

Vliv aktivních látek esenciálních olejů na tvorbu biofilmu

Bc. Lucie Žurková

Diplomová práce
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Žurková**
Osobní číslo: **T19389**
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**
Studijní obor: **Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Vliv aktivních látek esenciálních olejů na tvorbu biofilmu**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Charakteristika mikroorganismů vyskytujících se při tvorbě biofilmů.
2. Biofilm.
3. Aktivní látky esenciálních olejů.

II. Praktická část

1. Kultivační metoda pro stanovení biofilmů.
2. Vliv Aktivních látek esenciálních olejů na tvorbu biofilmů.
3. Vyhodnocení a zpracování výsledků.
4. Diskuze a formulace závěrů.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] AN, Yuehwei H a Richard J FRIEDMAN, 1997. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *Journal of Microbiological Methods*. 30(2), 141-152. DOI: 10.1016/S0167-7012(97)00058-4. ISSN 01677012.
- [2] BAZARGANI, Mitra Mohammadi a Jens ROHLOFF. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*. 2016, 61, 156-164. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.09.036. ISSN 09567135.
- [3] KAVANAUGH, Nicole L. a Katharina RIBBECK. Selected Antimicrobial Essential Oils Eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78(11), 4057-4061. DOI: 10.1128/AEM.07499-11. ISSN 0099-2240.
- [4] SZCZEPANSKI, Sandra a André LIPSKI. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control*. 2014, 36(1), 224-229. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.08.023. ISSN 09567135.
- [5] Dle doporučení vedoucího.
- [6] Databáze Web of Science a další elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Pavel Pleva, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá vlivem aktivních látek esenciálních olejů na biofilm pozitivní bakterie, které mohou znehodnocovat potraviny a kosmetické produkty. V teoretické části je popsána charakteristika esenciálních olejů a biofilmu a popis aktivních látek. V experimentální části práce je popsána použitá metodika a zhodnoceny výsledky inhibičních účinků aktivních látek na růst bakterií a jejich tvorbu biofilmu. Testované bakterie byly nejvíce citlivé na přítomnost cinnamaldehydu, ale byly prokázány i inhibiční účinky karvakrolu a thymolu. Nejcitlivější byl na přítomnost těchto látek *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, kdy MIC růstu cinnamaldehyd : karvakrol : thymol byla stanovena na 6,25 : 50 : 25 mg/l a *Enterococcus faecalis* CCM 4224 s MIC pro cinnamaldehyd a karvakrol 6,25 mg/l a thymol 50 mg/l. Karvakrol dokázal potlačit tvorbu biofilmu v koncentraci 250 mg/l u *Proteus mirabilis* CCM 7188, *Enterococcus faecalis* CCM 4224 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, i přestože bakterie byly schopné růstu.

Klíčová slova: esenciální oleje, thymol, karvakrol, cinnamaldehyd, biofilm, difúzní metoda, diluční metoda, detekce biofilmu

ABSTRACT

The thesis focuses on the influence of active substances of essential oils on biofilm-positive bacteria which can devalue food and cosmetics products. The theoretical part describes the characteristics of essential oils and biofilm and description of active substances. The experimental part defines the used methodology and the results of the inhibitory effects of active substances on the growth of bacteria and their biofilm formation are evaluated. Tested bacteria were the most susceptible to the presence of cinnamaldehyde, but the inhibitory effects of carvacrol and thymol were also demonstrated. The most sensitive to the presence of these substances was *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, where the MIC of growth of cinnamaldehyde : carvacrol : thymol was set at 6,25 : 50 : 25 mg/l and *Enterococcus faecalis* CCM 4224 with MIC for cinnamaldehyde and carvacrol was set at 6,25 mg/l and thymol at 50 mg/l. Carvacrol was able to inhibit biofilm formation at concentration of 250 mg/l in *Proteus mirabilis* CCM 7188, *Enterococcus faecalis* CCM 4224 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, even though the bacteria were able to grow.

Keywords: essential oils, thymol, carvacrol, cinnamaldehyde, biofilm, diffusion method, dilution method, biofilm detection

Touto cestou bych chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce panu Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D. především za rady, ochotu, trpělivost a čas, který mi věnoval při konzultacích. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Veronice Kučabové a Ing. Olze Vlčkové za pomoc a rady během realizace praktické části v laboratoři. Mé poděkování patří i rodině a příteli za podporu a motivaci během studia v době virové pandemie.

Motto:

„Vzdělání a moudří lidé byli, jsou a budou vždy největším národním bohatstvím.“

Jan Procházka

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD | 10 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 12 |
| 1 CHARAKTERISTIKA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ | 13 |
| 1.1 DEFINICE ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ..... | 13 |
| 1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ | 13 |
| 1.3 BIOLOGICKÉ ÚČINKY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ..... | 14 |
| 1.3.1 Antibakteriální účinky..... | 14 |
| 1.3.2 Antioxidační aktivita | 17 |
| 1.4 TECHNOLOGICKÉ POSTUPY VÝROBY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ | 17 |
| 1.5 VYUŽITÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ | 18 |
| 1.6 AKTIVNÍ LÁTKY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ | 20 |
| 1.6.1 Cinnamaldehyd | 20 |
| 1.6.2 Eugenol | 20 |
| 1.6.3 Karvakrol..... | 21 |
| 1.6.4 Linalool | 21 |
| 1.6.5 Thymol | 22 |
| 2 CHARAKTERISTIKA BIOFILMU | 23 |
| 2.1 DEFINICE BIOFILMU..... | 23 |
| 2.2 VÝSKYT BIOFILMU | 24 |
| 2.3 TVORBA BIOFILMU | 25 |
| 2.4 SLOŽENÍ A VLASTNOSTI BIOFILMU..... | 27 |
| 2.4.1 Extracelulární polymerní matrice..... | 27 |
| 2.4.2 Rezistence k antimikrobním látkám..... | 28 |
| 2.4.3 Mezibuněčná komunikace – quorum sensing | 29 |
| 2.4.4 Horizontální přenos genů | 30 |
| 2.5 DETEKČNÍ METODY TVORBY BIOFILMU | 31 |
| 3 CÍLE PRÁCE | 33 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 34 |
| 4 MIKROORGANISMY, MATERIÁL A ZAŘÍZENÍ | 35 |
| 4.1 BAKTERIÁLNÍ KULTURY | 35 |
| 4.2 ŽIVNÁ MÉDIA | 35 |
| 4.3 CHEMIKÁLIE..... | 36 |
| 4.4 ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY | 36 |
| 5 METODIKA PRÁCE | 37 |
| 5.1 PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍ SUSPENZE | 37 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.2 | PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ AKTIVNÍCH LÁTEK ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ | 37 |
| 5.3 | STANOVENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY DIFÚZNÍ METODOU..... | 37 |
| 5.4 | STANOVENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY DILUČNÍ METODOU | 38 |
| 5.4.1 | Příprava pracovních roztoků aktivních látek esenciálních olejů..... | 38 |
| 5.4.2 | Příprava mikrotitrační destičky | 38 |
| 5.5 | DETEKCE BIOFILMU – CHRISTENSENOVA METODA | 39 |
| 6 | VÝSLEDKY | 41 |
| 6.1 | DIFÚZNÍ METODA | 41 |
| 6.2 | DILUČNÍ METODA | 41 |
| 6.2.1 | Cinnamaldehyd | 42 |
| 6.2.2 | Eugenol | 43 |
| 6.2.3 | Karvakrol..... | 44 |
| 6.2.4 | Linalool | 46 |
| 6.2.5 | Thymol | 47 |
| 6.3 | DETEKCE BIOFILMU..... | 48 |
| 6.3.1 | Cinnamaldehyd | 49 |
| 6.3.2 | Eugenol | 51 |
| 6.3.3 | Karvakrol..... | 52 |
| 6.3.4 | Linalool | 54 |
| 6.3.5 | Thymol | 55 |
| 7 | DISKUZE | 57 |
| 8 | ZÁVĚR..... | 61 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 63 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK..... | 74 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 75 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 77 |

ÚVOD

Biofilm je složité společenství mikroorganismů, které adhezuje k biotickému nebo abiotickému povrchu. Biofilmy se tvoří ve formě lepkavého slizu, složeného z polysacharidů, bílkovin a jiných organických složek a nachází se v přírodním, klinickém a průmyslovém prostředí. Bakterie uvnitř biofilmu mají narozdíl od planktonických buněk pozměněné fyziologické a fenotypové vlastnosti (odlišnou rychlost růstu, změny v expresi genů), jsou odolnější vůči antibiotikům a chemickým látkám, což má negativní vliv a dopad na lidské zdraví. Mohou mít však pro lidstvo i prospěšnou roli ve výrobě produktů jako je sýr, pivo a víno nebo mohou čistit odpady, které vyprodukuje (Rulík, 2011).

Je obecně známo, že bakterie se snadno adaptují na podmínky vnějšího prostředí, obzvláště pak ve formě biofilmu, kdy se prostřednictvím buněčné komunikace v této činnosti podporují. Jejich všudypřítomnost, nově vznikající mechanismy odolnosti nebo rezistence vůči antibiotikům jsou faktory ohrožující lidské zdraví. Jednou z alternativ v boji proti patogením biofilmům jsou přírodní látky s biologickou aktivitou. Jejich výhodou je přirozený výskyt v okolí bakterií, které tak nemají potřebu se jim bránit, a proto nedochází ke vzniku rezistence. Aplikace těchto látek může být řešením, protože přírodní produkty byly pro léčbu nemocí používány lidmi již od pradávna a jsou šetrné k životnímu prostředí.

V posledních letech se o tyto přírodní antimikrobní látky zvýšil zájem. Je prokázáno, že éterické oleje pocházející ze široké škály léčivých rostlin, jsou velmi účinnými rostlinnými extrakty kvůli obsaženým aktivním látkám, které vykazují potenciální antimikrobní vlastnosti. Inhibiční účinek rostlinných extraktů byl testován v několika studiích i na bakterie tvořící biofilm.

Esenciální oleje mají kvůli antimikrobním účinkům využití v potravinářském průmyslu jako konzervační látky a dále jako dochucovadla a antioxidanty. Na trhu existuje řada kosmetických přípravků s obsahem esenciálních olejů pro osobní péči za účelem čištění, vyživování, zkrášlení a parfémování lidského těla, tudíž nalézají uplatnění i v kosmetickém průmyslu při výrobě parfémů, mýdel, krémů, šamponů a čisticích prostředků (Bašer a Buchbauer, 2020). Kosmetické přípravky definuje v rámci EU Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích. Podmínky používání esenciálních olejů, resp. jejich jednotlivých složek jsou stanoveny v Příloze III tohoto nařízení. Příloha III obsahuje přehlednou tabulku, kde je definováno 26 možných alergenních vonných složek z nichž 18 lze nalézt jako složky esenciálních olejů. Z tohoto dů-

vodu, musí být uvedeny na obalu nebo přiloženém informačním letáku, pokud je koncentrace těchto alergenních látek vyšší než 0,01 % v oplachových přípravcích a vyšší než 0,001 % v bezoplachových přípravcích (ČESKO, 2009). I když jsou esenciální oleje v kosmetice využívány spíše jako vonné látky, mohou také podporovat funkci konzervantů a antioxidantů. Kosmetika obsahuje základní minerály, růstové faktory, organické i anorganické sloučeniny a vodu, které poskytují vhodné podmínky pro růst mikroorganismů. Kontaminace takových přípravků vede ke změně organoleptických vlastností a může mít negativní důsledky na lidské zdraví a kůži. V kontaminovaných kosmetických přípravcích převládají rody bakterií jako *Bacillus*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, rody plísní *Aspergillus*, *Penicillium*, a kvasinek *Candida* a bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Protože je většina z nich součástí normální mikroflóry člověka, kontaminace může být způsobena opakovaným používáním přípravku spotřebitelem, dále z použitých surovin a přísad anebo v průběhu výroby. Každý výrobce kosmetiky zodpovídá za mikrobiální nezávadnost svých výrobků a řídí se zásadami správné výrobní praxe (SVP) dle ČSN EN ISO 22716. Kosmetické přípravky a suroviny nemusí být sterilní, avšak mikroorganismy přítomné ve výrobku nesmí ovlivnit zdraví spotřebitele a kvalitu výrobku, a to i během používání. Pro zajištění kvality a bezpečnosti výrobku existuje norma ČSN EN ISO 17516, která vymezuje celkový počet aerobních mezofilních mikroorganismů, který musí být do 1×10^2 CFU/g (ml) u výrobků určených pro oblast okolo očí a sliznic nebo pro děti do 3 let, a 1×10^3 CFU/g (ml) u ostatních výrobků (Dadashi a Dehghanzadeh, 2016).

Tato diplomová práce se zabývá vlivem aktivních látek obsažených v esenciálních olejích na tvorbu biofilmu. Konkrétně se jedná o eugenol, linalool, thymol, karvakrol a cinnamaldehyd. Pozornost je věnována především metodám, kterými lze stanovit jejich inhibiční účinek jak na růst, tak tvorbu biofilmu. Jedná se o diskovou difúzní metodu s vyhodnocením inhibičních zón kolem disku, a diluční metodu v mikrotitrační destičce se spektrofotometrickým vyhodnocením minimální inhibiční koncentrace růstu. Ke studiu bakteriální adheze byla použita Christensenova metoda v mikrotitrační destičce.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ

1.1 Definice esenciálních olejů

Francouzská agentura pro normalizaci Agence Française de Normalisation (AFNOR) uvádí definici (NF T 75-006): „esenciální olej je produkt získaný z rostlinné suroviny, a to suchou či parní destilací nebo mechanickými procesy z epikarpu citrusových plodů, kdy je výsledný esenciální olej oddělen od vodné fáze fyzikálními metodami“ (Dhifi *et al.*, 2016). Esenciální oleje známé také jako éterické oleje či silice jsou vonné, vysoce těkavé látky přítomné v rostlinách. Jedná se o komplexní směsi, tvořené mnoha složkami, které jsou obvykle tekuté, někdy i pevné (Ríos, 2016). Většina esenciálních olejů je složena z nasycených a nenasycených uhlovodíků, alkoholů, aldehydů, esterů, etherů, ketonů, oxidů, fenolů, terpenů, terpenoidů a dalších aromatických a alifatických sloučenin s nízkou molekulovou hmotností (Swamy, Akhtar a Sinniah, 2016; Ali *et al.*, 2015). Při pokojové teplotě mají obvykle bezbarvou až mírně nažloutlou barvu s aromatickou vůní. Vyznačují se nízkou hustotou s výjimkou skořicového a hřebíčkového oleje a vysokým indexem lomu. Jsou špatně rozpustné ve vodě, běžně se rozpouští v organických rozpouštědlech jako je ethanol nebo diethylether. Jejich výhodou je dobrá mísitelnost s rostlinnými oleji, tuky a vosky a jsou lehce vstřebatelné do pokožky (Ríos, 2016).

Role éterických olejů v dané rostlině se liší. Může sloužit k opylování, nebo často k obrannému mechanismu jako repelent. Jsou také považovány za antifungální a antibakteriální látky (Ríos, 2016). Využití nalézají v parfumerii, aromaterapii, v potravinářství, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu (Dhifi *et al.*, 2016).

1.2 Chemické složení esenciálních olejů

Složení každého esenciálního oleje se může lišit v závislosti na určitých podmínkách jako je odrůda rostliny, část rostliny, oblast růstu, klimatické změny, doba sklizně nebo podmínky skladování (Elshafie a Camele, 2017). Esenciální oleje jsou složeny z lipofilních a vysoce těkavých sekundárních rostlinných metabolitů s nízkou molekulovou hmotností. Hlavními složkami esenciálních olejů jsou terpenoidní uhlovodíky. Esenciální oleje ve většině rostlin obsahují asi 80 % terpenoidů. Terpenoidní uhlovodíky jsou tvořeny přesmykem jedné či více izoprenových jednotek. V závislosti na počtu izoprenových jednotek se dělí na hemiterpeny (jedna jednotka; C_5H_8), monoterpeny (dvě jednotky; $C_{10}H_{16}$), seskviterpeny (tři jednotky; $C_{15}H_{24}$) a diterpeny (čtyři izoprenové jednotky; $C_{20}H_{32}$) (Hashemi,

Mousavi Khaneghah a de Souza Sant'Ana, 2017). Monoterpeny a seskviterpeny jsou hlavními složkami esenciálních olejů. Mezi nejčastější monoterpeny patří α a β -pinen (olej z pryskyřice jehličnatých stromů), geraniol (olej z damažkové růže), linalool (olej z koriandru), menthol (mátový olej) a limonen (citrónový olej). Mezi příklady seskviterpenů lze zařadit santalol (olej ze santalového dřeva) a bisabolol (heřmánkový olej). Některé rostliny mají esenciální olej tvořený aromatickými deriváty odvozenými od allylfenolu. Rostliny obsahující tyto sloučeniny jsou vzácnější než rostliny obsahující terpeny. Patří mezi ně například eugenol vyskytující se v hřebíčkovém oleji nebo cinnamaldehyd obsažený ve skořicovém oleji. V esenciálních olejích mohou být také přítomny další téžavé sloučeniny. Tyto sloučeniny jsou součástí těchto olejů, které byly získány extrakcí rozpouštědly, lisováním nebo pomocí enfleuráže. V mnoha případech se jedná o seskviterpenové laktony nebo glykosidy. Mezi takové sloučeniny lze zařadit kumariny obsažené v levandulovém oleji a furanokumariny obsažené v esenciálním oleji z bergamotu (Ríos, 2016).

1.3 Biologické účinky esenciálních olejů

Mezi pozitivní biologické účinky řadíme účinky analgetické, antiseptické, protizánětlivé, insekticidní, antivirové, antifungální, mezi negativní pak účinky fototoxické. (Chouhan *et al.*, 2017). Z mikrobiologického hlediska nás nejvíce zajímají účinky antibakteriální a z hlediska kosmetického či potravinářského účinky antioxidační.

