

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Eliška Tesařová

**Univerzita Pardubice**  
**Fakulta chemicko - technologická**

**Antimikrobiální účinky koncentrovaných hydrolátů získaných destilací  
rostlinných materiálů**

Bc. Eliška Tesařová

Diplomová práce

2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eliška Tesařová**  
Osobní číslo: **C17457**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Antimikrobiální účinky koncentrovaných hydrolátů získaných destilací rostlinných materiálů**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování:

#### Teoretická část:

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši vztahující se k zadanému tématu. V úvodu práce se věnujte shrnutí informací o přírodních látkách, jejich získávání a také antimikrobiálních vlastnostech.
2. Literární rešerši zaměřte zejména na materiály testované v rámci experimentální části diplomové práce.

#### Experimentální část:

1. Otestujte antimikrobiální účinnost hydrátů získaných destilací vybraných přírodních matic.
2. Hydroláty zakonzentrujte vhodným způsobem pomocí SPE kolonek a zjistěte jejich antimikrobiální účinek pomocí diskové difúzní metody (základní paleta mikroorganismů a výběr bakterií *Arcobacter* spp.).
3. Stanovte minimální inhibiční koncentrace vybraných vzorků na vybrané mikroorganismy.
4. Získané výsledky vhodným způsobem interpretujte a srovnajte s účinkem některých antibiotik.
5. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 9/2012 Univerzity Pardubice a dále ve znění Dodatku č. 1 ke Směrnicí č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravou".

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

Vedoucí diplomové práce: **Ing. David Šilha, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Karolína Morávková**  
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 Kanfár, 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 9. 5. 2019

.....

Bc. Eliška Tesařová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce panu Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D. za cenné rady a ochotu v průběhu experimentů a při zpracování mé práce. Také bych chtěla poděkovat konzultantce Mgr. Karolíně Morávkové za vstřícný přístup a přátelské rady v průběhu práce v laboratoři. Nadále děkuji paní laborantce Drahomíře Hofmanové, za ochotu vždy pomoci. Závěrem největší dík patří mé rodině za velkou trpělivost, psychickou podporu a pochopení, jak při psaní diplomové práce, tak během doby celého mého studia.

## **ANOTACE**

Tématem této práce je stanovení antimikrobiální a antifungální aktivity hydrolátů. Pro testování byly využity hydroláty levandule, fenyklu, bobkového listu a hřebíčku. Hydroláty jsou vedlejší produkty destilace silic a po řadě dalších experimentů by mohly být některé tyto látky využívány pro své antimikrobiální účinky.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Antimikrobiální účinky, *Arcobacter*, bobkový list, fenykl, hřebíček, hydroláty, levandule, přírodní látky

## **TITLE**

Antimicrobial effect of concentrated hydrolats obtained from plant material distillation

## **ANNOTATION**

The diploma thesis is devoted to the determination of antimicrobial activity and antifungal activity. There were tested hydrolates of lavender, fennel, laurel and clove. Hydrolates are products of the distillation of essential oils. They could be used in natural medicine for a lot of testing.

## **KEYWORDS**

Antimicrobial effects, *Arcobacter*, laurel, fennel, clove, hydrolates, lavender, natural substances

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ .....	10
SEZNAM TABULEK .....	11
SEZNAM ZKRATEK .....	13
ÚVOD .....	14
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	15
1.1 Přírodní látky – seznámení a historie .....	15
1.1.1 Zdroje přírodních látek .....	16
1.2 Hlavní skupiny antimikrobiálních sloučenin .....	18
1.2.1 Esenciální oleje .....	19
1.2.2 Alkaloidy .....	20
1.2.3 Glykosidy .....	21
1.2.4 Fenoly .....	21
1.2.5 Terpenoidy .....	22
1.3 Hydrosoly .....	24
1.4 Léčivé rostliny .....	25
1.4.1 Levandule lékařská .....	25
1.4.2 Hřebíčkovce kořený .....	26
1.4.3 Fenykl obecný .....	27
1.4.4 Vavřín vznešený .....	28
1.5 Extrakce a způsoby separace .....	30
1.5.1 Extrakce tuhou fází .....	30
1.6 Charakteristika vybraných mikroorganismů .....	32
1.6.1 Rod <i>Arcobacter</i> .....	32
1.6.2 Rod <i>Staphylococcus</i> .....	34
1.6.3 Rod <i>Escherichia</i> .....	34
1.6.4 Rod <i>Pseudomonas</i> .....	35



1.6.5	Rod <i>Enterococcus</i> .....	36
1.6.6	Rod <i>Candida</i> .....	36
2	PRAKTICKÁ ČÁST .....	38
2.1	Použité živné půdy, přístroje a pomůcky .....	38
2.1.1	Živná média a pracovní roztoky .....	38
2.1.2	Přístroje a vybavení .....	41
2.1.3	Pomůcky .....	41
2.1.4	Analyzované vzorky .....	42
2.1.5	Testované mikroorganismy .....	43
2.2	Pracovní postupy .....	44
2.2.1	Zakoncentrování hydrolátů .....	44
2.2.2	Disková difúzní metoda ke stanovení inhibičních zón hydrolátů .....	44
2.2.3	Stanovení minimálních inhibičních koncentrací hydrolátů .....	45
2.2.4	Disková difúzní metoda pro stanovení citlivosti k antibiotikům .....	46
3	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	48
3.1	Stanovení citlivosti bakterií k hydrolátům získaných destilací .....	49
3.1.1	Levandulový hydrolát .....	51
3.1.2	Fenyklový hydrolát .....	57
3.1.3	Hydrolát bobkového listu .....	62
3.1.4	Hřebíčkový hydrolát .....	67
3.2	Stanovení minimálních inhibičních koncentrací studovaných hydrolátů .....	72
3.2.1	Levandulový hydrolát .....	73
3.2.2	Fenyklový hydrolát .....	75
3.2.3	Hydrolát bobkového listu .....	77
3.2.4	Hřebíčkový hydrolát .....	79
	ZÁVĚR .....	83
	POUŽITÁ LITERATURA .....	85

ZDROJE OBRÁZKŮ .....	96
PŘÍLOHY .....	97

# SEZNAM ILUSTRACÍ

<b>Obrázek 1</b> Struktury běžných rostlinných chemických sloučenin s antimikrobiálním účinkem (Cowan, 1999) .....	18
<b>Obrázek 2</b> Schéma parní destilace (Bruckle, 1997) .....	19
<b>Obrázek 3</b> Vzorec sanguinarinu (Chowdhury a kol., 2010) .....	21
<b>Obrázek 4</b> Vzorec kafru (Eastman a Kluger, 1998) .....	23
<b>Obrázek 5</b> Levandule lékařská, (Balogh, 2019) .....	25
<b>Obrázek 6</b> Hřebíčkovce kořený (Dyer, 2019) .....	27
<b>Obrázek 7</b> Fenykl obecný (převzato z: amazon.com) .....	28
<b>Obrázek 8</b> Vavřín vznešený (převzato z: selvaasturiana.com) .....	29
<b>Obrázek 9</b> SPE-frita (převzato z: en.bio-protocol.org) .....	31
<b>Obrázek 10</b> Buňky bakterií rodu <i>Arcobacter</i> v elektronovém mikroskopu (Van den Abeele a kol., 2014, Donachie a kol., 2005) .....	32
<b>Obrázek 11</b> Buňky <i>Pseudomonas aeruginosa</i> v elektronovém mikroskopu (Whiteley a kol., 2001) .....	35
<b>Obrázek 12</b> Promývání kolonky (foto autor) .....	44
<b>Obrázek 13</b> Inhibiční zóny hydrolátu bobkového listu <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224 (foto autor) .....	64
<b>Obrázek 14</b> Inhibiční zóny hydrolátu bobkového listu <i>Candida albicans</i> CCM 8186 (foto autor) .....	64
<b>Obrázek 15</b> Inhibiční zóny hydrolátu hřebíčku <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224 (foto autor) .....	69
<b>Obrázek 16</b> Inhibiční zóny hydrolátu hřebíčku <i>Candida albicans</i> CCM 8186 (foto autor) ..	69
<b>Obrázek 17</b> Mikrotitrační destička s testovanými hydroláty (foto autor) .....	72
<b>Obrázek 18</b> Odečty MIC testovaných mikroorganismů (foto autor) .....	72

# SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1</b> Testované kmeny bakterií .....	43
<b>Tabulka 2</b> Inkubační podmínky daných mikroorganismů .....	45
<b>Tabulka 3</b> Přehled použitých antibiotik pro testování .....	46
<b>Tabulka 4</b> Průměr inhibičních zón daných druhů antibiotik a antimykotika, (n=2) .....	49
<b>Tabulka 5</b> Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát levandule, (n=4).....	51
<b>Tabulka 6</b> Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát levandule, rod <i>Arcobacter</i> 1. část, (n=4) .....	54
<b>Tabulka 7</b> Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát levandule, rod <i>Arcobacter</i> 1. část, (n=4) .....	55
<b>Tabulka 8</b> Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát fenyklu, (n=4) .....	57
<b>Tabulka 9</b> Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát fenyklu, rod <i>Arcobacter</i> 1. část, (n=4).....	59
<b>Tabulka 10</b> Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát fenyklu, rod <i>Arcobacter</i> 2. část, (n=4).....	60
<b>Tabulka 11</b> Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát bobkového listu, (n=4).....	62
<b>Tabulka 12</b> Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát bobkového listu, rod <i>Arcobacter</i> , (n=4).....	65
<b>Tabulka 13</b> Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát hřebíčku, (n=4).....	67
<b>Tabulka 14</b> Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát hřebíčku, rod <i>Arcobacter</i> , (n=4) .....	70
<b>Tabulka 15</b> Průměr minimálních inhibičních koncentrací - hydrolát levandule, (n=4) .....	73
<b>Tabulka 16</b> Průměr minimálních inhibičních koncentrací - hydrolát fenyklu, (n=4).....	75
<b>Tabulka 17</b> Průměr minimálních inhibičních koncentrací - hydrolát bobkového listu, (n=4) .....	77

**Tabulka 18** Průměr minimálních inhibičních koncentrací - hydrolát hřebíčku, (n=4).....79

## SEZNAM ZKRATEK

AMP	Ampicilin
ATB	Antibiotika
BHI bujón	Bujón z mozkosrdcové infuze
CIP	Ciprofloxacín
DA	Clindamycin
DAEC	Difúzně adhezivní <i>E. coli</i>
DDM	Disková difúzní metoda
E	Erytromycin
EAEC	Enteroagregativní <i>E. coli</i>
EAHEC	Enteroagregativní hemoragická <i>E. coli</i>
EHEC	Enterohemoragická <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvazivní <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropatogenní <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxigenní <i>E. coli</i>
FCA	Flukonazol
FCHT	Fakulta chemicko – technologická
HD	Hydrodestilace
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
SD	Parní destilace
SDS – PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
SPE	Extrakce tuhou fází
STEC	<i>E. coli</i> produkující Shiga-toxin
TE	Tetracyklin
TSA	Trypton sójový agar

# ÚVOD

Žijeme v době, kdy neustále stoupá zájem o alternativní medicínu a s ní spojená přírodní léčiva. Přírodní produkty sloužily jako hlavní zdroj léků po celá staletí a přibližně polovina léčiv používaných dnes pochází z přírodních zdrojů (Clark, 1996). Do velké obliby se dostávají esenciální oleje, kterými je dnešní trh značně zásoben. Při výrobě těchto silic vzniká velké množství vedlejších produktů parní destilace či hydrodestilace zvané hydroláty, které nejsou nijak dál využívány.

Téma práce je odrazem rostoucího zájmu o přírodní lékařství. Hlavním cílem je prokázání antimikrobiálních účinků daných druhů hydrolátů – jedná se o hydroláty levandule, fenyklu, bobkového listu a hřebíčku. Je známo, že silice těchto rostlin mají antimikrobiální účinky, jak se ale chovají jejich hydroláty, není doposud jasně definováno. Pro srovnání nebyly testovány pouze získané hydroláty, avšak také hydroláty do zakoncentrování. K testování byly použity klinicky dostupné bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a kvasinka *Candida albicans*. Velká část testování byla také věnována bakteriím rodu *Arcobacter*.

Zásadní otázkou pro budoucí studie je to, jak velkých antimikrobiálních účinků jsou hydroláty schopny a zda by se do budoucnosti mohly zařadit bok po boku k běžně používaným esenciálním olejům nebo zda jejich případné léčivé účinky zůstanou definovány pouze v teoretické rovině.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Přírodní látky – seznámení a historie

Přírodní látky mívají často antimikrobiální účinky. Tyto látky můžeme zjednodušeně nazývat přírodními antibiotiky, neboť mívají protizánětlivé a tlumící účinky (Wenzel, 2014). Vědci z odlišných částí světa neustále zkoumají rostliny s ohledem na jejich antimikrobiální užitečnost (Cowan, 1999).

Život na Zemi začal před asi čtyřmi miliardami let vývojem jednobuněčných organismů. Mnoho z těchto základních organismů, včetně řas a bakterií, stále žije v našem dnešním světě (Bruckle, 1997). Dlouho předtím, než lidstvo poprvé popsalo existenci mikroorganismů, byla vyslovena teorie o léčivém potenciálu některých rostlin. V současné době hovoříme o antimikrobiálním potenciálu (Ríos a Recio, 2005). U rostlin byla v současnosti popsána produkce až 30 000 různých těkavých sloučenin s antimikrobiálním potenciálem (Bruckle, 1997). Rostlinné těkavé oleje jsou obecně izolovány z nerostného rostlinného materiálu destilačními metodami a jsou různorodými směsmi hlavních terpenoidů (monoterpenů a seskviterpenů). Ze studií je jasné, že tyto sekundární metabolity rostlin mají potenciál i v medicíně (Dorman a Deans, 2000).

Od Starověku používá člověk rostliny k léčbě běžných infekčních onemocnění a některé z těchto tradičních „léků“ jsou stále zahrnuty v rámci obvyklého léčení různých chorob. Například použití brusinkové šťávy (*Vaccinium macrocarpon*) je hojně používáno k léčbě infekcí močových cest (Ríos a Recio, 2005). Přírodní látky využívaly ke svému prospěchu již v Antice (Wenzel, 2014). Pád starodávných civilizací předcházal západnímu pokroku v chápání léčivých rostlin, přičemž velká část dokumentace rostlinných léčiv byla zničena nebo ztracena. Během temného věku arabský svět pokračoval ve vykopávání vlastních starších děl a stavění na nich (Cowan, 1999). Největšího rozkvětu dosáhlo přírodní lékařství v období baroka, kde byly hojně vydávány ilustrované knihy, které sloužily nejen pro lékaře, ale i pro bohaté měšťany. V této době se konečně podařilo získat kvalitní léčiva a stanovit tak přesné dávkování, ze kterého vychází dnešní medicína z části dodnes. Bohužel až o 100 let později se začala věda zajímat o přírodní látky v širším měřítku a přihlížet na ně s větším respektem, než s jakým na ně bylo v minulosti nahlíženo. Současný trend nám ukazuje, že poptávka po těchto látkách bude dál strmě stoupat (Wenzel, 2014) i vzhledem k postupnému celosvětovému zanikání některých rostlinných druhů (Cowan, 1999).



Léčivé rostliny mívají antibakteriální, antivirové a antimykotické účinky, díky obsahu biologicky aktivních látek. Tyto látky vznikají nebo se ukládají jak v celém rostlinném těle, tak mohou být obsaženy i jednotlivých částech rostliny (Wenzel, 2014). Poměrně malé procento (1 až 10 %) rostlin slouží jako potravina pro lidi i zvířata. Dalším hnacím faktorem pro znovu získaný zájem o antimikrobiální látky v rostlinách za posledních 40 let je fakt, že stále více rostlinných druhů zaniká (Cowan, 1999).

### **1.1.1 Zdroje přírodních látek**

Potenciál vyšších rostlin jako zdroje nových léčivých látek je stále značně neprozkoumaný. Z odhadovaných 250-500 000 druhů rostlin bylo zkoumáno pouze malé procento a frakce podrobená biologickému nebo farmakologickému testování je ještě menší. Každé fytochemické vyšetření dané rostliny tedy odhalí pouze velmi úzké spektrum jeho složek (Mahesh a Satish, 2008). Vzhledem k velkému počtu rostlinných druhů, které máme potenciálně k dispozici pro případné studie, je nezbytné mít účinné metody pro hodnocení účinnosti léčivých rostlin (Das a kol., 2009).

Bakteriální rezistence je stále čím dál větší problém po celém světě a je jednou z hlavních příčin selhání při léčbě infekčních onemocnění. Výrobky na bázi přírodních látek, včetně sekundárních metabolitů rostlin (fytochemikálie), mohou být použity k překonání nebo snížení tohoto problému (Lopez-Romero a kol. 2015). Z několika stovek tisíc léčivých přípravků daných druhů rostlin rozšířených po celém světě, byla jen malá část zkoumána jak fytochemicky, tak i farmakologicky (Das a kol., 2009). Antibakteriální sloučeniny odvozené od rostlin mohou být cenné jako nové prostředky pro eliminaci výskytu zoonotických patogenů rezistentních vůči antibiotikům (Palaniappan a Hollley, 2010). Antibakteriální látky odvozené od rostlin jsou opětovným zdrojem nových léčiv, avšak způsob účinku se významně liší od běžných chemických léčiv (Hemaiswarya a kol., 2008). Bakterie jsou schopny získat rezistenci na antibiotika a antiseptická činidla. Objev terapeuticky užitečných přírodních sloučenin, by mohl zlepšit léčbu a eradikaci daných kmenů (Oluwatuyi a kol., 2014).

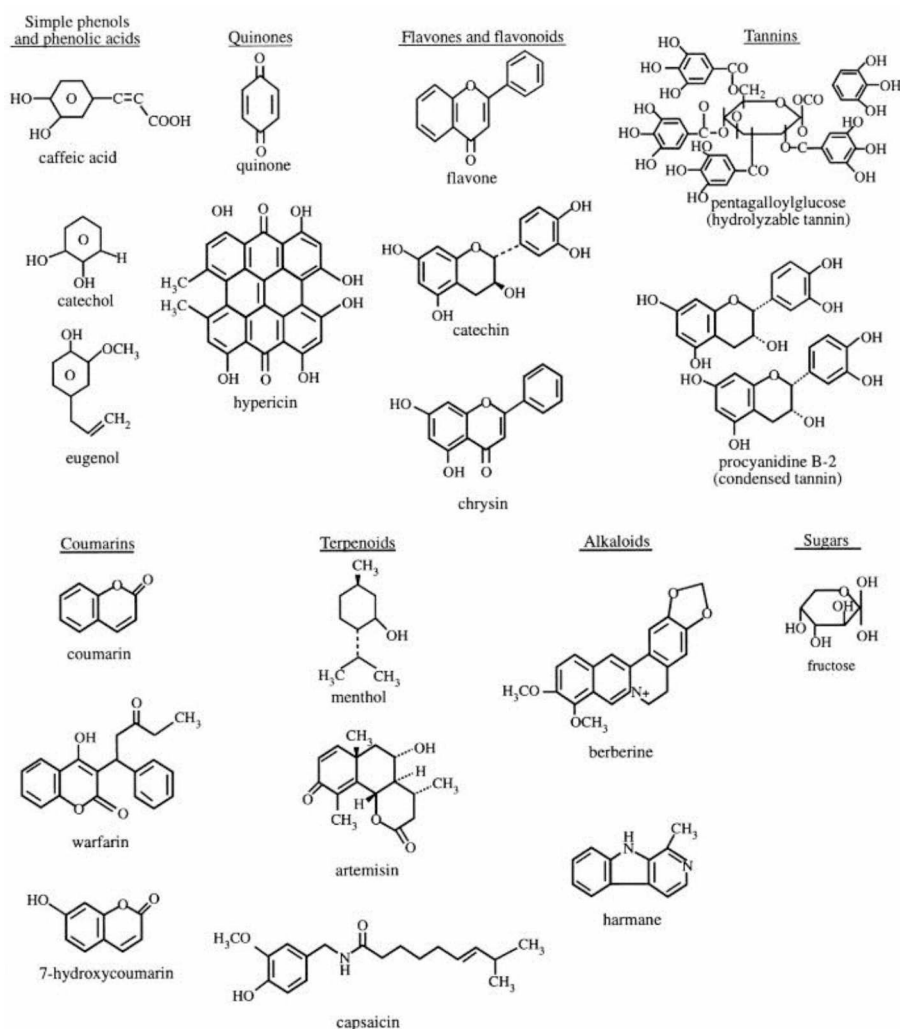
V přírodě existuje velké množství různých typů antimikrobiálních látek, které hrají důležitou roli v přirozené obraně všech druhů organismů (Rauha a kol., 2000). V příštích několika letech by studie léčivých rostlin jako antimikrobiálních látek měly být částečně zaměřeny na zjišťování specifických informací o antimikrobiální aktivitě rostlin. Izolace účinných sloučenin by měla být provedena ve světle známých aktivit rostliny a podobně by měla být

řízena izolace potenciálních principů (Ríos a Recio, 2005). Zájem o výzkum přírodních produktů je silný a lze jej přisoudit několika faktorům, včetně nesplněných terapeutických potřeb, pozoruhodnou rozmanitost chemických struktur a biologických aktivit přirozeně se vyskytujících sekundárních metabolitů (Clark, 1996).

## 1.2 Hlavní skupiny antimikrobiálních sloučenin

Studium léčivých rostlin jako antimikrobiálních látek je nezbytné pro získání informací o léčivých rostlinách a jejich skutečné biologické hodnotě. Je však nezbytné použít standardní metodu vyšetřování (Ríos a Recio, 2005).

Některé chemické sloučeniny vykazují menší či větší antimikrobiální účinky, jenž bývají poté zkoumány a následně využity ve farmaceutickém průmyslu.



**Obrázek 1** Struktury běžných rostlinných chemických sloučenin s antimikrobiálním účinkem (Cowan, 1999)

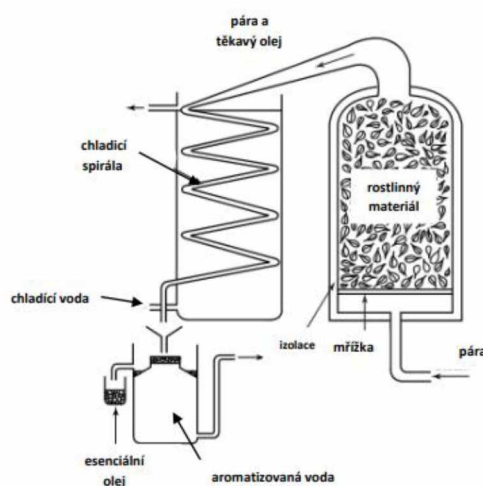
Nejvýznamnějšími skupinami látek v rostlinách jsou alkaloidy, fenoly, terpeny, glykosidy a silice. Jedná se o příklady sekundárních metabolitů rostlin, které můžeme identifikovat u živočichů, v houbách či mikroorganismech (Appendino a kol., 2010).

