIS a E. D. TZIKA. A comparative study of boar semen extenders with

different proposed preservation times and their effect on semen quality and fertility. *Acta Veterinaria Brno*. 2016, **85**, 23-31. Dostupné z doi: 10.2754/avb201685010023

KIM S., KANG D., KIM J., HA Y., HWANG J., KIM T. a LEE S.. Antimicrobial activity of plant extracts against *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157: H7, and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce. *Journal of Food Science* [online]. 2011, **76**(1), M41-M46 [cit. 2019-01-17]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01926.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01926.x>

KNARREBORG A., N. MIQUEL, T. GRANLI a B. JENSEN. Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Animal Feed Science and Technology*. 2002, 99(1-4), 131-140. DOI: 10.1016/S0377-8401(02)00069-X. ISSN 03778401. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037784010200069X>

KOOTI W. a N. DARAEI. A review of the antioxidant activity of celery (*Apium graveolens* L). *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 2017, **22**(4), 1029-1034. DOI: 10.1177/2156587217717415. ISSN 2156-5872. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2156587217717415>

KOZŁOWSKA M., A. LAUDY, B. STAROŚCIAK, A. NAPIÓRKOWSKI, L. CHOMICZ a Z. KAZIMIERCZUK. Antimicrobial and antiprotozoal effect of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *ACTA Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*. 2010, **9**(4), 133-141.

KREJCAROVÁ J., E. STRAKOVÁ, P. SUCHÝ, I. HERZIG a K. KARÁSKOVÁ. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) as a potential source of nutraceuticals and its therapeutic possibilities - a review. *Acta Veterinaria Brno*. 2015, **84**(3), 257-268. DOI: 10.2754/avb201584030257. ISSN 0001-7213. Dostupné také z: <https://actavet.vfu.cz/84/3/0257/>

KUKLA R. Methods for monitoring of antimicrobial activities of natural compounds. Pardubice, 2017. Dissertation. *Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice*.

KUMAR S. a M. BROOKS. Use of Red Beet (*Beta vulgaris* L.) for antimicrobial applications—a critical review. *Food and Bioprocess Technology*. 2018, **11**(1), 17-42. DOI: 10.1007/s11947-017-1942-z. ISSN 1935-5130. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-017-1942-z>

KUSTER C. E. a G. C. ALTHOUSE. The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance. *Theriogenology*. 2016, **85**(1), 21-26. Dostupné z doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.049

LI J., J. CHAYTOR, B. FINDLAY, L. MCMULLEN, D. SMITH a J. VEDERAS. Identification of Didecyldimethylammonium Salts and Salicylic Acid as Antimicrobial Compounds in Commercial Fermented Radish Kimchi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015, 63(11), 3053-3058. DOI: 10.1021/jf5063588. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf5063588>

LUSTYKOVÁ A., S. FRYDRYCHOVÁ a E. VÁCLAVKOVÁ. Effect of natural substances added to semen extender on the boar semen survival time. *Research in Pig Breeding*. 2012, **6**, 3.

LYCZAK J. B., C. L. CANNON a G. B. PIER. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*. 2000, **2**(9), 1051-1060.

MARTÍN L. O. M., E. C. MUNOZ, F. DE CUPERE, E. VAN DRIESSCHE, D. ECHEMENDIA-BLANCO, J. M. M. RODRÍGUEZ a S. BEECKMANS. Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Animal Reproduction Science*. 2010, **120**(1-4), 95-104. Dostupné z doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.03.008

MAYACHIEW P. a S. DEVAHASTIN. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *LWT - Food Science and Technology*. 2008, **41**(7), 1153-1159. DOI: 10.1016/j.lwt.2007.07.019. ISSN 00236438. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643807002745>

MAZUROVÁ J., R. KUKLA, M. ROZKOT a A. LUSTYKOVÁ. Use of natural substances for boar semen decontamination. *Veterinární Medicína*. 2015, **60**(No. 5), 235-247. DOI: 10.17221/8175-VETMED. ISSN 03758427.