1.3.1 Antibakteriální účinky

Mezi výhody esenciálních olejů používaných jako antibakteriálních činidel jsou nízká toxicita, šetrnost k životnímu prostředí a snadné způsoby získávání. (Başer a Buchbauer, 2020). Antibakteriální mechanismus účinku se liší podle typu esenciálního oleje nebo kmene testovaného mikroorganismu (Chouhan *et al.*, 2017). Důležitou vlastností esenciálních olejů je jejich hydrofobicita, která je zodpovědná za zvýšení propustnosti buněčné stěny (Dhifi *et al.*, 2016). Díky své lipofilní povaze mohou snadno pronikat do buňky (Swamy, Akhtar a Sinniah, 2016). Esenciální oleje mohou inhibovat bakteriální růst (účinek bakteriostatický) nebo bakteriální buňky usmrcovat (účinek baktericidní). Mechanismus účinku esenciálních olejů spočívá ve ztrátě integrity buněčné stěny, čímž dojde ke zvýšení její permeability. Poškození cytoplazmatické membrány vede k úniku intracelulárních složek (proteiny, cukry, ATP a DNA). Dalším možným mechanismem účinku může být také poškození bakteriálního enzymatického systému (Swamy, Akhtar a Sinniah,

2016). Obecně jsou na esenciální oleje citlivější grampozitivní bakterie než gramnegativní bakterie. Je to dáno tím, že gramnegativní bakterie mají vnější membránu tuhou, složitější a bohatou na lipopolysacharid, čímž je omezena difúze hydrofobních sloučenin. Grampozitivní bakterie jsou obklopeny silnou stěnou peptidoglykanu, která není dostatečně hustá na to, aby odolávala antimikrobním látkám. Průnik hydrofobních sloučenin může být také usnadněn přítomností lipofilních konců kyseliny teikoové v buněčné stěně (Chouhan *et al.*, 2017; Pandey *et al.*, 2017).

Podle Elshafie a Camele, (2017) závisí antibakteriální aktivita rostlinných esenciálních olejů hlavně na jejich jednotlivých aktivních složkách, zejména pak na jejich funkčních skupinách. Dhifi *et al.*, (2016) uvádí, že esenciální oleje obsahující aldehydy či fenoly jako je cinnamaldehyd, citral, karvakrol, eugenol nebo thymol jsou obecně charakterizovány nejvyšší antibakteriální aktivitou. Thymol, eugenol a karvakrol mají antibakteriální účinek proti širokému spektru bakterií. Působí inhibičně na *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus sakei*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* a *Staphylococcus aureus*.

Synergický účinek dvou nebo více aktivních látek vede ke zvýšení účinnosti biologické aktivity (Elshafie a Camele, 2017). Thymol nebo karvakrol pravděpodobně může zvýšit propustnost cytoplazmatické membrány a umožnit tak cinnamaldehydu snadněji difundovat do buňky (Dhifi *et al.*, 2016). Také kombinace esenciálních olejů s antibiotiky může snížit rezistenci vůči antibiotikům. Bylo zjištěno, že esenciální oleje z máty peprné, skořicové kůry a levandule modifikují rezistenci na antibiotika, pokud se použijí v kombinaci s piperacilinem (Dagli *et al.*, 2015).

Esenciální oleje mají významnou roli i proti bakteriálním biofilmům. Vykazují baktericidní aktivitu proti orálním a zubním patogenům, a proto jsou často součástí ústních vod (A. Shaaban, 2020). Svou roli hrají i v potravinářství, kde se používají jako přírodní konzervační činidla. Často zkoumanými druhy bakterií tvořící biofilm jsou stafylokoky, bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* a potravinový patogen *Listeria monocytogenes*. Uvádí se, že pro inhibici biofilmu jsou zapotřebí dvojnásobně až čtyřnásobně vyšší koncentrace esenciálních olejů než v případě planktonických buněk. Studie Kerekes *et al.*, (2015) uvádí, že esenciální oleje mají potenciální vliv na komunikační systém quorum sensing. K prokázání účinku bylo použito diskové difúzní metody a modelové bakterie *Chromobacterium violaceum* vylučující pigment violacein, jehož produkce je regulována

quorum sensing. Za pozitivní účinek je považován světlý kruh bez pigmentu kolem disku, což naznačuje, že buňky přežily, ale jejich komunikace byla přerušena.

1.3.1.1 Možnosti stanovení antibakteriální aktivity esenciálních olejů

Vyšetření citlivosti bakterií k antimikrobní látce se provádí s cílem zjistit, zda je mikrob citlivý a do jaké míry. Kvantitativně je citlivost přímo vyjádřena minimální inhibiční koncentrací (MIC), kdežto kvalitativně (nepřímo), průměrem inhibiční zóny kolem disku.

Difúzní metoda

Podstata metody spočívá v rovnoměrném rozetření testovaného mikroorganismu na agarovou plotnu. Poté se na roztěr rozloží papírové disky napuštěné antimikrobiální látkou, nebo se antimikrobní látka dávkuje do vyhloubených jamek v agaru. Principem metody je difúze látky z disku či jamky horizontálně do okolního agaru v koncentračním gradientu. Účinná látka vytvoří kruhovou tzv. inhibiční zónu kolem disku. Citlivost mikroorganismu k testované látce se určí z velikosti inhibiční zóny. Velikost zóny je ovlivněna schopností antimikrobiální látky difundovat agarem, tloušťkou půdy a rychlostí růstu mikroorganismu. Čím se kmen množí pomaleji, tím je inhibiční zóna při stejné citlivosti kmene větší. Test využívá ke kultivaci Mueller-Hinton agar, v němž látky volně difundují. Tento test je pouze kvalitativní. Zjišťuje, zda je mikrob rezistentní či citlivý (Schindler, 2010; Bednář, 1996).

Diluční metoda

Tato metoda je kvantitativní a slouží ke zjištění míry citlivosti či rezistence testovaného mikroorganismu. Její podstatou je přidání antimikrobní látky do kultivačního media. Diluční test se provádí buď v bujonu na polystyrenových mikrotitračních destičkách či zkumavkách nebo lze antimikrobní látky přidávat do pevných půd. Principem agarové diluční metody je hodnocení minimální inhibiční koncentrace (MIC) na pevných půdách, které obsahují dané koncentrace antimikrobních látek. Na půdy je naočkováno inokulum a po kultivaci je sledován růst či absence kolonií. V případě dilučního testu na mikrotitračních destičkách se do jamek dávkuje tekuté médium obsahující různé koncentrace inhibičních látek a poté je každá jamka zaočkována suspenzí buněk. V tomto případě se po kultivaci MIC hodnotí buď vizuálně (nedochází k zakalení média), nebo pomocí měření absorbance či turbidimetrického stanovení (Schindler, 2010; Bednář, 1996).

1.3.2 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita esenciálních olejů hraje důležitou roli v prevenci a zpomalení oxidace lipidů jak v potravinách, tak kosmetice. Oxidační poškození lipidů vede ke vzniku nežádoucích chutí a vůní, čímž se snižuje kvalita a bezpečnost potravin a kosmetických přípravků. (Lee a Shibamoto, 2002). Kromě toho přispívají i k prevenci předčasného stárnutí kůže vyvolaného reaktivními formami kyslíku, které mohou poškodit biomakromolekuly v kůži (Ziosi *et al.*, 2010).

Antioxidační účinek závisí především na složení esenciálních olejů. Antioxidanty lze definovat jako molekuly schopné omezovat aktivitu volných kyslíkových radikálů, snižovat pravděpodobnost jejich vzniku nebo je převádět do méně reaktivních forem (Elshafie a Camele, 2017; Amorati, Foti a Valgimigli, 2013).

Esenciální oleje ze skořice, muškátového oříšku, hřebíčku, bazalky, petrželky, oregana a tymiánu se vyznačují největší antioxidační aktivitou. Je to dáno obsahem thymolu a karvakrolu, které mají fenolickou strukturu (Dhifi *et al.*, 2016). Potenciál fenolických složek vylučovat radikály lze vysvětlit schopností darovat atom vodíku z jejich hydroxylové skupiny. Působení antioxidantů fenolového typu probíhá radikálových mechanismem (Koroch, Rodolfo Juliani a Zygadlo, 2007).

1.4 Technologické postupy výroby esenciálních olejů

Kvalita esenciálních olejů závisí na stupni zralosti rostliny, podnebí, srážkách, zeměpisnému původu rostliny, ale také na způsobu jejich získávání. Esenciální oleje lze získat třemi způsoby a to destilací (parní destilace, hydrodestilace), extrakcí (enfleuráž, extrakce organickými rozpouštědly, superkritická fluidní extrakce) a lisováním (Başer a Buchbauer, 2020; Burt, 2004). Esenciální oleje jsou tvořeny jako sekundární metabolity rostlin. V mnoha případech jsou uloženy v olejových buňkách, žláznatých trichomech či sekrečních kanálcích (Ríos, 2016). Esenciální oleje mohou být získávány buď z celé rostliny nebo pouze z jednotlivých částí, nejčastěji jsou získávány z květů (šeřík, růže, jasmín), listů (máta, bobkový list, šalvěj), stonků (heřmánek, levandule), plodů (anýz, citrusy), semen (ibišek, muškátový oříšek, koriandr), oddenků (zázvor), kořene (kosatec) a dřeva (santalové dřevo, skořice, kadidlo) (Başer a Buchbauer, 2020; Dhifi *et al.*, 2016).

Parní destilace se od hydrodestilace liší tím, že nedochází k přímému kontaktu materiálu s vodou. V případě parní destilace je materiál umístěn na mřížce, pára unáší silice do chla-

diče a vzniklý kondenzát se shromažďuje v zásobníku. V případě hydrodestilace se materiál vaří a silice unášené párou kondenzují zpět do kapaliny. U obou metod se výsledný produkt odděluje na základě rozdílných hustot vhodnými postupy (Božović *et al.*, 2017; Cook a Lanaras, 2016;).

Enfleuráž je technologický postup získávání esenciálních olejů z okvětních lístků fialky nebo jasmínu, které se pokládají na skleněné desky s tenkou vrstvou vysoce kvalitního tuku bez zápachu. Esenciální olej absorbovaný v tuku se následně extrahuje alkoholem. Extrakce s použitím těkavých rozpouštědel, probíhá při teplotě 50 °C, čímž nehrozí degradace tepelně labilních sloučenin. Po extrakci a následné filtraci se esenciální olej izoluje odpařením těkavého rozpouštědla pomocí vakuové odparky. Výroba esenciálních olejů s použitím těkavých rozpouštědel nebo pomocí enfleuráže je drahá a časově náročná a využívá se při výrobě parfémů. Alternativou extrakčních postupů šetrných k životnímu prostředí je superkritická fluidní extrakce (SFE). Reakčním činidlem je oxid uhličitý v superkritickém stavu, což znamená, že byl vystaven teplotám a tlakům nad jeho kritickou hodnotu. Rozšiřuje se jako plyn, ale má hustotu kapaliny. Tím získá vlastnosti rozpouštědla, které je bez zápachu, bezbarvé, nehořlavé a s nízkou toxicitou ve srovnání s ostatními rozpouštědly. Oleje vyráběné touto metodou jsou velmi čisté a mají jedinečnou kvalitu. Negativem této metody je cenová nákladnost (Cook a Lanaras, 2016; Sovová a Stateva, 2011).

Lisování se výlučně používá pro citrusové plody (např. citron, pomeranč, bergamot). Získávání esenciálních olejů se provádí za studena, nedochází tak k tepelné degradaci složek esenciálního oleje (Baptiste Hounda Fokou, Michel Jazet Dongmo a Fekam Boyom, 2020). Působením tlaku a mechanickým válčováním kůry ovoce, ve které se nachází olejové buňky, dojde k samovolnému vytékání oleje, který je poté odplaven vodou. Olej je následně od vodné fáze oddělen centrifugací (Başer a Buchbauer, 2020; Cook a Lanaras, 2016).

1.5 Využití esenciálních olejů

Esenciální oleje obsahují mnoho bioaktivních sloučenin, které se kromě své vůně a chuti vyznačují antibakteriálními, antifungálními, antioxidačními, insekticidními, protizánětlivými, antikarcinogenogenními a analgetickými účinky. Více než 300 esenciálních olejů je využíváno v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, ve zdravotnictví a medicíně, aromaterapii, kosmetice a parfumerářství (Cook a Lanaras, 2016).

V potravinářském průmyslu se využívá asi 60 % produkce esenciálních olejů, primárně k ochucování potravinářských výrobků jako jsou uzená masa, alkoholické a nealkoholické nápoje, zmrzliny a cukrovinky (Cook a Lanaras, 2016). Esenciální oleje jsou i vhodnými přírodními látkami ke konzervaci potravin. Důvodem jejich aplikace je obsah bioaktivních látek, které jsou zodpovědné za antimikrobní a antioxidační účinky (López a Martos, 2018). K prodloužení trvanlivosti potravin se používá např. esenciální olej z oregana, hřebíčku, skořice nebo rozmarýnu. Bioaktivní látky karvakrol, cinnamaldehyd, eugenol a kafr obsažené v těchto olejích, jsou zodpovědné za antimikrobiální aktivitu (A. Shaaban, 2020). Způsob, jakým se esenciální olej do potravin přidává, je jedním z nejdůležitějších aspektů. Přímý přírůstek esenciálního oleje sebou nese některá rizika. Jedná se především o nízkou rozpustnost oleje ve vodě, vysokou těkavost, nízkou stabilitu a silný odér. Většina procesů zpracování potravin zahrnuje tepelné zpracování nebo expozici vzduchu či světla, což jsou faktory, které vedou k degradaci olejů a mohou tak znehodnocovat potraviny. Alternativním způsobem, jak zachovat jejich stabilitu, je zapouzdření do polymerních částic, liposomů nebo pevných lipidových nanočástic (López a Martos, 2018).

Obecně by esenciální oleje neměly být podávány k vnitřnímu použití nebo pro přímou aplikaci na kůži. Hrozí zde riziko alergické reakce, dermatitidy či fotosenzibilizace kůže. Avšak lokální aplikace zředěného levandulového a oregánového oleje podporuje hojení ran a popálenin. Ve farmacii se esenciální oleje využívají jako analgetika (hřebíčkový olej), antiseptika, jako součást nosních kapek a sprejů (olej z máty peprné) nebo jako pomocná látka léků proti kašli (olej z eukalyptu) (Cook a Lanaras, 2016). Některé esenciální oleje se používají k aromatizaci farmaceutických přípravků a ke zlepšení jejich chuti (Ríos, 2016).

Důvodem používání esenciálních olejů v kosmetice je především jejich vůně. Mastné kyseliny a povrchově aktivní látky používané v kosmetice často vykazují nepříjemnou vůni, a proto se přidávají k těmto výrobkům. Používají se jako vonné esence do dekorativní kosmetiky, vlasové kosmetiky, parfémů, prostředků péče o kůži a toaletních potřeb. Jedním z problémů v souvislosti s kosmetikou je fototoxicita esenciálních olejů. Po aplikaci přípravku obsahující esenciální olej a jeho vystavení slunečnímu záření se může objevit na kůži alergická kontaktní dermatitida (Sarkic a Stappen, 2018).

Esenciální oleje, jako součást masážní terapie mohou být inhalovány po přidání několika kapek do horké vody nebo pomocí rozprašovače či zvlhčovače. Kromě toho je lze aplikovat i jako obklady (Ríos, 2016).

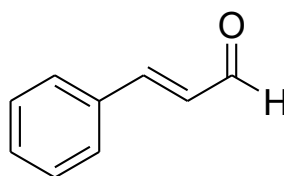
Dále se mohou využívat jako doplňky stravy pro zvířata nebo jako repelenty účinné proti komárům, blechám, klíšťatům, mouchám nebo vším (Cook a Lanaras, 2016).

1.6 Aktivní látky esenciálních olejů

V této kapitole jsou krátce popsány aktivní látky esenciálních olejů použitých při experimentu.

1.6.1 Cinnamaldehyd

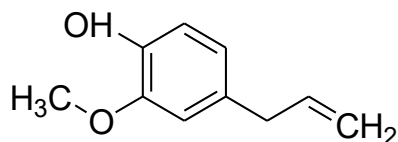
Cinnamaldehyd (Obr. 1) známý také jako skořicový aldehyd je nažloutlá kapalina, která se získává parní destilací ze skořicové kůry. Asi v 85 % je zastoupen ve skořicovém oleji. Molekula sestává z fenylové skupiny navázané na nenasycený aldehyd. Olej i čistý cinnamaldehyd působí inhibičně na řadu grampozitivních i gramnegativních bakterií, hub i kvasinek. Své uplatnění nachází v potravinářství, kde se využívá jako ochucovadlo do žvýkaček, zmrzliny, nápojů a cukrovinek a v parfumerářství jako součást sladkých a ovocných vůní. V zemědělství se využívá jako insekticid (Ashakirin *et al.*, 2017). V kosmetice se používá jako vonná přísada do dekorativní kosmetiky, šamponů, toaletních mýdel a čisticích prostředků pro domácnost (Cocchiara *et al.*, 2005).



Obrázek 1: Strukturní vzorec cinnamaldehydu (upraveno dle Ashakirin *et al.*, 2017)

1.6.2 Eugenol

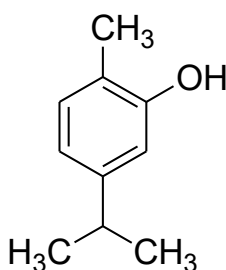
Eugenol (Obr. 2) je světle žlutá až bezbarvá aromatická olejovitá kapalina, která je hlavní složkou hřebíčkového oleje (70–80 %). V menší míře se nachází i v esenciálním oleji ze skořice cejlonské, muškátového oříšku, bazalky a pepře. Používá se k výrobě syntetického vanilinu. Existuje široká škála jeho použití v kosmetice, kde je součástí přípravků pro domácnost, vůní, mýdel a přípravků pro péči o pleť. Kvůli své aromaticčnosti se hojně využívá i v potravinářství nebo farmacii, dále pak jako přírodní analgetikum ve stomatologii. Má schopnost větší penetrace léků do kůže. Je také vhodný k léčbě kožních infekcí a onemocnění. Nadměrná dávka eugenolu je však toxická (Sarkic a Stappen, 2018).