## 1.2.1 Esenciální oleje

Esenciální oleje neboli silice jsou příkladem těkavých, ve vodě nerozpustných olejovitých látek či jejich směsí. Jsou charakteristické svými vůněmi a palčivou chutí, jsou velmi těkavé při nízkých teplotách (Cosentino a kol., 2002).

Chemické složky, které tvoří esenciální oleje, jsou produkovány během druhého stupně biosyntézy, proto se nazývají sekundární metabolity. Existuje několik způsobů extrakce těkavých složek z rostlin. Destilaci je možné provádět několika způsoby - vodní destilace, destilace vodou a parou a parní destilace (Buckle, 1997). Hlavní sloučeniny jsou odvozeny pouze ze tří biosyntetických cest, mevalonátové dráhy vedoucí k seskviterpenům, dráhy methyl-erithrytolu vedoucí k mono- a diterpenům a dráhy kyseliny shikimové na cestě k fenypropenům (Baser a Buchbauer, 2010).

Parní destilace je nejrychlejší způsob, jak destilovat éterické oleje. Pára uvolňuje těkavé nepolární složky rostliny a prochází do kondenzátoru, který ochlazuje směs (Buckle, 1997). Nejčastěji jsou silice tvořeny terpeny, zejména monoterpenickými uhlovodíky, aldehydy, alkoholy, ketony, kyselinami, estery nebo seskviterpeny. Dále mohou obsahovat fenypropanoidy (Sobkova, 2009).



**Obrázek 2** Schéma parní destilace (Buckle, 1997)

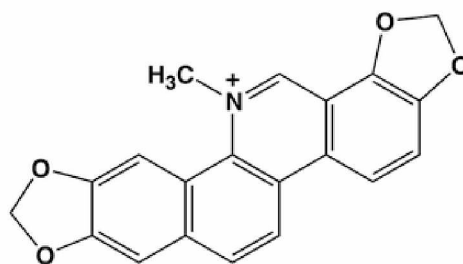
Všechny rostliny mají schopnost produkovat těkavé sloučeniny, poměrně často se ale setkáváme s příklady, kdy je produkují pouze ve stopovém množství (Baser a Buchbauer, 2010). Rostlinné oleje a výtažky jsou používány pro nejrůznější účely po mnoho tisíc let (Hammer a kol., 2001). Esenciální oleje a jejich složky jsou stále oblíbenější jako přirozeně se vyskytující antimikrobiální látky (Cosentino a kol., 2002). Každý olej obsahuje až 100 chemických složek, které spolu vzájemně kooperují a mají daný vliv na daného jedince. Esenciální oleje jsou prchavé látky, které se převádějí na páru, v závislosti na tom, který komponent v oleji převládá (Goldstein, 2006). Vývoj rezistence vůči různým antimikrobiálním činidlům je velkou výzvou pro moderní medicínu a proto je naléhavá potřeba hledat nové antimikrobiální látky. Antimikrobiální aktivita silic a biogenních nanočástic je již známa. Nedávné studie ukázaly, že nanočástice funkcionalizované s éterickými oleji mají významný antimikrobiální potenciál proti multirezistentním patogenům (Rai a kol., 2017).

Většina silic se setkává s problémem rozpustnosti ve vodě. Dále jsou antimikrobiální vlastnosti ovlivněny agronomickou praxí a zpracováním, protože tyto faktory přispívají jak k profilu, tak k relativním koncentracím účinných látek (Delaquis a kol., 2002).

## 1.2.2 Alkaloidy

Prvotní zájem o alkaloidy byl zcela lékařský, až později bylo však dokázáno, že tyto heterocyklické sloučeniny mají antimikrobiální vlastnosti (Robinson, 1974). Prvním lékařsky užitečným příkladem alkaloidu byl morfin, jehož deriváty jsou kodein a heroin. U diterpenových alkaloidů, které jsou běžně izolovány z pryskyřníků, byly zjištěny vysoké antimikrobiální vlastnosti. Solamargine, glykoalkaloid z bobulí *Solanum khasianum* a jiné alkaloidy mohou být užitečné proti infekci HIV (Cowan, 1999).

Berberin je příkladem alkaloidu, který může být úspěšně separován z čínských bylin, ačkoliv jeho způsob účinku není přesně znám (Kong a kol., 2004). Jedná se o kationtovou molekulu, která se převede z iminové formy s  $\text{pH} < 6$  na formu alkanolaminu s  $\text{pH} > 7$ . Sanguinarin je benzofenantridinový alkaloid odvozený od kravěnky *Sanguinaria canadensis* L. Extrakt ze sanguinarií se skládá ze sanguinarinu a dalších pěti příbuzných alkaloidů (Godowski, 1989).



*Obrázek 3* Vzorec sanguinarinu (Chowdhury a kol., 2010)

### 1.2.3 Glykosidy

Glykosidy jsou příkladem derivátů sacharidů, které vznikají náhradou hydroxylové poloacetalové nebo poloketalové skupiny jiným cukerným či necukerným radikálem. Glykosidy s polycyklickými aglykony mohou po hydrolýze vykazovat vysokou antimikrobiální aktivitu (Majak, 2008).

Mnoho rostlin má schopnost uvolňovat kyanovodík do poškozených tkání. Nejčastěji jsou odpovědnými sloučeninami kyanogenní glykosidy, které jsou relativně polární, ve vodě rozpustné sloučeniny (Brinker a Seigler, 1992). Různé skupiny toxických glykosidů se vyskytují ve vyšších rostlinách, mezi které patří například glukosinoláty, kyanogenní glykosidy, glykoalkaloidy, saponiny, alifatické nitrotoxiny a kardenolidy. Fenyletanoidové glykosidy jsou skupinou ve vodě rozpustných přírodních produktů, které jsou široce distribuovány v rostlinné říši, z nichž většina je izolována z léčivých rostlin. Strukturně jsou charakterizovány kyselinou skořicovou a hydroxyfenylethylovou skupinou připojenou k P-glukopyranóze prostřednictvím esteru a glykosidických vazeb. Na glukózový zbytek, který ve většině případů tvoří jádro molekuly, může být také připojena ramnóza, xylóza, apióza atd (Jiménez a Riguera, 1994). Některé glykosidy z tohoto rodu mají antibakteriální, antifungální a insekticidní účinky a používají se pro lékařské, zemědělské a veterinární účely (Kirmizigül a kol., 1996).

### 1.2.4 Fenoly

Rostliny mají neomezenou schopnost syntetizovat aromatické látky, sekundární metabolity, z nichž většinu tvoří fenoly nebo jejich deriváty substituované kyslíkem. Mezi důležité podtřídy této skupiny sloučenin patří fenolové kyseliny, chinony, flavony, flavonoidy,

flavonoly, taniny a kumariny. Tyto skupiny sloučenin vykazují antimikrobiální účinek (Das a kol., 2009).

Rostlinné fenoly zahrnují širokou škálu sekundárních metabolitů, které jsou syntetizovány ze sacharidů. To, že jsou fenolové sloučeniny v rostlinné říši všudypřítomné, dokazuje fakt, že je můžeme nalézt ve všech druzích ovoce a zeleniny prakticky ve všech částech rostliny (Robards, 2003).

Kumariny pocházejí z fenylypropanoidové dráhy a vyskytují se téměř ve všech vyšších rostlinách. Přispívají k ochraně proti fytopatogenům, reakcím na abiotické stresy či k regulaci oxidativního stresu. Některé přírodní kumariny byly použity jako lidská terapeutika, která se objevují v průběhu nového vývoje v různých terapeutických oblastech, jako je symptomatická léčba roztroušené sklerózy, chemoterapie nádorů či transplantace orgánů (Bourgaud a kol., 2006).

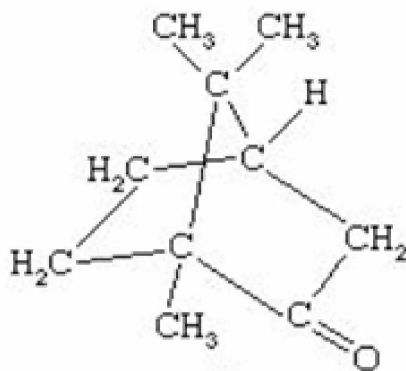
Taniny neboli třísloviny je obecný název skupiny polymerních fenolických látek schopných opalovat kůži. Tato skupina sloučenin získala v posledních letech velkou pozornost, neboť bylo naznačeno, že konzumace nápojů obsahujících taniny, zejména zelených čajů a červených vín, může vyléčit nebo zabránit různým onemocněním (Cowan, 1999). Předpokládá se, že zvýšená tvorba tříslovin v rostlině je způsob ochrany před infekcí, hmyzem a býložravci (Patel a Patel, 2013). Nejčastěji můžeme třísloviny rozdělit do 2 kategorií – na hydrolyzovatelné a kondenzovatelné. Hydrolyzovatelné třísloviny jsou složeny ze sacharidů, na které je za pomoci esterifikace navázáno několik monomerních skupin kyseliny gallové. Kondenzovatelné třísloviny jsou tvořeny z flavanoidových prekurzorů, které jsou spojené ze dvou a více katechinových jednotek (nejčastěji mezi C-4 a C-8). Jako příklad kondenzovaných tříslovin můžeme uvést proanthokyanidiny (Ree a Khanbabaee, 2001).

### **1.2.5 Terpenoidy**

Terpenoidy, také známé jako izoprenoidy, jsou největší rodinou přírodních sloučenin, sestávající z více než 40 000 různých molekul. Isoprenoidní biosyntetická dráha vytváří primární i sekundární metabolity, které mají velký význam pro růst a přežití rostlin. Terpenoidy jsou důležité pro přežití rostlin a také mají biologické vlastnosti, které jsou prospěšné pro člověka, neboť tvoří podstatnou součást éterických olejů (Aharoni a kol., 2005).

Jedná se o těkavé, vonné látky, které jsou obsaženy v listech, plodech, a dokonce i v kořenech rostlin. Terpenoidy jsou účinné proti bakteriím, plísním a virům (Cowan, 1999). Rostliny využívají terpenoidní metabolity pro řadu základních funkcí při růstu a vývoji, ale hlavně využívají většinu terpenoidů pro specializované chemické interakce a ochranu v abiotickém a biotickém prostředí (Tholl, 2015). Fungují jako fytoalexiny v přímé obraně rostlin nebo jako signály v nepřímých odezvách na obranu před jejich přirozenými škůdci (Cheng a kol., 2007).

Bylo zjištěno, že zvýšení hydrofilnosti diterpenoidů, tj. přidáním methylové skupiny, dochází ke snížení jejich antimikrobiální aktivity. Příklady běžných terpenoidů jsou metanol a kafr (monoterpeny) i farnesol a artemisin (seskviterpenoidy). Artemisin a jeho derivát  $\alpha$ -arteether, také známý pod jménem qinghaosu, nacházejí současné využití jako antimalarika (Cowan, 1999).



**Obrázek 4** Vzorec kafru (Eastman a Kluger, 1998)



### 1.3 Hydrosoly

Vodné roztoky získané jako vedlejší produkty destilace silic jsou známé jako hydrosoly či hydroláty. Bylo prokázáno, že mohou obsahovat mnoho bioaktivních látek (Rabha a kol., 2012). Hydroláty jsou druhotnými produkty hydrodistilace či parní destilace rostlin. Jsou složeny z kapaliny pocházející z rostliny a destilační kapaliny (Thring a kol., 2011). Hydrosoly musí být skladovány v aseptických nádobách, naplněných až po okraj bez vzduchové mezery, uzavřené a skladované na chladném místě. Během doby skladování může dojít ke změně složení, například ke snížení chuti hlavních složek či v krajním případě ke snížení koncentrace hlavních esenciálních složek. Doba použitelnosti hydrolátů závisí na jejich chemickém složení a na vlastní antimikrobiální aktivitě obsažených sloučenin (D'Amato a kol., 2018).

Kosmetický průmysl se snaží nacházet další možnosti, jak tyto produkty efektivně a šetrně využít (Thring a kol., 2011). Hydrosoly jsou mnohem méně zkoumány, ale vzhledem k poměrně vysokým nákladům na výrobu esenciálních olejů jsou pro výrobce ekonomicky prospěšné.

Údaje o antimikrobiální aktivitě hydrosolů nejsou přesně popsány, ale bylo rovněž zjištěno, že hydrosoly levandule, tymiánu, oregana, bazalky, hřebíčku, skořice a fenyklu vykazují antibakteriální účinky a mohou být potenciálním konzervačním prostředkem v potravinách. Hydrosoly, jakožto vodní roztoky, se intenzivně používají v aromaterapii a lze je snadno aplikovat místně bez ředění (Kunicka-Styczyńska a kol., 2014). Vzhledem k jejich rozsáhlé antibakteriální a antifungální aktivitě, by se mohla brzy rozšířit aplikace hydrosolů v potravinářských výrobcích, zejména ke kontrole růstu patogenních mikroorganismů nebo ke zpomalení oxidačních účinků a následnému prodloužení životnosti potravin (D'Amato a kol., 2018).

Je také známo, že kompozice hydrosolů a jejich antimikrobiální účinky závisí na druhu dané rostliny a regionálních podmínkách (Sağdıç a Özcan, 2003).

## 1.4 Léčivé rostliny

Následující text blíže rozvíjí výše zmiňované zástupce rostlin, jejichž hydroláty mají potenciální antimikrobiální účinky.

### 1.4.1 Levandule lékařská

Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*) může růst do výšky 50 cm a vytváří kompaktní, pravidelné shluky. Spodní část dřívku je dřevnatá, zatímco horní část je zelená. Levandule má lineární nebo kopinaté listy se zvlněnými okraji a vysoce rozvětveným vláknitým kořenovým systémem. Stříbrně zelené listy chrání rostlinu před silným slunečním světlem, větrem a nadměrnou ztrátou vody. Květy levandule rostou v hrotech, uspořádané v kruzích (3-5 květů na kruh) v horní části stopky. Mají bledě fialovou barvu. Levandule roste na dobře odvodněných, úrodných a vápenných půdách. Roste nejlépe na plném slunci s ochranou proti větru (Prusinowska a Smigielski, 2014).

Levandule lékařská patří do čeledi hluchavkovité (*Lamiel*). Celkem tato čeleď obsahuje 4 druhy levandule. Dalšími zástupci jsou levandule široolistá (*Lavandula latifolia*), levandule smilovitá (*Lavandula stoechas*) a levandule prostřední (*Lavandula intermedia*) (El Alaoui a Lory, 2017).



**Obrázek 5** Levandule lékařská (Balogh, 2019)

Řadí se mezi nejoblíbenější léčivé rostliny, které se v dnešní době pěstují. Přirozeně roste v jižní části Evropy, je však rozšířena do celé části kontinentu. Používá se buď sušená, nebo jako éterický olej pro různé kulinářské, kosmetické a léčebné účely (El Alaoui a Lory, 2017).

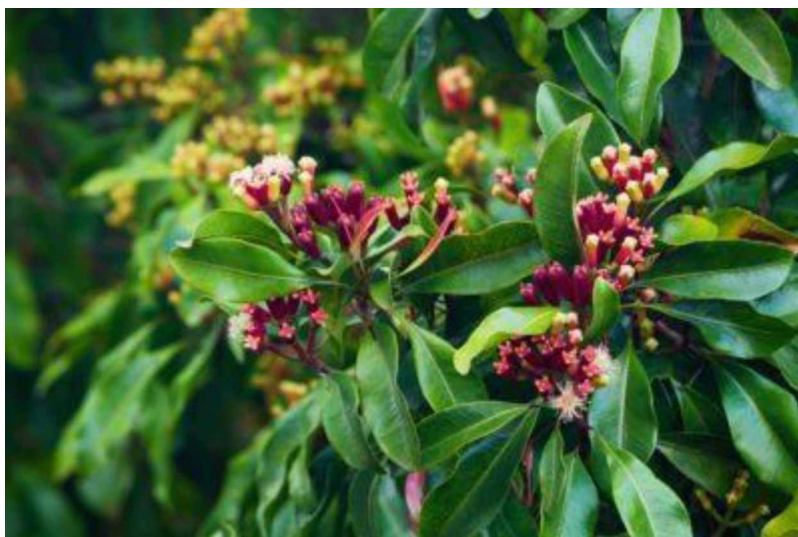
Levandulový esenciální olej se vyrábí obvykle destilací z květů a listů. Olej je tradičně považován za antibakteriální a antifungální sedativum, účinný při popáleninách a bodnutí hmyzem. Oleje mohou být užitečné při léčbě bakteriálních infekcí, které jsou odolné proti antibiotikům (Cavanagh a Wilkinson, 2002). Esenciální olej levandule, který je tvořen převážně monoterpeny se uchovává zejména ve žláзовém trichomu, jenž pokrývá povrch listů rostliny (Chrisargyris a kol., 2016). Kvalitativní a kvantitativní složení esenciálního oleje levandule je proměnlivé a závisí na genotypu, místě výskytu, klimatických podmínkách, šíření a morfologických rysech. Silice obsahuje více než 300 chemických sloučenin (Prusinowska a Smigielski, 2014).

#### **1.4.2 Hřebíčkovce kořený**

*Syzygium aromaticum* (neboli hřebíček) je nejčastěji známý pro jeho sušený kalich s poupětem hřebíčkovce kořeného (Kybal a Kaplická., 1988).

Jedná se o druh stromu, který pochází z Moluckých ostrovů, dále je široce rozšířený na Madagaskaru, Srí Lance, v Indonésii a na jihu Číny. Dosahuje výšky 1-8 m. Nejdůležitější částí stromu, využívanou ke komerčním účelům jsou květinové lístky. Květní pupeny se shromažďují ve fázi dozrávání před květem po 4 letech růstu. Sběr je prováděn ručně nebo chemicky za použití přírodního fytohormonu, který uvolňuje ethylen v rostlinné tkáni a produkuje předčasné zrání. Často je pěstován v pobřežních oblastech v maximálních nadmořských výškách 200 m n. m. Jedná se o jedno z nejcennějších koření, které bylo po staletí používáno jako konzervační prostředek a pro mnohé léčebné účely (Cortés-Rojas a kol., 2014).

Hlavními složkami esenciálního oleje je carvacrol, thymol, eugenol a cinnamaldehyd (Chaieb a kol., 2007). Jedna z hlavních složek hřebíčkového oleje – eugenol, vykazuje širokou antimikrobiální aktivitu, což prokázaly laboratorní testy, které pozitivně eugenol identifikovali v křovinách (Bhowmik a kol., 2012). Hřebíčkový olej je druh aromatického oleje, extrahovaný z pupenů a listů stromů (Cui a kol., 2018).



**Obrázek 6** Hřebíčekovec kořený (Dyer a Writerr, 2019)

Hřebíček má velké zastoupení v alternativní medicíně neboť zmírňuje nevolnost, nauzeu a je používán při bolestech zubů a zánětu krku (Bhowmik a kol., 2012). Používá se ve farmaceutickém průmyslu, zejména v léčivých přípravcích při již zmíněných bolestech zubů (Abdali a Aji, 2015).

### 1.4.3 Fenykl obecný

Fenykl obecný (*Foeniculum vulgare*) je rostlina pocházející ze středomoří, po staletí používána v lidové medicíně díky farmakologickým vlastnostem svého esenciálního oleje (Křižman a kol., 2007). Znovuobnovený zájem o fenykl pramení z poptávky o plody této rostliny, které jsou využívány v dnešní gastronomii (Oktay a kol., 2003).

Jedná se o zástupce víceletých bylin, patřící do řádu *Apiales* (miříkotvaré). Fenykl se pěstuje pro své plody, které obsahují kolem 6 % silice. Hlavními složkami silice jsou trans-anethol, fenchon, estragol (methy chavikol) a  $\alpha$ -pinen. Fenykl je velmi všestranná bylina, ze které se využívají jak listy, plody, tak řapíkatá část a kořen. V přírodní medicíně jsou nejdůležitější semena, neboť obsahují anethol, silice, fenyلكarbonové kyseliny, mastný olej, flavonoidy, kumariny, pryskyřice, hořčiny, saponiny, rutin či vitamíny A, B, C, E.

Fenyklové extrakty prokázaly, že mají protizánětlivý, antispasmodický, karminační a diuretický účinek. Dále jsou extrakty využívány jako analgetika, stimulanty gastrointestinální pohyblivosti a při léčbě nervových poruch (El-Awadi a Hassan, 2010).



**Obrázek 7** Fenykl obecný (převzato z: amazon.com)

Kromě prostředí pravděpodobně nejvíce ovlivňuje výnos a kvalitu plodů genotyp. Jejich interakce je hlavní příčinou obtížnosti, jak vysvětlit vysokou variabilitu znaků v generacích. Variabilita složení silice je dána relativním poměrem jednotlivých konstituentů a nikoliv jejich přítomností nebo absencí. Chemický profil silice ovlivňuje průběh počasí, stanoviště, stupeň zaplevelení, dále teplota, relativní vlhkost, suma světelných dní a dlouhodobé povětrnostní podmínky (Růžičková a kol., 2005).

#### **1.4.4 Vavřín vznešený**

Jedná se o příklad aromatické rostliny, která se často používá jako koření či jako tradiční lék při léčbě infekčních onemocnění. Tento dvoudomý keř dorůstá výšky až 12 metrů. Vavřín je známý spíše pro svůj druhý název – bobkový list. Pochází z Přední Asie, z které se rozšířil do Evropy, kde byl dříve samozřejmou součástí středomořských lesů (Ramos a kol., 2010). Vavřín můžeme nejčastěji najít ve stále zelené vegetaci s jinými tvrdolistými dřevinami. Silice, které se nachází zejména v listech mají prokazatelný baktericidní účinek. Tyto silice mají velmi pozitivní vliv při léčbě diabetu. Z plodů se dále lisuje olej, který našel své uplatnění v parfumerii (Grulich, 2011). Od Starověku jsou listy vavřínu považovány jako symbol vítězství (Kybal a Kaplická, 1988).

Izolované složky z vavřínu jsou především flavonoidy, seskviterpenové laktony a isochinolinové alkaloidy (Simić a kol., 2003).



**Obrázek 8** Vavřín vznešený (převzato z: selvaasturiana.com)

Listy našly využití v perorální medicíně k léčbě symptomů gastrointestinálních problémů, například epigastrické nadýmání či plynatost (Kivcak a Mert, 2002). Plody vavřínu jsou velmi bohaté na silice, neboť listy obsahují až 1,3 % éterického oleje, který je tvořen z části tuky a z části terpenickými látkami (Ramos a kol., 2010).

## 1.5 Extrakce a způsoby separace

Extrakce je příklad dělicí metody, při které dochází k distribuci analyzované látky mezi dvě fáze – kapalnou a tuhou; plynnou či tuhou nebo mezi dvě kapalně fáze, které jsou nemísitelné (Churáček, 1990).