MICHALAK I., K. CHOJNACKA a A. SAEID. plant growth biostimulants, dietary feed supplements and cosmetics formulated with supercritical CO₂ algal extracts. *Molecules*. 2017, **22**(1). DOI: 10.3390/molecules22010066. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/1/66>

MICHEL T., E. DESTANDAU, G. LE FLOCH, M. LUCCHESI a C. ELFAKIR. Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chemistry*. 2012, **131**(3), 754-760. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.09.029. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611012866>

MORRELL J. a M. WALLGREN. Alternatives to antibiotics in semen extenders: A Review. *Pathogens*. 2014, **3**(4), 934-946. DOI: 10.3390/pathogens3040934. ISSN 2076-0817. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2076-0817/3/4/934>

MURPHY M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*. 2009, **417**. Dostupné z doi: 10.1042/BJ2008138

NEGI P., A. CHAUHAN, G. SADIA, Y. ROHINISHREE a R. RAMTEKE. Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (L.) seed extracts. *Food Chemistry*. 2005, **92**(1), 119-124. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.07.009. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814604005643>

OONMETTA-AREE J., T. SUZUKI, P. GASALUCK a G. EUMKEB. Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT - Food Science and Technology*. 2006, **39**(10), 1214-1220. DOI: 10.1016/j.lwt.2005.06.015. ISSN 00236438. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643805001490>

PAPATSIROS V., P. TASSIS, E. TZIKA, D. PAPAIOANNOU, E. PETRIDOU, C. ALEXOPOULOS a S. KYRIAKIS. Effect of benzoic acid and combination of benzoic acid with a probiotic containing *Bacillus Cereus* var. *toyoi* in weaned pig nutrition. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2011, **14**(1). DOI: 10.2478/v10181-011-0017-8. ISSN 1505-1773. Dostupné také z: <http://content.sciendo.com/view/journals/pjvs/14/1/article-p117.xml>

PINART E., M. PUIGMULÉ. Factors affecting boar reproduction, testis function, and sperm quality. BONET, S., I. CASAS, W. V. HOLT a M. YESTE. *Boar Reproduction*. Berlin: Springer, 2013, s. 109-202. ISBN 978-3-642-35049-8.

PINART E., M. YESTE a S. BONET. A comparative study of the effects of *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* upon boar semen preserved in liquid storage. *Animal Reproduction Science*. 2016, **177**, 65-78. Dostupné z doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.12.007

PRIETO-MARTÍNEZ N., E. BUSSALLEU, E. GARCIA-BONAVILA a M. YESTE. Effects of *Enterobacter cloacae* on boar sperm quality during liquid storage at 17°C. *Animal Reproduction Science*. 2014, **148**(1-8), 72-82. Dostupné z doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.05.008

QADIR M., K. ABBAS a R. SHAIKH. Antibacterial activity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016, **29**(5), 1705-1707.

RAGHAVENDRA M., A. REDDY, P. YADAV, A- RAJU a L. KUMAR. Comparative studies on the in vitro antioxidant properties of methanolic leafy extracts from six edible leafy vegetables of India. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2013, **6**(3), 96-99.

RAVINDRAN P., G. PILLAI, I. BALACHANDRAN a M. DIVAKARAN. Galangal. Handbook of herbs and spices. 2nd ed. Philadelphia: Woodhead Pub., 2012, s. 304-318. Woodhead Publishing in food science, technology, and nutrition, no. 227. ISBN 978-0-85709-568-8.

SAJJAD W., M. AHMAD, S. KHAN, S. ILYAS, F. HASAN, C. CELIK, K. MCPHAIL a A. SHAH. Radio-protective and antioxidative activities of astaxanthin from newly isolated radio-resistant bacterium *Deinococcus* sp. strain WMA-LM9. *Annals of Microbiology*. 2017, **67**(7), 443-455. DOI: 10.1007/s13213-017-1269-z. ISSN 1590-4261. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-017-1269-z>

SAMY R., GOPALAKRISHNAKONE P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2010, **7**(3), 283-294 [cit. 2019-01-17]. DOI: 10.1093/ecam/nen036. ISSN 1741-427X. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2010/260483/>

ŞENER I., M. GÜR, D. VEREP, K. GÜNEY a E. ALTUNER. Antimicrobial activities and some flavonoids in extracts of some medicinal plants. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2017, **51**(3s), 234-238. DOI: 10.5530/ijper.51.3s.20. ISSN 00195464. Dostupné také z: <http://www.ijper.org/article/655>

SEPÚLVEDA L., E. BUSSALLEU, M. YESTE a S. BONET. Effects of different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 2014, **150**(3-4), 96-106. Dostupné z doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.09.001

SEPÚLVEDA L., E. BUSSALLEU, M. YESTE a S. BONET. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* on sperm capacitation and protein phosphorylation of boar spermatozoa. *Theriogenology*. 2016, **85**(8), 1421-1431. Dostupné z doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.12.025

SHAFFIQUE S. a S. AHMAD. Comprehensive review on homeopathic uses of acid benzoicum. *International Journal of Complementary & Alternative Medicine*. 2017, **9**(6), 1 - 3.