Obrázek 2: Struktur-
ní vzorec
eugenolu (upraveno dle
Tao *et al.*, 2005)

1.6.3 Karvakrol

Karvakrol (Obr. 3) je kapalný monoterpenový fenol a vyskytuje se v řadě bylin ve vysokých koncentracích (De Vincenzi *et al.*, 2004). Nachází se jako součást esenciálního oleje z oregana (až 75 %), majoránky a tymiánu (Başer a Buchbauer, 2020). Karvakrol buď sám nebo v kombinaci s jinými látkami je účinný vůči potravinářským patogenům jako jsou *Bacillus subtilis*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus sakei*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*, tudíž se využívá jako konzervační přísada. Přítomnost volné hydroxylové skupiny a delokalizovaný elektronový systém hraje zásadní roli v jeho antibakteriální aktivitě. Ta se dokonce může zvyšovat v kombinaci s thymolem nebo s řadou antibiotik. Obecně je jeho antibakteriální aktivita silnější vůči grampozitivním než proti gramnegativním bakteriím (Wang *et al.*, 2016; Magi, Marini a Facinelli, 2015; Suntres, Coccimiglio a Alipour, 2014). V potravinářství má i funkci ochucovadla ve žvýkačkách, měkkých bonbonech, nealkoholických nápojích a pečivu (ULTEE *et al.*, 2000).

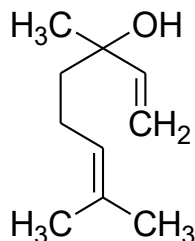


Obrázek 3: Struktur-
ní vzorec karvakrolu
(upraveno dle
Ben Arfa *et al.*,
2006)

1.6.4 Linalool

Linalool (Obr. 4) je monoterpenový alkohol, se sladkou příjemnou vůní, který lze nalézt v olejích z máty peprné, růže, levandule, citronu, bergamotu nebo skořice. Je kapalný a má bezbarvou až světle žlutou barvu se sladkou vůní. Používá se jako přísada do čistících

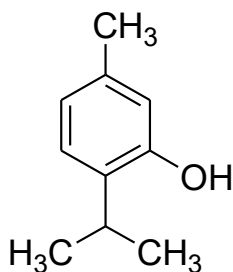
a pracích prostředků, osvěžovačů vzduchu, ale také do výrobků pro osobní péči. Linalool se může používat v kosmetice i jako konzervační činidlo, kvůli jeho antimikrobním účinkům (Sarkic a Stappen, 2018; Raguso a Pichersky, 1999).



Obrázek 4:
Strukturní vzorec
linaloolu (upraveno
dle Dhifi *et al.*,
2016)

1.6.5 Thymol

Thymol (Obr. 5) je monoterpenový fenol, derivát cymenu a izomeru karvakrolu, který je z 10–64 % obsažený v silici tymiánu. Narozdíl od již zmíněných aktivních látek, tvoří thymol bezbarvé a průsvitné krystaly. Má kořenitou, aromatickou vůni a sladkou chuť. Vyznačuje se antiseptickými, antimikrobiálními, insekticidními a antioxidantními účinky. Do potravin se přidává za účelem konzervace nebo jako aromatická přísada do nápojů a cukrovinek. V kosmetickém průmyslu může být součástí mýdel a pleťových vod nebo desinfekčních přípravků. Thymol, obvykle v kombinaci s glycerinem a alkoholem, bývá součástí ústních vod. Některé studie uvádí, že thymol může mít léčebné účinky na rány, nevolnost, únavu, nachlazení a akné. Podporuje posílení paměti a soustředění či pomáhá předcházet vzniku orálních infekcí (Salehi *et al.*, 2018).



Obrázek 5: Struk-
turní vzorec thy-
molu (upraveno
dle Marchese
et al., 2016)

2 CHARAKTERISTIKA BIOFILMU

2.1 Definice biofilmu

Biofilmy byly poprvé detekovány v roce 1684 Antoniem van Leeuwenhoekem, který pomocí svých jednoduchých mikroskopů pozoroval mikroorganismy ve vlastním zubním plaku. To, co objevil pojmenoval *animalcules* (Mazzoli, 2015). Tehdy se domníval, že se jedná o miniaturní živočichy. Neměl však tušení, že objevil bakterie žijící ve formě biofilmu. Lze mu tedy připisovat objev mikrobiálních biofilmů. (Donlan, 2002)

Mikroorganismy mohou žít ve dvou různých formách. Buď formě planktonu, kdy se jednotlivé buňky volně vznášejí v kapalném médiu, anebo ve formě biofilmu (Mazzoli, 2015). Donlan, (2002) definuje biofilm jako společenství mikroorganismů pevně připojených k povrchu a uzavřených v matrici z polysacharidové substance, kterou sami produkují. Tloušťka biofilmu závisí na tom, zda je složen z jednoho či více druhů mikroorganismů, které spolu interagují. Biofilm jednoho druhu je poměrně vzácný a má jednodušší stavbu. Mezi mikroorganismy, které tvoří biofilm se řadí bakterie, houby a protista (Chew a Yang, 2016; Malachová, 2004).

Biofilm se tvoří na široké škále různých povrchů včetně živých tkání, na lékařských zařízeních a pomůckách a také na potrubí průmyslových a pitných vod. Jsou široce distribuovány v přírodě (půda, horniny, potoky nebo kořeny rostlin). U člověka se lze setkat s biofilmem ať už komensálně nebo patogenně (Mazzoli, 2015). Tvorba biofilmů na lékařských zařízeních, jako jsou katétry nebo implantáty, často vede ke vzniku obtížně léčitelných infekcí (Lopez, Vlamakis a Kolter, 2010). Mezi bakteriální rody tvořící patogenní biofilmy patří *Escherichia*, *Listeria*, *Mycobacteria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Vibrio* (Rulík, 2011). Nacházejí se i v extrémních podmínkách pH v rozmezí 0,5–14 a teplotách od –5 do 120 °C (Schulte, Wingender a Flemming, 2005).

Život ve formě biofilmu přináší mikrobům řadu výhod. Jednou z nich je jeho ochranná funkce. Zvýšená odolnost vůči teplu, chladu, UV záření, fagocytóze, detergentům a antibiotikům, zachycování živin v biofilmu, mikro-difúze a disperze biofilmu s následnou tvorbou nových kolonií a zvýšená produkce toxinů podporuje mikrobiální přežití (Mazzoli, 2015). Ne všechny biofilmy jsou škodlivé. Metabolická činnost biofilmu má i prospěšnou roli v biotechnologiích a technologiích při čištění odpadních vod a u člověka jsou součástí střevní mikroflóry (Rulík, 2011).

2.2 Výskyt biofilmu

Typickým příkladem a nejdéle známým biofilmem v lidském těle je zubní plak. Jeho tvorbu podporuje sacharóza přítomná v potravě. V ústech je přítomno velké množství bakterií vylučující lepivou hmotu, do které ulpívají další bakterie a kvasinky. Plak se ztlušťuje a stává se málo propustným. Hladovějící bakterie začnou štěpit vlastní cukry za vzniku kyselin poškozující zubní sklovinu, což vede k tvorbě zubního kazu, jehož původcem jsou zejména streptokoky. Nedostatečná zubní hygiena může být důsledkem zánětu dásní (Rulík, 2011; Schindler, 2008).

Bakterie v podobě biofilmu rostou i na střevních sliznicích a na povrchu kůže. Jsou tedy součástí normální mikroflóry člověka. Kůže je největším orgánem lidského těla, která je kolonizována rozmanitými druhy mikroorganismů, které jsou neškodné nebo dokonce prospěšné. Biofilm naší normální mikroflóry chrání kůži před invazí patogenních mikroorganismů. Většina mikroorganismů se nachází v nejsvrchnější vrstvě pokožky (*stratum corneum*), dále kolonizují vlasové míšky a mazové žlázy. Množství a druhové zastoupení závisí na stupni hydratace pokožky, pH, dostupnosti živin, přítomnosti kyslíku, věku a pohlaví (Grice a Segre, 2011). Na druhou stranu, pokud biofilmy naší normální komenzální mikroflóry zmohutní, mohou vyvolat zánět nebo se jejich mikrobiální složka začne šířit do organismu. Jsou také kritickým prvkem u některých kožních onemocnění. Roli při infekci kůže a ran hrají i přechodné mikroorganismy (Rulík, 2011).

Biofilm však hraje nejčastější roli v infekcích uvnitř těla. Největším problémem v souvislosti s infekcemi je rezistence bakterií na antibiotika. Jedná se o infekce jako je bakteriální endokartitida, kdy se biofilm usazuje na srdečních chlopních a obtížně se léčí. V lékařské praxi se lze setkat s genetickým respiračním onemocněním, cystickou fibrózou. V raném stádiu je infekce způsobena stafylokoky, hemofily, pneumokoky, později se usazuje *Pseudomonas aeruginosa*. Ten po kolonizaci mění svůj fenotyp a začne produkovat viskózní hlen alginát. Bakterie úspěšně odolává imunitnímu systému člověka a léčba antibiotiky je téměř neúspěšná (Jamal *et al.*, 2018; Rulík, 2011; Schindler, 2008).

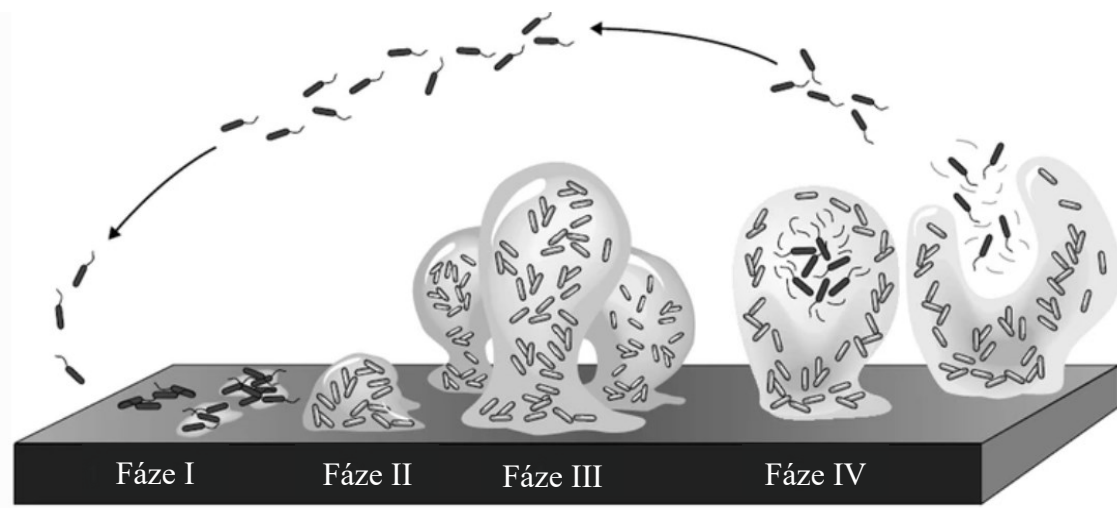
Bakterie mají tendenci ulpívat a tvořit biofilm na pomůckách zavedených do tělních dutin, jako jsou močové katétry a katétry zavedené do žil, na nitroděložních tělískách nebo na kloubních náhradách. Biofilm se tvoří i při nesprávném používání kontaktních čoček (Rulík, 2011; Schindler, 2008).

V přírodě se s biofilmy lze setkat na povrchu kamenů nebo na skalnatých pobřežích moří. Mohou se vyskytovat na trupech lodí a v průmyslových potrubních systémech. Zde mohou napáchat značné škody, neboť znečišťují povrchy, na nichž se tvoří, případně je i poškozují korozí (Rulík, 2011). V systémech distribuce pitné vody se mohou tvořit biofilmy patogenních mikroorganismů (*Legionella*, *Mycobacterium*, *Aeromonas*), které se mohou uvolňovat do vody a představovat tak riziko pro lidské zdraví. Používané techniky desinfekce pitné vody jsou obvykle neúčinné (Rulík, 2011; Schulte, Wingender a Flemming, 2005).

Bakterie tvořící biofilm vykazují vyšší metabolickou činnost ve srovnání s planktonními bakteriemi, čehož lze využívat v čističkách odpadních vod nebo chladících okruzích elektráren. (Rulík, 2011).

2.3 Tvorba biofilmu

Vývoj komunity biofilmu probíhá v několika fázích, formuje se několik hodin a je ovlivněn okolním prostředím. Tvorbu biofilmu reguluje několik klíčových kroků: počáteční připojení k povrchu (adheze), růst a proliferace, zrání (maturace) biofilmu a uvolnění (disperze) viz (Obr. 6) (McCarty *et al.*, 2014).



Obrázek 6: Tvorba biofilmu (upraveno dle Srivastava a Bhargava, 2016)

Fáze I – připojení (adheze)

Rozhraní pevná látka-kapalina je ideální prostředí pro připojení a růst mikroorganismů, ale lze je nalézt i na rozhraní voda-vzduch nebo pevná látka-vzduch (Schulte, Wingender a Flemming, 2005; Donlan, 2002). V počáteční fázi se planktonické buňky připevňují na povrch slabými reverzibilními van der Waalsovými interakcemi. Pevný povrch může mít

několik charakteristik, které jsou důležité v procesu připevnění. Rozsah mikrobiální kolonizace se zvyšuje se zvyšující se drsností povrchu. Mikroorganismy se mnohem rychleji připojují k hydrofobním nepolárním povrchům, jako je teflon nebo plast než k hydrofilním povrchům jako je sklo nebo kov (Donlan, 2002). Adheze je také ovlivněna přítomností buněčných struktur jako jsou fimbrie nebo bičíky (McCarty *et al.*, 2014).

Fáze II – růst a proliferace

Po reverzibilním připojení následuje růst a proliferace, při které se buňky začínají dělit a množit se za vzniku mikrokolonií. Při kolonizaci začnou buňky produkovat a obalovat se slizovitou a lepkavou matricí tzv. extracelulární polymerní matricí (EPM) (McCarty *et al.*, 2014). Tato matrice zahrnuje až 90 % celkové biomasy a je tvořena primárně z polysacharidů. Mikroorganismy jsou v ní rozloženy nerovnoměrně a rostou v mikrokoloniích kuželovitého nebo houbovitého tvaru (Mazzoli, 2015; Schindler, 2001). Výsledná morfologie biofilmu může být hladká, drsná, načechraná nebo vláknitá (Flemming a Wingender, 2010). Bakterie rostoucí v biofilmu rostou pomaleji než planktonní formy. Důvodem je pravděpodobně omezené množství živin nebo kyslíku (Donlan, 2001).

Fáze III – zrání (maturace)

V předposlední fázi dochází ke zrání, neboli maturaci biofilmu. Jedná se o děj ireverzibilní. Buňky mezi sebou komunikují prostřednictvím quorum sensing, dochází ke změně fenotypu buněk, k tvorbě mikrokanálek a vytváří se veškerá odolnost biofilmu (McCarty *et al.*, 2014).

Fáze IV – uvolnění

Jakmile se vytvoří zralý biofilm, některé buňky přechází do planktonického stavu a jsou schopné se připojit k novému povrchu a vyvinout další biofilm na novém místě (McCarty *et al.*, 2014; Ray a Bhunia, 2014). Příčinou může být zvyšující se konkurence a neúnosnost jejich další existence ve společenství (Schindler, 2001). Buňky prostřednictvím chemických signálů upozorňují okolní buňky na svou přítomnost a zabraňují tak zvýšení hustoty populace. Bakterie se z biofilmu mohou uvolňovat ve shlucích nebo po jednotlivých buňkách (Rulík, 2011).

2.4 Složení a vlastnosti biofilmu

2.4.1 Extracelulární polymerní matrice

Biofilmy jsou heterogenní systémy obsahující mikrokolonie bakteriálních buněk, které jsou obklopeny slizovitou matricí z extracelulárních polymerních látek a od ostatních mikrokolonií oddělené vodními kanálky. V těchto kanálcích dochází ke transportu a difúzi živin, kyslíku i antimikrobních látek (Donlan, 2002). Extracelulární polymerní matrice (EPM) je produkována samotnými bakteriemi, tvoří trojrozměrnou strukturu biofilmu a je zodpovědná za adhezi k povrchům a soudržnost biofilmu (Flemming a Wingender, 2010). Je vysoce hydrofilní a prostřednictvím vodíkových vazeb může vázat velké množství vody a tím zabraňovat vysušení biofilmu (Donlan, 2002). Díky tvorbě EPM jsou bakterie odolné vůči oxidačnímu stresu, UV záření, desinfekčním prostředkům, lidskému imunitnímu systému i dalším faktorům a také jsou méně citlivé na antibiotika (Mazzoli, 2015).

Množství produkované EPM závisí na druhu mikroorganismu a stáří biofilmu. Produkce je také ovlivněna stavem živin růstového média a množstvím dostupného uhlíku. K větší produkci EPM přispívá i pomalý růst bakterií. Může představovat 50 – 90 % celkové hmoty a lze ji považovat za primární matrici biofilmu. Je složena především z vody, která může být v biofilmu vázaná v kapsulích mikrobiálních buněk, nebo slouží jako rozpouštědlo. Dále pak z proteinů, lipidů, lipopolysacharidů, nukleových kyselin a polysacharidů. Právě tyto molekuly jsou zodpovědné za veškerou funkci EPM (Donlan, 2002). Zejména pak polysacharidy, které jsou zodpovědné za adhezi a za zachování strukturální integrity. Většinou se jedná o dlouhé, lineární nebo rozvětvené molekuly. (Flemming a Wingender, 2010). Polysacharidy, mohou být neutrální nebo aniontové, jako tomu je v případě EPM gramnegativních bakterií. Aniontový charakter je zajištěn přítomností uronových kyselin. Tato vlastnost je důležitá, protože umožňuje asociaci vápníku a hořčíku, které se síťují s polymerními vlákny a poskytují tak větší vazebnou sílu ve vzniklém biofilmu (Donlan, 2002). Nejběžnějším exopolysacharidem je alginát vylučovaný gramnegativní tyčinkou *Pseudomonas aeruginosa* (Flemming a Wingender, 2010). V případě některých grampozitivních bakterií, může být chemické složení EPM zcela odlišné a vykazuje spíše kationtový charakter (Donlan, 2002). Polysacharidy v biofilmu tak fungují jako lešení, do kterého jsou mikrobiální buňky a jejich bioaktivní složky zanořeny (Chew a Yang, 2016).