K vlastnostem dobrého rozpouštědla při rostlinných extrakcích patří nízká toxicita a snadné odpařování při nízké teplotě. Konečný produkt extrakce bude obsahovat stopy zbytkového rozpouštědla, které by mělo být netoxické. Voda je univerzální rozpouštědlo, které se používá k extrakci rostlin s antimikrobiální aktivitou. Změny v extrakčních metodách obvykle závisí na délce extrakční periody, použitém rozpouštědle, pH rozpouštědla, teplotě, velikosti částic rostlinných tkání a poměru rozpouštědla ke vzorku (Das a kol., 2009).

Mezi používané způsoby separace smění se používají dané chromatografické metody, jako příklad můžeme uvést plynovou, kapalinovou a tenkovrstvou chromatografii. Pro analýzu těkavých látek, které jsou přítomny v esenciálních olejích a hydrosolech se nejčastěji používá zmíněná plynová chromatografie.

### 1.5.1 Extrakce tuhou fází

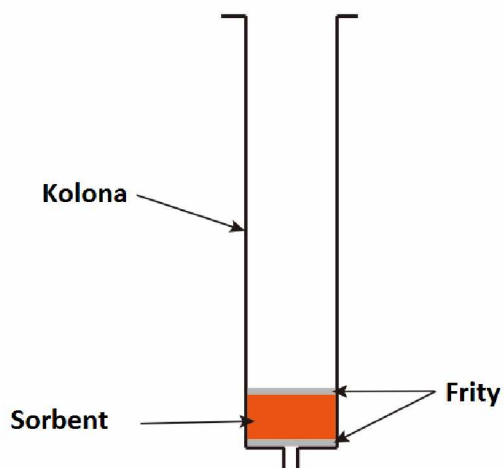
Extrakce na tuhé fázi SPE neboli (*Solid Phase Extraction*) je technika, která umožňuje zachycení sledovaných analytů z roztoku, jejich zakoncentrování před vlastním stanovením, následnou eluci, která dále zprostředkovává přečištění extraktu, tzn. snaží se odstranit látky, které by mohly ovlivnit vlastní stanovení. Metoda funguje na principu rovnovážné distribuce analytu mezi dvě nemísitelné fáze - vodnou a tuhou fází, rovnováha je zde posunuta ve prospěch tuhé fáze (Arnoštová, 2016).

SPE je nejpoužívanější technikou především kvůli různorodosti daných materiálů používajících se jako sorbenty. Typické je použití pro extrakci kapalných vzorků a zejména pro extrakci polotuhých analytů (Vidal a kol., 2012).

Hlavním cílem této extrakce je obohacení vzorku, zjednodušení matrice a výměna média, což můžeme chápat jako přenos z matrice vzorku na jiné rozpouštědlo nebo do plynné fáze (Poole, 2003). Při extrakci v pevné fázi prochází kapalným vzorkem částicemi sorbentu, ve kterém mají analyty větší afinitu než objemová kapalina. Analyty jsou selektivně zachovány pomocí sorbentu.

Existují čtyři typické kroky pro extrakci v pevné fázi - kondiciace, nanesení vzorku, promývání a eluce (Lombardi, 2015).

Kolonka se v první řadě propláchne daným rozpouštědlem a následně rozpouštědlem podobným vzorku, toto vše zajistí úpravu prostředí pro vlastní vzorek. Poté následuje samotné dávkování vzorku, po kterém probíhá odstranění nežádoucích koextrahovaných látek, a poté co je extrakce ukončena, dojde k uvolnění analytu z pevné fáze (Arnoštová 2016).



*Obrázek 9* SPE-frita (převzato z: en.bio-protocol.org)

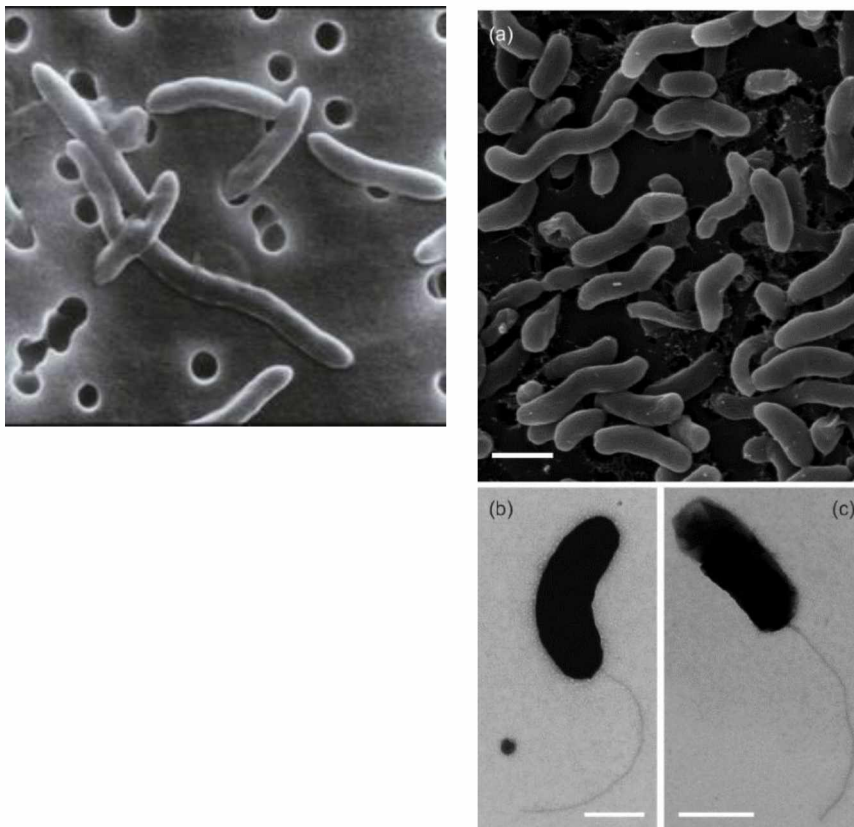


## 1.6 Charakteristika vybraných mikroorganismů

### 1.6.1 Rod *Arcobacter*

Rod *Arcobacter* patří do rodiny *Campylobacteraceae*. Jedná se o gramnegativní tyčky. Tyto bakterie jsou pohyblivé, s mírným zakřivením. Výsledek biochemických testů říká, že se jedná o oxidáza a kataláza pozitivní bakterie, nevytvářející spóry (Levican a kol., 2013). Arkobaktery mohou růst aerobně nebo mikroaerofilně. Zástupci tohoto rodu mohou růst i při 15 °C, což je charakteristický rys, který odlišuje *Arcobacter* spp. od *Campylobacter* spp. (Snelling a kol., 2006). Optimální teplota pro kultivaci se však nachází při 30 °C (Phillips, 2001).

Rod *Arcobacter* byl poprvé izolován v Belfastu – ve Spojeném království z potráceného plodu skotu. Na rozdíl od svého blízkce příbuzného rodu *Campylobacter*, rod *Arcobacter* není v současné době hlavním problémem veřejného zdraví (Snelling a kol., 2006).



**Obrázek 10** Buňky bakterií rodu *Arcobacter* v elektronovém mikroskopu (Van den Abeele a kol., 2014, Donachie a kol., 2005)

V současnosti tento rod zahrnuje 28 uznaných druhů, izolovaných z různého prostředí a hostitelů. Jedná se o tyto zástupce: *Arcobacter nitrofigilis*, *A. cryaerophilus*, *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. cibarius*, *A. marinus*, *A. trophiarum*, *A. molluscorum*, *A. ellisii*, *A. thereius*, *A. halophilus*, *A. mytili*, *A. defluvii*, *A. bivalviorum*, *A. venerupis*, *A. cloacae*, *A. suis*, *A. anaerophilus*, *A. ebronensis*, *A. aquimarimus* a *A. lanthieri*, *A. aquaticus*, *A. nitrofigilis*, *A. faecis*, *A. hispanicus*, *A. lacus*, *A. miroungae* a *A. pornicus* (Pérez-Cataluña a kol., 2018).

Arkobaktery můžeme běžně najít v střevním traktu a stolici u zdravých či nemocných zvířat. Potraviny živočišného původu se považují za důležité zdroje přenosu druhů *Arcobacter* spp. Ořechy jsou také zdrojem několika nových druhů s neznámým patogenním potenciálem. Kontaminovaná pitná voda je dalším důležitým zdrojem *Arcobacter* spp., neboť byly již několikrát zaznamenány případy infekce prostřednictvím kontaminované pitné vody (Laishram a kol., 2016).

Pro optimální aerobní růst arkobakterů bylo již navrženo pevné médium. Důležité je přidání 0,05% kyseliny thioglykolové, 0,05% pyruvátu sodného a 5% ovčí krve (pH 6,9) k bazální živné směsi, což vede ke vzniku účinného média pro růst kolonií, kolem nichž se vyvine tmavě červená barva (Phillips, 2001). V poslední době byl také vyvinut obohacovací bujon, pro kvantitativní a kvalitativní izolaci všech arkobakterů z kůže a masa drůbeže s maximálním potlačením doprovázející flóry. Tento selektivní přípravek musí pro svou účinnost obsahovat 5-fluorouracil, amfotericin, cefoperazon, novobiocin a trimethoprim (Vandenberg a kol., 2004).

Použití spektra biochemických testů porovnávající charakteristiky neznámého izolátu s charakteristikami definovaných taxonů poskytuje metodu identifikace různých druhů těchto bakterií. Dále bylo prokázáno, že elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) je úspěšná metoda pro identifikaci druhu *Arcobacter* spp. izolovaných z jateční drůbeže (Phillips, 2001).

Již několik testů citlivosti na antibiotika prokázalo, že *Arcobacter* spp. vykazuje citlivost k aminoglykosidům, včetně kanamycinu a streptomycinu. Přítomnost získané rezistence vůči erytromycinu a ciprofloxacinu u izolátů drůbeže vyvolává obavy, neboť tyto dvě antimikrobiální látky jsou obecně předepisovány jako léky pro léčbu infekcí způsobených kamylobaktery u lidí. Tedy je zřejmé, že aminoglykosidy mohou být vhodná antibiotika pro léčení onemocnění způsobených arkobaktery (Snelling a kol., 2006).

### 1.6.2 Rod *Staphylococcus*

Rod *Staphylococcus* je příkladem nepohyblivých, grampozitivních koků, které produkují katalázu, nikoli oxidázu (Kateete a kol., 2010).

Tyto bakterie nemají žádný zvláštní nutriční a environmentální požadavek na svůj růst a mohou tedy růst při pH vyšší než 4,8 a jejich minimální teplota růstu je 9 °C. Avšak teplotní optimum pro růst tohoto kmene je 37 °C. Většina kmenů je schopna produkovat jeden nebo více enterotoxinů, které jsou příčinou gastrointestinálních příznaků pozorovaných během intoxikace (Normanno a kol., 2005). *Staphylococcus* je celosvětově nejrozšířenějším patogenem při otravě jídlem a způsobuje u lidí gastrointestinální příznaky, jako je nevolnost, vomitus, křeče břicha a diarhea (Scherrer, 2004). Jedná se o hlavní příčinu bakterémie a infekční endokarditidy (Tong a kol., 2015). Většina z nich není nijak závratně škodlivá a najdeme je běžně na kůži a sliznici lidí (Harris a kol., 2002).

Pro izolaci je nejvhodnější krevní agar s 5% ovčích erytrocytů a obyčejný nebo thioglykolátový bujon. Ke kultivaci z kontaminovaných vzorků je vhodné použití selektivní půdy, jako je krevní agar s 10 % NaCl, který potlačuje gramnegativní mikroflóru, bohužel i stafylokoky, takže je odečítáme za 48 hodin. Na Baird-Parker agaru rostou jako velké kolonie (1-3 mm), neprůhledné s hladkým povrchem, rovnými okraji a s krémovou konzistencí. Kolem kolonií je různě znatelná beta – hemolýza (Votava a kol., 2003).

### 1.6.3 Rod *Escherichia*

Tento rod patří do čeledi *Enterobacteriaceae*, jedná se o zástupce rovných gramnegativních tyčinek. Tyto bakterie se vyznačují pozitivním testem na katalasu, oxidasu však neprodukují. Laboratorní optimum pro růst tohoto rodu je 30-37 °C za fakultativně anaerobních podmínek (Akond a kol., 2009). Na Endově agaru rostou jako výrazné purpurově zbarvené kolonie, zbarveno je i jejich blízké okolí. Další půdou vhodnou pro kultivaci tohoto kmene je MacConkey agar. Bakterie zde vyrůstají v růžových koloniích a růžově zbarvené je i následně médium v jejich okolí (Votava a kol., 2003).

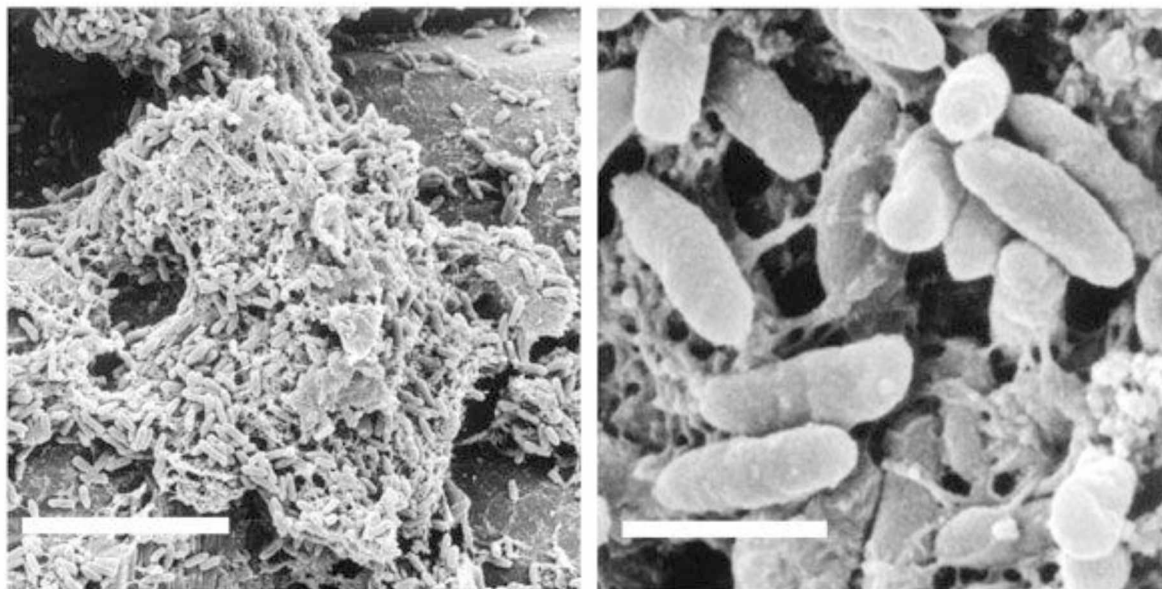
Nejznámějším zástupcem je *Escherichia coli*, která představuje jeden z nejlépe studovaných modelových organismů (Touchon a kol., 2009). Kromě toho, že je důležitým členem běžné střevní mikroflóry lidí a jiných savců, obsahuje mnoho patotypů, které způsobují různé nemoci.

Nejčastěji způsobují infekce močových cest a meningitidy (Kaper a kol., 2004). Některé kmeny se však mohou stát patogenními a infikují střevní oblast a způsobují těžké onemocnění. Jsou klasifikovány podle jejich mechanismů virulence, klinických příznaků a následků - enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), enteroagregativní *E. coli* (EAEC), enterohemoragická *E. coli* (EHEC), *E. coli* produkující Shiga toxin (STEC), difúzně adhezivní *E. coli* (DAEC) a enteroagregativní hemoragické *E. coli* (EAHEC) (Vásques-García a kol., 2019).

#### 1.6.4 Rod *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* charakterizují gramnegativní, lehce zahnuté, striktně aerobní tyčinky, které mohou být uspořádány jednotlivě nebo v kratších řetězcích (Qin a kol., 2003). Tyto bakterie najdeme v půdě či bažinách, stejně tak i v rostlinných a živočišných tkáních (Stover a kol., 2000). Testy na oxidasu a katalasu má tento kmen výrazně pozitivní (Hasser a kol., 2000).

Kultivace tohoto rodu je poměrně snadná, neboť tyto kolonie mají typický perleťový lesk a typický jasmínový zápach. Na Endově a MacConkeyově půdě můžeme pozorovat po 24 h a 37 °C jasné růzovofialové kolonie (Klaban, 2005).



**Obrázek 11** Buňky *Pseudomonas aeruginosa* v elektronovém mikroskopu (Whiteley a kol., 2001)

Oportunní patogenní bakterie, jako je rod *Pseudomonas* mohou vyvinout perzistující infekce (Whiteley a kol., 2001). Jsou významným zdrojem bakterémie u obětí popálenin, u infekcí močových cest, u pacientů s katetrizací a pneumonií získaných v nemocnici (Stover a kol., 2000). Ukázalo se, že je dominantním plicním patogenem se schopností vytvářet biofilmy, což vede k progresivním a resistantním chronickým infekcím plic, zejména u pacientů s cystickou fibrózou (Abdi-Ali a kol. 2006).

### **1.6.5 Rod *Enterococcus***

Enterokoky jsou fakultativně anaerobní, grampozitivní koky, uspořádané ve dvojicích či krátkých řetězcích. Jsou široce rozšířené v přírodě, představující se buď jako neškodní komenzálové nebo oportunní patogeny, které jsou hlavní příčinou nozokomiálních infekcí (Teixeira a Merquior, 2012). Enterokoky jsou příkladem kultivačně nenáročného rodu (Votava a kol., 2003). Tyto bakterie jsou schopny přežívat i při 8 °C, kultivační optimum se však nachází v rozpětí 35–45 °C (Cools a kol., 2001). Bakterie tohoto rodu jsou kataláza negativní, byla zde pouze identifikována tvorba pseudokatalázy (Frankenberg a kol., 2002). Dobře rostou na krevním agaru v drobných šedých koloniích, často se zónou viridace. Pro kultivaci enterokoka bývá používána selektivně diagnostická půda Slanetz-Bartley, která je složena z azidu sodného, trifenylnitrazoliumchloridu a glukózy, enterokoky zde můžeme pozorovat růžových koloniích (Votava a kol., 2003).

Zástupci tohoto rodu jsou bakteriocinogenní a schopni inhibovat růst některých patogenů a mikroorganismů, které mají velký potenciál při konzervování potravin (Gomes a kol., 2008). Zástupci se také tradičně používají jako hygienické indikátory a metody jejich detekce jsou základními prvky regulace pitné vody na celém světě (Frahm a Obst, 2003).

### **1.6.6 Rod *Candida***

Tento rod kvasinek může růst v nejméně třech různých morfologiích - kvasinky, pseudohyfy a hyfy. Vzhled je do jisté míry podmíněn charakterem prostředí (Sudbery a kol., 2004).

Na krevním agaru vyrůstají za 24 hodin, avšak v nenápadných drobných koloniích s typickým zápachem – vůně po chlebu. Základním agarem pro kultivaci kandidy je Sabourauduv agar se 4% glukózy nebo maltózy. Na tomto agaru vyrostou krémově zbarvené, neprůhledné kolonie s matným povrchem (Votava a kol., 2003). Optimální inkubační teplota pro *Candida albicans* je 37 °C (Huang a kol., 2009). Pro kvasinky je charakteristické to, že využívají ve svém metabolismu glukózu a kvasí ji za tvorby CO<sub>2</sub> (Hall a kol., 2010).

Při mikroskopování můžeme pozorovat kulovité či vejčité buňky zvané blastospory. *C. albicans* vytváří na žlučovém agaru chlamydospory – toto se využívá k identifikaci těchto bakterií (Klaban, 2005).

Tyto kvasinky jsou často členem normálního humánního mikrobiomu. U většiny jedinců se nachází jako celoživotní, neškodní komenzálové (Mayer a kol., 2013). Poměrně malý počet druhů rodu *Candida* je pro člověka patogenní. Tyto organismy jsou schopny způsobit celou řadu povrchových a dalších mykóz, které jsou distribuovány po celém světě. Všichni jsou oportunními patogeny, které mohou napadnout imunokompromitované hostitele nebo ty, kteří jsou oslabeni jiným způsobem (Douglas, 2003).

## 2 PRAKTICKÁ ČÁST

### 2.1 Použité živné půdy, přístroje a pomůcky

#### 2.1.1 Živná média a pracovní roztoky

- **Fyziologický roztok**

HiMedia

***Příprava:***

8,5 g chloridu sodného bylo naváženo a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Při teplotě 121 °C byl roztok sterilizován po dobu 15 minut v autoklávu. Dále byl skladován při chladničkové teplotě (2–5 °C).

***Složení:***

Chlorid sodný	8,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

- **BHI (Brain Heart Infusion)**

HiMedia

***Příprava:***

Navážíme 37,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody a zahříváme do úplného rozpuštění. Sterilizujeme v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Médium se doporučuje používat čerstvě připravené, jinak je nutno krátce převařit (několik minut) a před použitím ochladit.

***Složení:***

Telecí mozková infuse	z 200,0 g/l
Hovězí srdcová infuse	z 250,0 g/l
Proteosový pepton	10,0 g/l
Chlorid sodný	5,0 g/l
Hydrogenfosforečnan (di)sodný	2,5 g/l

Dextrosa 2,0 g/l

- **Krevní agar**

HiMedia

***Příprava:***

Navážíme 21,25 g přípravku do 500 ml destilované vody a zahříváme do úplného rozpuštění. Sterilizujeme v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Ochladíme na 40–50 °C a asepticky přidáme 7 % sterilní defibrinované krve.

***Složení:***

Proteasový pepton	15,0 g/l
Játrový extrakt	2,5 g/l
Kvasničný extrakt	5,0 g/l
Chlorid sodný	5,0 g/l
Agar	15,0 g/l

- **Malt agar**

HiMedia

***Příprava:***

Navážíme 45,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody a zahříváme do úplného rozpuštění. Sterilizujeme v autoklávu při 118 °C po dobu 15 minut. Zabraňte přehřátí média, což způsobuje ztmavnutí a změknutí agaru.