SHAN B., Y. CAI, J. BROOKS a H. CORKE. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*.

2007, **117**(1), 112-119. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.003. ISSN 01681605. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160507001778>

SCHIERACK P., N. WALK, K. REITER, K. D. WEYRAUCH a L. H. WIELER. Composition of intestinal *Enterobacteriaceae* populations of healthy domestic pigs. *Microbiology*. 2007, **153**(Pt 11), 3830-3837. Dostupné z doi: 10.1099/mic.0.2007/010173-0

SCHULZE M., C. AMMON, K. RÜDIGER a M. JUNG. Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. *Theriogenology*. 2015, **83**(3), 430-437. Dostupné z doi: /10.1016/j.theriogenology.2014.10.004

SCHULZE M., M. DATHE, D. WABERSKI a K. MÜLLER. Liquid storage of boar semen: Current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*. 2016, **85**(1), 39-46. Dostupné z doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.016

SMOLE I., A. THOMANN, J. FREY a V. PERRETEN. Repression of common bull sperm flora and *in vitro* impairment of sperm motility with *Pseudomonas aeruginosa* introduced by contaminated lubricant. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010, **45**(4), 737-742. Dostupné z doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01319.x

SOFOS J., M. PIERSON, J. BLOCHER a F. BUSTA. Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. *International Journal of Food Microbiology*. 1986, **3**(1), 1-17. DOI: 10.1016/0168-1605(86)90036-X. ISSN 01681605. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016816058690036X>

SOFOS J. a F. BUSTA. Antimicrobial activity of sorbate. *Journal of Food Protection*. 1981, **44**(8), 614-622. DOI: 10.4315/0362-028X-44.8.614. ISSN 0362-028X. Dostupné také z: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-44.8.614>

STEPANOVIĆ S., N. ANTIĆ, I. DAKIĆ a M. ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*. 2003, **158**(4), 353-357. DOI: 10.1078/0944-5013-00215. ISSN 09445013. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501304701391>

SUGANYA V. a S. ASHEEBA. Antioxidant and antimicrobial activity of astaxanthin isolated from three varieties of crabs. *International Journal of Recent Scientific Research*. 2015, **6**(10), 6753-6758.

SUTKEVICIENE N., V. RISKEVICIENE, A. JANUSKAUSKAS, H. ZILINSKAS a M. ANDERSSON. Assessment of sperm quality traits in relation to fertility in boar semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2009. Dostupné z doi: 10.1186/1751-0147-51-53

TVRDÁ E., B. BOTMAN a M. HALENÁR. *In vitro* effects of *Savia officinalis* on bovine spermatozoa. *International Journal of Biological, Boimolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*. 2017, **11**(2), 8.

ÚBEDA J. L., R. AUSEJO, Y. DAHMANI, M. V. FALCETO, A. USAN, C. MALO a F. C. PEREZ-MARTINEZ. Adverse effects of members of the *Enterobacteriaceae* family on boar sperm quality. *Theriogenology*. 2013, **80**(6), 565-570. Dostupné z doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.05.022

USHAKUMARI U. a R. RAMANUJAN. Isolation of astaxanthin from marine yeast and study of its pharmacological activity. *International Current Pharmaceutical Journal*. 2013, **2**(3), 67-69. DOI: 10.3329/icpj.v2i3.13584. ISSN 2224-9486. Dostupné také z: <https://www.banglajol.info/index.php/ICPJ/article/view/13584>

VICTÓRIO C., D. ALVIANO, C. ALVIANO a C. LAGE. Chemical composition of the fractions of leaf oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. and antimicrobial activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009, **19**(3), 697-701. DOI: 10.1590/S0102-695X2009000500008. ISSN 0102-695X.