Proteiny přítomné v EPM zajišťují růst biofilmu a přežití buněk, podílí se na regulaci integrity a stabilitě biofilmu. EPM obsahuje také několik extracelulárních enzymů mající

schopnost degradace některých složek EPM na produkty s nízkou molekulovou hmotností, které mohou být asimilovány a použity jako zdroj energie. Některé enzymy mohou poškozovat povrchy, na kterých se biofilm tvoří (Flemming a Wingender, 2010).

Extracelulární DNA obsažená v matrici, je identická nebo velmi podobná genomové DNA a v přirozeném prostředí slouží pro horizontální přenos genů (Madsen *et al.*, 2012). Mechanismy uvolňování jsou doposud nejasné, avšak značná část pochází z odumřelých buněk mikrobiální populace. Sekrece extracelulární DNA může být zprostředkována i přes vezikuly z membrány (Whitchurch, 2002).

2.4.2 Rezistence k antimikrobním látkám

Existuje mnoho teorií, proč jsou bakterie v biofilmu rezistentnější než planktonické formy. Uvádí se, že biofilmy jsou 10krát až 1000krát odolnější k široké škále antimikrobních látek než odpovídající planktonické buňky (Schulte, Wingender a Flemming, 2005). Jedna z nejzjevnějších příčin zvýšené rezistence k antimikrobiálním látkám je tvorba EPM. Její vysoká hustota a vazebná síla umožňuje snížit penetraci antimikrobiálních látek do hlubších částí biofilmu (Chew a Yang, 2016; Mah a O'Toole, 2001). Mezi další mechanismy podílející se na rezistenci biofilmu k antimikrobiálním látkám patří pomalý růst v důsledku nedostatku živin, stresová odpověď, heterogenita mikrobiální populace, změna fenotypu specifického pro biofilm, pozměněný metabolismus nebo nárůst perzistentních buněk v biofilmu (Rulík, 2011; Schulte, Wingender a Flemming, 2005; Mah a O'Toole, 2001).

Začnou-li bakteriální buňky v biofilmu hladovět, jejich růst se zpomalí. Přejít z exponenciální fáze růstu na pomalý nebo žádný růst je doprovázen zvýšením odolnosti k antimikrobiálním látkám (Mah a O'Toole, 2001).

Každá buňka v biofilmu žije za trochu odlišných podmínek než ostatní buňky, a proto roste různou růstovou rychlostí. K heterogenitě uvnitř biofilmu také přispívají gradienty živin, různé odpadní produkty, a četné signální faktory. Díky této heterogenitě se v biofilmové populaci nalézají buňky s mnoha odlišnými projevy fenotypu (Rulík, 2011).

Indukce biofilm-specifického fenotypu u určité subpopulace buněk je další teorií mechanismu rezistence. Tento fenotyp může vést k vyloučení aktivních mechanismů potlačujících účinky antimikrobních látek. Je možné, že fenotyp zvýšené rezistence k antimikrobiálním látkám je vylučován buď všemi nebo jen určitou částí buněk v biofilmu a může být indukován určitým typem stresu, nedostatkem živin nebo vysokou hustotou bakteriálních buněk (Rulík, 2011; Mah a O'Toole, 2001).

Buňky uvnitř biofilmu odpovídají na různé chemické látky syntézou σ faktorů (Mah a O'Toole, 2001). Tyto faktory regulují transkripci genů, jejichž produkty pak zmírňují účinky stresu. Syntézou produktů těchto genů bakterie odpovídají na působení stresových faktorů, což pak vede k určitým fyziologickým změnám, např. ke změně permeability buněčné membrány (Rulík, 2011).

Role komunikačního systému quorum sensing v rezistenci k antimikrobiálním látkám je dle Mah a O'Toole, (2001) doposud zcela nejasná. Teorii, že quorum sensing hraje určitou úlohu v rezistenci k antimikrobiálním látkám posiluje fakt, že rezistentní bakterie mohou svou citlivost nabýt, jsou-li přeneseny do čerstvého média, čímž se snižuje koncentrace mezibuněčných signálních molekul. Rezistence biofilmu k antimikrobiálním látkám je spíše fenotypového typu než výsledek genetických změn (Rulík, 2011).

2.4.3 Mezibuněčná komunikace – quorum sensing

Bakterie využívají quorum sensing k regulaci různých situací jako je např. produkce toxinů exopolysacharidů, tvorba biofilmů, regulace faktorů virulence nebo koordinace pohyblivosti (Klaban, c2011). Tento druh komunikace byl poprvé objeven v 70. letech 20. století u mořské bakterie *Vibrio fischeri* u níž kontroluje luminiscenci. Tyto bakterie mají schopnost být jakýmsi světelným orgánem v symbióze s určitými mořskými organismy. Luminiscence jsou schopné tehdy, když dosáhnou dostatečné buněčné hustoty (Rulík a Holá, 2012).

Quorum sensing je druh komunikace mezi bakteriemi, která reguluje expresi genů (Čermák, c2008). Aby byla aktivita bakterií před nějakou činností úspěšná, musí dosáhnout tzv. kritické (minimální) koncentrace. Právě této minimální hranici počtu bakterií se říká quorum. Toto quorum si však musí bakterie navzájem sdělit a to vzájemnou komunikací zvanou sensing. Tato komunikace je zprostředkována malými chemickými signálními molekulami tzv. autoinduktory. Jejich koncentrace je závislá na hustotě populace (Klaban, c2011). Při dostatečné populační hustotě dosahují tyto signální molekuly požadovaných koncentrací, což vede k aktivaci genů a diferenciaci biofilmu. U gramnegativních bakterií se jedná o acylované homoserinové laktony složené z mastné kyseliny a aminokyseliny serinu a u grampozitivních bakterií o oligopeptidy, které lze přirovnat k feromonům či hormonům (Başer a Buchbauer, 2020; Rulík, 2011; Čermák, c2008).

Komunikaci mezi buňkami lze rozdělit do tří fází: detekce, přenos signálu a odpověď (Başer a Buchbauer, 2020). Bakterie používající quorum sensing mají na svém povrchu

receptory, které mohou detekovat signální molekuly sousedních buněk. Když se autoinduktor naváže na receptor, dochází k aktivaci transkripce genů a také genů pro syntézu vlastního induktoru. Aby došlo k indukci transkripce určitého genu, musí se buňka setkat se signálními molekulami ostatních buněk. Pokud se v prostředí vyskytuje pouze jedna nebo malé množství bakterií, snižuje se koncentrace induktoru a ostatní bakterie nejsou informovány, protože jej nedokáží zachytit. Pokud však koncentrace bakterií vzroste, je produkováno dostatečné množství induktoru, kterého je dostatek i pro ostatní buňky populace. Teprve v tomto okamžiku je autoinduktor schopen se navázat na receptory ostatních buněk a vyvolat tak aktivaci genů např. pro syntézu patogenních faktorů či enzymů (Klaban, c2011).

2.4.4 Horizontální přenos genů

Přenos genů z jedné buňky na druhou se může uskutečnit pomocí konjugace, transformace a transdukce. Konjugace je přímý přenos DNA z jedné bakteriální buňky do druhé, který je podmíněn přítomností kruhové molekuly dvouřetězcové DNA – plazmidu. Plazmidy kódují povrchové struktury (pili), pomocí nichž se dvě bakterie spojí a přenesou si DNA plazmidu. V případě, že bakterie vycytávají DNA ze svého okolí, jedná se o transformaci. Třetím typem přenosu genů je transdukce, která je závislá na přítomnosti bakteriofágů. Bakteriální buňky infikované bakteriofágem slouží k jejich pomnožení. To následně vede k lýzi buňky a uvolnění fágů do prostředí. (Rogers, 2019; Heuer a Smalla, 2007). Cizorodá DNA se do bakteriálního genomu včleňuje rekombinací nebo integrací. Rekombinace se děje v případě, že se jedná o DNA příbuzných druhů bakterií, a integrace, v případě když jde o DNA fágů, která je včleněna do bakteriální DNA pomocí enzymů (Šíma a Trebichavský, 2006).

Dle Srivastava a Bhargava, (2016) je konjugace pravděpodobným mechanismem přenášení genů v populaci biofilmopozitivních bakterií. Díky blízkému kontaktu buněk v matici, probíhá konjugace mezi buňkami v biofilmech rychleji než mezi buňkami planktonickými. Horizontální přenos genů umožňuje bakteriím vznik rezistence na antibiotika a předávání této vlastnosti na jiné bakterie (Šíma a Trebichavský, 2006).

2.5 Detekční metody tvorby biofilmu

Metody, kterými lze otestovat tvorbu biofilmu patří metody fenotypové a genotypové. Mezi fenotypové metody řadíme Christensenovu metodu, jejíž principem je obarvení fixované vrstvy biofilmu krystalovou violetí na dně či stěnách mikrotitrační destičky nebo zkumavky. Tvorba biofilmu je považována za pozitivní, jestliže se vytvoří vrstva na stěně zkumavky. Tento test se hodnotí pouhým okem, přesnější je spektrofotometrické vyhodnocení mikrotitrační destičky. Dále je možné využít kultivace na agaru s kongo-červení, na kterém biofilm pozitivní bakterie rostou v černých koloniích s matným povrchem. Biofilm negativní bakterie pak rostou v lesklých koloniích s červeným nebo červenohnědým zbarvením (Žurková, 2019).

V případě genotypových metod je detekce založena na průkazu genů (např. průkaz přítomnosti *ica* operonu u *Staphylococcus aureus*), které jsou potřebné pro adhezi nebo se podílejí na tvorbě EPM. Přítomnost takových genů lze otestovat pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (RT-PCR) nebo fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Nevýhodami obou metod jsou vysoké náklady a přesnost při přípravě vzorů (Kırmusaoğlu, 2019; Nourbakhsh a Namvar, 2016; Srivastava a Bhargava, 2016).

Další metody využívají buď rozdílů povrchového náboje, přítomnosti či nepřítomnosti specifických povrchových antigenů nebo hydrofobnost či hydrofilnost mezi biofilm pozitivními a biofilm negativními bakteriemi (Rulík, 2011).

Pro posouzení metabolické aktivity bakterií uvnitř biofilmu lze využít MTT test, jehož principem je redukce žlutého MTT živými buňkami na fialový formazan. Ten se následně rozpustí pomocí dimethylsulfoxidu. Vyluhované barvivo se stanovuje spektrofotometricky a jeho množství je přímo úměrné množství živých buněk (Riss, 2018). K posouzení životaschopnosti a kvantifikaci skutečného počtu životaschopných buněk v biofilmu lze využít i test s barvivem resazurin, Nevýhodou je však snížení účinnosti resazurinu v přítomnosti antibakteriálních látek. K počítání živých bakterií v biofilmu a k vyhodnocení citlivosti biofilmu na antibiotika lze využít kolorimetrický BioTimer test (BTT). Jedná se o nízkonákladovou a snadno proveditelnou metodu. Metoda je však nevhodná pro hodnocení vícedruhového biofilmu (Srivastava a Bhargava, 2016).

Při zkoumání struktury a tvorby biofilmové vrstvy a její fyziologie mají význam i mikroskopické techniky. Světelná mikroskopie patří mezi nejzákladnější metody používané pro výzkum biofilmů. Slouží pro průkaz již vytvořeného biofilmu na průhledných materiálech.

Strukturu biofilmu lze zvýraznit pomocí vhodných barviv. Nevýhodou je však možnost pozorovat pouze tenké biofilmy. Fluorescenční mikroskopie je metoda, kterou lze pozorovat biofilm vytvořený na povrchu neprůhledných materiálů (Rulík, 2011). Principem fluorescenční mikroskopie je absorpce krátkovlnného viditelného světla nebo UV světla určité vlnové délky látkou a jeho vyzáření o vlnové délce delší než je světlo absorbované. Při ozáření dochází k absorpci energie elektrony v základním stavu, což následně vede k jejich excitaci do vyšší energetické hladiny. V tomto stavu jsou elektrony nestabilní, a proto se vracejí zpět do základního stavu. Přechod elektronu z vyšší energetické hladiny do nižší je doprovázen vyzářením fotonu (Kočárek, Pánek a Novotná, 2010). Výhodou fluorescenční mikroskopie je možnost posoudit metabolickou aktivitu buněk uvnitř biofilmu s použitím fluorescenčních barviv (Rulík, 2011). K pozorování silných biofilmů slouží konfokální skenovací mikroskopie, která umožňuje pozorovat strukturu biofilmu včetně zobrazení jeho průřezu a měření jeho tloušťky. Pomocí analýzy obrazu pak lze zhotovit skutečnou trojrozměrnou strukturu biofilmu. Pro přímé zobrazení trojrozměrné struktury biofilmu včetně hydratovaných struktur, lze využít rastrovací elektronovou mikroskopii. Nevýhodou posledních dvou zmíněných metod je poměrně vysoká cena a náročné zpracování vzorků. (Rulík, 2011)

V neposlední řadě je také nutno zmínit hmotnostní spektrometrii, kterou lze detekovat a charakterizovat proteiny lokalizované v EPM. Výhodou metody je použití minimálního množství vzorku a vysoká citlivost (Kırmusaoğlu, 2019).

3 CÍLE PRÁCE

- Kvalitativní testování citlivosti vybraných druhů bakterií k aktivním látkám esenciálních olejů pomocí diskové difúzní metody,
- stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) aktivních látek esenciálních olejů pomocí diluční metody na mikrotitrační destičce se spektrofotometrickým vyhodnocením,
- průkaz tvorby biofilmu v přítomnosti aktivních látek s využitím Christensenovy metody na mikrotitrační destičce,
- na základě vyhodnocení výsledků porovnat antibakteriální účinnost všech testovaných aktivních látek jak na růst jednotlivých kmenů bakterií, tak na tvorbu biofilmu.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MIKROORGANISMY, MATERIÁL A ZAŘÍZENÍ

4.1 Bakteriální kultury

V experimentu bylo nejprve použito 10 kmenů a jeden bakteriální druh, které byly podrobeny kultivaci v čistém bujonu po dobu 24, 48 a 72 hodin. Christensenovou metodou na mikrotitrační destičce bylo zjištěno, že pouze 5 kmenů a jeden druh tvořil biofilm. Bakterie byly získány ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Lactoflora (CCDM) nebo z České sbírky mikroorganismů (CCM). Jednalo se o grampozitivní a gramnegativní bakterie: *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420, *Proteus mirabilis* CCM 7188, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a *Bacillus subtilis* (R25), který byl poskytnut z Ústavu mlékárenského v Praze a jeho identifikace byla provedena již dříve v rámci bakalářské práce.

4.2 Živná média

V experimentu byly použity dvě různá živná média. Pro bakteriální kmeny *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420, *Proteus mirabilis* CCM 7188 a bakteriální druh *Bacillus subtilis* (R25) byl použit bujon mozkosrdcové infúze (BHI, Brain Heart Infusion Broth, HiTech, Bombaj, Indie) a pro bakteriální kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 médium M17 Broth (HiMedia, Bombaj, Indie).

Při přípravě tekutého živného média byla půda BHI nebo M17 Broth navážena s přesností na 0,01 g. Oba bujony byly obohaceny o 5 % sacharózy (HiMedia, Bombaj, Indie), protože se uvádí, že podporuje tvorbu biofilmu (Schindler, 2001). Půda se sacharózou byla rozpuštěna v požadovaném množství destilované vody a následně sterilována v autoklávu Systec 2540 EL (Systec, Linden, Německo) při teplotě 121 °C po dobu 15 min. Pro přípravu pevné půdy byla použita půda BHI nebo M17 spolu s agarem (Agar, Type I, HiMedia, Bombaj, Indie) za účelem ztuhnutí. Bujon byl pipetován do zkumavek v množství 4,5 ml a půda s agarem byla rozlita do Petriho misek. Pevná půda sloužila k uchování bakterií.

4.3 Chemikálie

- Ethanol denaturovaný, 96% (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- Krystalová violet (Penta, Praha, ČR)
- Fyziologický roztok
- Aktivní látky esenciálních olejů: cinnamaldehyd (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, USA), eugenol (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, USA), karvakrol (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, USA), linalool (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, USA), thymol (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, USA)

4.4 Zařízení a pomůcky

- Biohazard box EUROFLOW (Schoeller Instruments, ČR)
- Autokláv Systec 2540 EL (Linden, Německo)
- Biologický termostat Memmert INE 600 (Memmert, Schwabach, Německo)
- Tecan infinite M200Pro (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)
- Denzitometr Denzilometr (Erba Lachema s.r.o., ČR)
- Analytické váhy Adventurer Pro 500 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Vortex IKA MS 3 basic
- Laboratorní předvážky KERN
- Kahan
- Automatické mikropipety
- Laboratorní sklo a plast (Petriho misky, mikrotitrační destičky, kádinky, zkumavky, odměrné válce, zásobní láhve)
- Sterilní disky, bakteriologické kličky, pinzety a další běžné laboratorní pomůcky

5 METODIKA PRÁCE

Experimentální část diplomové práce má dvě části. V první části byly testovány antimikrobní účinky aktivních látek esenciálních olejů pomocí difúzní a diluční metody. Ve druhé části byl testován inhibiční účinek na tvorbu biofilmu v časech 24, 48 a 72 hodin pomocí Christensenovy metody na mikrotitrační destičce.