***Složení:***

Sladový extrakt	30,0 g/l
Agar	15,0 g/l



- **TSA agar**

(Tryptone Soya Agar)

HiMedia

***Příprava:***

Navážíme 40,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody a zahříváme do úplného rozpuštění. Sterilizujeme v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

***Složení:***

Enzymatický hydrolát kaseinu	15,0 g/l
Sójový pepton	5,0 g/l
Chlorid sodný	5,0 g/l
Agar	15,0 g/l

- **Mueller Hinton agar**

HiMedia

***Příprava:***

Navážíme 38,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody a zahříváme do úplného rozpuštění. Sterilizujeme v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

***Složení:***

Kyselý hydrolát kaseinu	17,5 g/l
Hovězí srdcová infuse	2,0 g/l
Škrob, rozpustný	1,5 g/l
Agar	17,0 g/l

## 2.1.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy KERN KB	(KERN, Německo)
Analytické váhy KERN ALS 120-4N	(KERN, Německo)
Autokláv PS 20A	(BMT, Česká republika)
BACMED 6iG2	(ASPIAG s.r.o., Česká republika)
Biologický termostat ST 3 COMF/S	(POL-EKO, Polsko)
Biologický termostat BT 120	(Laboratorní přístroje, Česká republika)
Denzitometr McFarland	(Biosan, Litva)
Horkovzdušný sterilizátor STERIMAT 5104.2	(BMT, Česká republika)
Chladnička Gorenje RK 6201 BW	(Gorenje, Slovinsko)
Chladnička Zanussi ZRA 40100 WA	(Zanussi, Itálie)
Sterimat 5104.2	(BMT, Česká republika)
Tecan Infinte ® 200 PRO	(Tecan, Švýcarsko)
Třepačka a vortex IKA MS 3 Digital	(IKA, USA)
Třepačka Vomado vortex	(Benchmark, USA)

## 2.1.3 Pomůcky

Běžné laboratorní sklo
Běžné plastové a kovové pomůcky
Mikropipety automatické

#### 2.1.4 Analyzované vzorky

Pro účely diplomové práce byly vzorky nezakoncentrovaných hydrolátů dodány z Katedry analytické chemie, Univerzity Pardubice a před vlastními experimenty skladovány v tmavých nádobách při chladničkové teplotě.

Hydrolát parní destilace – levandule **Datum výroby:** 13. 11. 2017

Hydrolátní hydrodestilace – levandule **Datum výroby:** 7. 11. 2017

Hydrolát parní destilace – fenykl **Datum výroby:** 10. 5. 2017

Hydrolátní hydrodestilace – fenykl **Datum výroby:** 16. 5. 2017

Hydrolát parní destilace – bobkový list **Datum výroby:** 4. 4. 2017

Hydrolátní hydrodestilace – bobkový list **Datum výroby:** 30. 3. 2017

Hydrolát parní destilace – hřebíček **Datum výroby:** 11. 4. 2017

Hydrolátní hydrodestilace – hřebíček **Datum výroby:** 20. 4. 2017

## 2.1.5 Testované mikroorganismy

Pro účely diplomové práce bylo testováno 13 vybraných mikroorganismů, z toho 12 bakterií a jedna kvasinka. Všechny testované kmeny bakterií a kvasinek jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 Testované kmeny bakterií

Testované kmeny bakterií	Původ kmene
<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828	Sbírka mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Univerzity v Gentu
<i>Arcobacter butzleri</i> CCUG 30484	Sbírka mikroorganismů Univerzity v Göteborgu
<i>Arcobacter butzleri</i> UPa 2012/3	Interní sbírka Univerzity Pardubice
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050	Česká sbírka mikroorganismů Přírodovědecké fakulty MU Brno
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> UPa 2013/13	Interní sbírka Univerzity Pardubice
<i>Arcobacter lanthieri</i> LMG 28517	Sbírka mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Univerzity v Gentu
<i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 6621	Sbírka mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Univerzity v Gentu
<i>Arcobacter thereius</i> LMG 24488	Sbírka mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Univerzity v Gentu
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	Česká sbírka mikroorganismů Přírodovědecké fakulty MU Brno
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	Česká sbírka mikroorganismů Přírodovědecké fakulty MU Brno
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	Česká sbírka mikroorganismů Přírodovědecké fakulty MU Brno
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	Česká sbírka mikroorganismů Přírodovědecké fakulty MU Brno
<i>Candida albicans</i> CCM 8186	Česká sbírka mikroorganismů Přírodovědecké fakulty MU Brno

## 2.2 Pracovní postupy

### 2.2.1 Zakoncentrování hydrolátů

Na zakoncentrování hydrolátových vzorků levandule, bobkového listu, fenyklu a hřebíčku byla použita metoda extrakce tuhou fází (SPE). K těmto měřením byly používány kolonky se sorbentem Separon SGX C18 (modifikovaný oktadecylsilikagel, 60  $\mu\text{m}$ , 0,5 g). Všechny tyto extrakce byly provedeny ručně s použitím injekčních stříkaček z důvodu vysoké těkavosti látek, pro které by prosávání za sníženého tlaku nebylo vhodné.

Sorbent kolonky byl nejprve aktivován promytím 5 ml methanolu a poté promytím 10 ml sterilizované vody. Vzorky byly pro účely experimentů této studie zakoncentrovány (50 $\times$  a 100 $\times$ ). Objem hydrolátu, který odpovídal 100 ml, byl zakoncentrován do finálních eluovaných 2 ml ethanolu.



*Obrázek 12* Promývání kolonky (foto autor)

Mezi jednotlivými výrobami byla vždy kolonka promyta hexanem. Pro každý jednotlivý hydrolát byla použita nová kolonka, aby každá extrakce probíhala na čistém sorbentu.

### 2.2.2 Disková difúzní metoda ke stanovení inhibičních zón hydrolátů

Disková difúzní metoda (DDM) sloužila ke stanovení citlivosti daného kmene k daným látkám, v tomto případě k hydrolátům.

Byla připravena buněčná suspenze ve fyziologickém roztoku o buněčné densitě odpovídající stupni 0,5-1,5 McFarlandovy zákalové stupnice ( $10^8$  CFU/ml). Na příslušná agarová média jsme pomocí stěrových tamponů nanесли suspenzi stěrových tamponů z původní zkumavky o densitě  $10^8$  CFU/ml. Suspenzi jsme pečlivě rozetřeli ve všech směrech, aby byl povrch média rovnoměrně inokulován.

Poté jsme za pomoci diosenzoru nanесли 4 blankové disky pro antimikrobiální testování, které jsme impregnovali 8 µl vzorků daných hydrolátů.

V tabulce níže jsou uvedeny kultivační podmínky daných bakteriálních kmenů:

**Tabulka 2** Inkubační podmínky daných mikroorganismů

Mikroorganismy	Čas	Teplota
<i>Arcobacter</i> spp.	48 h	30 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	24 h	30 °C
<i>Escherichia coli</i>	24 h	30 °C
<i>Enterococcus faecalis</i>	24 h	30 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24 h	30 °C
<i>Candida albicans</i>	24 h	37 °C

Takto připravené misky jsme nechali inkubovat v termostatu, dle výše zmíněných podmínek. Po inkubaci se případná citlivost mikroorganismu projevila inhibiční zónou, jejíž průměr se měřil v mm.

Dále bylo nutné provést kontrolu skutečné buněčné density připravené bakteriální suspenze. Na povrch příslušných agarů bylo napipetováno 100 µl bakteriální suspenze o denzitě  $10^3$  CFU/ml (po desítkovém ředění), rozetřeli jsme L-hokejkou a po kultivaci spočítali narostlé kolonie.

### 2.2.3 Stanovení minimálních inhibičních koncentrací hydrolátů

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

Nejprve bylo nutné zhotovení dvojkové ředící řady extraktu. Do první jamky prvního řádku bylo napipetováno 180 µl příslušného hydrolátu a do ostatních jamek (2–12) 90 µl BHI bujónu. Postupným přenášáním 90 µl suspenze za pomoci pipety z předešlé jamky do následující, byla připravena ředící řada v rozsahu koncentrací 50–0, 049 % (jamka 2–12). Do takto připravené destičky byl následně napipetován objem 10 µl bakteriální suspenze testovaného mikroorganismu o buněčné denzite  $10^6$  CFU/ml, tzn. objem jamek byl 100 µl.

Po 24 hodinové kultivaci byla destička následně promíchána na třepačce a všechny zaočkované jamky u bakterií rodu *Arcobacter* byly následně vyočkovány na výseč agaru. Po následné kultivaci jsme odečetli minimální inhibiční koncentrace. U klinicky významných druhů bakterií a kvasinky byla MIC stanovována okometricky. Stanovení MIC bylo pro každý hydrolát opakováno 2x ve dvou po sobě nezávisle jdoucích experimentech.

Dále bylo nutné provést kontrolu skutečné buněčné density připravené bakteriální suspenze. Na povrch příslušných agarů bylo napipetováno 100  $\mu$ l bakteriální suspenze o denzitě  $10^3$  CFU/ml (po desítkovém ředění), rozetřeno L-hokejkou a po kultivaci byly spočítány narostlé kolonie.

#### 2.2.4 Disková difúzní metoda pro stanovení citlivosti k antibiotikům

Diskový test je standardní metoda vhodná pro stanovení citlivosti mikroorganismu k antibiotikům či jiným antimikrobiálním látkám. Výsledek určuje citlivost nebo rezistenci antibiotika vůči testovanému mikroorganismu, podle toho, zda je průměr inhibiční zóny kolem disku na tuhé půdě alespoň stejný, nebo naopak menší, než jsou stanovené break-pointy. Je to metoda kvalitativní, nejde o měření stupně citlivosti.

Byla připravena buněčná suspenze ve fyziologickém roztoku o buněčné denzitě odpovídající stupni 0,5-1,5 McFarlandovy zákalové stupnice ( $10^8$  CFU/ml). Na příslušná agarová média jsme pomocí stěrových tampónů nanесли suspenzi stěrových tamponů z původní zkumavky o denzitě  $10^8$  CFU/ml. Suspenzi jsme pečlivě rozetřeli ve všech směrech, aby byl povrch média rovnoměrně inokulován.

Poté jsme za pomoci diosenzoru nanесли antibiotické disky pro antimikrobiální testování. Pro dané účely byly vybrány antibiotika, které máme pro přehlednost umístěny v tabulce 3.

**Tabulka 3** Přehled použitých antibiotik pro testování

Účinná látka	Kategorie
Ampicilin (AMP) 30 $\mu$ g	širokospektrální antibiotikum
Ciprofloxacin (CIP) 5 $\mu$ g	fluorochinolon
Clindamycin (DA) 2 $\mu$ g	linkosamid
Erytromycin (E) 15 $\mu$ g	makrolid
Tetracyklin (TE) 30 $\mu$ g	tetracyklin
Flukonazol (FCA) 25 $\mu$ g	antimykotikum

Inkubace proběhla v temostatu dle stanovených podmínek viz tabulka 2. Po inkubaci se případná citlivost mikroorganismu projevila inhibiční zónou, jejíž průměr se měřil v mm. Výsledky jsme porovnali s tabulkovými hodnotami a stanovili jsme, zda je kmen na antibiotika citlivý či rezistentní (uvedeno v tabulce 4). Testování proběhlo ve 2 opakováních.

Dále bylo nutné provést kontrolu skutečné buněčné density připravené bakteriální suspenze. Na povrch příslušných agarů bylo napipetováno 100  $\mu$ l bakteriální suspenze o denzitě  $10^3$  CFU/ml (po desítkovém ředění), rozetřeno L-hokejkou a po kultivaci byly spočítány narostlé kolonie.



### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Hlavním cílem diplomové práce bylo testování hydrolátů získaných jako vedlejší produkt hydrodestilace a parní destilace přírodních matric (levandule lékařská, fenykl obecný, vavřín vznešený a hřebíčkovce kořený) a zjišťování jejich potenciálních antimikrobiálních účinků. Hydroláty byly testovány v získaném stavu, avšak také jako matrice po zakoncentrování (50-100×). Všechny hydroláty byly zakoncentrovány 50×, dále byl levandulový a fenyklový hydrolát pro účely práce zakoncentrován ještě 100×, porovnáním výsledků bylo ale patrné, že takto zakoncentrované hydroláty se významně nelišily v jejich antimikrobiální schopnosti od hydrolátů, které byly zakoncentrovány pouze 50×.

Antimikrobiální testování bylo provedeno v případě 12 kmenů bakterií (*Arcobacter butzleri* LMG 10828, *Arcobacter butzleri* CCUG 30484, *Arcobacter butzleri* UPa 2012/3, *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050, *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13, *Arcobacter lanthieri* LMG 28517, *Arcobacter skirrowii* LMG 6621, *Arcobacter thereius* LMG 24488, *Staphylococcus aureus* CCM 4223, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Escherichia coli* CCM 3954) a jednoho kmene kvasinky (*Candida albicans* CCM 8186). Antibakteriální a antimykotické účinky byly testovány pomocí diskové difúzní metody. Stanovené hodnoty byly porovnány s účinky běžně používaných antibiotik (ampicilin, ciprofloxacín, clindamycin, erytromycin, tetracyklin) a antimykotika (flukonazol), dále byly stanovovány minimální inhibiční koncentrace jednotlivých vzorků, a to mikrodiluční bujónovou metodou.

### 3.1 Stanovení citlivosti bakterií k hydrolátům získaných destilací

Testování, které je blíže popsáno v podkapitole 2.2.2., probíhalo ve 2 opakováních v rámci každého ze dvou nezávislých experimentů. Z experimentálně naměřených dat byl vypočten průměr a směrodatná odchylka (Tabulky 5-14). Vlastní disk má průměr 6 mm, výsledky inhibičních zón jsou měřeny včetně průměru disku.

Inhibiční zóny byly následně porovnány s výsledky inhibičních zón vybraných standartních antimikrobiálních látek (antibiotik a antimykotik). V tabulce 4 můžeme vidět výsledky testování antibiotik a antimykotik.

**Tabulka 4** Průměr inhibičních zón daných druhů antibiotik a antimykotika, (n=2)

Průměr inhibiční zóny s uvedenou směrodatnou odchylkou [mm]						
	AMP	CIP	DA	E	TE	FCA
<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828	6,0±0,00	34,5±0,70	6,0±0,00	23,0±0,00	16,0±0,00	nt
<i>Arcobacter butzleri</i> CCUG 30484	6,0±0,00	43,5±2,12	7,5±0,70	37,5±0,70	31,5±2,12	nt
<i>Arcobacter butzleri</i> UPa 2012/3	6,0±0,00	39,0±1,41	6,0±0,00	29,0±1,41	24,0±1,41	nt
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050	6,0±0,00	25,0±0,00	6,0±0,00	31,5±0,70	27,5±0,70	nt
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> UPa 2013/13	18,5±2,12	36,5±0,70	6,0±0,00	30,5±0,70	29,0±1,41	nt
<i>Arcobacter lanthieri</i> LMG 28517	6,0±0,00	37,0±1,41	6,0±0,00	22,0±2,82	17,5±0,70	nt
<i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 6621	6,0±0,00	41,0±1,41	23,0±2,82	30,0±0,00	34,0±2,82	nt
<i>Arcobacter thereius</i> LMG 24488	13,5±2,12	32,5±0,70	35,5±0,70	6,0±0,00	35,0±0,00	nt
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4232	27,0±0,00	25,5±0,50	27,0±1,41	28,0±2,82	14,5±0,70	nt
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	13,0±0,00	22,0±0,00	7,0±0,00	17,5±0,70	29,0±1,41	nt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	6,0±0,00	34,0±1,41	6,0±0,00	8,5±0,70	13,5±0,70	nt
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	6,0±0,00	31,0±1,41	6,0±0,00	9,5±0,70	20,5±0,70	nt
<i>Candida albicans</i> CCM 8186	nt	nt	nt	nt	nt	16,00±1,41

Poznámka: AMP - ampicilin, CIP - ciprofloxacín, DA - clindamycin, E - erytromycin, TE - tetracyklin, FCA - fukonazol, nt – netestováno

Při testování grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* CCM 4232 působilo na tento kmen nejlépe makrolidové antibiotikum (erytromycin), jehož průměrná inhibiční zóna byla 28,0±2,82 mm. U dalšího grampozitivního kmene *Enterococcus faecalis* CCM 4224 vykazuje největších antimikrobiálních účinků antibiotikum tetracyklin (průměrná inhibiční zóna 29,0±1,41 mm).

U bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* vykazuje nejlepších antimikrobiálních účinků fluorochinolonové antibiotikum ciprofloxacin. Průměrná inhibiční zóna u kmene *Escherichia coli* CCM 3954 činila  $31,0 \pm 1,41$  mm a u kmene *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 byla průměrná inhibiční zóna  $34,0 \pm 1,41$  mm. Studie z roku 2009 poukazuje na problémy spojené s ciprofloxacinem, neboť Fantin a kol. (2009) dokázali, že špatně nastavené dávkování má vliv na postupnou rezistenci střevních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* (zejména *Escheria coli*) vůči ciprofloxacinu. Vysoká míra rezistence vůči ciprofloxacinu v rozmezí od 32-40 % byla prokázána u pacientů s rakovinou.

V Tabulce 4 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón se směrodatnou odchylkou každého testovaného bakteriálního kmene rodu *Arcobacter* vůči standardně používaným druhům antibiotik. Ve studii Fera a kol. (2003) je zjištěna vysoká antimikrobiální rezistence na ampicilin u většiny kmenů rodu *Arcobacter*. Tento výsledek potvrzují také hodnoty z tabulky 4, výjimku tvoří pouze kmeny *Arcobacter thereius* LMG 24488 a *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13. Antimikrobiální účinky fluorochinolonového antibiotika ciprofloxacinu byly stanoveny u všech testovaných arkobakterů. Hodnoty inhibičních zón se pohybovaly v rozmezí 25,0-43,5 mm. Většina arkobakterů dále prokázala rezistenci proti ciprofloxacinu, avšak kmeny *Arcobacter thereius* LMG 24488, *Arcobacter butzleri* CCUG 30484 a *Arcobacter skirrowii* LMG 6621 proti ciprofloxacinu rezistentní nebyly. *Arcobacter thereius* LMG 24488 byl jediným rezistentním kmenem vůči erytromycinu ze všech kmenů zahrnutých do této studie. Dále byl testován tetracyklin u kterého byly prokázány antimikrobiální účinky proti všem testovaným kmenům. Hodnoty inhibičních zón se pohybovaly v rozmezí 16,0-35,0 mm. Dle tabulky 4 můžeme v závěru vidět, že abnormálně odlišné výsledky prokazuje kmen *Arcobacter thereius* LMG 24488. Tento výsledek můžeme přisoudit tomu, že tento kmen je pouze jedním ze čtyř kmenů arkobakterů, které byly diagnostikovány u člověka.

Výsledky inhibičních zón většiny bakterií a kvasinky použitých pro potřeby diplomové práce testovaných proti daným antibiotikům a antimykotiku byly zdokumentovány a pro přehlednost umístěny v příloze (str. 97-101).

### 3.1.1 Levandulový hydrolát

V Tabulce 5 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón levandulového hydrolátu testovaného proti klinicky významným druhům bakterií a kvasinky.

**Tabulka 5** Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát levandule, (n=4)

Průměr inhibiční zóny s uvedenou směrodatnou odchylkou [mm]		
<b><i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4232</b>	H (HD)	6,5±0,58
	50×H (HD)	8,5±1,73
	100×H (HD)	8,0±0,08
	H (SD)	6,8±0,96
	50×H (SD)	8,3±1,50
	100×H (SD)	9,3±0,50
<b><i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224</b>	H (HD)	6,3±0,50
	50×H (HD)	7,5±0,58
	100×H (HD)	8,0±0,82
	H (SD)	6,3±0,50
	50×H (SD)	9,5±1,29
	100×H (SD)	8,3±0,96
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	8,5±2,38
	100×H (HD)	7,3±0,50
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	10,5±1,29
	100×H (SD)	7,3±0,50
<b><i>Escherichia coli</i> CCM 3954</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	8,8±1,50
	100×H (HD)	7,3±0,50
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	9,0±2,31
	100×H (SD)	7,3±0,50
<b><i>Candida albicans</i> CCM 8186</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	6,0±0,00
	100×H (HD)	6,0±0,00
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	6,0±0,00
	100×H (SD)	6,0±0,00

Poznámka: HD – hydrodestilace, SD – pamí destilace, H – hydrolát

Z tabulky je patrné, že levandulový hydrolát získaný parní destilací, který byl 50× zakoncentrován působil nejlépe na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, průměrná inhibiční zóna činila  $10,5 \pm 1,29$ . V případě tabulky 5 můžeme říci, že levandulový hydrolát působil účinněji na grampozitivní bakterie, tyto výsledky ale nejsou nijak zásadně větší než u gramnegativních bakterií. Při porovnání antimikrobiálního potenciálu levandulového hydrolátu proti *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 s ATB, dojdeme k závěru, že inhibiční zóna se nejvíce přiblížila účinku tetracyklinu a erytromycinu.

Levandulový hydrolát získaný hydrodestilací působil nejlépe na bakterii *Escherichia coli* CCM 3954, průměrná inhibiční zóna činila  $8,8 \pm 1,50$  mm.

Pro testování antimikrobiálních účinků levandulového hydrolátu proti klinicky významným druhům bakterií a kvasinky byl používán levandulový hydrolát získaný parní destilací a hydrodestilací, tyto hydroláty byly pro potřeby testování 50× a 100× zakoncentrovány. Při aplikaci hydrolátu získaného parní destilací bylo získáno větších inhibičních zón. Z tabulky je dále patrné, levandulový hydrolát zakoncentrovaný 50× vytvořil obdobné inhibiční zóny proti testovaným mikroorganismům, jako hydrolát zakoncentrovaný 100×. Z čehož můžeme vyvodit závěr, že stupeň zakoncentrování zásadně neovlivňuje antimikrobiální účinky hydrolátů. Je však důležité, aby daný hydrolát zakoncentrovaný byl, neboť při testování antimikrobiálních účinků nezakoncentrovaných hydrolátů vůči bakteriálním suspenzím můžeme z tabulky 5 určit, že v tomto případě levandulový hydrolát působí pouze na kmen *Staphylococcus aureus* CCM 4232 a kmen *Enterococcus faecalis* CCM 422 a u ostatních testovaných bakterií a kvasinky vidíme rezistenci vůči nezakoncentrovanému levandulovému hydrolátu.

Roku 2011 byla zveřejněna studie, ve které byla testována antibakteriální aktivita esenciálních olejů proti klinicky významným bakteriím (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* a *Pseudomonas aeruginosa*). Výsledky této studie dokumentují značné antimikrobiální působení esenciálního oleje levandule, proti *Pseudomonas aeruginosa* (Sienkiewicz a kol., 2011). Tuto skutečnost můžeme prokázat i při experimentech náležících diplomové práci, jak uvádí text výše. Již dříve bylo zmíněno, že hydroláty jsou vedlejší produkty destilace esenciálních olejů, ale je zde patrná spojitost týkající se jejich antimikrobiálních účinků. Studie dokazují, že větší antimikrobiální potenciál mají esenciální oleje, což bývá způsobeno vyšší koncentrací účinných látek v olejích.

Při testování antimikrobiálních účinků levandulového hydrolátu vůči kvasince *Candida albicans* CCM 8186 nebylo při testování získáno žádných pozitivních výsledků, jak je patrné z tabulky 5 a můžeme říct, že tento hydrolát na kvasinku vůbec nepůsobí.