VORAVUTHIKUNCHAI S., S. LIMSUWAN, O. SUPAPOL a S. SUBHADHIRASAKUL. Antibacterial activity of extracts from family zingiberaceae against foodborne pathogens. *Journal of Food Safety*. 2006, **26**(4), 325-334. DOI: 10.1111/j.1745-4565.2006.00052.x. ISSN 0149-6085. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1745-4565.2006.00052.x>

VORAVUTHIKUNCHAI S., S. PHONGPAICHIT a S. SUBHADHIRASAKUL. Evaluation of antibacterial activities of medicinal plants widely used among AIDS patients in Thailand. *Pharmaceutical Biology*. 2008, **43**(8), 701-706. DOI: 10.1080/13880200500385194. ISSN 1388-0209. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13880200500385194>

VRANIC S. a A. UZUNOVIC. Antimicrobial resistance of *Escherichia Coli* strains isolated from urine at outpatient population: a single laboratory experience. *Materia Socio Medica*. 2016, **28**(2). DOI: 10.5455/msm.2016.28.121-124. ISSN 1512-7680. Dostupné také z: <http://www.scopemed.org/fulltextpdf.php?mno=223168>

VYT P., D. MAES, E. DEJONCKHEERE, F. CASTRYCK a A. SOOM. Comparative Study on five different commercial extenders for boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 2004, **39**, 8-12.

WANG P., T. MORI, K. KOMORI, M. SASATSU, K. TODA a H. OHTAKE. Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989, **55**(7), 1665-1669.

WASILEWSKA K., L. ZASIADCZYK, L. FRASER, M. MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA a W. KORDAN. The benefits of cooling boar semen in long-term extenders prior to cryopreservation on sperm quality characteristics. *Reproduction in Domestic Animals*. 2016, **51**(5), 791-799. Dostupné z doi: 10.1111/rda.12751

WEERAKKODY N., N. CAFFIN, L. LAMBERT, M. TURNER a G. DYKES. Synergistic antimicrobial activity of galangal (*Alpinia galanga*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and lemon iron bark (*Eucalyptus staigerana*) extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011, 91(3), 461-468. DOI: 10.1002/jsfa.4206. ISSN 00225142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.4206>

WEI Q., X. WANG, J. CHENG, G. ZENG a D. SUN. Synthesis and antimicrobial activities of novel sorbic and benzoic acid amide derivatives. *Food Chemistry*. 2018, 268, 220-232. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.06.071. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618310446>

WEINTRAUB S., T. SHPIGEL, L. G. HARRIS, R. SCHUSTER, E. C. LEWIS a D. Y. LEWITUS. Astaxanthin-based polymers as new antimicrobial compounds. *Polymer Chemistry*. 2017, **8**(29), 4182-4189. DOI: 10.1039/C7PY00663B. ISSN 1759-9954. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7PY00663B>

YOON M., J. OH, H. KANG a J. PARK. Antioxidant and antibacterial behavior for sediment removed ethanol extract from sea buckthorn seed. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2012, 29(8), 1069-1073. DOI: 10.1007/s11814-011-0279-y. ISSN 0256-1115. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11814-011-0279-y>

ZARE M., S. ROHANI, M. RAEISI a M. HASHEMI. Antibacterial effects of monolaurin, sorbic acid and potassium sorbate on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Food Quality and Hazards Control*. 2014, 1(2), 52-55.

ZHOU Y., B. TAYLOR, T. SMITH, Z. LIU, M. CLENCH, N. DAVIES a K. RAINSFORD. A novel compound from celery seed with a bactericidal effect against *Helicobacter pylori*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009, **61**(8), 1067-

1077. DOI: 10.1211/jpp/61.08.0011. ISSN 00223573. Dostupné také z:
<http://doi.wiley.com/10.1211/jpp/61.08.0011>

ZIMMERMANN P. a N. CURTIS. Antimicrobial effects of antipyretics.
antimicrobial agents and chemotherapy. 2017, 61(4), e02268-16. DOI:
10.1128/AAC.02268-16. ISSN 0066-4804. Dostupné také z:
<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.02268-16>