5.1 Příprava bakteriální suspenze

Bakteriální suspenze byla připravena zaočkováním tekutého živného media se sacharózou pomocí sterilní kličky kulturou z Petriho misky. Suspenze byla kultivována v termostatu Memmert INE 600 (Memmert, Schwabach, Německo) po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C. Tato bakteriální suspenze byla zředěna ve fyziologickém roztoku tak, aby hodnota denzitometru (Denzilometr, Erba Lachema s.r.o., ČR) odpovídala 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice.

5.2 Příprava zásobních roztoků aktivních látek esenciálních olejů

Pro experimentální část bylo nejprve nutné připravit zásobní roztoky aktivních látek o koncentraci 5 %. Zásobní roztok byl připraven navážením 0,5 g aktivní látky s přesností na 0,001 a jejím rozpuštěním v 9,5 ml 96% ethanolu. Zásobní roztoky byly uchovávány v lednici.

5.3 Stanovení antibakteriální aktivity difúzní metodou

Na povrch agaru BHI nebo M17 bylo rovnoměrně napipetováno 100 µl předem připraveného zředěného inokula. Poté bylo na sterilní disky aplikováno pomocí automatické mikropipety 10 µl 5% zásobního roztoku aktivních látek esenciálních olejů a destilovaná voda. Po odpaření ethanolu byly disky sterilní pinzetou umístěny na agarovou plotnu. Disk s destilovanou vodou sloužil jako negativní kontrola a nebyl zde očekáván vznik inhibiční zóny. Na jednu Petriho misku bylo tedy umístěno 6 papírových disků. Celý postup byl prováděn za aseptických podmínek v Biohazard boxu EUROFLOW (Schoeller, Instruments, ČR). Kultivace probíhala v termostatu po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C. Po kultivaci byl měřen průměr inhibičních zón každého disku pomocí pravítka. Průměr jednoho disku činil 6 mm.

5.4 Stanovení antibakteriální aktivity diluční metodou

Vliv antibakteriální aktivity aktivních látek esenciálních olejů na růst bakterií byl sledován pomocí diluční metody na mikrotitrační destičce. Do jamek bylo dávkováno tekuté živné médium obsahující různé koncentrace aktivních látek a následně zaočkováno definovaným inokulem. MIC byla vyhodnocena měřením absorbancí po dobu 24 hodin.

5.4.1 Příprava pracovních roztoků aktivních látek esenciálních olejů

Požadovaná koncentrace pracovních roztoků aktivních látek byla připravena přidáním příslušného množství zásobního roztoku do 4 ml tekutého živného media se sacharózou viz Tab. 1. Každá aktivní látka byla testována v koncentracích 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 250 a 500 mg/l. Pro každou destičku byly pracovní roztoky připraveny nové.

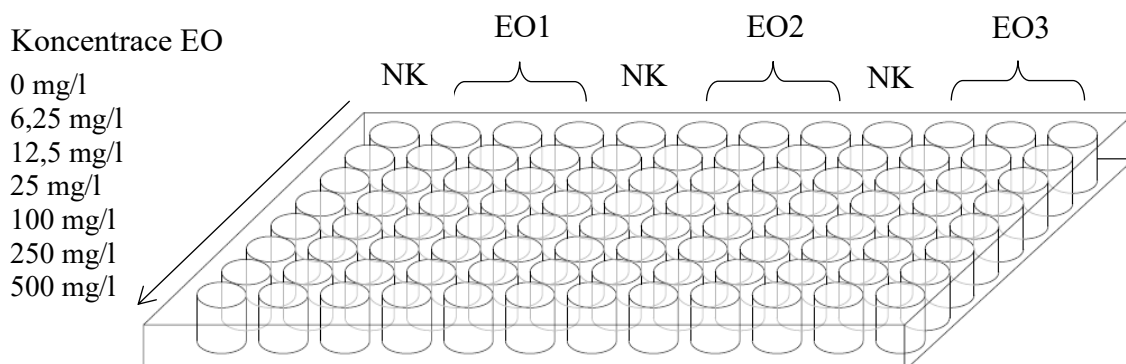
Tabulka 1: Pipetované objemy pro přípravu pracovních roztoků aktivních látek

| Koncentrace aktivní látky [mg/l] | Pipetovaný objem zásobního roztoku [μl] |
|-------------------------------------|--|
| 6,25 | 0,5 |
| 12,5 | 1 |
| 25 | 2 |
| 50 | 4 |
| 100 | 8 |
| 250 | 20 |
| 500 | 40 |

5.4.2 Příprava mikrotitrační destičky

Připravené pracovní roztoky s požadovanými koncentracemi byly pipetovány do 96 jamkové mikrotitrační destičky v množství 200 μl. Schéma přípravy mikrotitrační destičky je na Obr. 7. Symboly EO1–EO3 značí tři různé aktivní látky esenciálních olejů. Koncentrace aktivní látky byly pipetovány vzestupně od 6,25 mg/l do 500 mg/l. Každá aktivní látka v každé koncentraci byla pipetována ve třech opakováních. Všechny tyto jamky byly zaočkovány 5 μl zředěného inokula, kromě prvního, pátého a devátého sloupce. Ty sloužily jako negativní kontrola (NK) a jednalo se pouze o čistý bujon bez inokula. V první řadě byl pipetován čistý bujon, který byl zaočkován 5 μl zředěného inokula pro příslušné sloup-

ce aktivních látek. Jamky, ve kterých rostly bakterie pouze v čistém bujonu bez přidavku aktivních látek, sloužily jako pozitivní kontrola. Na mikrotitrační destičce byl testován pouze jeden bakteriální kmen.



Obrázek 7: Schéma přípravy mikrotitrační destičky (upraveno dle Žurková, 2019)

Připravená mikrotitrační destička byla vložena do přístroje Tecan infinite M200Pro (Tecan, Männedorf, Švýcarsko), ve kterém byla měřena změna optické density suspenze buněk po dobu 24 hodin. Na přístroji byly nastaveny následující podmínky analýzy: míchání po dobu 15 sekund s frekvencí 2 mm před každým měřením, měření optické density po půl hodinových intervalech při vlnové délce 600 nm a teplota kultivace 30 °C. Data byla zaznamenávána softwarem Microsoft Excel 2010. Z naměřených hodnot optické density byl vypočítán průměr a sestrojena růstová křivka pro jednotlivé koncentrace aktivních látek daného bakteriálního kmene.

5.5 Detekce biofilmu – Christensenova metoda

Pro detekci tvorby biofilmu v přítomnosti aktivních látek byla zvolena standardní Christensenova metoda v mikrotitrační destičce. Průkaz tvorby biofilmu byl sledován po 24, 48, 72hodinové kultivaci. Destička byla připravena, tak jak je popsáno v kapitole 5.4.2. Obsah jamek destičky byl po výše uvedené kultivaci opatrně vylit a jamky byly třikrát promyty vodou, aby se odstranila planktonická fáze a poté fixovány denaturovaným ethanolem po dobu 20 minut. Po fixaci byly jednotlivé jamky obarveny krystalovou violetí po dobu 20 minut. Poté bylo barvivo z jamek odstraněno a jamky promyty vodou. Po usušení byly jednotlivé jamky naplněny 250 µl 96% ethanolu (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR), který vyluhoval barvivo z vytvořené vrstvy biofilmu. Intenzita zbarvení výluhu v jednotlivých jamkách byla měřena na přístroji Tecan infinite M200Pro při vlnové délce 600 nm.

V tomto pokusu byl proveden i kontrolní slepý vzorek, tj. čistý bujon s aktivními látkami, z důvodu vyloučení možnosti tvorby olejového filmu na povrchu jamek, který by potenciálně mohl znehodnocovat barvení biofilmu. Slepý vzorek byl proveden u všech aktivních látek pro všechny koncentrace.

Z naměřených hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka optické denzity negativních kontrol (OD_{NK}). Hraniční hodnota pro pozitivitu (OD_H) byla vypočítána jako součet trojnásobku směrodatné odchylky a OD_{NK} ($OD_H = OD_{NK} + 3 \times \text{směrodatná odchylka } OD_{NK}$). Výsledky měření lze rozdělit do tří kategorií na základě porovnání vypočtených OD s hraniční hodnotou OD_H :

- Kmen netvořící biofilm: $OD \leq OD_H$
- Kmen se slabou tvorbou biofilmu: $OD_H < OD \leq 2OD_H$
- Kmen se silnou tvorbou biofilmu: $2OD_H < OD$

6 VÝSLEDKY

6.1 Difúzní metoda

Byla otestována antibakteriální účinnost aktivních látek esenciálních olejů s použitím agarové difúzní metody. Průměr inhibičních zón jednotlivých aktivních látek je zaznamenán v Tab. 2.

Tabulka 2: Průměry inhibičních zón na kultivační půdě

| Kultivační půda | Bakterie | Průměr inhibiční zóny [mm] | | | | | |
|--------------------|----------|----------------------------|---------------|---------|-----------|----------|--------|
| | | H ₂ O | Cinnamaldehyd | Eugenol | Karvakrol | Linalool | Thymol |
| BHI | R25 | 0 | 8 | 8 | 15 | 7 | 15 |
| | 4420 | 0 | 10 | 9 | 14 | 0 | 15 |
| | 7188 | 0 | 13 | 9 | 12 | 0 | 12 |
| | 4224 | 0 | 10 | 0 | 9 | 0 | 9 |
| M17 | 48 | 0 | 13 | 8 | 18 | 0 | 19 |
| | 824 | 0 | 5 | 0 | 9 | 0 | 9 |

Pozn.: R25 – *Bacillus subtilis*; 4420 – *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420; 7188 – *Proteus mirabilis* CCM 7188; 4224 – *Enterococcus faecalis* CCM 4224; 48 – *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48; 824 – *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

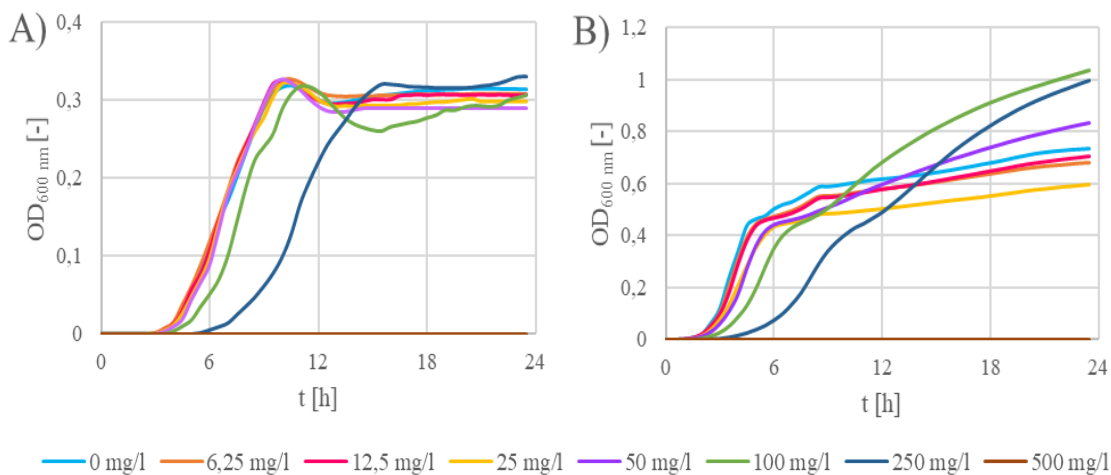
Z tabulky 2 je patrné, že největší inhibiční účinek vykazoval thymol a karvakrol, přičemž největší inhibiční zóna se vytvořila u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48. Naopak nejmenší inhibiční zóna se vytvořila u *Enterococcus faecalis* CCM 4224 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824. U těchto dvou zmíněných bakterií byla zjištěna rezistence vůči eugenolu. Vůči cinnamaldehydu byl nejvíce citlivý *Proteus mirabilis* CCM 7188 a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48. Nejmenší inhibiční účinek vykazoval linalool. Inhibiční zóna se vytvořila pouze u *Bacillus subtilis*. U ostatních bakterií nebyl prokázán antimikrobní efekt. K průkazu jeho antimikrobní aktivity by bylo zapotřebí větší koncentrace než 5 %.

6.2 Diluční metoda

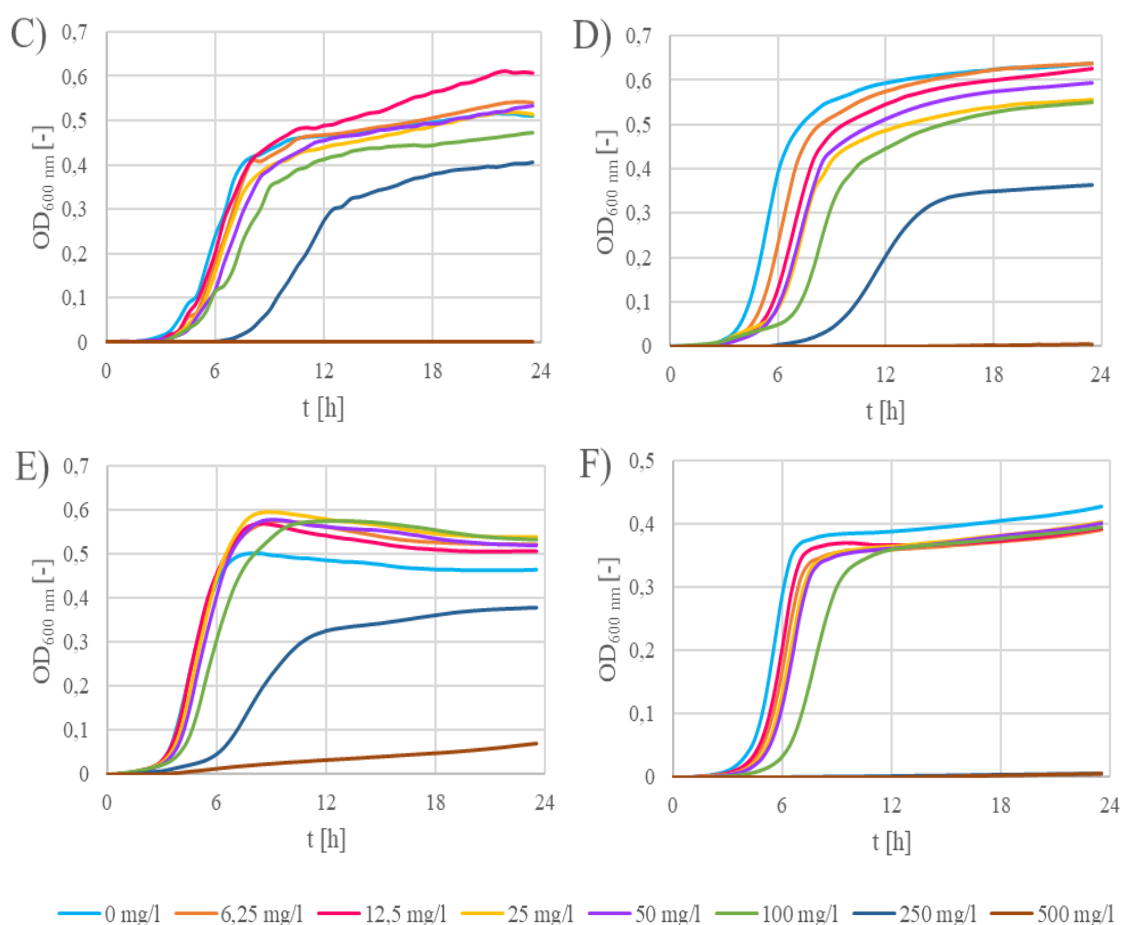
Účinek aktivních látek esenciálních olejů na růst bakterií byl hodnocen pomocí růstových křivek od doby lag-fáze po fázi stacionární. Na Obr. 8 – 15 jsou v grafech znázorněny růstové křivky testovaných bakterií. Kontrolou byl růst bakterií v čistém bujónu bez přítomnosti aktivních látek (světle modré křivky).

6.2.1 Cinnamaldehyd

Vliv cinnamaldehydu na testované bakterie je zobrazen na Obr. 8 a 9. Již nejnižší koncentrace cinnamaldehydu působila bakteriostaticky, a to na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 a *Enterococcus faecalis* CCM 4224. Z růstových křivek pro bakterie *Proteus mirabilis* CCM 7188 a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420 je patrné, že růst těchto bakterií je inhibován při koncentraci 25 mg/l a růst bakterie *Bacillus subtilis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 je inhibován při koncentraci 100 mg/l. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 byl vůči cinnamaldehydu nejméně odolný a jeho růst byl zastaven již při koncentraci 250 mg/l, u většiny bakterií došlo při této koncentraci pouze k prodloužení lag-fáze. Růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420 byl při koncentraci 250 mg/l opožděn o 4 hodiny, u *Enterococcus faecalis* CCM 4224 o 3,5 hodiny a u ostatních bakterií došlo ke prodloužení lag-fáze růstu o 2,5 hodiny. Kromě bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 působil cinnamaldehyd v nejvyšší koncentraci na všechny bakterie baktericidně. U něj lze při nejvyšší koncentraci cinnamaldehydu zaznamenat snížený, ale přesto sledovatelný růst.