Dle výsledků měření je patrné, že levandulový hydrolát nemá velké antimikrobiální účinky. Tyto výsledky jsou také potvrzeny ve studii Prusinowské a Smigielski (2014), poukazují na to, že velký vliv na antimikrobiální vlastnosti hydrolátů má způsob, dle kterého jsou rostliny, které jsou použity k destilaci získávány. Levandule pro testování byla získávána pouhým domácím sběrem, proto také nemůžeme vyloučit to, že kdyby byl zvolen kvalifikovaný sběr, tak by mohl být získán kvalitnější materiál a díky tomu by bylo možné dosáhnout lepších výsledků. Ve studii z roku 2014 je kladen důraz na to, aby byly hydroláty získány destilací sušených či čerstvých bylin, neboť i tento faktor má vliv na antimikrobiální účinky hydrolátů (Kunická-Styczyńska a kol., 2014). Pro účely diplomové práce byla využívána levandule sušená, proto také nemůžeme vyloučit to, že kdyby byly využity k destilaci čerstvé byliny, tak by antimikrobiální účinky hydrolátů mohly být větší.

**Tabulka 6** Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát levandule, rod *Arcobacter* 1. část, (n=4)

Průměr inhibiční zóny s uvedenou směrodatnou odchylkou [mm]		
<b><i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	9,5±1,29
	100×H (HD)	7,0±0,00
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	10,8±0,96
	100×H (SD)	7,3±0,50
<b><i>Arcobacter butzleri</i> CCUG 30484</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	8,8±1,26
	100×H (HD)	8,5±1,73
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	13,5±0,58
	100×H (SD)	8,5±1,73
<b><i>Arcobacter butzleri</i> UPa 2012/3</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	12,8±1,26
	100×H (HD)	8,3±0,50
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	10,5±1,29
	100×H (SD)	8,8±0,50
<b><i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	8,3±1,50
	100×H (HD)	7,0±0,82
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	9,5±1,91
	100×H (SD)	7,0±0,82
<b><i>Arcobacter cryaerophilus</i> UPa 2013/13</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	8,0±0,00
	100×H (HD)	9,0±1,15
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	11,5±2,08
	100×H (SD)	8,8±0,96

Poznámka: HD – hydrodestilace, SD – pamí destilace, H – hydrolát

**Tabulka 7** Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát levandule, rod *Arcobacter* 1. část, (n=4)

Průměr inhibiční zóny s uvedenou směrodatnou odchylkou [mm]		
<b><i>Arcobacter lanthieri</i> LMG 28517</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	11,3±0,96
	100×H (HD)	7,3±0,50
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	11,8±1,26
	100×H (SD)	7,5±0,58
<b><i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 6621</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	9,0±0,82
	100×H (HD)	7,3±0,50
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	10,3±0,50
	100×H (SD)	7,0±0,00
<b><i>Arcobacter thereius</i> LMG 24488</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	11,5±1,29
	100×H (HD)	8,5±0,58
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	13,3±1,89
	100×H (SD)	8,5±0,58

Poznámka: HD – hydrodestilace, SD – parní destilace, H – hydrolát

V Tabulce 6 a 7 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón levandulového hydrolátu proti bakteriím rodu *Arcobacter*. Z tabulky je patrné, že levandulový hydrolát získaný parní destilací, který byl 50× zakoncentrován působil nejlépe na bakterii *Arcobacter butzleri* CCUG 30484, průměrná inhibiční zóna činila 13,5±0,58 mm. Levandulový hydrolát působil lépe na bakterie rodu *Arcobacter* než na bakterie a kvasinku z tabulky 5.

Pro testování antimikrobiálních účinků levandulového hydrolátu u rodu *Arcobacter* byl používán levandulový hydrolát parní destilace a hydrodestilace, který byl pro potřeby testování 50× a 100× zakoncentrován. Větších inhibičních zón dosáhly hydroláty parní destilace. Výjimku tvoří *Arcobacter butzleri* UPa 2012/3, na něhož působil lépe levandulový hydrolát získaný hydrodestilací, průměrná inhibiční zóna činila 12,8±1,26 mm. Z tabulky je dále patrné, že levandulový hydrolát, který byl zakoncentrováný 50× vytvořil obdobné inhibiční zóny, jako hydrolát, který byl zakoncentrováný 100×. Z čehož můžeme vyvodit závěr, že stupeň zakoncentrování zásadně neovlivňuje antimikrobiální účinky hydrolátů.



Je však důležité, aby daný hydrolát zakoncentrovaný byl, neboť při testování antimikrobiálních účinků nezakoncentrovaných hydrolátu vůči bakteriálním suspenzím můžeme z tabulky 6 a 7 určit, že nejsou prokázány vůbec žádné antimikrobiální účinky. Komplexně můžeme říci, že levandulový hydrolát působil lépe na bakterie rodu *Arcobacter* než na bakterie a kvasinku z tabulky 5.

### 3.1.2 Fenyklový hydrolát

V Tabulce 8 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón fenyklového hydrolátu, testovaného proti klinicky významným kmenům bakterií a kvasinky *Candida albicans*.

**Tabulka 8** Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát fenyklu, (n=4)

Průměr inhibiční zóny s uvedenou směrodatnou odchylkou [mm]		
<b><i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4232</b>	H (HD)	8,0±0,00
	50×H (HD)	10,8±0,89
	100×H (HD)	9,8±1,70
	H (SD)	8,0±0,00
	50×H (SD)	11,3±0,70
	100×H (SD)	9,8±1,50
<b><i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224</b>	H (HD)	7,8±1,25
	50×H (HD)	9,3±0,95
	100×H (HD)	12,5±1,73
	H (SD)	7,8±1,25
	50×H (SD)	15,0±1,14
	100×H (SD)	14,3±0,95
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	11,0±0,82
	100×H (HD)	10,0±0,82
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	11,5±0,81
	100×H (SD)	9,8±0,95
<b><i>Escherichia coli</i> CCM 3954</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	11,3±0,50
	100×H (HD)	9,8±0,95
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	11,5±1,29
	100×H (SD)	11,0±0,82
<b><i>Candida albicans</i> CCM 8186</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	10,5±0,57
	100×H (HD)	11,5±1,29
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	11,8±1,70
	100×H (SD)	10,8±0,50

Poznámka: HD – hydrodestilace, SD – pamí destilace, H – hydrolát

Z tabulky je patrné, že fenyklový hydrolát získaný parní destilací, který byl 50× zakoncentrován působil nejlépe na bakterii *Enterococcus faecalis* CCM 4224, průměrná inhibiční zóna činila  $15,0 \pm 1,14$  mm. Ve snaze porovnat antimikrobiální potenciál fenyklového hydrolátu vůči kmeni *Enterococcus faecalis* CCM 4224 s ATB dojdeme k závěru, že inhibiční zóna se nejvíce přiblížila účinku ampicilinu (průměrná inhibiční zóna  $13,0 \pm 0,00$  mm) a erytromycinu (průměrná inhibiční zóna  $17,5 \pm 0,70$  mm), neboť tyto antibiotika vykazovala velmi podobné antimikrobiální účinky jako fenyklový hydrolát.

Pro testování antimikrobiálních účinků fenyklového hydrolátu vůči bakteriím a kvasince z tabulky 8 byl používán fenyklový hydrolát získaný parní destilací a hydrodestilací, tyto hydroláty byly pro potřeby testování 50× a 100× zakoncentrovány. Větších inhibičních zón prokazovaly hydroláty parní destilace. Z tabulky je dále patrné, že fenyklový hydrolát zakoncentrovaný 50× vytvořil obdobné inhibiční zóny, jako hydrolát zakoncentrovaný 100×. Z čehož můžeme vyvodit závěr, že stupeň zakoncentrování zásadně neovlivňuje antimikrobiální účinky hydrolátů. Je však důležité, aby daný hydrolát zakoncentrovaný byl, neboť při testování antimikrobiálních účinků nezakoncentrovaných hydrolátů vůči bakteriálním suspenzím můžeme z tabulky 8 určit, že v tomto případě fenyklový hydrolát působí pouze na kmen *Staphylococcus aureus* CCM 4232 a kmen *Enterococcus faecalis* CCM 422 a u ostatních testovaných bakterií a kvasinky vidíme rezistenci. Fenyklový hydrolát získaný hydrodestilací, který byl zakoncentrován 100× působil nejlépe na bakterii *Enterococcus faecalis* CCM 4224, průměrná inhibiční zóna byla  $12,5 \pm 1,73$  mm.

V případě tabulky 8 můžeme říci, že fenyklový hydrolát působil účinněji na grampozitivní bakterie, tyto výsledky ale nejsou nijak zásadně větší než u gramnegativních bakterií. Tuto skutečnost nám z části potvrzuje studie z roku 2017, ve které byl testován kmen *Staphylococcus aureus* a skupina autorů prokázala, že má fenykl proti klinickým izolátům tohoto kmene velké antimikrobiální účinky (Kwiatkowski a kol, 2017). Roby a kol. (2013), testovali antioxidační aktivitu fenyklu a jeho volných radikálů a zjistili, že fenykl vykazuje potenciální antimikrobiální aktivitu. Ve studii bylo potvrzeno, že tento hydrolát vykazuje větší antimikrobiální účinky pro bakterie než pro kvasinky, které byly ve studii také porovnávány.

**Tabulka 9** Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát fenyklu, rod *Arcobacter* 1. část, (n=4)

Průměr inhibiční zóny s uvedenou směrodatnou odchylkou [mm]		
<b><i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	6,8±0,95
	100×H (HD)	9,3±0,50
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	10,8±0,95
	100×H (SD)	11,0±0,82
<b><i>Arcobacter butzleri</i> CCUG 30484</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	9,0±0,81
	100×H (HD)	10,5±0,58
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	10,8±1,50
	100×H (SD)	10,8±0,50
<b><i>Arcobacter butzleri</i> UPa 2012/3</b>	H (HD)	6,5±0,58
	50×H (HD)	10,5±1,90
	100×H (HD)	10,0±0,94
	H (SD)	6,5±1,91
	50×H (SD)	10,8±2,00
	100×H (SD)	10,00±0,94
<b><i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	9,8±0,95
	100×H (HD)	9,3±0,95
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	10,0±0,95
	100×H (SD)	9,8±0,95
<b><i>Arcobacter cryaerophilus</i> UPa 2013/13</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	8,5±1,29
	100×H (HD)	9,3±0,50
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	10,0±0,80
	100×H (SD)	10,3±0,95

Poznámka: HD – hydrodestilace, SD – pamí destilace, H – hydrolát

**Tabulka 10** Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát fenyklu, rod *Arcobacter* 2. část, (n=4)

Průměr inhibiční zóny s uvedenou směrodatnou odchylkou [mm]		
<b><i>Arcobacter lanthieri</i> LMG 28517</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	10,8±0,50
	100×H (HD)	8,8±0,95
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	11,8±0,96
	100×H (SD)	9,0±1,15
<b><i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 6621</b>	H (HD)	6,3±0,50
	50×H (HD)	7,8±0,50
	100×H (HD)	8,5±0,58
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	10,3±1,20
	100×H (SD)	10,5±1,29
<b><i>Arcobacter thereius</i> LMG 24488</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	12,0±2,10
	100×H (HD)	9,8±0,70
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	11,3±0,50
	100×H (SD)	9,5±1,29

Poznámka: HD – hydrodestilace, SD – parní destilace, H – hydrolát

V Tabulce 9 a 10 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón fenyklového hydrolátu proti bakteriím rodu *Arcobacter*. Z tabulky vyplývá, že fenyklový hydrolát získaný hydrodestilací, který byl 50× zakoncentrován působí nejlépe na kmen *Arcobacter thereius* LMG 24488, průměrná inhibiční zóna v tomto případě vycházela 12,0±2,10 mm. Ve snaze porovnat antimikrobiální potenciál fenyklového hydrolátu testovanému proti *Arcobacter thereius* LMG 24488 s ATB dojdeme k závěru, že tato inhibiční zóna se nejvíce přiblížila účinku ampicilinu, průměrná inhibiční zóna 13,5±2,12 mm.

Fenyklový hydrolát získaný parní destilací působil nejlépe na kmen *Arcobacter butzleri* LMG 10828, průměrná inhibiční zóna činila 10,75±2,00 mm.

Pro testování antimikrobiálních účinků fenyklového hydrolátu vůči bakteriím rodu *Arcobacter* byl používán fenyklový hydrolát získaný pomocí parní destilace a hydrodestilace, který byl pro potřeby testování 50× a 100× zakoncentrován. Větších inhibičních zón prokazovaly hydroláty parní destilace. Z tabulek 9 a 10 je dále patrné, že fenyklový hydrolát

zakoncentrovaný 50× vytvořil obdobné inhibiční zóny, jako hydrolát zakoncentrovaný 100× proti všem testovaným mikroorganismům. Z čehož můžeme vyvodit závěr, že stupeň zakoncentrování zásadně neovlivňuje antimikrobiální účinky hydrolátů. Je však důležité, aby daný hydrolát zakoncentrovaný byl, neboť při testování antimikrobiálních účinků nezakoncentrovaných hydrolátů vůči bakteriálním suspenzím můžeme z tabulky 6 určit, že nejsou prokázány skoro žádné antimikrobiální účinky. Jediné změny můžeme vidět však důležité, aby daný hydrolát zakoncentrovaný byl. Jediné změny můžeme vidět u kmene *Arcobacter butzleri* UPa 2012/3 a u kmene *Arcobacter skirrowii* LMG 6621. Z tabulky 9 a 10 je patrné, že fenyklový hydrolát působil na rod *Arcobacter* antimikrobiálně méně účinně než na bakterie a kvasinku z tabulky 8.

### 3.1.3 Hydrolát bobkového listu

V Tabulce 11 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón hydrolátu bobkového listu, testovaného proti klinicky významným kmenům bakterií a kvasinky *Candida albicans*.

**Tabulka 11** Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát bobkového listu, (n=4)

Průměr inhibiční zóny s uvedenou směrodatnou odchylkou [mm]		
<b><i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4232</b>	H (HD)	7,3±0,50
	50×H (HD)	9,5±1,29
	H (SD)	7,3±0,50
	50×H (SD)	9,5±0,58
<b><i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224</b>	H (HD)	7,8±0,50
	50×H (HD)	11,0±1,83
	H (SD)	7,8±0,50
	50×H (SD)	12,3±0,50
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	10,3±1,71
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	11,5±2,89
<b><i>Escherichia coli</i> CCM 3954</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	10,3±1,71
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	10,5±2,89
<b><i>Candida albicans</i> CCM 8186</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	9,8±3,86
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	13,3±0,96

Poznámka: HD – hydrodestilace, SD – parní destilace, H – hydrolát

Z tabulky je patrné, že hydrolát bobkového listu získaný parní destilací, působil nejlépe na kvasinku *Candida albicans* CCM 8186, průměrná inhibiční zóna činila 13,3±0,96 mm. Hydrolát bobkového listu získaný též parní destilací působil nejlépe na bakteriální kmen *Enterococcus faecalis* CCM 4224, průměrná inhibiční zóna činila 12,3 mm±0,50. Ve snaze porovnat antimikrobiální potenciál hydrolátu bobkového listu proti *Enterococcus faecalis* CCM 4224 s inhibičními zónami ATB dojdeme k závěru, že nejvíce se těmto výsledkům přiblížil ampicilin s inhibiční zónou 13,0±0,00 mm. Z tohoto závěru můžeme usoudit,

že hydrolát bobkového listu prokazoval velmi podobné antimikrobiální účinky jako ampicilin působící na *Enterococcus faecalis* CCM 4224.

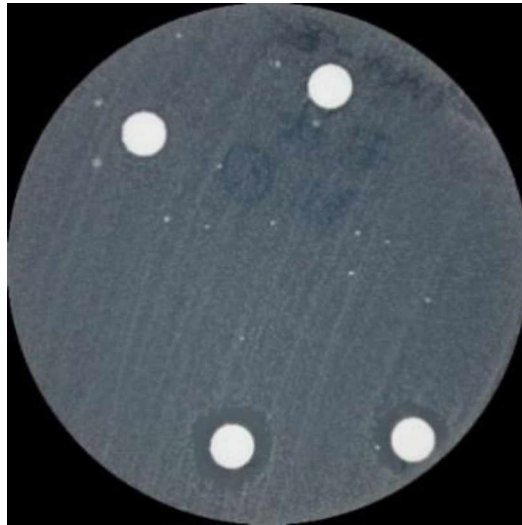
Výsledky testování z roku 2011 jasně ukázaly to, že testovaný bobkový list dosahuje významné antimykotické aktivity. Inhibiční zóna pro kandidu, která byla testována vůči účinkům hydrolátu vavřínu se ve studii pohybovala v rozmezí 8-25 mm (Sahan, 2011).

Hydrolát bobkového listu působil účinněji na grampozitivní bakterie. Ve studii z roku 2016 došlo k potvrzení tohoto závěru, neboť použití extraktů bobkového listu prokazuje větší antimikrobiální účinnost vůči grampozitivním bakteriím (Vijayakumar a kol. 2016). V roce 2009 bylo prokázáno, že účinnost získaných hydrolátů bobkového listu se liší dle jednotlivých bylin, které byly získávány různě v odlišných zeměpisných lokalitách (Lira a kol., 2009).

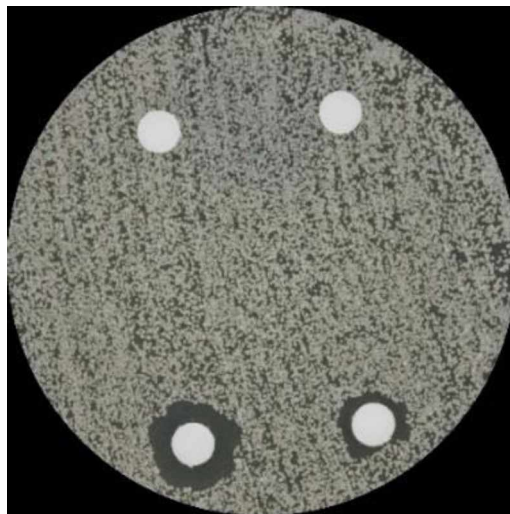
Pro testování antimikrobiálních účinků bobkového byl používán hydrolát získaný parní destilací a hydrodestilací. Tyto hydroláty byly pro potřeby testování zakoncentrovány už jenom 50×. Neboť při testování antimikrobiálních účinků levandule a fenyklu bylo zjištěno, že stupeň zakoncentrování zásadně neovlivnil antimikrobiální účinky hydrolátů. Je však důležité, aby daný hydrolát zakoncentrováný byl, neboť při testování antimikrobiálních účinků nezakoncentrovaných hydrolátů vůči bakteriálním suspenzím, můžeme z tabulky 11 určit, že nejsou prokázány takřka žádné antimikrobiální účinky. Hydrolát bobkového listu působil v tomto případě pouze na kmeny *Staphylococcus aureus* CCM 4232 a *Enterococcus faecalis* CCM 4224.

Obrázky 13 a 14, které jsou umístěny níže, znázorňují antimikrobiální účinky hydrolátu bobkového listu u vybraných bakterií.





**Obrázek 13** Inhibiční zóny hydrolátu bobkového listu  
*Enterococcus faecalis* CCM 4224 (foto autor)



**Obrázek 14** Inhibiční zóny hydrolátu bobkového listu  
*Candida albicans* CCM 8186 (foto autor)

**Tabulka 12** Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát bobkového listu, rod *Arcobacter*, (n=4)

Průměr inhibiční zóny s uvedenou směrodatnou odchylkou [mm]		
<b><i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	8,0±1,15
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	10,5±1,29
<b><i>Arcobacter butzleri</i> CCUG 30484</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	9,0±1,83
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	9,5±0,58
<b><i>Arcobacter butzleri</i> UPa 2012/3</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	9,0±0,00
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	14,0±0,82
<b><i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	9,5±1,29
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	10,3±0,96
<b><i>Arcobacter cryaerophilus</i> UPa 2013/13</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	9,5±1,29
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	10,0±1,15
<b><i>Arcobacter lantieri</i> LMG 28517</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	11,3±0,96
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	10,5±0,58
<b><i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 6621</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	9,0±1,15
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	12,5±1,73
<b><i>Arcobacter thereius</i> LMG 24488</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	10,8±0,96
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	13,3±2,63

Poznámka: HD – hydrodestilace, SD – parní destilace, H – hydrolát

V Tabulce 12 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón hydrolátu bobkového listu proti bakteriím rodu *Arcobacter*. Z tabulky je patrné, že hydrolát bobkového listu získaný parní destilací působí nejlépe na kmen *Arcobacter butzleri* UPa 2012/3, průměrná inhibiční zóna v tomto případě vycházela  $14,0 \pm 0,82$  mm. Ve snaze porovnat antimikrobiální účinky bobkového listu testovanému proti *Arcobacter butzleri* UPa 2012/3 s ATB nejsme schopni přirovnat daný antimikrobiální účinek k žádnému z testovaných antibiotik, neboť výsledky inhibičních zón vycházely mnohonásobně větší nebo se jednalo o rezistenci. Hydrolát bobkového listu získaný hydrodestilací působí nejlépe na kmen *Arcobacter lanthieri* LMG 28517, průměrná inhibiční zóna činila  $11,3 \pm 0,96$  mm.

Pro testování antimikrobiálních účinků hydrolátu bobkového listu vůči rodu *Arcobacter* byl používán hydrolát bobkového listu, který byl získán parní destilací a hydrodestilací. Tyto hydroláty byly pro potřeby testování zakoncentrovány už jenom 50×. Neboť při testování antimikrobiálních účinků daných mikroorganismů vůči hydrolátům levandule a fenyklu bylo zjištěno, že stupeň zakoncentrování zásadně neovlivnil antimikrobiální účinky hydrolátů. Je však důležité, aby daný hydrolát zakoncentrovaný byl, neboť při testování antimikrobiálních účinků nezakoncentrovaných hydrolátů vůči bakteriálním suspenzím můžeme z tabulky 12 určit, že nejsou prokázány vůbec žádné antimikrobiální účinky. Komplexně můžeme říci, že při porovnání tabulek 11 a 12 hydrolát bobkového listu vykazoval obdobné antimikrobiální účinky u všech testovaných kmenů.

### 3.1.4 Hřebíčkový hydrolát

V Tabulce 13 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón hřebíčkového hydrolátu, testovaného proti klinicky významným kmenům bakterií a kvasinky *Candida albicans*.