7 Příloha

Corynebacterium glucuronolyticum

Tabulka 16: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů pro bakterii *Corynebacterium glucuronolyticum*

extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)		extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)	
60 %ethanol		12	12	60 %ethanol		12	12
galgán	1,1	14	14	galgán	0,82	12	14
petržel	0,75	10	10	petržel	0,62	8	8
celer	0,58	9	9	celer	0,52	9	10
zázvor	0,27	15	13	zázvor	0,22	10	10
řepa	0,96	10	8	řepa	0,67	9	9
máta	0,54	15	11	máta	0,6	12	12
rakytník	0,66	11	12	rakytník	0,68	12	8
rozmarnýn	0,44	19	18	rozmarnýn	0,48	18	17
majoránka	0,65	10	11	majoránka	0,7	13	12
60 %ethanol		10	10	60 %ethanol		12	12
10x	5 % A	10	10	10x	11 % A	11	9
100x	5 % A	11	12	100x	11 % A	10	10
1000x	5 % A	9	10	1000x	11 % A	11	12
10000x	5 % A	9	10	10000x	11 % A	10	11
čistý	5 % A	9	9	čistý	11 % A	9	9
60% ethanol		11	10	60% ethanol		11	10

Poznámka: velikost disku se rovná 6 mm.

Corynebacterium confusum

Tabulka 17: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů pro bakterii *Corynebacterium confusum*

extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)		extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)	
60 %ethanol		10	10	60 %ethanol		11	11
galgán	1,1	13	10	galgán	0,82	12	14
petržel	0,75	10	9	petržel	0,62	9	9
celer	0,58	11	8	celer	0,52	8	9
zázvor	0,27	13	13	zázvor	0,22	8	10
řepa	0,96	9	9	řepa	0,67	11	10
máta	0,54	10	11	máta	0,6	12	13
rakytník	0,66	9	10	rakytník	0,68	10	10
rozmarník	0,44	14	15	rozmarník	0,48	16	13
majoránka	0,65	10	10	majoránka	0,7	11	9
60 %ethanol		9	10	60 %ethanol		11	15
10x	5 % A	12	11	10x	11 % A	12	13
100x	5 % A	13	10	100x	11 % A	10	11
1000x	5 % A	9	11	1000x	11 % A	9	9
10000x	5 % A	10	9	10000x	11 % A	18	10
čistý	5 % A	7	10	čistý	11 % A	6	7
60% ethanol		9	14	60% ethanol		10	10

Poznámka: velikost disku se rovná 6 mm.

Corynebacterium sp.

Tabulka 18: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů pro bakterii *Corynebacterium* sp.

extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)		extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)	
60 %ethanol		12	12	60 %ethanol		12	12
galgán	1,1	15	10	galgán	0,82	12	11
petržel	0,75	10	10	petržel	0,62	9	8
celer	0,58	9	9	celer	0,52	10	10
zázvor	0,27	12	10	zázvor	0,22	10	10
řepa	0,96	10	10	řepa	0,67	8	11
máta	0,54	12	11	máta	0,6	11	10
rakytník	0,66	9	9	rakytník	0,68	9	10
rozmarník	0,44	14	13	rozmarník	0,48	13	14
majoránka	0,65	9	9	majoránka	0,7	11	9
60 %ethanol		10	10	60 %ethanol		10	11
10x	5 % A	9	10	10x	11 % A	10	11
100x	5 % A	8	12	100x	11 % A	9	11
1000x	5 % A	9	11	1000x	11 % A	11	10
10000x	5 % A	10	10	10000x	11 % A	10	9
čistý	5 % A	6	6	čistý	11 % A	6	6
60% ethanol		10	10	60% ethanol		10	11

Poznámka: velikost disku se rovná 6 mm.

Rothia nasimurium

Tabulka 19: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů pro bakterii *Rothia nasimurium*

extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)		extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)	
60 %ethanol		13	12	60 %ethanol		12	12
galgán	1,1	14	10	galgán	0,82	13	13
petržel	0,75	10	8	petržel	0,62	9	9
celer	0,58	10	8	celer	0,52	11	10
zázvor	0,27	10	10	zázvor	0,22	11	11
řepa	0,96	9	10	řepa	0,67	9	10
máta	0,54	16	14	máta	0,6	11	11
rakytník	0,66	10	10	rakytník	0,68	10	10
rozmarnýn	0,44	21	16	rozmarnýn	0,48	16	14
majoránka	0,65	10	10	majoránka	0,7	10	11
60 %ethanol		12	11	60 %ethanol		12	13
10x	5 % A	10	10	10x	11 % A	12	12
100x	5 % A	9	9	100x	11 % A	12	12
1000x	5 % A	10	10	1000x	11 % A	11	10
10000x	5 % A	11	11	10000x	11 % A	11	11
čistý	5 % A	11	11	čistý	11 % A	10	10
60% ethanol		12	12	60% ethanol		12	12

Poznámka: velikost disku se rovná 6 mm.