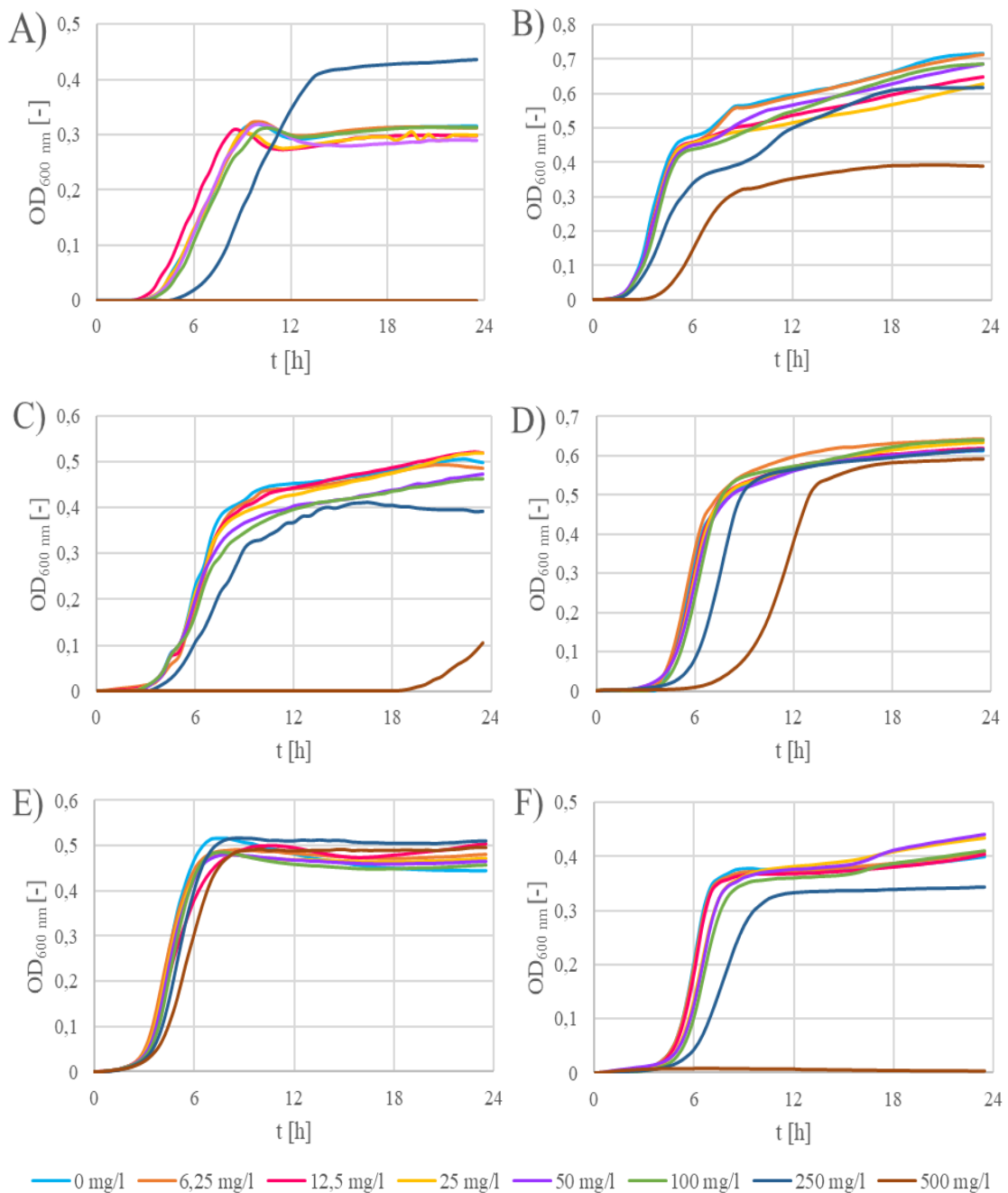
Obrázek 8: Vliv cinnamaldehydu na růst A) *Bacillus subtilis*; B) *Proteus mirabilis* CCM 7188



Obrázek 9: Vliv cinnamaldehydu na růst C) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420; D) *Enterococcus faecalis* CCM 4224; E) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824; F) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

6.2.2 Eugenol

Na Obr. 10 je vyobrazen růst testovaných bakterií pomocí růstových křivek v přítomnosti eugenolu. Bakteriostatické účinky této aktivní látky se projeví u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 při koncentraci 100 mg/l a u všech ostatních bakterií až při 250 mg/l. Eugenol o koncentraci 250 mg/l způsobí prodloužení lag-fáze růstu *Bacillus subtilis* o 2,5 hodiny. Nejvíce odolnou bakterií byl *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, kdy nejvyšší koncentrace eugenolu působila na růst této bakterie taktéž bakteriostaticky. Všechny ostatní koncentrace eugenolu na bakterii antimikrobně nepůsobí a růstové křivky jsou téměř totožné s kontrolou. Koncentrace 500 mg/l ovlivnila růst *Proteus mirabilis* CCM 7188 prodloužením doby lag-fáze o 2 hodiny, u *Enterococcus faecalis* CCM 4224 o 3,5 hodiny a u bakterie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420 lze zaznamenat růst dokonce až po 19 hodinách. Pro růst bakterií *Bacillus subtilis* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 byla tato koncentrace smrtící.

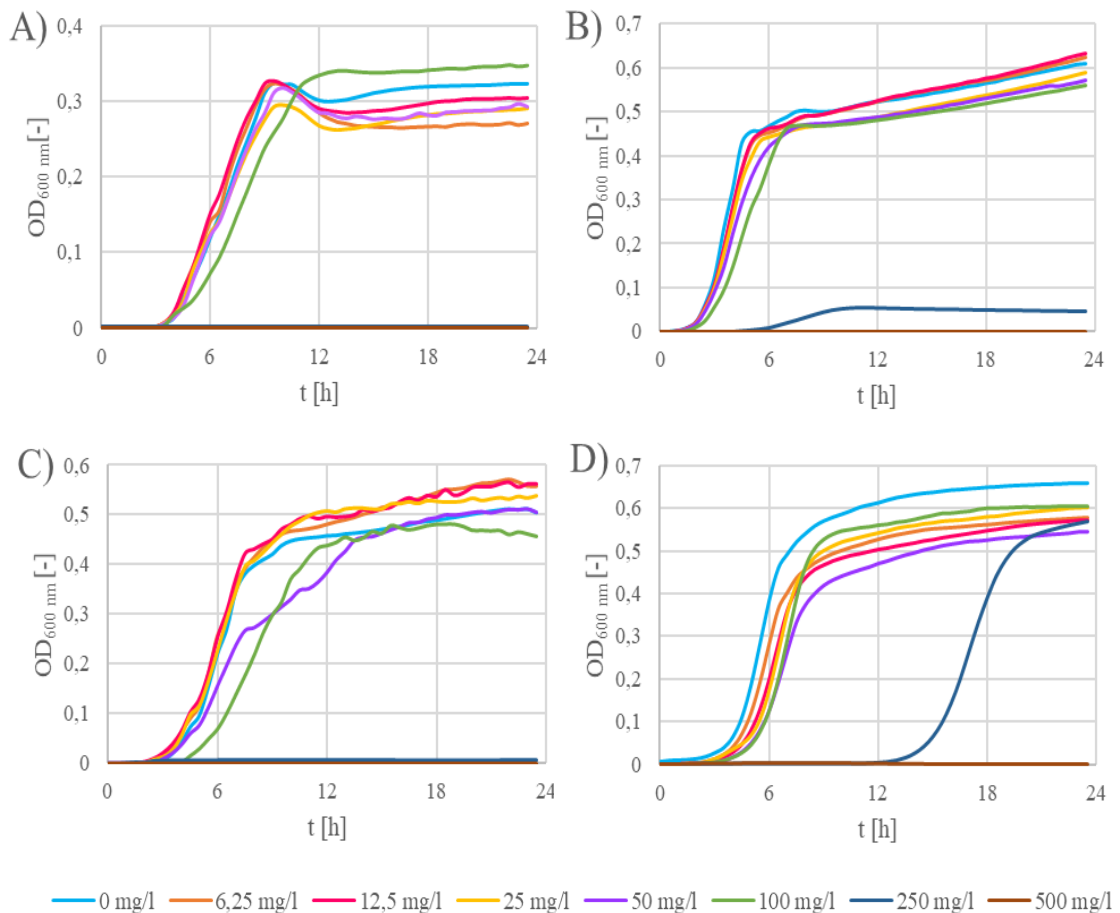


Obrázek 10: Vliv eugenolu na růst A) *Bacillus subtilis*; B) *Proteus mirabilis* CCM 7188; C) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420; D) *Enterococcus faecalis* CCM 4224; E) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824; F) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

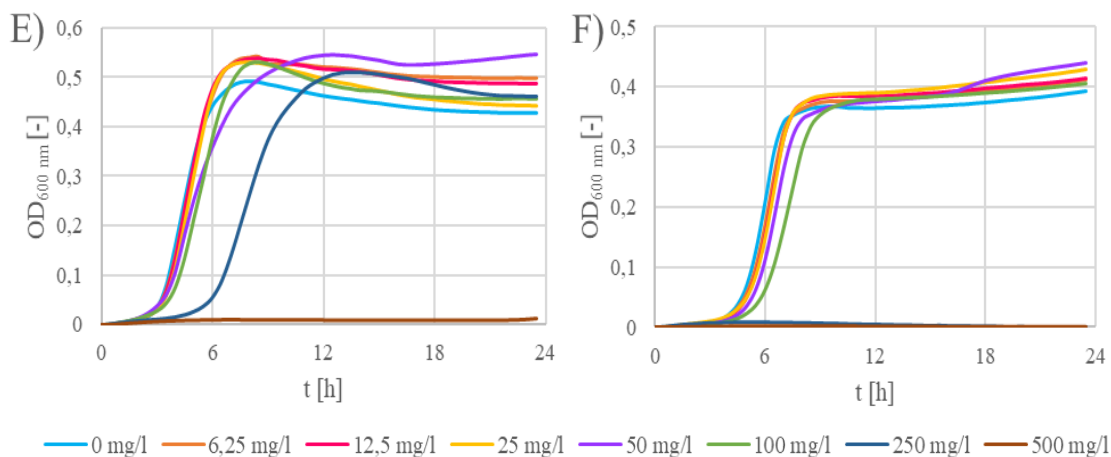
6.2.3 Karvakrol

Účinky karvakrolu na růst bakterií jsou zaznamenány na Obr. 11 a 12. Nejvíce citlivou bakterií k této látce byl *Enterococcus faecalis* CCM 4224, kdy inhibici růstu lze zaznamenat již při nejnižší koncentraci, tedy při 6,25 mg/l. U bakterií *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a *Lactococcus lactis*

subsp. *lactis* CCDM 48 jsou bakteriostatické účinky pozorovány v koncentraci 50 mg/l, u bakterií *Bacillus subtilis* a *Proteus mirabilis* CCM 7188 v koncentraci 100 mg/l. Z grafu s růstovými křivkami *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a *Enterococcus faecalis* CCDM 4224 lze vyčíst, že u roztoku s koncentrací 250 mg/l je pozorována pomalejší adaptace bakterií na prostředí, kdy při této koncentraci došlo k prodloužení lag-fáze růstu laktokoků o 3 hodiny a u enterokoků až o 11 hodin. V případě bakterie *Proteus mirabilis* CCM 7188 je při této koncentraci sledován velmi zpomalený, ale přesto sledovatelný růst, jehož lag-fáze byla ukončena po 6 hodinách. Pro ostatní kmeny testovaných bakterií byla tato a nejvyšší koncentrace smrtelná.



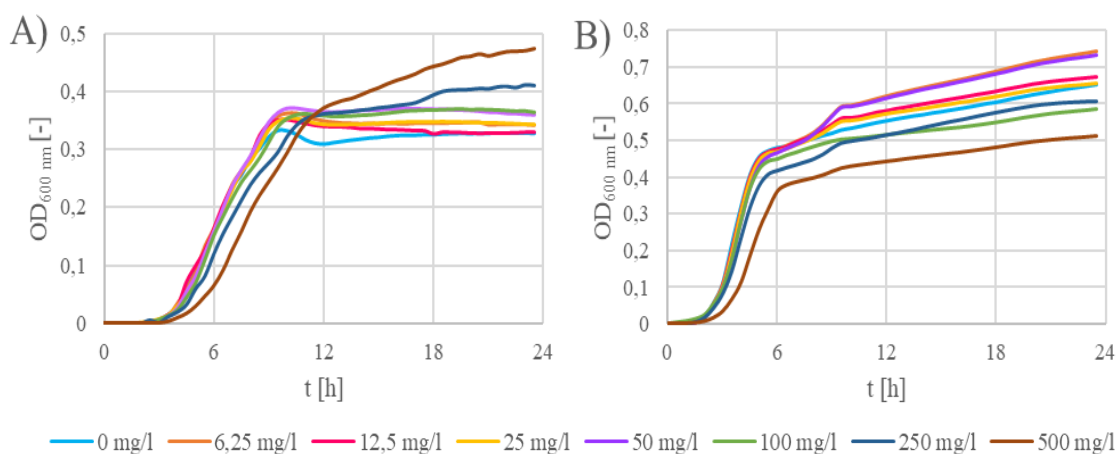
Obrázek 11: Vliv karvakurolu na růst A) *Bacillus subtilis*; B) *Proteus mirabilis* CCM 7188; C) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420; D) *Enterococcus faecalis* CCM 4224



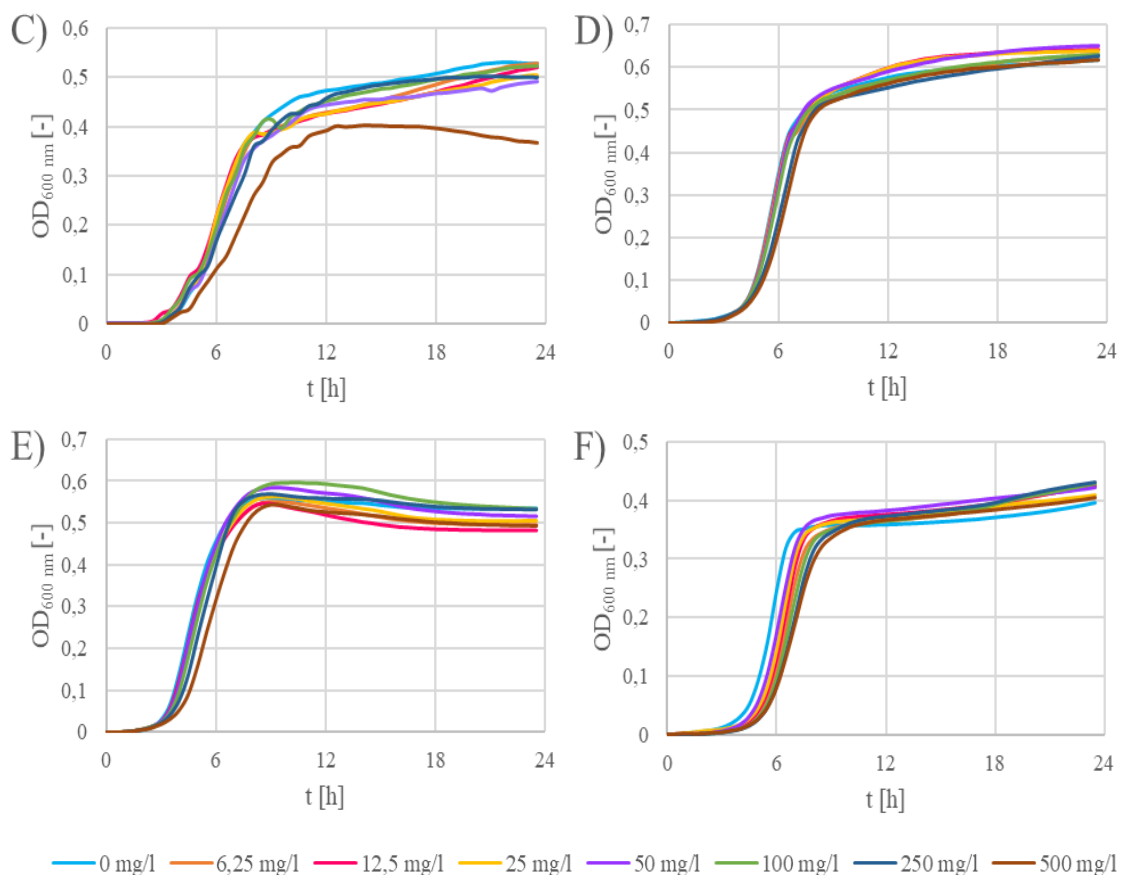
Obrázek 12: Vliv karvakrolu na růst E) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824; F) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

6.2.4 Linalool

Na Obr. 13 a 14 jsou vyobrazeny růstové křivky zkoumaných bakterií v přítomnosti různých koncentrovaných roztoků linaloolu. Testované koncentrace této aktivní látky neměly téměř žádný antimikrobní efekt na růst. Za nejodolnější bakterii lze považovat *Enterococcus faecalis* CCM 4224, protože všechny růstové křivky testovaných koncentrací jsou totožné s kontrolou. Menší inhibiční účinek na růst lze pozorovat v koncentraci 250 mg/l u bakterií *Bacillus subtilis* a *Proteus mirabilis* CCM 7188 a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48. Nejvyšší koncentrace roztoku, tj. 500 mg/l vykazovala bakteriostatické účinky na růst všech testovaných bakterií. Linalool neměl na žádnou z testovaných bakterií baktericidní účinek.