**Tabulka 13** Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát hřebíčku, (n=4)

Průměr inhibiční zóny s uvedenou směrodatnou odchylkou [mm]		
<b><i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4232</b>	H (HD)	7,8±0,50
	50×H (HD)	15,8±1,70
	H (SD)	8,3±0,96
	50×H (SD)	15,5±1,00
<b><i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224</b>	H (HD)	7,5±1,73
	50×H (HD)	15,3±1,26
	H (SD)	7,5±0,58
	50×H (SD)	18,8±0,96
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955</b>	H (HD)	7,3±0,50
	50×H (HD)	11,3±2,07
	H (SD)	7,0±0,00
	50×H (SD)	12,8±1,70
<b><i>Escherichia coli</i> CCM 3954</b>	H (HD)	7,3±0,50
	50×H (HD)	13,5±1,00
	H (SD)	7,0±0,00
	50×H (SD)	14,0±0,82
<b><i>Candida albicans</i> CCM 8186</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	14,8±8,42
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	23,5±3,70

Poznámka: HD – hydrodestilace, SD – parní destilace, H – hydrolát

Z tabulky je patrné, že hřebíčkový hydrolát získaný parní destilací působil nejlépe na kvasinku *Candida albicans* CCM 8186, průměrná inhibiční zóna činila 23,5±3,7 mm. Toto potvrzuje i studie z roku 2018, ve které byl hřebíček testován a bylo jasně prokázáno, že se jedná o silný antioxidant, způsobující anti-agregaci krevních destiček s výraznými antifungálními účinky, které jsou velkým potenciálem pro farmaceutický a potravinářský průmysl (Ferreira a kol., 2018). Ve snaze porovnat antimikrobiální potenciál hřebíčkového

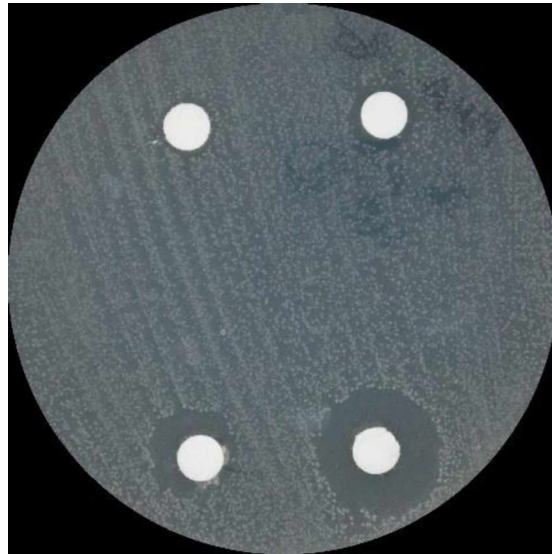
hydrolátu testovaného vůči kvasince *Candida albicans* CCM 8186 s jediným testovaným antimykotikem flukonazolem dosáhneme větších inhibičních průměrů než při testování antimykotika. Z tohoto nám vyplývá, že hřebíčkový hydrolát má na kvasinku větší antimikrobiální účinky než flukonazol.

Hřebíčkový hydrolát působil účinněji na grampozitivní bakterie, tyto výsledky ale nejsou nijak zásadně větší než účinek proti gramnegativním bakteriím. Hydrolát hřebíčku získaný parní destilací působil nejlépe na kmen *Enterococcus faecalis* CCM 4224, průměrná inhibiční zóna činila  $18,8 \pm 0,96$  mm.

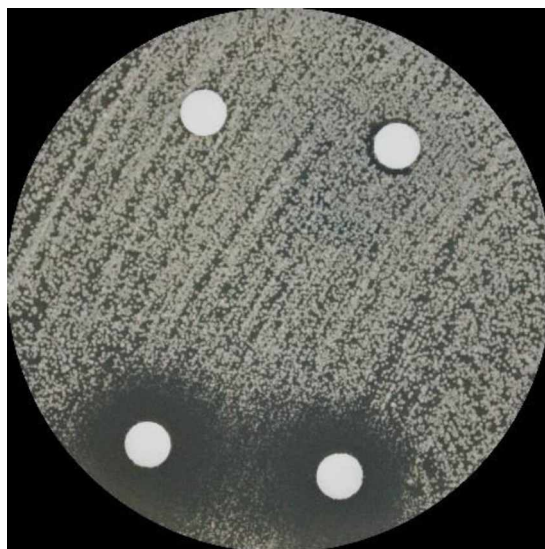
Dle výsledků měření je patrné, že hřebíčkový hydrolát má z testovaných hydrolátů největší antimikrobiální účinky. Fakt, že má hřebíček velký potenciál pro budoucí použití v alternativní medicíně, poukazuje i studie z roku 2006, ve které byly testovány bakterie *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*. Výsledky ukázaly, že hřebíčkový esenciální olej vykazuje antibakteriální aktivitu v širokém rozmezí. Jako pozitivní výsledek byla použita inhibiční zóna nad průměrem 7,0 mm. Hřebíčkový olej vykazoval významný inhibiční účinek proti *P. aeruginosa* (17,4 mm), *B. subtilis* (14,5 mm), *P. vulgaris* (20,1 mm), *K. pneumoniae* (16,2 mm), *S. aureus* (16,3 mm) a *E. coli* (17,4 mm) (Prabuseenivasan a kol., 2006). Při srovnání výsledků této studie s výsledky testování v diplomové práci, vidíme fakt, že inhibiční zóny hydrolátů vycházejí nižší. Tato skutečnost může být způsobena tím, že větší antimikrobiální potenciál mívají esenciální oleje, což bývá způsobeno vyšší koncentrací hlavních esenciálních složek v olejích než v hydrolátech.

Pro testování antimikrobiálních účinků hřebíčkového hydrolátu proti klinicky významným druhům bakterií a kvasinky byl používán hřebíčkový hydrolát, který byl získán parní destilací a hydrodestilací. Tyto hydroláty byly pro potřeby testování zakoncentrovány už jenom 50×. Neboť při testování antimikrobiálních účinků hydrolátů levandule a fenyklu bylo zjištěno, že stupeň zakoncentrování zásadně neovlivnil antimikrobiální účinky hydrolátů. Je však důležité, aby daný hydrolát zakoncentrovaný byl, neboť při testování antimikrobiálních účinků nezakoncentrovaných hydrolátů vůči bakteriálním suspenzím můžeme z tabulky 13 vyčíst, že antimikrobiální účinky nezakoncentrovaných hydrolátů jsou mnohonásobně menší než v případě hydrolátů zakoncentrovaných. Kvasinka *Candida albicans* CCM 8186 je jediná rezistentní vůči nezakoncentrovanému hydrolátu hřebíčku ze všech testovaných mikroorganismů.

Obrázky 15 a 16, které jsou umístěny níže, znázorňují antimikrobiální účinky hřebíčkového hydrolátu u vybraných bakterií.



**Obrázek 15** Inhibiční zóny hydrolátu hřebíčku  
*Enterococcus faecalis* CCM 4224 (foto autor)



**Obrázek 16** Inhibiční zóny hydrolátu hřebíčku  
*Candida albicans* CCM 8186 (foto autor)

**Tabulka 14** Průměr inhibičních zón s uvedenými směrodatnými odchylkami - hydrolát hřebíčku, rod *Arcobacter*, (n=4)

Průměr inhibiční zóny s uvedenou směrodatnou odchylkou [mm]		
<b><i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	10,5±1,29
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	12,5±1,73
<b><i>Arcobacter butzleri</i> CCG 30484</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	12,0±2,94
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	13,5±2,38
<b><i>Arcobacter butzleri</i> UPa 2012/3</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	13,0±1,63
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	14,5±1,00
<b><i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	10,5±1,29
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	12,5±1,26
<b><i>Arcobacter cryaerophilus</i> UPa 2013/13</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	14,3±0,50
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	16,5±1,29
<b><i>Arcobacter lanthieri</i> LMG 28517</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	12,0±0,58
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	12,8±1,71
<b><i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 6621</b>	H (HD)	6,0±0,00
	50×H (HD)	12,0±2,94
	H (SD)	6,0±0,00
	50×H (SD)	11,0±1,15
<b><i>Arcobacter thereius</i> LMG 24488</b>	H (HD)	6,5±0,58
	50×H (HD)	14,8±1,50
	H (SD)	6,8±0,50
	50×H (SD)	15,5±1,73

Poznámka: HD – hydrodestilace, SD – parní destilace, H – hydrolát

V Tabulce 14 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón hřebíčkového hydrolátu proti bakteriím rodu *Arcobacter*. Z tabulky je patrné, že hřebíčkový hydrolát získaný parní destilací působí nejlépe na kmen *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13, průměrná inhibiční zóna v tomto případě vycházela  $16,5 \pm 1,29$  mm. Ve snaze porovnat antimikrobiální potenciál hřebíčkového hydrolátu vůči *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13 s ATB dosáhneme podobného výsledku jako u ampicilinu, průměrná inhibiční zóna v tomto případě vycházela  $18,5 \pm 2,12$  mm.

Hřebíčkový hydrolát získaný hydrodestilací působil nejlépe na kmen *Arcobacter thereius* LMG 24488, průměrná inhibiční zóna činila  $14,8 \pm 1,50$  mm.

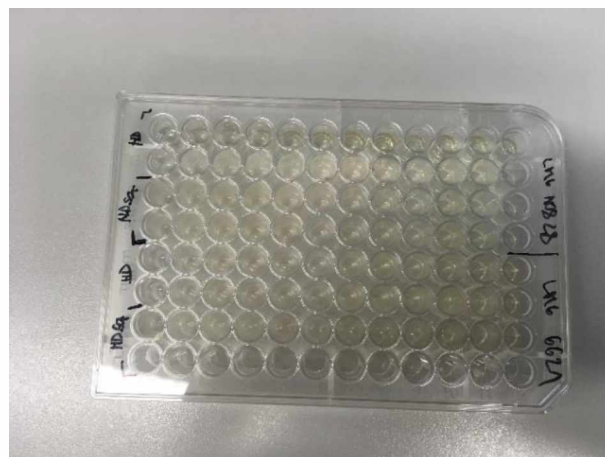
Pro testování antimikrobiálních účinků hřebíčkového hydrolátu vůči rodu *Arcobacter* byl používán hřebíčkový hydrolát, který byl získán parní destilací a hydrodestilací. Tyto hydroláty byly pro potřeby testování zakoncentrovány už jenom 50×. Neboť při testování antimikrobiálních účinků hydrolátů levandule a fenyklu bylo zjištěno, že stupeň zakoncentrování zásadně neovlivnil jejich antimikrobiální účinky. Je však důležité, aby daný hydrolát zakoncentrováný byl, neboť při testování antimikrobiálních účinků nezakoncentrovaných hydrolátů vůči bakteriálním suspenzím z tabulky 14 můžeme určit, že jedinou změnu průměrných inhibičních zón můžeme vidět u *Arcobacter thereius* LMG 24488, avšak tento výsledek je takřka nulový. Komplexně můžeme říci, že při porovnání tabulek 13 a 14 hydrolát hřebíčku vykazoval obdobné antimikrobiální účinky u všech testovaných mikroorganismů.



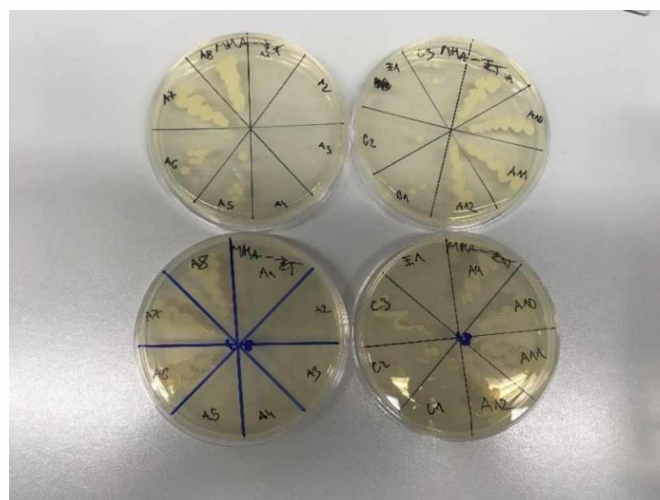
### 3.2 Stanovení minimálních inhibičních koncentrací studovaných hydrolátů

Testování, které je blíže popsáno v podkapitole 2.2.3., probíhalo ve 2 opakováních v rámci každého ze dvou nezávislých experimentů. Z experimentálně naměřených dat byl vypočten průměr a směrodatná odchylka (Tabulky 15-18). Jako minimální inhibiční koncentrace byla určena nejnižší koncentrace, která je již schopná inhibice daného mikrobiálního kmene.

Výsledky testování kmenů *Staphylococcus aureus* CCM 4223, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Candida albicans* CCM 8186 byly odečítány pouze okometricky. Výsledky minimálních inhibičních koncentrací u rodu *Arcobacter* byly prokázány po vyočkování na misky s TSA agarem.



**Obrázek 17** Mikrotitrační destička s testovanými hydroláty (foto autor)



**Obrázek 18** Odečty MIC testovaných mikroorganismů (foto autor)

### 3.2.1 Levandulový hydrolát

V Tabulce 15 jsou zaznamenány průměrné hodnoty minimálních inhibičních koncentrací týkající se testování levandulového hydrolátu.

Tabulka 15 Průměr minimálních inhibičních koncentrací - hydrolát levandule, (n=4)

Průměr minimálních inhibičních koncentrací s uvedenou směrodatnou odchylkou [%]				
	H (SD)	50×H (SD)	H (HD)	50×H (HD)
<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828	1,6±0,00	0,8±0,00	0,8±0,00	0,4±0,00
<i>Arcobacter butzleri</i> CCUG 30484	6,3±0,00	0,8±0,00	1,6±0,00	0,8±0,00
<i>Arcobacter butzleri</i> UPa 2012/3	6,3±0,00	1,6±0,00	3,1±0,00	1,6±0,00
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050	3,1±0,00	0,8±0,00	1,6±0,00	0,8±0,00
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> UPa 2013/13	3,1±0,00	0,8±0,00	0,8±0,00	0,4±0,00
<i>Arcobacter lantieri</i> LMG 28517	1,6±0,00	0,8±0,00	0,8±0,00	0,8±0,00
<i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 6621	0,8±0,00	0,4±0,00	0,8±0,00	0,4±0,00
<i>Arcobacter thereius</i> LMG 24488	3,1±0,00	1,6±0,00	1,6±0,00	0,8±0,00
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4232	12,5±0,00	3,1±0,00	6,3±0,00	3,1±0,00
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	25,0±0,00	3,1±0,00	12,5±0,00	3,1±0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	6,3±0,00	3,1±0,00	3,1±0,00	1,6±0,00
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	12,5±0,00	3,1±0,00	6,3±0,00	3,1±0,00
<i>Candida albicans</i> CCM 8186	3,1±0,00	1,6±0,00	0,8±0,00	0,8±0,00

Poznámka: HD – hydrodestilace, SD – parní destilace, H – hydrolát

Tyto výsledky dokumentují, že levandulový hydrolát nejlépe inhiboval růst bakterií rodu *Arcobacter*. Nejlepších hodnot MIC bylo dosaženo při koncentraci 0,4 %. Nejnižší potřebné množství hydrolátu levandule, získaného parní destilací, jsme potřebovali k inhibici růstu kmene *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13 a kmene *Arcobacter skirrowii* LMG 6621.

Nejlepších hodnot minimálních inhibičních koncentrací hydrolátu levandule, který byl získán parní destilací, bylo zjištěno u kmene *Arcobacter skirrowii* LMG 6621.

Levandulový esenciální olej - nikoliv však hydrolát, je v posledních letech velmi využívanou alternativou v přírodním léčitelství. Vypovídá o tom také studie z roku 2006, ve které se snaží najít alternativu k syntetickým fungicidům, za pomoci antimykotických účinků levandule. Esenciální olej levandule zde vykazoval nízké hodnoty minimálních inhibičních koncentrací (Soyulu a kol., 2006). V tomto můžeme vidět jistou podobnost s výsledky diplomové práce, neboť levandulový hydrolát inhiboval kvasinku *Candida albicans* CCM 8186 v nízkých koncentracích. V mírném rozporu s těmito výsledky stojí další studie, která se zabývá antimikrobiální aktivitou vzorků esenciálního oleje levandule, kdy Hanamantagouda a její tým testovali klinicky významné bakterie: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus* a 3 houby *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* a *Candida albicans*. Esenciální olej byl pro jejich testování dvojitě sériově zředěn DMSO obsahujícím 0,125–8 µg/µl oleje. Výsledné minimální inhibiční koncentrace silice se pohybovaly od 0,5 do 2,0 µg/µl a 2 až 4 µg/µl. Obecně zde esenciální olej vykazoval lepší antibakteriální aktivitu než antifungální účinnost. Bylo prokázáno, že grampozitivní bakterie jsou náchylnější k antimikrobiálním vlastnostem esenciálních olejů, což může být způsobeno jejich vnější membránou (Hanamantagouda a kol., 2010). Tento malý rozpor s výsledky experimentů diplomové práce nesmí být chápán jako potenciální problém při testování. Za prvé, studie se jen z části shoduje s druhy testovaných bakterií a patogenní kvasinky a za druhé bylo již několikrát zmíněno, že esenciální oleje se nechovají totožně jako hydroláty využívané pro potřeby diplomové práce.

Pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací levandulového hydrolátu proti klinicky významným druhům bakterií a kvasinky byl používán hydrolát, který byl získáván parní destilací a hydrodestilací. Tyto hydroláty byly pro potřeby testování dále 50× zakoncentrované. Z tabulky 15 je vidět, že vyšší antimikrobiální účinnost prokazují hydroláty zakoncentrované než hydroláty, které zakoncentrovány nebyly.

### 3.2.2 Fenyklový hydrolát

V Tabulce 16 jsou zaznamenány průměrné hodnoty minimálních inhibičních koncentrací týkající se testování fenyklového hydrolátu.

**Tabulka 16** Průměr minimálních inhibičních koncentrací - hydrolát fenyklu, (n=4)

Průměr minimálních inhibičních koncentrací s uvedenou směrodatnou odchylkou [%]				
	H (SD)	50×H (SD)	H (HD)	50×H (HD)
<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828	3,1±0,00	1,6±0,00	1,6±0,00	1,6±0,00
<i>Arcobacter butzleri</i> CCUG 30484	3,1±0,00	3,1±0,00	6,3±0,00	3,1±0,00
<i>Arcobacter butzleri</i> UPa 2012/3	6,3±0,00	3,1±0,00	3,1±0,00	1,6±0,00
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050	3,1±0,00	0,8±0,00	3,1±0,00	0,8±0,00
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> UPa 2013/13	6,3±0,00	1,6±0,00	3,1±0,00	0,8±0,00
<i>Arcobacter lanthieri</i> LMG 28517	3,1±0,00	1,6±0,00	1,6±0,00	1,6±0,00
<i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 6621	3,1±0,00	0,8±0,00	0,4±0,00	0,4±0,00
<i>Arcobacter thereius</i> LMG 24488	3,1±0,00	1,6±0,00	1,6±0,00	0,8±0,00
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4232	6,3±0,00	6,3±0,00	12,5±0,00	6,3±0,00
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	25,0±0,00	12,5±0,00	25,0±0,00	12,5±0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	6,3±0,00	3,1±0,00	6,3±0,00	3,1±0,00
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	6,3±0,00	3,1±0,00	6,3±0,00	3,1±0,00
<i>Candida albicans</i> CCM 8186	6,3±0,00	3,1±0,00	3,1±0,00	3,1±0,00

Poznámka: HD – hydrodestilace, SD – pamí destilace, H – hydrolát

Tyto výsledky dokumentují, že fenyklový hydrolát opět nejlépe inhiboval růst bakterií rodu *Arcobacter*. Při srovnání hodnot MIC u levandulového hydrolátu zde nejsou ve výsledcích vidět takové rozdíly, jako právě v tabulce 15.

Nejlepších hodnot MIC bylo dosaženo při koncentraci 0,8 %. Fenyklový hydrolát získaný hydrodestilací působil nejlépe na kmeny *Arcobacter thereius* LMG 2488 a *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13. Nejlepších hodnot minimálních inhibičních koncentrací hydrolátu fenyklu, který byl získán parní destilací byl kmen *Arcobacter skirrowii* LMG 6621. Jednoznačně nelépe působil fenyklový hydrolát (shodně parní destilace a hydrodestilace) na kmen *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050.

Pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací fenyklového hydrolátu proti klinicky významným druhům bakterií a kvasinky byl používán hydrolát, který byl získáván parní destilací a hydrodestilací. Tyto hydroláty byly pro potřeby testování dále 50× zakoncentrovány. Z tabulky 16 je vidět, že vyšší antimikrobiální účinnost prokazují hydroláty zakoncentrované než hydroláty, které zakoncentrovány nebyly.

V tabulce 16 můžeme pozorovat to, že hodnoty MIC u hydrolátu fenyklu vychází s drobnými odchylkami podobně pro všechny testované kmeny. (Výjimku tvoří pouze MIC kmene *Enterococcus faecalis* CCM 4224). Toto tvrzení potvrzuje studie z roku 2014, kde autoři testovali účinky fenyklového hydrolátu. Jejich následné měření MIC prokázalo, že hydrolát fenyklu měl silné a konzistentní inhibiční účinky na všechny testované patogeny, které byly testovány v potravinách, včetně grampozitivních a gramnegativních bakterií (Diao a kol., 2014).

V roce 2012 byla testována antimikrobiální aktivita fenyklového oleje proti bakterii kmene *Staphylococcus aureus* za pomoci stanovení minimálních inhibičních koncentrací. Ředění fenyklového oleje bylo připraveno na 96 jamkové destičce v rozmezí 8–1024 µg/ml. Výsledky studie jsou takové, že fenyklový olej byl účinný proti *S. aureus*, s MIC v rozmezí od 64 do 256 µg/ml. Díky těmto pozitivním výsledkům bylo ve studii konstatováno to, že v dnešní době vyvíjí *S. aureus* velmi rychle rezistenci vůči novým antibiotikům, a mohlo by být pravděpodobné zapojení fenyklového oleje do vývoje alternativních terapeutických strategií ve farmaceutickém průmyslu (Qiu a kol., 2012). Při snaze porovnat tento výsledek s tabulkou 16 dojdeme k opačnému závěru, avšak rozdíl v těchto 2 výsledcích testování mohl být ovlivněn odlišným původem zvoleného mikroorganismu.

### 3.2.3 Hydrolát bobkového listu

V Tabulce 17 jsou zaznamenány průměrné hodnoty minimálních inhibičních koncentrací týkající se testování hydrolátu bobkového listu.