Klebsiella pneumoniae

Tabulka 20: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů pro bakterii *Klebsiella pneumoniae*

extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)		extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)	
60 %ethanol		12	12	60 %ethanol		12	10
galgán	1,1	10	11	galgán	0,82	10	9
petržel	0,75	9	10	petržel	0,62	9	9
celer	0,58	7	9	celer	0,52	10	9
zázvor	0,27	10	11	zázvor	0,22	10	9
řepa	0,96	9	9	řepa	0,67	10	9
máta	0,54	10	10	máta	0,6	11	10
rakytník	0,66	9	9	rakytník	0,68	9	9
rozmarník	0,44	14	12	rozmarník	0,48	14	14
majoránka	0,65	9	10	majoránka	0,7	10	9
60 %ethanol		11	13	60 %ethanol		10	12
10x	5 % A	10	8	10x	11 % A	9	10
100x	5 % A	10	11	100x	11 % A	8	9
1000x	5 % A	10	10	1000x	11 % A	10	7
10000x	5 % A	12	10	10000x	11 % A	11	11
čistý	5 % A	7	7	čistý	11 % A	7	7
60% ethanol		13	12	60% ethanol		10	12

Poznámka: velikost disku se rovná 6 mm.

Bacillus sp.

Tabulka 21: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů pro bakterii *Bacillus* sp.

extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)		extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)	
60 %ethanol		15	14	60 %ethanol		13	14
galgán	1,1	15	16	galgán	0,82	17	22
petržel	0,75	12	13	petržel	0,62	10	11
celer	0,58	12	11	celer	0,52	10	12
zázvor	0,27	11	12	zázvor	0,22	11	11
řepa	0,96	10	9	řepa	0,67	10	10
máta	0,54	20	13	máta	0,6	12	13
rakytník	0,66	13	16	rakytník	0,68	13	11
rozmarník	0,44	18	15	rozmarník	0,48	18	16
majoránka	0,65	11	13	majoránka	0,7	12	12
60 %ethanol		11	12	60 %ethanol		12	11
10x	5 % A	12	13	10x	11 % A	12	12
100x	5 % A	11	11	100x	11 % A	13	12
1000x	5 % A	11	12	1000x	11 % A	13	13
10000x	5 % A	11	11	10000x	11 % A	12	12
čistý	5 % A	14	13	čistý	11 % A	12	11
60% ethanol		12	12	60% ethanol		13	12

Poznámka: velikost disku se rovná 6 mm.

Escherichia coli

Tabulka 22: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů pro bakterii *Escherichia coli*

extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)		extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)	
60 %ethanol		11	11	60 %ethanol		12	10
galgán	1,1	10	11	galgán	0,82	11	12
petržel	0,75	9	8	petržel	0,62	8	8
celer	0,58	8	7	celer	0,52	7	8
zázvor	0,27	10	8	zázvor	0,22	10	11
řepa	0,96	7	6	řepa	0,67	11	13
máta	0,54	9	10	máta	0,6	9	9
rakytník	0,66	7	9	rakytník	0,68	8	9
rozmarýn	0,44	11	11	rozmarýn	0,48	12	11
majoránka	0,65	10	8	majoránka	0,7	9	10
60 %ethanol		10	11	60 %ethanol		10	11
10x	5 % A	10	8	10x	11 % A	7	10
100x	5 % A	9	9	100x	11 % A	9	10
1000x	5 % A	9	10	1000x	11 % A	9	11
10000x	5 % A	11	10	10000x	11 % A	11	12
čistý	5 % A	6	6	čistý	11 % A	6	6
60% ethanol		11	12	60% ethanol		11	11

Poznámka: velikost disku se rovná 6 mm.

Proteus sp.

Tabulka 23: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů pro bakterii *Proteus* sp.

extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)		extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)	
60 %ethanol		6	6	60 %ethanol		6	6
galgán	1,1	7	9	galgán	0,82	9	9
petržel	0,75	6	6	petržel	0,62	8	7
celer	0,58	6	6	celer	0,52	6	6
zázvor	0,27	6	6	zázvor	0,22	6	6
řepa	0,96	6	6	řepa	0,67	6	6
máta	0,54	6	6	máta	0,6	6	6
rakytník	0,66	6	6	rakytník	0,68	6	6
rozmarýn	0,44	7	7	rozmarýn	0,48	8	9
majoránka	0,65	6	6	majoránka	0,7	6	6
60 %ethanol		6	6	60 %ethanol		6	6
10x	5 % A	7	9	10x	11 % A	7	7
100x	5 % A	6	6	100x	11 % A	9	8
1000x	5 % A	6	6	1000x	11 % A	6	6
10000x	5 % A	6	6	10000x	11 % A	6	6
čistý	5 % A	10	10	čistý	11 % A	10	11
60% ethanol		6	6	60% ethanol		6	6

Poznámka: velikost disku se rovná 6 mm.