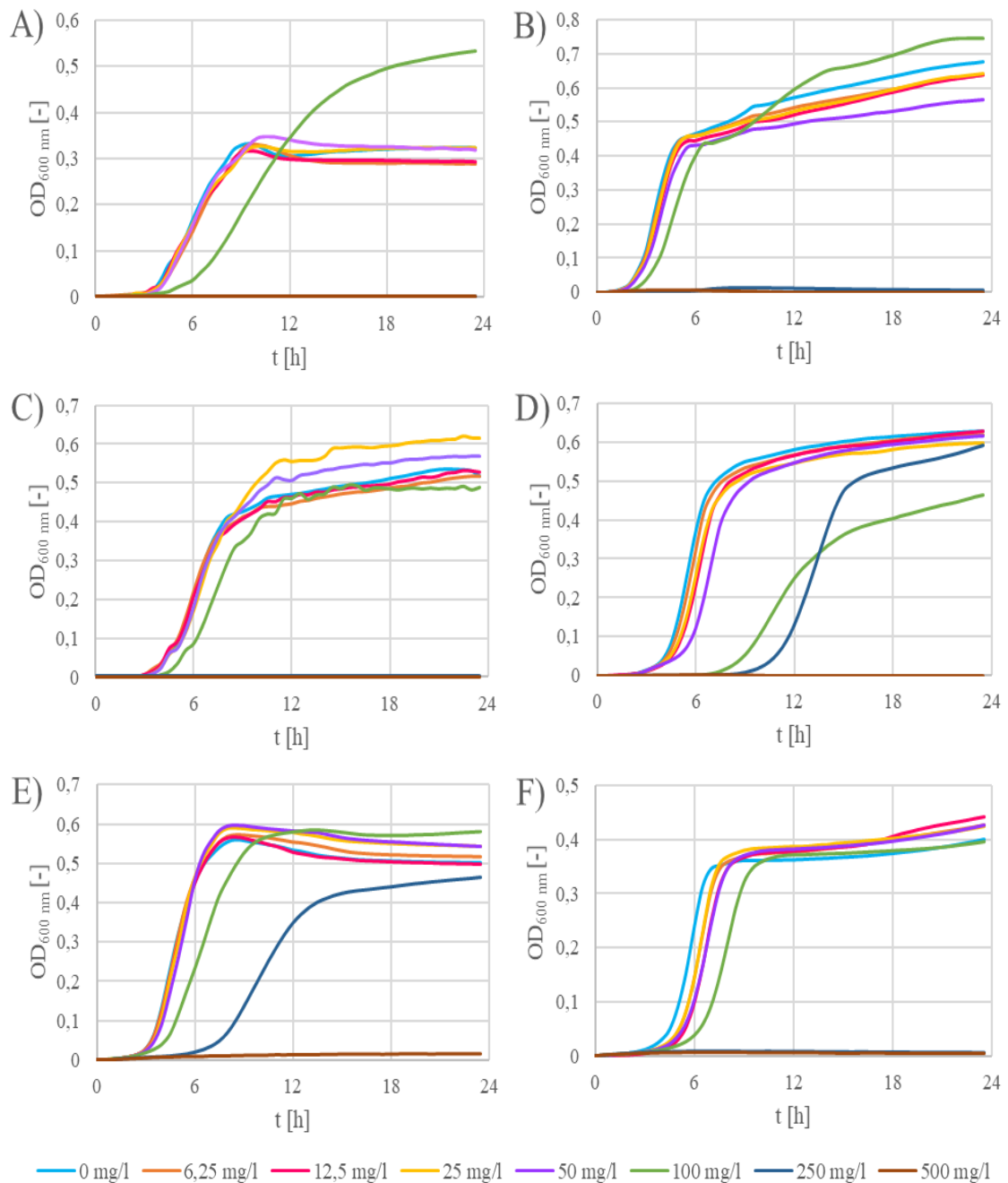
Obrázek 13: Vliv linaloolu na růst A) *Bacillus subtilis*; B) *Proteus mirabilis* CCM 7188



Obrázek 14: Vliv linaloolu na růst C) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420; D) *Enterococcus faecalis* CCM 4224; E) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824; F) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

6.2.5 Thymol

Růst testovaných bakterií v přítomnosti různě koncentrovaných roztoků thymolu jsou zobrazeny na Obr. 15. Nejcitlivější bakterií k této látce byl *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, kdy se inhibiční účinek projevil již při koncentraci 25 mg/l, u *Enterococcus faecalis* CCM 4224 pak při 50 mg/l. U všech ostatních bakterií lze pozorovat opožděnější růst oproti kontrole při 100 mg/l. V této koncentraci dochází u *Enterococcus faecalis* CCM 4224 k prodloužení lag-fáze růstu o 5 hodin a u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 o 2,5 hodiny. I přestože byl *Enterococcus faecalis* CCM 4224 k této látce již při nižších koncentracích nejcitlivější, můžeme z grafu vyčíst, že při koncentraci 250 mg/l lze po 8 hodinách zaznamenat růst. V této koncentraci roztoku rostl také *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, jehož lag-fáze růstu byla prodloužena o 3 hodiny. Pro ostatní testované bakterie byla koncentrace 250 a 500 mg/l smrtící.



Obrázek 15: Vliv thymolu na růst A) *Bacillus subtilis*; B) *Proteus mirabilis* CCM 7188; C) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420; D) *Enterococcus faecalis* CCM 4224; E) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824; F) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

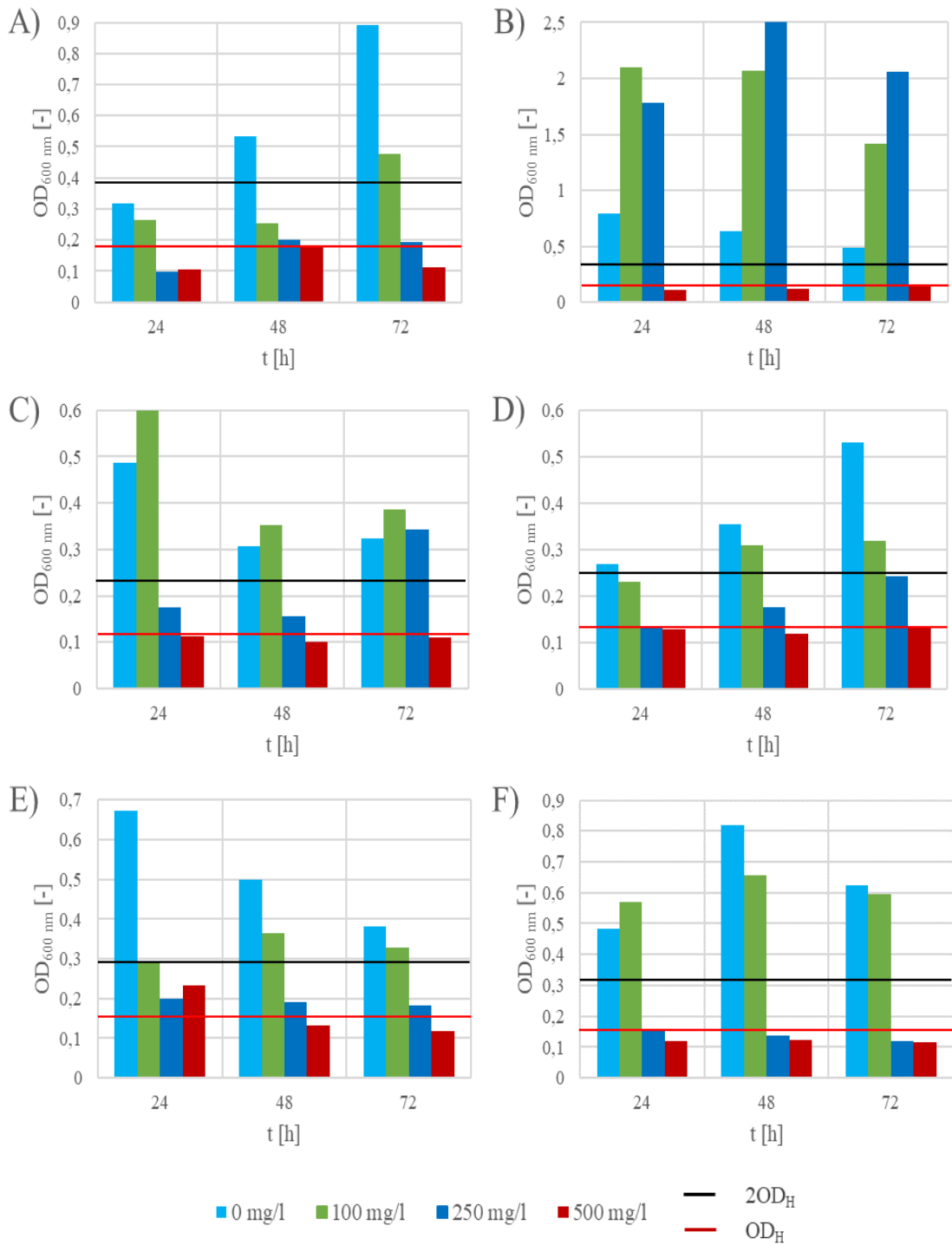
6.3 Detekce biofilmu

Na Obr. 16 – 22 je zaznamenána tvorba biofilmu testovaných bakterií. Tvorba biofilmu byla hodnocena v časech 24, 48 a 72 hodin. V přítomnosti karvakrolu a thymolu byl hodnocen od koncentrace 50 mg/l a u cinnamaldehydu, eugenolu a linaloolu od koncentrace 100 mg/l, jelikož nižší koncentrace neměly na tvorbu biofilmu žádný vliv, a byly shodné

s kontrolou. Kontrolou byla tvorba biofilmu v čistém bujonu (světle modrý sloupec). Hraní hodnota pro pozitivitu OD_H byla vypočtena tak, jak je uvedeno v kapitole 5.5, v grafech je zaznačena vodorovnou červenou čarou, a $2OD_H$ je pak dvojnásobek OD_H a je zaznačena vodorovnou černou čarou. Oblast pod červenou čarou značí negativní tvorbu biofilmu, oblast mezi červenou a černou čarou značí slabou tvorbu biofilmu a oblast nad černou čarou značí silnou tvorbu biofilmu.

6.3.1 Cinnamaldehyd

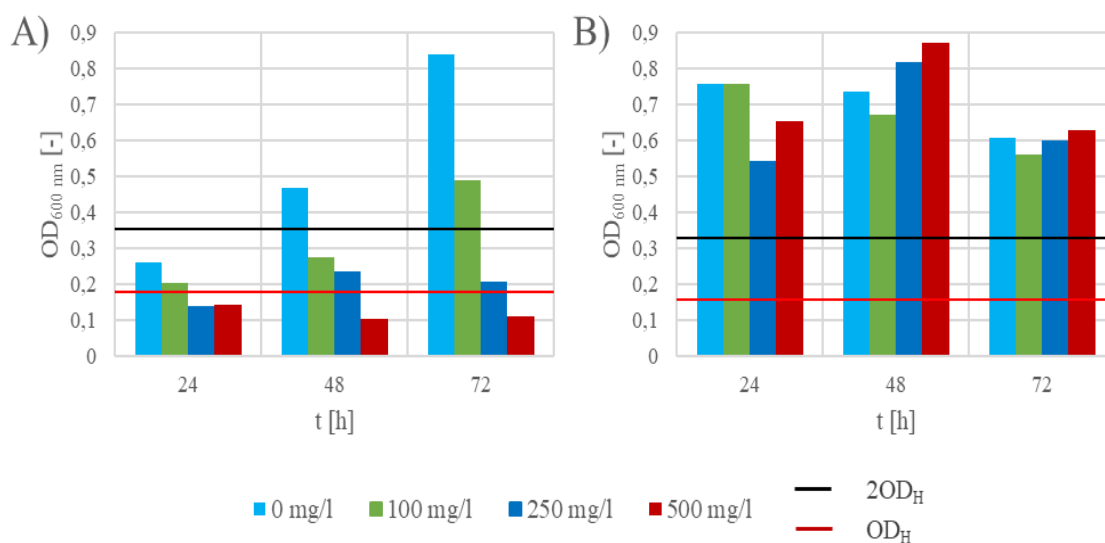
Působení cinnamaldehydu na tvorbu biofilmu testovaných bakterií je znázorněno na Obr. 16. Bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 byla schopna růstu v roztoku cinnamaldehydu do koncentrace 500 mg/l, avšak již koncentrace 100 mg/l způsobila časový posun tvorby silného biofilmu na 48 hodin. V koncentraci 250 mg/l byl již biofilm oslaben. U této bakterie si lze povšimnout, že v roztoku o nejvyšší koncentraci lze zaznamenat snížený růst a s tím i tvorbu slabého biofilmu. V dalších časových intervalech je ale biofilm eradikován. Stejně tak u *Bacillus subtilis*, jakožto producenta slabého biofilmu způsobila koncentrace 100 mg/l časový posun tvorby silného biofilmu na 72 hodin. I přestože bakterie v roztoku cinnamaldehydu o koncentraci 250 mg/l po 24hodinové kultivaci roste, dokázala tato koncentrace významně potlačit tvorbu biofilmu. Velmi slabý biofilm se začal tvořit až po 48 hodinách. Nejodolnější biofilm vytvořil *Proteus mirabilis* CCM 7188. Tato bakterie byla schopná růst, a především tvořit silný biofilm v roztoku cinnamaldehydu do koncentrace 250 mg/l. V grafu této bakterie si lze i povšimnout zvýšenou tvorbu biofilmu při expozici cinnamaldehydu oproti kontrole. Může to být způsobeno tím, že bakterie nacházející se v nepříznivých podmínkách, začne produkovat větší množství biofilmu pro svou ochranu, anebo může tato látka tvorbu biofilmu podporovat. V této koncentraci byly schopné tvořit biofilm i další bakterie. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420 potřebovala na vytvoření silného biofilmu v koncentraci 250 mg/l 72 hodin. Pouze slabou tvorbu biofilmu po 48 hodinách lze zaznamenat u *Enterococcus faecalis* CCM 4224.



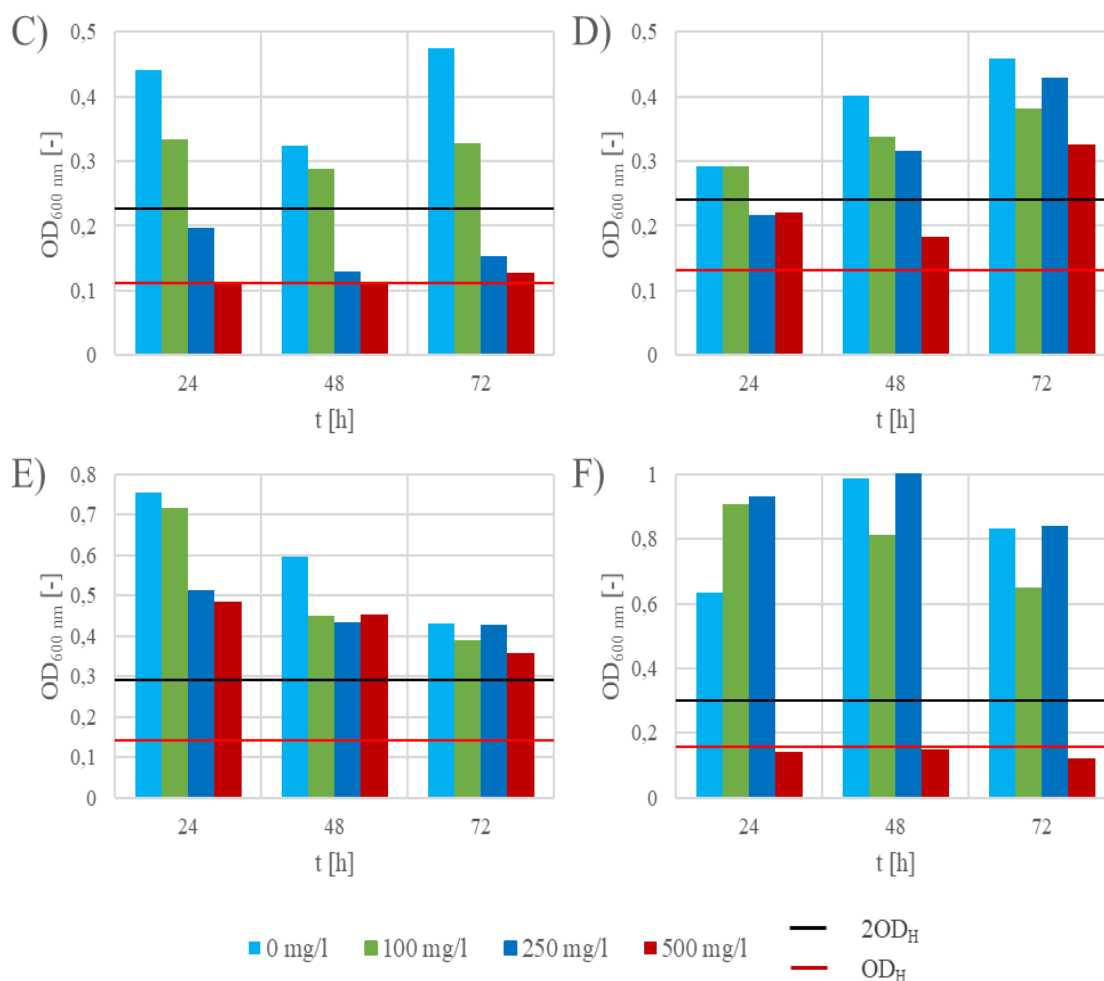
Obrázek 16: Vliv cinnamaldehydu na tvorbu biofilmu A) *Bacillus subtilis*; B) *Proteus mirabilis* CCM 7188; C) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420; D) *Enterococcus faecalis* CCM 4224; E) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824; F) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

6.3.2 Eugenol

Tvorba biofilmu testovaných bakterií v přítomnosti roztoku eugenolu je znázorněna na Obr. 17 a 18. Za nejvíce odolnou bakterii lze považovat *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, protože nejvyšší testovaná koncentrace eugenolu nedokázala potlačit ani růst, a ani tvorbu biofilmu. Ve všech časových intervalech tato bakterie tvořila velmi silný biofilm. Velmi odolný a silný biofilm tvořil i *Proteus mirabilis* CCM 7188. I když byl jeho růst nejvyšší koncentrací zpomalen, dokázal již po 24 hodinách vytvořit silný biofilm. U bakterie *Enterococcus faecalis* CCM 4224 taktéž došlo při nejvyšší koncentraci ke zpomalení růstu, avšak k tvorbě silného biofilmu bylo zapotřebí třídní kultivace. Bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 tvořila silný biofilm ve všech časových intervalech a v těch koncentracích, ve kterých byla schopna růstu. U bakterie *Bacillus subtilis* došlo ke stejnému časovému posunu tvorby biofilmu, jako v případě roztoku cinnamaldehydu. Biofilm *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420 byl oslaben koncentrací 250 mg/l. V nejvyšší koncentraci došlo k výraznému zpomalení růstu, a proto k vytvoření slabého biofilmu bylo zapotřebí 72 hodin.