**Tabulka 17** Průměr minimálních inhibičních koncentrací - hydrolát bobkového listu, (n=4)

Průměr minimálních inhibičních koncentrací s uvedenou směrodatnou odchylkou [%]				
	H (SD)	50×H (SD)	H (HD)	50×H (HD)
<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828	3,1±0,00	1,6±0,00	3,1±0,00	1,6±0,00
<i>Arcobacter butzleri</i> CCUG 30484	3,1±0,00	1,6±0,00	6,3±0,00	1,6±0,00
<i>Arcobacter butzleri</i> UPa 2012/3	3,1±0,00	3,1±0,00	3,1±0,00	1,6±0,00
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050	3,1±0,00	1,6±0,00	6,3±0,00	6,3±0,00
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> UPa 2013/13	6,3±0,00	1,6±0,00	3,1±0,00	1,6±0,00
<i>Arcobacter lanthieri</i> LMG 28517	6,3±0,00	3,1±0,00	6,3±0,00	3,1±0,00
<i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 6621	12,5±0,00	6,3±0,00	3,1±0,00	1,6±0,00
<i>Arcobacter thereius</i> LMG 24488	1,6±0,00	0,8±0,00	3,1±0,00	1,6±0,00
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4232	6,3±0,00	1,6±0,00	6,3±0,00	1,6±0,00
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	25,0±0,00	12,5±0,00	25,0±0,00	6,3±0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	6,3±0,00	3,1±0,00	3,1±0,00	1,6±0,00
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	25,0±0,00	6,3±0,00	12,5±0,00	3,1±0,00
<i>Candida albicans</i> CCM 8186	3,1±0,00	0,8±0,00	12,5±0,00	3,1±0,00

Poznámka: HD – hydrodestilace, SD – parní destilace, H – hydrolát

Hydrolát bobkového listu, získaný parní destilací nejlépe inhiboval kmen *Arcobacter thereius* LMG 24488, při koncentraci 0,8. Stejně MIC dosáhla také kvasinka *Candida albicans* CCM 8186.

Pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací hydrolátu bobkového listu proti klinicky významným druhům bakterií a kvasinky byl používán hydrolát, který byl získáván parní destilací a hydrodestilací. Tyto hydroláty byly pro potřeby testování dále 50× zakoncentrované. Z tabulky 17 je vidět, že vyšší antimikrobiální účinnost prokazují hydroláty zakoncentrované než hydroláty, které zakoncentrovány nebyly.

Bobkový list se neřadí mezi nejvyhledávanější rostliny, u kterého jsou extrakty využity jako potenciální předmět pro testování antimikrobiální aktivity. Avšak ve studii z roku 2014 došli k závěru, že extrakty vavřínu hrají důležitou roli proti hlavním včelím škůdcům. V dané problematice stanovovali MIC a prokázali, že téměř všechny mikroorganismy jsou schopné inhibovat v relativně stejné rovině (Damiani a kol., 2014). Tuto studii potvrzuje i tabulka 17, která poukazuje na to, že nemůžeme zcela jasně určit, kdy hydrolát bobkového listu působil nejlépe.

Nejvyšší potřebné množství hydrolátu bobkového listu jsme potřebovali k inhibici růstu kmene *Escherichia coli* CCM 3954 a kmene *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Podobného závěru došli také ve studii z roku 2008, kdy na bakteriích (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis* a *Listeria monocytogenes*) zkoumaly antimikrobiální aktivitu esenciálního oleje vavřínu v koncentracích od 0,02% do 2,5% (obj./obj.). Vavřín byl při testování proti *E. coli* a *S. typhimurium* neúčinný (Erkmen a Özcan, 2008).

### 3.2.4 Hřebíčkový hydrolát

V Tabulce 18 jsou zaznamenány průměrné hodnoty minimálních inhibičních koncentrací týkající se testování hřebíčkového hydrolátu.

Tabulka 18 Průměr minimálních inhibičních koncentrací - hydrolát hřebíčku, (n=4)

Průměr minimálních inhibičních koncentrací s uvedenou směrodatnou odchylkou [%]				
	H (SD)	50×H (SD)	H (HD)	50×H (HD)
<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828	0,4±0,00	0,1±0,00	0,4±0,00	0,1±0,00
<i>Arcobacter butzleri</i> CCUG 30484	0,8±0,00	0,2±0,00	0,4±0,00	0,1±0,00
<i>Arcobacter butzleri</i> UPa 2012/3	1,6±0,00	0,8±0,00	6,3±0,00	0,8±0,00
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050	1,6±0,00	0,2±0,00	1,6±0,00	0,1±0,00
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> UPa 2013/13	3,1±0,00	0,4±0,00	0,4±0,00	0,1±0,00
<i>Arcobacter lanthieri</i> LMG 28517	0,8±0,00	0,4±0,00	0,8±0,00	0,4±0,00
<i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 6621	0,8±0,00	0,2±0,00	0,2±0,00	0,1±0,00
<i>Arcobacter thereius</i> LMG 24488	1,6±0,00	0,4±0,00	0,8±0,00	0,4±0,00
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4232	12,5±0,00	0,4±0,00	12,5±0,00	0,8±0,00
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	6,3±0,00	0,8±0,00	6,3±0,00	0,8±0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	6,3±0,00	0,8±0,00	3,1±0,00	1,6±0,00
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	12,5±0,00	6,3±0,00	3,1±0,00	0,8±0,00
<i>Candida albicans</i> CCM 8186	6,3±0,00	3,1±0,00	12,5±0,00	1,6±0,00

Poznámka: HD – hydrodestilace, SD – pamí destilace, H – hydrolát

Výsledky z tabulky 18 dokumentují, že hřebíčkový hydrolát nejlépe inhiboval růst bakterií rodu *Arcobacter*. Nejlepších hodnot MIC bylo dosaženo při koncentraci 0,1 %. Hřebíčkový hydrolát získaný hydrodestilací nejlépe působil na zástupce kmene *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13, kmene *Arcobacter butzleri* CCUG 30484, kmene *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050, kmene *Arcobacter butzleri* LMG 10828 a kmen *Arcobacter skirrowii* LMG 6621.



Hřebíčkový hydrolát získaný parní destilací působil nejlépe na kmen *Arcobacter butzleri* LMG 10828. Díky údajům z tabulky 18 je dobře viditelné, že jednoznačně nejlépe vyšel z testování kmen *Arcobacter butzleri* LMG 10828.

Pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací hřebíčkového hydrolátu proti klinicky významným druhům bakterií a kvasinky byl používán hydrolát, který byl získáván parní destilací a hydrodestilací. Tyto hydroláty byly pro potřeby testování dále 50× zakoncentrované. Z tabulky 18 je vidět, že vyšší antimikrobiální účinnost prokazují hydroláty zakoncentrované než hydroláty, které zakoncentrovány nebyly. V porovnání se všemi hydroláty můžeme říci, že právě hřebíčkový hydrolát vykazoval nejlepší výsledky minimálních inhibičních koncentrací. Tento fakt byl ale velmi očekávaný, neboť hřebíček je v alternativní medicíně již několik století považován za významné přírodní léčivo se značnými antimikrobiálními účinky. Toto tvrzení potvrzuje studie, ve které byly testovány hydroláty běžně používaných bylin. Hodnoty MIC hřebíčkového hydrolátu byly ze všech nejlepší (0,25 ml/100 ml hydrolátu) (Moreira a kol., 2005). Tyto fakta také potvrzuje studie z roku 2006, kdy Prabuseenivasan a jeho tým testovali mnoho druhů esenciálních olejů včetně hřebíčkového oleje. Tento olej byl podroben screeningu proti čtyřem gramnegativním bakteriím (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*) a dvěma grampozitivním bakteriím (*Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*). Řada dvojnásobného ředění oleje byla testována v rozmezí od 0,2 do 25,6 mg/ml. Výsledná minimální koncentrace pro hřebíčkový olej vycházela následovně: *S. aureus* > 6,4 mg/ml, *B. subtilis* > 3,2 mg/ml, *K. pneumoniae* > 6,4 mg/ml, *P. vulgaris* > 3,2 mg/ml, *P. aeruginosa* > 1,6 mg/ml, *E. coli* > 1,6 mg/ml. Výsledky ukazují fakt, že MIC vychází pro hřebíčkový olej ve všech případech velmi dobře bez ohledu na jakoukoliv testovanou bakterii (Prabuseenivasan a kol., 2006).

V současné době se intenzivně diskutuje o bezpečnostních aspektech chemických konzervačních látek, neboť jsou často považovány za karcinogenní. Z těchto důvodů mají spotřebitelé tendenci být podezřívaví vůči chemickým přísadám. Pro tyto aspekty se v dnešní době zintenzivnila poptávka po přírodních léčivech (Moreira a kol., 2005). Toto vše je také jeden z důvodů, proč se tato diplomová práce zabývá stanovováním antimikrobiální aktivity hydrolátů.

V této práci bylo pro testování antimikrobiální (antimykotické) aktivity hydrolátů levandule, fenyklu, bobkového listu a hřebíčku využito 13 mikrobiálních kmenů. Jednalo se o směs gramnegativních a grampozitivních bakterií a také jedné patogenní kvasinky.

Při testování klinicky významných druhů bakterií (*Staphylococcus aureus* CCM 4232, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 a *Escherichia coli*) můžeme konstatovat fakt, že největších antimikrobiálních účinků proti těmto bakteriím dosáhl hřebíčkový hydrolát, dále následoval fenyklový hydrolát a nejhořší antimikrobiální účinky vyšly u levandulového hydrolátu. *Candida albicans* CCM 8186 byla jediná rezistentní vůči levandulovému hydrolátu ze všech kmenů zahrnutých do této studie, avšak hřebíčkový hydrolát působil nejlépe na tuto kvasinku. Hřebíčkový hydrolát také nejlépe působil na všechny akrobaktery. Druhým v pořadí byl též fenyklový hydrolát, zde však najdeme jednu výjimku a to, že u kmene *Arcobacter skirrowii* LMG 6621 působil lépe hydrolát bobkového listu. Při celkovém hodnocení rodu *Arcobacter* vyšla najevo skutečnost, že levandulový, fenyklový a hřebíčkový hydrolát působí nejlépe na kmen *Arcobacter therius* LMG 24488. Nejlepšího výsledku antimikrobiálních účinků u hydrolátu bobkového listu vykazoval *Arcobacter butzleri* UPa 2012/3.

Při porovnání jednotlivých antimikrobiálních účinků testovaných hydrolátů docházíme k závěru, že hřebíčkový hydrolát má největší potenciál pro budoucí testování, a bylo by vhodné tento hydrolát rozšířit do klinické praxe. Druhým nejlepším výsledkem týkající se antimikrobiální aktivity disponuje hydrolát fenyklu, poté následuje hydrolát bobkového listu a nejhůře dopadnul levandulový hydrolát. Velmi obdobných výsledků jsme dosáhli také při stanovování minimálních inhibičních koncentrací, kde jsme z výsledků určili, že nejnížší množství k inhibici růstů testovaných kmenů jsme zjistili u zakoncetrovaného hydrolátu hřebíčku. Jediná odlišnost nastala v případě hydrolátu bobkového listu, kdy nejnížší potřebné množství k inhibici mikroorganismu jsme dosáhli u kvasinky *Candida albicans* CCM 8186.

Z výše uvedených výsledků není patrné, zda hydroláty působí lépe na grampozitivní nebo gramnegativní bakterie. Při testování antimikrobiálních vlastností hydrolátů proti klinicky významným druhům bakterií a kvasince *Candida albicans* vycházely průměrné inhibiční zóny lépe u grampozitivních bakterií. Avšak při testování arko-bakterů docházelo k obdobným výsledkům jako u grampozitivních bakterií. Proto nelze jednoznačně říci, kdy hydroláty působily nejlépe a musíme si vystačit s faktem, že hydroláty prokazovaly antimikrobiální účinky více či méně u všech kmenů.

Výsledky minimálních inhibičních koncentrací byly také experimentálně ověřovány za pomoci přístroje Tecan Infinite® 200 PRO, měřícího hodnoty absorbance. Výsledky těchto experimentů však nebyly adekvátní vůči výsledkům mikrodiluční metody, proto nebyly dále zařazovány do výsledků této diplomové práce. Neshody ve výsledcích souvisí pravděpodobně s volbou vlnových délek. Vlnové délky pro tyto experimenty nejsou jasně definovány v žádné odborné literatuře, proto byla navolena standartně používaná vlnová délka 450 nm, přičemž se zjistilo, že výsledné absorbance vychází zcela odlišně a od této metody se opustilo.

V poslední řadě je nutné zdůraznit již několikrát zmiňovaný fakt, že ikdyž je v dnešní době produkováno velké množství hydrolátů, jakožto vedlejších produktů výroby esenciálních olejů, nenáme k dispozici dostatečné množství odborné literatury a studií, které by se více věnovaly této problematice. Většina studií porovnává pouze antimikrobiální aktivitu esenciálních olejů a při experimentech náležících diplomové práci se vycházelo z faktu, že aktivita hydrolátů má vycházet obdobně, avšak s největší pravděpodobností nižší. Vzhledem k těmto okolnostem byly veškeré výsledky konzultovány formou diskuze s vedoucím diplomové práce. Z tohoto důvodu by bylo dobré stanovit a vyhodnotit další laboratorní experimenty, které by dosavadní výsledky těchto pokusů potvrdily a dále rozvíjely.

## ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo dokázat antimikrobiální a antimykotické účinky hydrolátů získaných destilací rostlinných materiálů (levandule lékařská, fenykl obecný, vavřín vznešený a hřebíčkovec kořený). Byly nám poskytnuty hydroláty parní destilace a hydrodestilace. Všechny vzorky byly nejprve zakoncentrovány 50×. Poté byly další hydroláty levandule a hydroláty fenyklu zakoncentrovány ještě 100×. Výsledky obou zakoncentrování se zásadně nelišily, proto další testování probíhalo už jen se vzorky zakoncentrovanými 50×.

Antimikrobiální aktivita byla nejprve stanovována diskovou difúzní metodou na základě výsledků inhibičních zón. Tyto hodnoty byly okrajově porovnávány s testovaným spektrem antibiotik. Z výsledků lze vyvodit, že se nejedná o látky, které by byly schopné antibiotika někdy v budoucnu nahradit, ale mohly by sloužit jako doplňující léčiva v přírodní medicíně. Dále jsme stanovovali minimální inhibiční koncentrace jednotlivých hydrolátů. Zde můžeme zaznamenat podobnější spektrum výsledků, které je ovlivněno ozemenou koncentrační řadou. Z prováděných experimentů lze jednoznačně říci, že zakoncentrované hydroláty prokazují větší antimikrobiální účinnost, než hydroláty, které zakoncentrovány nebyly. Ve většině případů byly zjištěny lepší antimikrobiální účinky hydrolátů získaných parní destilací, nejednalo se ale o markantně lepší hodnoty vůči hydrolátům hydrodestilace.

Při závěrečném porovnání naměřených hodnot a vyhodnocení výsledků můžeme říci to, že všechny hydroláty vykazovaly jistou antimikrobiální aktivitu vůči testovaným bakteriím a kvasince. Co se týče výsledků diskové difúzní metody, jednoznačně nejúčinněji se prokázal hydrolát hřebíčku. Takřka totožné výsledky byly zjištěny při stanovování minimálních inhibičních koncentrací, kde bylo stanoveno, že nejmenší množství k inhibici růstů všech bakterií nastalo u hřebíčkového hydrolátu. Pouze u jediné testované kvasinky bylo nejmenší množství potřebné k inhibici růstu zjištěno u hydrolátu bobkového listu.

Rod *Arcobacter* nepatří mezi běžně testované bakterie. Proto pozitivní výsledky v souvislosti s těmito experimenty, jsou příjemným překvapením, které nemají v literatuře velké zastupení. Proto průkaz větších antimikrobiálních účinků při testování hydrolátů proti *Arcobacter thereius* LMG 24488 a vůči *Arcobacter butzleri* UPa 2012/3 můžeme brát v souvislosti s tímto rodem jako pozitivní přínos pro další experimenty.

Z hlediska získaných výsledků antimikrobiální a antimykotické aktivity vybraných hydrolátů a na základě dalších startujících studií by bylo dobré pokračovat ve výzkumu těchto „vedlejších produktů destilace“, aby se dostaly do širšího povědomí společnosti a mohly být v budoucnu používány jako podpurné přípravky alternativní medicíny.

## POUŽITÁ LITERATURA

**Abdali H. and Aji A.** (2015), Development of antibacterial structures and films using clove bud powder. *Industrial Crops and Products*, 72, p. 214-219.

**Abdi-Ali A., Mohammadi-Mehr M. and Alaei Y. A.** (2006), Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27 (3), p. 196-200.

**Aharoni A., Jangma A. J. and Bouwmeester H. J.** (2005), Volatile science, Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends in plant Science*, 10 (12), p. 594-602.

**Akond M. A., Alam S., Hassan S. M. R. and Shirin M.** (2009), Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* Isolated From Poultry and Poultry Environment of Bangladesh, Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* Isolated From Poultry and Poultry Environment of Bangladesh. *Internet Journal of Food Safety*, 11, p. 19-23.

**Ali-Shtayeha M. S., Yaghmoura R. M. R and Al-Nurid M. A.** (1998), Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology*, 60 (3), p. 265-271.

**Appendino G., Fontana, G. and Pollastro F.** (2010), Natural products drug discovery. *Comprehensive Natural Products II. Elsevier*, p. 205.

**Arnoštová V.**, (2016), *Stanovení neopterinu v biologickém materiálu*, Diplomová práce (Mgr.), Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie, 2016-22-09.

**Balogh A.** (2019), The fundamentals of growing gorgeous lavender. *Garden design*, [online], [cit. 2019-03-20], Dostupné z: <https://www.gardendesign.com/plants/lavender.html>.

**Baser K. H. C. and Buchabuer G.** (2010), *Essential oils Science, Technology, and Applications*, Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, ISBN 978-1-4200-6315-8.

**Bhowmik D., Kumar K. P. S., Yadav A., Srivastava S., Paswan S., Dutta A.** (2012), Recent Trends in Indian Traditional Herbs *Syzygium aromaticum* and its Health Benefits, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1 (1), p. 13-22.

- Bourgaud F., Hehn A., Larbat R., Doerper S., Gontier E., Kellner S. and Matern U.** (2006), Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, 5 (2-3), p. 293-308.
- Brinker A. M and Seigler D. S.** (1992), Determination of Cyanide and Cyanogenic Glycosides from Plants. *Plant Toxin Analysis*, p. 359-381.
- Buckle J.** (1997), Clinical aromatherapy. Library of Congress Cataloging in Publication Data, ISBN 0-443-07236-1.
- Cavanagh H. M. A. and Wilkinson J. M.** (2002), Biological activities of Lavender essential. *Phytotherapy research*, 16 (4), p. 301-308.
- Clark A. M.** (1996), Natural Products as a Resource for New Drugs *Pharmaceutical Research*, 13 (8), p. 1133–1141.
- Cools D., Merckx R., Vlassak K. and Verhaegen J.** (2001), Survival of *E. coli* and *Enterococcus spp.* derived from pig slurry in soils of different texture. *Applied Soil Ecology*, 17 (1), p. 53-62.
- Cortés-Rojas D. F., Fernandesde Souza C. R. and Oliveira W. P.** (2014), Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2), p. 90-96.
- Cosentino S., Tuberoso C. I. G, Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. and Palmas F.** (2002), *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29, p. 130-135.
- Cowan M. M.** (1999), Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), p. 564-582.
- Cui H, Zhang Ch and Lin L.** (2018), Antimicrobial mechanism of clove oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 94, p. 140-146.
- D'Amato S., Serio A., López C. Ch. and Paparella A.** (2018), Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control*, 86, p- 126-137.
- Damiani N., Fernández N. J., Porrini M. P., Gende L. B., Álvarez E., Buffa F., Brasesco C., Maggi M. D., Marcangeli J. A. and Eguaras M. J.** (2014), Laurel leaf extracts for honeybee pest and disease management: antimicrobial, microsporidicidal, and acaricidal activity. *Parasitology Research*, 113 (2), p. 701-709.

- Das K., Tiwari R. K. S. and Shrivastava D. K.** (2010), Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (2), p. 104-111.
- Delaquis P. J., Stanich K., Girard B. and Mazza G.** (2002), Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils, *International Journal of Food Microbiology*, 74 (1-2), p. 101-109.
- Diao W-R., Hu Q-P, Zhang H. and Xu J-G.** (2014), Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of hydrosols from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control*, 35 (1), p. 109-116.
- Donachie S. P., Bowman J. P., On S. L. W. and Alam M.** (2005) *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*, [online], [cit. 2019-03-20], Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/a-Scanning-electron-micrograph-of-cells-of-Arcobacter-halophilus-sp-nov-Bar-1-m-m\\_fig1\\_7862257](https://www.researchgate.net/figure/a-Scanning-electron-micrograph-of-cells-of-Arcobacter-halophilus-sp-nov-Bar-1-m-m_fig1_7862257).
- Dorman H. J. and Deans S. G.** (2000), Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *Journal of Applied Microbiology*, 88 (2), p. 308-316.
- Douglas L. J.** (2003), *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11 (1), p. 30-36.
- Dyer M. H. and Writer C. G.** (2019), Common Clove Tree Diseases: Learn How To Treat A Sick Clove Tree. *Gardening know how*, [online], [cit. 2019-03-20], Dostupné z: <https://www.gardeningknowhow.com/ornamental/trees/clove-tree/clove-tree-diseases.htm>.
- Eastman R. H and Kluger R. H.** (1998), Isoprenoid, Encyclopedia britannica. [online], [cit. 2019-02-28], Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/isoprenoid>.
- El Alaoui Ch. and Lory P.** (2017), Modulation of T-type Ca<sup>2+</sup> channels by Lavender and Rosemary extracts. *PLoS One*, 12 (10).
- El-Awadi M. E. and Hassan E. A.** (2010), Physiological Responses of Fennel (*Foeniculum Vulgare* Mill) Plants to Some Growth Substances. The Effect of Certain Amino Acids and a Pyrimidine Derivative *Journal of American Science*, 6 (7), p. 120-125.
- Erkmen O. and Özcan M. M.** (2008), Antimicrobial Effects of Turkish Propolis, Pollen, and Laurel on Spoilage and Pathogenic Food-Related Microorganisms. *Journal of Medicinal Food*, 13 (3).



- Fantin B., Duval X., Massias L., Alavoine L., Retout F. CH., Andreumont A. and Mentré F.** (2009), Ciprofloxacin Dosage and Emergence of Resistance in Human Commensal Bacteria. *The Journal of Infectious Diseases*, 200 (3), p 390-398.
- Fera M. T., Maugeri T. L., Giannone M., Gugliandolo C., La Kamera E., Blandino G. and Carbone M.** (2003), In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21 (5), p. 488-491.
- Ferreira F. M., Delmonte C. C., Novato T. L. P., Monteiro C. M. O., Daemon E., Vilela F. M. P. and Amaral M. P. H.** (2018), Acaricidal activity of essential oil of *Syzygium aromaticum*, hydrolate and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 32 (1), p. 41-47.
- Frahm E. and Obst U.** (2003), Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus spp.* and *Escherichia coli* in water samples. *Journal of Microbiological Methods* 52 (1), p. 123-131.
- Frankenberg L., Mrugna M. and Hederstedt L.** (2002), *Enterococcus faecalis* Heme-Dependent Catalase. *Journal of Bacteriology*, 184 (22), p. 6351-6356.
- Godowski K. C.** (1989), Antimicrobial action of sanguinarine. *The journal of Clinical Dentistry*, 1(4), p. 96-101.
- Goldstein T.** 2006, The Aromatherapy Handbook. *LabRats Project*.
- Gomes B. C., Esteves C. T., Palazzo I. C. V., Darini A. L. C., Felis G. E., Sechi L. A., Franco B. D. G. M. and De Martinis E. C. P.** (2008), Prevalence and characterization of *Enterococcus spp.* isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, 25 (5), p. 668-675.
- Grulich V.** (2011), *Laurus nobilis*. – vařin vznešený, botany.cz, [online], [cit. 2019-03-20], Dostupné z <https://botany.cz/cs/laurus-nobilis/>.
- Hall R. A., Sordi L., Mac Calluummm D. M., Topal H., Eaton R., Bloor J. W., Robinson G. K., Levin L. R., Buck J., Wang Y., Steegborn C. and Mühlshlege F. A.** (2010), CO<sub>2</sub> Acts as a Signalling Molecule in Populations of the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Plos Pathogens*, 6 (11).
- Hammer K. A., Carson C. F. and Riley T. V.** (2001), Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, p. 985-990.