Escherichia coli CCM 3954

Tabulka 24: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů pro bakterii *Escherichia coli* CCM 3954

extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)		extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)	
60 %ethanol		11	11	60 %ethanol		11	11
galgán	1,1	11	10	galgán	0,82	11	12
petržel	0,75	7	7	petržel	0,62	7	8
celer	0,58	7	7	celer	0,52	8	7
zázvor	0,27	9	7	zázvor	0,22	11	9
řepa	0,96	6	7	řepa	0,67	7	8
máta	0,54	10	10	máta	0,6	10	8
rakytník	0,66	10	11	rakytník	0,68	12	11
rozmarník	0,44	12	13	rozmarník	0,48	14	14
majoránka	0,65	11	6	majoránka	0,7	7	7
60 %ethanol		10	10	60 %ethanol		10	10
10x	5 % A	9	9	10x	11 % A	10	9
100x	5 % A	10	10	100x	11 % A	11	10
1000x	5 % A	10	10	1000x	11 % A	10	10
10000x	5 % A	11	11	10000x	11 % A	11	11
čistý	5 % A	11	8	čistý	11 % A	11	9
60% ethanol		6	6	60% ethanol		6	6

Poznámka: velikost disku se rovná 6 mm.

Pseudomonas aeruginosa CCM 3955

Tabulka 25: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů pro bakterii *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)		extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)	
60 %ethanol		10	12	60 %ethanol		11	11
galgán	1,1	10	11	galgán	0,82	12	11
petržel	0,75	9	9	petržel	0,62	12	11
celer	0,58	9	8	celer	0,52	12	10
zázvor	0,27	9	10	zázvor	0,22	10	10
řepa	0,96	8	8	řepa	0,67	10	10
máta	0,54	12	10	máta	0,6	9	10
rakytník	0,66	9	13	rakytník	0,68	12	11
rozmarýn	0,44	12	11	rozmarýn	0,48	14	11
majoránka	0,65	10	9	majoránka	0,7	11	11
60 %ethanol		12	10	60 %ethanol		10	11
10x	5 % A	9	9	10x	11 % A	10	9
100x	5 % A	10	10	100x	11 % A	10	10
1000x	5 % A	10	11	1000x	11 % A	10	11
10000x	5 % A	11	12	10000x	11 % A	12	11
čistý	5 % A	10	11	čistý	11 % A	11	10
60% ethanol		12	12	60% ethanol		12	12

Poznámka: velikost disku se rovná 6 mm.

Staphylococcus aureus CCM 3953

Tabulka 26: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů pro bakterii *Staphylococcus aureus* CCM 3953

extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)		extrakt	Koncentrace extraktu (g/ml)	Inhibiční zóna (mm)	
60 %ethanol		11	11	60 %ethanol		8	9
galgán	1,1	16	18	galgán	0,82	16	16
petržel	0,75	15	16	petržel	0,62	14	16
celer	0,58	7	7	celer	0,52	7	8
zázvor	0,27	10	11	zázvor	0,22	15	10
řepa	0,96	7	7	řepa	0,67	8	7
máta	0,54	9	6	máta	0,6	7	10
rakytník	0,66	8	10	rakytník	0,68	7	9
rozmarnýn	0,44	15	15	rozmarnýn	0,48	20	13
majoránka	0,65	11	10	majoránka	0,7	10	10
60 %ethanol		10	10	60 %ethanol		10	10
10x	5 % A	10	12	10x	11 % A	10	9
100x	5 % A	9	9	100x	11 % A	9	9
1000x	5 % A	6	6	1000x	11 % A	12	7
10000x	5 % A	6	6	10000x	11 % A	8	6
čistý	5 % A	12	13	čistý	11 % A	12	22
60% ethanol		12	12	60% ethanol		12	12