- Hanamanthagouda M. S., Kakkalameeli S. B., Naik P. M., Nagella P., Seetharamareddy H. R. and Murthy H. N.** (2010), Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. *Food Chemistry*, 118 (3), p. 836-839.
- Harris L. G., Foster S. J. and Richards R. G.** (2002), An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *Eur Cell Mater*, 31 (4), p. 39-60.
- Hasser D. J., Alsabbagh E., Parvatiyar K., Howell M. L., Wilmott R. W. and Ochsner U. A.** (2000), A Protease-Resistant Catalase, KatA, Released upon Cell Lysis during Stationary Phase Is Essential for Aerobic Survival of a *Pseudomonas aeruginosa* oxy R Mutant at Low Cell Densities. *Journal of Bacteriology*, 182 (16), p. 4557-4563.
- Hemaiwarya S., Kruthiventi A. K. and Doble M.** (2008), Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases *Phytomedicine*, 15 (8), p. 639-652.
- Huang G., Srikantha S., Sahni N., Yi S. and Soll D. R.** (2009), CO<sub>2</sub> Regulates White-to-Opaque Switching in *Candida albicans*. *Current Biology*, 19 (4), p. 330-334.
- Chaieb K., Hajlaoui H., Zmantar T., Kahla-Nakbi A. B., Roubhia M., Mahdouani K., and Bakhrouf A.** (2007), The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review, *Phytotherapy research*. 21 (6), p. 501-506.
- Cheng A-X., Lou Y. G., Mao Y. B., Lu S., Wang L-J. and Chen X-Y.** (2007), Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49 (2), p. 179-186.
- Chowdhury S. R., Islam M. M. and Kumar G. S.** (2010), Binding of the anticancer alkaloid sanguinarine to double stranded RNAs: Insights into the structural and energetics aspects. *Molecular BioSystems*, p. 7.
- Chrysargyris A., Panayiotou Ch. and Tzortzakis N.** (2016), Nitrogen and phosphorus levels affected plant growth, essential oil composition and antioxidant status of lavender plant. *Industrial Crops and Products* 83, p. 577-586.
- Churáček J.** (1990), *Analytická separace látek*. 1. Vydání Praha: SNTL, 1990, 384 s., ISBN 80-03-00569-8.
- Jiménez C. and Riguera R.** (1994), Phenylethanoid glycosides in plants: structure and biological activity. *Natural Product Repost*.

- Kaper J. B., Nataro J. P. and Mobley H. L. T.** (2004), Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews Microbiology*, 2, p. 123-140.
- Kateete D. P., Kimani C. N., Katabazi F. A., Okeng A., Okee M. S., Nanteza A., Joloba M. L. and Najjuka F. C.** (2010), Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9 (23), p. 1-7.
- Kirmizigül S., Anil H., Ucar F. and Akdemir K.** (1996), Antimicrobial and Antifungal Activities of Three New Triterpenoid Glycosides, Wiley online Library.
- Kivcak B. and Mert T.** (2002), Preliminary evaluation of cytotoxic properties of *Laurus nobilis* leaf extracts. *Fitoterapia*, 73 (3), p. 242-243.
- Klaban V.**, (2005), *Ilustrování mikrobiologický slovník*, Praha Galén, ISBN: 8072623419.
- Kong W., Wei J., Abidi P., Lin M. and Inaba S.** (2004), Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nature Medicine*, 10, p. 1344-1351.
- Križman M., Baričević D. and Prošek M.** (2007), Determination of phenolic compounds in fennel by HPLC and HPLC – MS using a monolithic reversed-phase column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(2), p. 481-485.
- Kunicka-Styczyńska A., Śmigielski K., Prusinowska R., Rajkowska K., Kuśmider B. and Sikora M.** (2014), Preservative activity of lavender hydrosols in moisturizing body gels, *Letters in Applied Microbiology*, p. 27-32.
- Kwiatkowski P., Mnichowska-Polanowska M., Pruss A., Masiuk H., Dziecioł M., Giedrys-Kalemba S. and Sienkiewicz M.** (2017), The effect of fennel essential oil in combination with antibiotics on *Staphylococcus aureus* strains isolated from carriers, *Burns*, 43 (7), p. 1544-1551.
- Kybal J. and Kaplická J.** (1988), *Naše a cizí koření*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. Kapitola Hřebíčkovce kořený, p. 110.
- Laishram M., Rathlavath S., Lekshmi M., Kumar S. and Nayak B. B.** (2016), Isolation and characterization of *Arcobacter* spp. from fresh seafood and the aquatic environment. *International Journal of Food Microbiology*, 232, p. 87-89.

- Levican A., Collado L. and Figueras M. J.** (2013), *Arcobacter cloacae* sp. nov. And *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Systematic and Applied Microbiology*, 36 (1), p. 22-27.
- Lira P. Di L, D. Retta, E. Tkacik, J. Ringuet, J. D. Coussio, Baren C. and Bandoni A. L.** (2009), Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis L.*) from Argentina. *Industrial Crops and Products*, 30 (2), p. 259-264.
- Lombardi Ch.** (2015), Solid phase extraction. *Chemistry in New Zeland*, 79 (2), p. 67-118.
- Lopez-Romero J. C., González-Ríos H., Borges A. and Simões M.** (2015), Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, ID 795435, p. 9.
- Mahesh B. and Satish S.** (2008), Antimicrobial Activity of Some Important Medicinal Plant Against Plant and Human Pathogens, *World Journal of Agricultural Sciences*, 4, p. 839-843.
- Majak W.** (2008), Mammalian Metabolism of Toxic Glycosides from Plants, *Journal of Toxicology*, 11, 1-40 oil, Wiley Online Library, [online], [cit. 2019-03-23], Dostupné z <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ptr.1103#accessDenialLayout>.
- Mayer F. L., Wilson D. and Hube B.** (2013), *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4 (2), p. 119-128.
- Moreira M. R. Ponce A. G., dell Vale C. E and Roura S. I.** (2005), Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen, *LWT - Food Science and Technology*, 38 (5), p. 565-570.
- Normanno G., Firinu A., Virgilio S., Mula G., Dambrosio A., Poggiu A., Mioni R., Decastelli L., Scuota S., Bolzoni G., Giannatale E., Salinetti A. P., La Salandra G., Bartoli M., Zuccon F., Pirino T., Sias S., Parisi A., Quaqlia N. C. and Celano G. V.** (2005), Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 98 (1), p. 73-79.
- Oktay M., Gülçin İ and Küfrevioğlu Ö.İ.** (2003), Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 36 (2), p. 263-271.
- Oluwatuyi M., Kaatz G. W. and Gibbons S.** (2004), Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*, *Phytochemistry*, 65 (24), p. 3249-3254.

- Palaniappan K. and Holley R. A.** (2010), Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 140 (2 – 3), p. 164-168.
- Patel V. and Patel R.** (2016), The active constituents of herbs and their plant chemistry, extraction and identification methods. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 8 (4), p. 1423-1443.
- Pérez-Cataluña A., Salas-Massó N., Diéguez A. L., Balboa S., Lema A., Romalde J. L. and Figueras M. J.** (2018), Revisiting the Taxonomy of the Genus *Arcobacter*: Getting Order From the Chaos. *Frontier in Microbiology*, 9: 3123.
- Phillips C. A.** (2001), *Arcobacters* as emerging human foodborne pathogens. *Food control*, 12 (1), p. 1-6.
- Poole C. F.** (2003), New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22 (6), p. 362-373.
- Prabuseenivasan S., Jayakumar M. and Ignacimuthu S.** (2006), In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6 (39).
- Prusinovska R and Śmigielski S. B.** (2014), Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia L.*), *De Gruyter*, 60 (2), p. 56-66.
- Qin X., Emerson J., Stapp J., Stapp L., Abe P. and Burn J. L.** (2003), Use of Real-Time PCR with Multiple Targets To Identify *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermenting Gram-Negative Bacilli from Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinically Microbiology*, 41 (9), p. 4312-4317.
- Qiu J., Li H., Su H., Dong J., Luo M., Wang J., Leng B., Deng Y., Liu J. and Deng X.** (2012), Chemical composition of fennel essential oil and its impact on *Staphylococcus aureus* exotoxin production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28 (4), p. 1399-1405.
- Rabha B., Gopalakrishnan R., Baruah I. and Singh L.,** (2012), Larvicidal activity of some essential oil hydrolates against dengue and filariasis vectors, *E3 Journal of Medical Research*, 1 (1), p. 014-016.
- Rai M., Paralikar P., Jogee P., Agarkar G., Ingle P. I., Derita M. and Zacchino S.** (2017), Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles:

Emerging trends and future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*, 519 (1 – 2), p. 67-78.

**Ramos C., Teixeira B., Batista I., Matos O., Serrano C., Neng N. R., Nogueira J. M. F and Nunes M. L.** (2010), Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay Laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. *Natural Product Research* , p. 518-529.

**Rauha J-P., Remes S., Heinonen M., Hopia A, Kahkonen M., Kujala T., Pihlaja K., Vuorela H and Vuorela P.** (2000), Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56 (1), p. 3-12.

**Ree T. and Khanbabae K. T.** (2001), Classification and Definition. *Natural Product Reports*, 18 (6), p. 641-649.

**Ríos J. L. and Recio M. C.** (2005), Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100 (1-2), p. 80-84.

**Robards K.** (2003), Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000 (1-2), p. 657-691.

**Robinson T.** (1974), Metabolism and Function of Alkaloids in Plants. *American Association for the Advancement of Science*, p. 184-430.

**Roby M. H. H., Sarhan M. A., Sekim K. A-H and Khalel I. K.** (2013), Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare L.*) and chamomile (*Matricaria chamomilla L.*). *Industrial Crops and Products*, 44, p. 437-445.

**Růžičková G., Kocourková B., Sedláková J. and Hajšlová J.** (2005), The effects of the desiccants treatment on the fennel quality. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendelianae Brun*, 5, p. 143-150.

**Sağdıç O. and Özcan M.** (2003), Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*, 14 (3), p. 141-143.

**Sahan Y.** (2011), Effect of *Prunus laurocerasus L.* (Cherry Laurel) leaf extracts on growth of bread spoilage fungi. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17 (1), p. 83-92.

- Scherrer D., Corti S., Muehlherr J. E., Zweifel C. and Stephan R.** (2004), Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Veterinary Microbiology*, 110 (2), p. 101-107.
- Sienkiewicz M., Lysakowska M., Cieciewicz J., Pawel D. and Kowalczyk E.** (2011), Antibacterial Activity of Thyme and Lavender Essential Oils. *Medicinal chemistry*, 7 (6), p. 674-689.
- Simić M., Kundaković T. and Kovačević N.** (2003), Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitoterapia*, 74(6), p. 613-616.
- Snelling W. J., Matsuda M., Moore J. E. and Dooley J. S. G.** (2006), Under the Microscope: *Arcobacter*. *Letters in Applied Microbiology*, 42 (1), p. 7-14.
- Sobkova K.**, (2009), *Antibakteriální účinky přírodních látek*, Diplomová práce (Mgr.), Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko – technologická, 2009-06-05.
- Soylu E. M., Soylu S. and Kurt S.** (2006), Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Various Plants against Tomato Late Blight Disease Agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*, 161 (2), p. 119-128.
- Stover C. K., Pham W. Q. and Olson M. V.** (2000), Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature*, 406, p. 959-964.
- Sudbery P., Gow N. and Berman J.** (2004), The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Cell Press*, 12 (7), p. 317-324.
- Teixeira L. M. and Carreira Merquior V. L.** (2012), Enterococcus, *Molecular Typing in Bacterial Infections*. p. 17-26.
- Tholl D.** (2015), Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. *Biotechnology of Isoprenoids*, 148, p. 63-106.
- Thring T. SA, Hili P. and Naughton D. P.** (2011), Antioxidant and potential anti-inflammatory activity of extracts and formulations of white tea, rose, and witch hazel on primary human dermal fibroblast cells. *Journal of inflammation*, 8 (1), p. 1-7.
- Tong S. Y. C., Davis J. S., Eichenberger E., Holland T. L. and Fowler V. G.** (2015), *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28 (3), p. 603-661.

**Touchon M., Hoede C., Tenailon O., Barbe V., Baeriswyl S., Bidet P., Bingen E., Bonacorsi S., Bouchier Ch., Bouvet O., Calteau A., Chaiapello H., Clermont O. and Denamur E.** (2009), Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. *Plos Genetics*.

**Van den Abeele A-M., Vogelaers D., Van Hende J. and Houf K.** (2014), Prevalence of *Arcobacter* (close to *Campylobacter*) species among humans. *Belgium, Doug Powell*, p. 2008-2013, [online], [cit. 2019-03-23], Dostupné z: <https://www.barfblog.com/2014/09/prevalence-of-arcobacter-close-to-campylobacter-species-among-humans-2008-2013-belgium/>.

**Vandenberg O., Dediste A., Houf K., Ibekwem S., Souayah H., Cadranel S., Douat N., Zissis G., Butzler J-P. and Vandamme P.** (2004), *Arcobacter* Species in Humans. *Emerg Infect Diseases*, 10 (10), p. 1863-1867.

**Vásquez-García A., Spranger A. P., Julian C., Mejia-Ballesteros J. E., Seraphin de Godoy S. H., Barbieri E., Moro de Sousa R. L. and Fernande A. M.** (2019), *Escherichia coli* detection and identification in shellfish from southeastern Brazil. *Aquaculture*, 504, p. 158-163.

**Vidal L., Riekkola M-L and Canals A.** (2012), Ionic liquid-modified materials for solid-phase extraction and separation: A review. *Analytica Chimica Acta*, 715, p. 19-41.

**Vijayakumar S., Vaseeharan B., Malaikozhundan B. and Shobiya M.** (2016), *Laurus nobilis* leaf extract mediated green synthesis of ZnO nanoparticles: Characterization and biomedical applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, p. 1213-1222.

**Votava M. a kol.,** *Lékařská mikrobiologie speciální*, Brno Neptun, ISBN: 8090289665.

**Wenzel. M.** (2014), *Léčivé rostliny: nejlepší využití pro zdraví celé rodiny*. 1. vyd. Praha: Grada, ISBN: 9788024751559.

**Whiteley M., Banger M. G., Bumgarner R. E., Parsek M. R., Teitzel G. M., Lory S. and Greenber E. P.** (2001), Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413, p. 860-864.



## ZDROJE OBRÁZKŮ

**Fenykl obecný**, Laurel (*laurus nobilis*), In: *Selvaasturiana.com*, [online], [cit. 2019-03-23], Dostupné z: [Dostupné z: https://selvaasturiana.com/project/laurel/](https://selvaasturiana.com/project/laurel/)

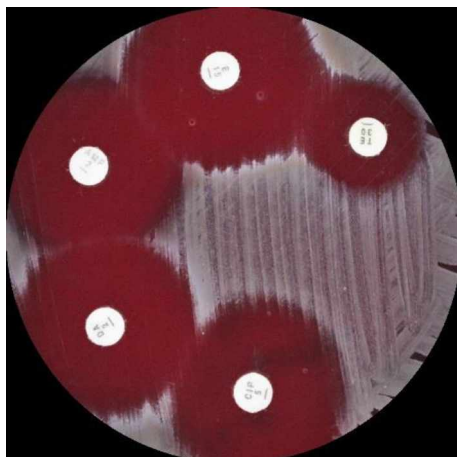
**Vavřík vznešený**, Florence Fennel 100 Seeds by Seeds and Thing, In: *Amazon.com* [online], [cit. 2019-03-23], Dostupné z: <https://www.amazon.com/Florence-Fennel-100-Seeds-Things/dp/B001LBH1G8>

**SPE-frita**, Set up of SNA-agarose gravity flow column, In: *En.bio-protocol.org* [online], [cit. 2019-05-3], Dostupné z: <https://en.bio-protocol.org/e1886>

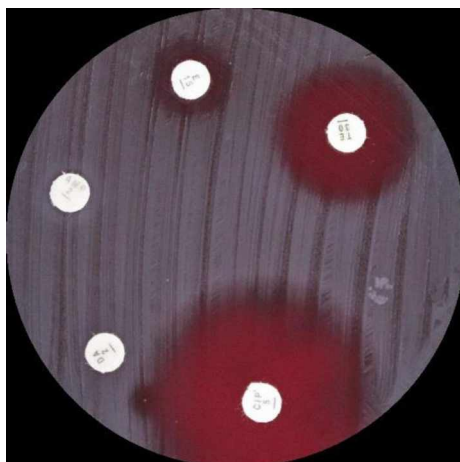
# PŘÍLOHY

- PŘÍLOHA č. 1:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Staphylococcus aureus* CCM 4232
- PŘÍLOHA č. 2:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Escherichia coli* CCM 3954
- PŘÍLOHA č. 3:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955
- PŘÍLOHA č. 4:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Enterococcus faecalis* CCM 4224
- PŘÍLOHA č. 5:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Candida albicans* CCM 8186
- PŘÍLOHA č. 6:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Arcobacter lanthieri* LMG 28517
- PŘÍLOHA č. 7:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Arcobacter butzleri* UPa 2012/3
- PŘÍLOHA č. 8:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13
- PŘÍLOHA č. 9:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Arcobacter butzleri* CCUG 30484
- PŘÍLOHA č. 10:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050
- PŘÍLOHA č. 11:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Arcobacter butzleri* LMG 10828

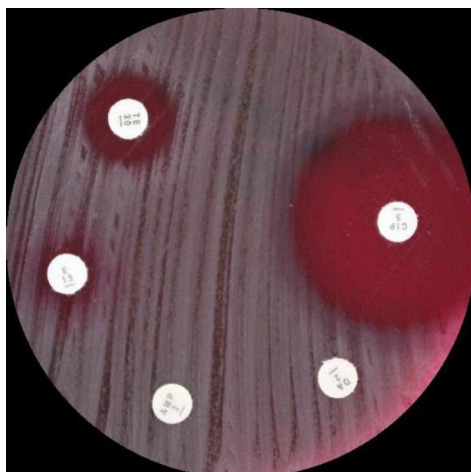
**PŘÍLOHA č. 1:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Staphylococcus aureus* CCM 4232



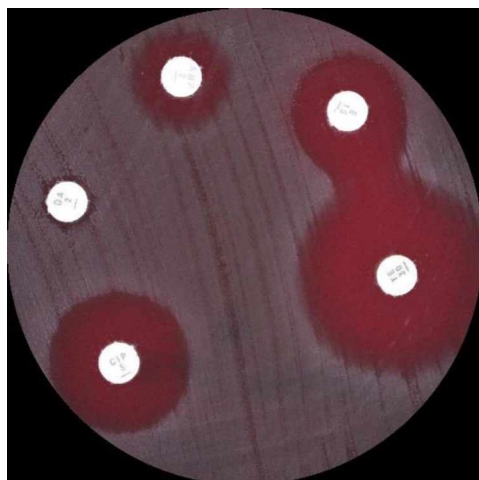
**PŘÍLOHA č. 2:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Escherichia coli* CCM 3954



**PŘÍLOHA č. 3:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955



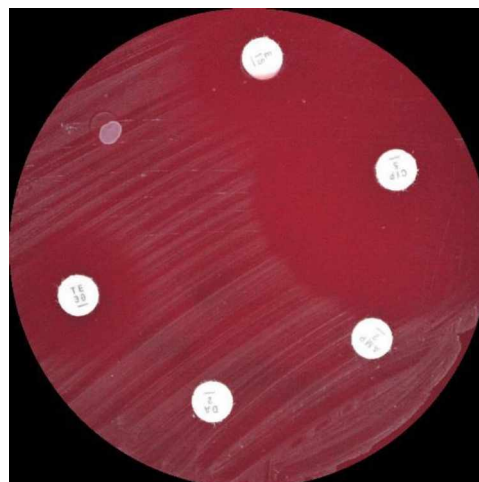
**PŘÍLOHA č. 4:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Enterococcus faecalis* CCM 4224



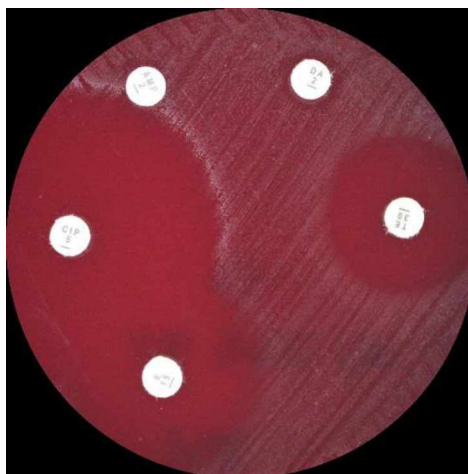
**PŘÍLOHA č. 5:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Candida albicans* CCM 8186



**PŘÍLOHA č. 6:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Arcobacter lanthieri* LMG 28517



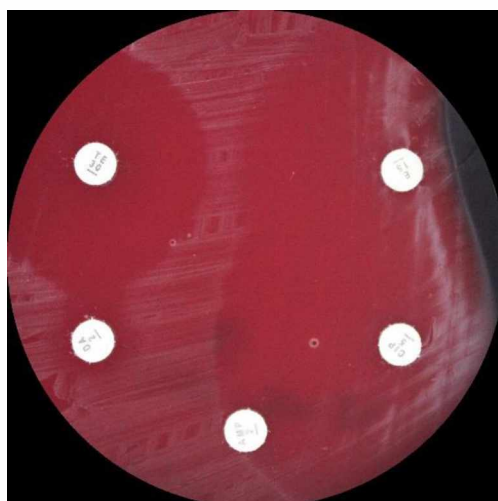
**PŘÍLOHA č. 7:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Arcobacter butzleri* UPa 2012/3



**PŘÍLOHA č. 8:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13



**PŘÍLOHA č. 9:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Arcobacter butzleri* CCUG 30484



**PŘÍLOHA č. 10:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050



**PŘÍLOHA č. 11:** Inhibiční zóny testovaných antibiotik – *Arcobacter butzleri* LMG 10828