Obrázek 17: Vliv eugenolu na tvorbu biofilmu A) *Bacillus subtilis*; B) *Proteus mirabilis* CCM 7188

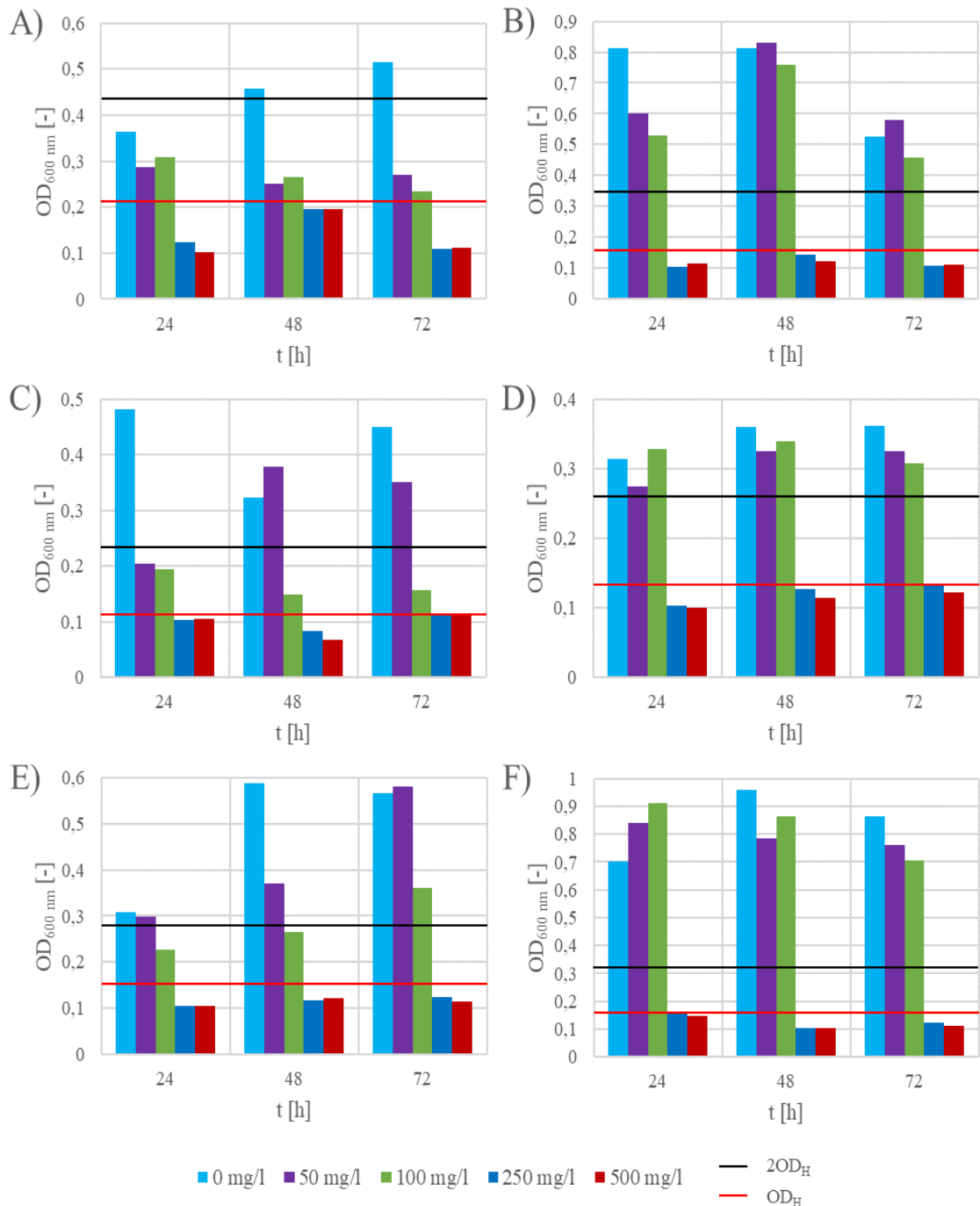


Obrázek 18: Vliv eugenolu na tvorbu biofilmu C) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420; D) *Enterococcus faecalis* CCM 4224; E) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824; F) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

6.3.3 Karvakrol

Na Obr. 19 je znázorněna tvorba biofilmu testovaných bakterií v přítomnosti karvakrolu. Tato látka měla velmi výrazný vliv na tvorbu biofilmu *Proteus mirabilis* CCM 7188, *Enterococcus faecalis* CCM 4224 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824. U těchto bakterií je zajímavé, že jsou schopny růstu v koncentraci karvakrolu 250 mg/l, ale tvorba biofilmu je ve všech časových intervalech potlačena. U bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 dokonce došlo k časovému posunu tvorby silného biofilmu na 72 hodin, a to v koncentraci 100 mg/l. K časovému posunu také došlo u bakterie *Bacillus subtilis*. I když není v koncentraci 50 mg/l zaznamenána žádná inhibice růstu, tvorba biofilmu byla oproti kontrole po 48 a 72 hodinách redukována na slabý. U bakterie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420 také došlo k časovému posunu v koncentraci 50 mg/l, kdy se silný biofilm začal tvořit až po 48 hodinách. Ovšem

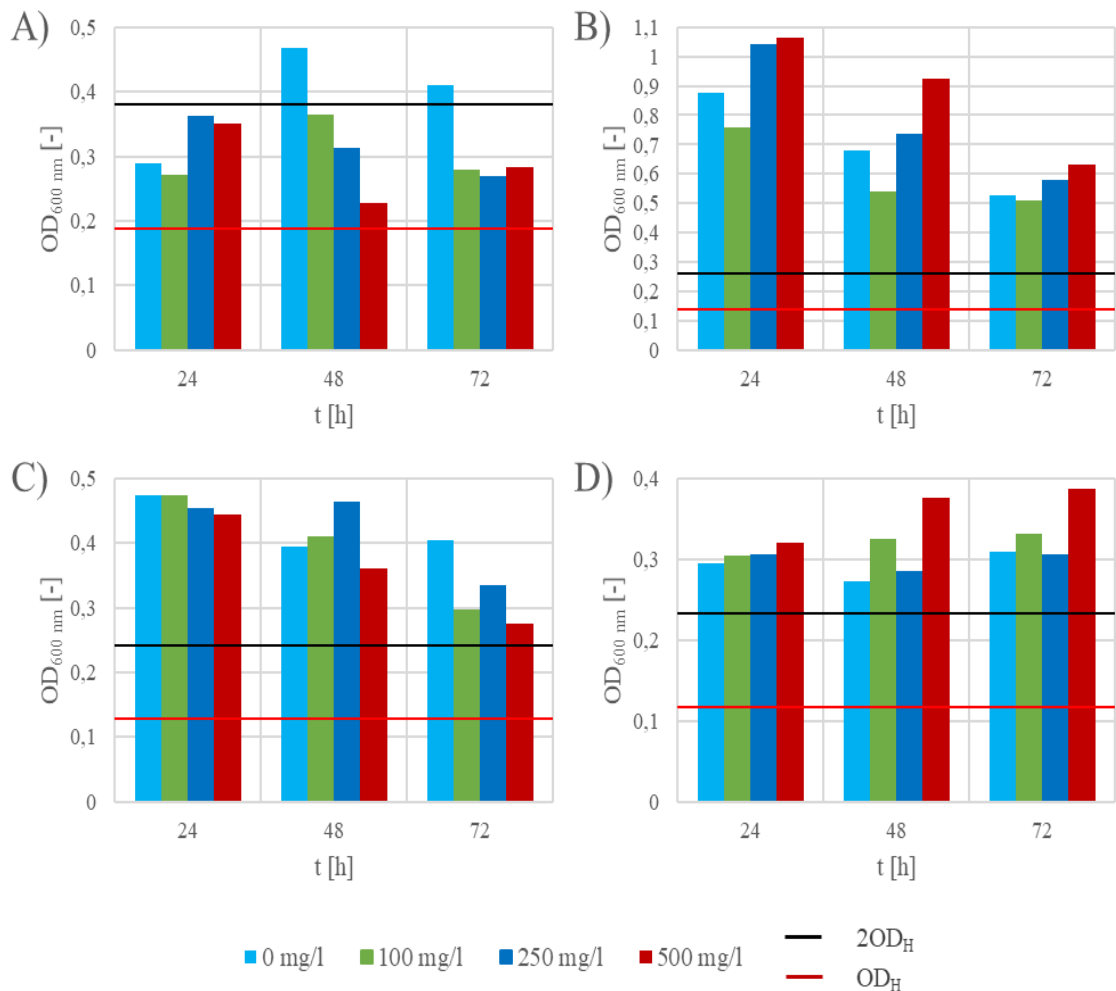
v koncentraci 100 mg/l byla tvorba silného biofilmu také potlačena. Bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 tvořila silný biofilm ve všech časových intervalech a v těch koncentracích, ve kterých byla schopna růstu.



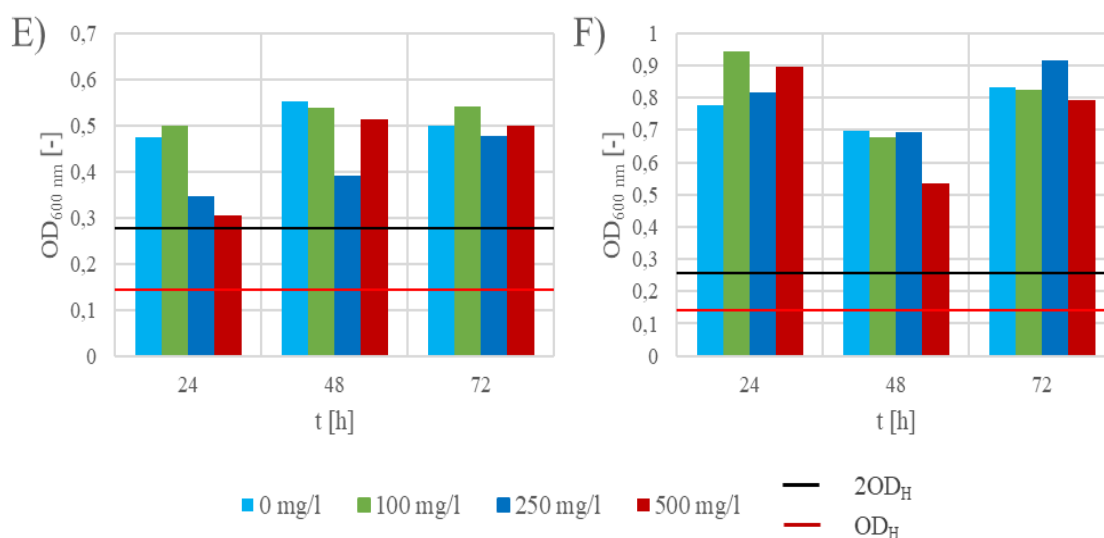
Obrázek 19: Vliv karvakrolu na tvorbu biofilmu A) *Bacillus subtilis*; B) *Proteus mirabilis* CCM 7188; C) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420; D) *Enterococcus faecalis* CCM 4224; E) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824; F) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

6.3.4 Linalool

Působení linaloolu na tvorbu biofilmu testovaných bakterií je znázorněno na Obr. 20 a 21. U této aktivní látky se neosvědčily ani inhibiční účinky na růst a ani na tvorbu biofilmu. V grafech si lze povšimnout, že všechny bakterie velmi dobře rostou a téměř všechny tvoří silný biofilm ve všech koncentracích. Pouze *Bacillus subtilis* tvořil v přítomnosti roztoku linaloolu po 48 a 72hodinové inkubaci slabý biofilm. Zajímavý rozdíl je však v množství produkovaného biofilmu, resp. v hodnotě naměřené absorbance vyluhovaného barviva u každé bakterie. U bakterie *Proteus mirabilis* CCM 7188 roste množství produkovaného biofilmu s koncentrací roztoku. Zvýšenou tvorbu biofilmu oproti kontrole lze pozorovat i u *Enterococcus faecalis* CCM 4224.



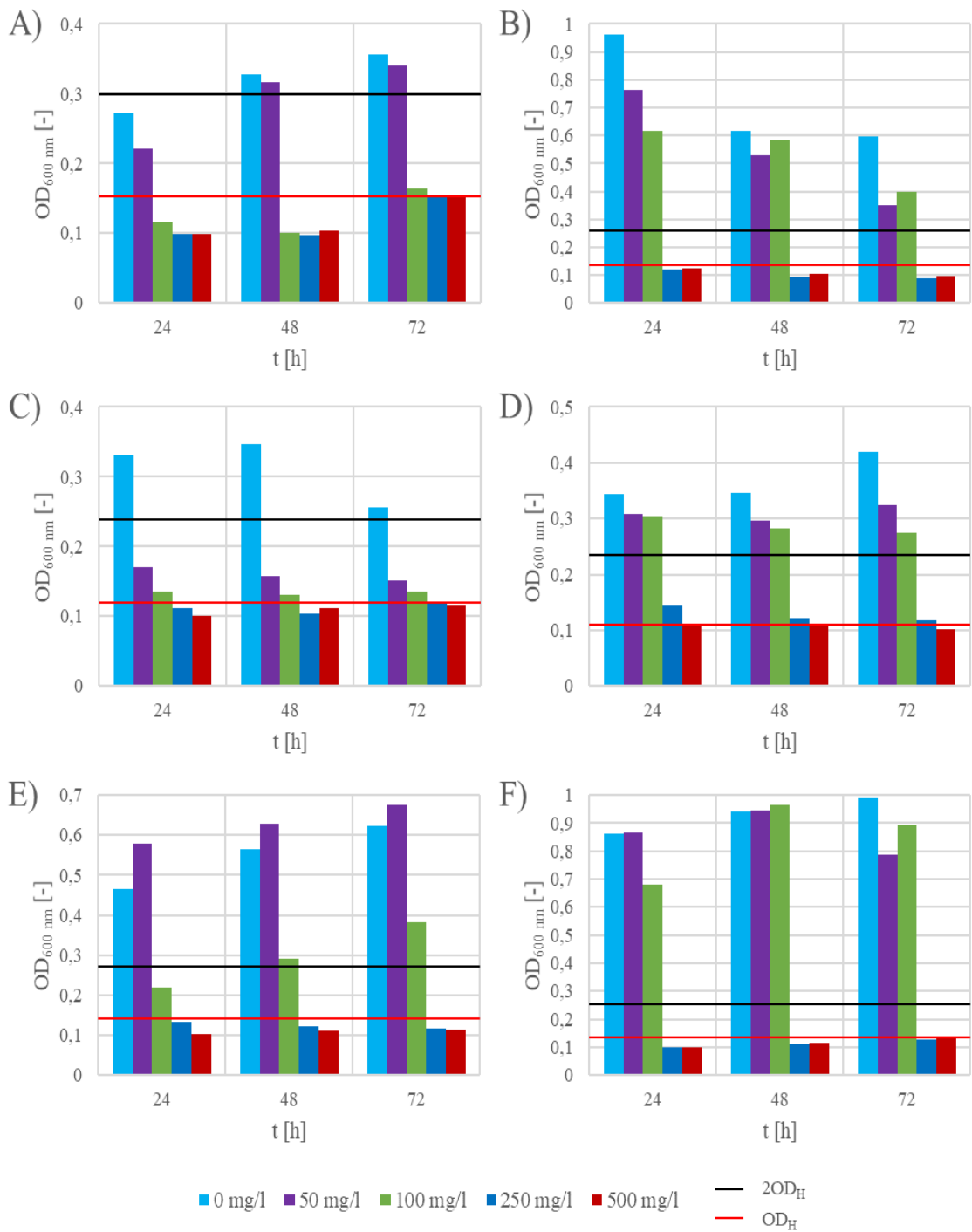
Obrázek 20: Vliv linaloolu na tvorbu biofilmu A) *Bacillus subtilis*; B) *Proteus mirabilis* CCM 7188; C) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420; D) *Enterococcus faecalis* CCM 4224



Obrázek 21: Vliv linaloolu na tvorbu biofilmu E) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824; F) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

6.3.5 Thymol

Na Obr. 22 jsou v grafech znázorněny výsledky měření optické denzity a určení tvorby biofilmu testovaných bakterií. Tato aktivní látka působila na růst bakterií a jejich tvorbu biofilmu obdobně jako karvakrol. Bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 dokázala stejně jako v karvakrolu růst v koncentraci 250 mg/l, ale její tvorba biofilmu byla v této koncentraci thymolem taktéž potlačena. Rozdílem u této bakterie je však časový posun tvorby biofilmu v koncentraci 100 mg/l, kdy se silný biofilm začal tvořit už po 48 hodinách. Oproti karvakrolu dokázal thymol posunout tvorbu biofilmu *Bacillus subtilis* v koncentraci 100 mg/l až na 72 hodin. I když není růst bakterie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420 v koncentraci 50 mg/l nijak inhibován, tvorba silného biofilmu byla potlačena. Za nejodolnější bakterii lze v tomto případě považovat *Enterococcus faecalis* CCM 4224. V koncentraci 250 mg/l dochází sice ke zpomalenému růstu, ale bakterie je schopna se vůči této látce bránit tvorbou slabého biofilmu. Bakterie *Proteus mirabilis* CCM 7188 a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 tvořily silný biofilm ve všech časových intervalech a v těch koncentracích, ve kterých byly schopny růstu.



Obrázek 22: Vliv thymolu na tvorbu biofilmu A) *Bacillus subtilis*; B) *Proteus mirabilis* CCM 7188; C) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420; D) *Enterococcus faecalis* CCM 4224; E) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824; F) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

7 DISKUZE

V publikovaných vědeckých člancích se uvádí, že esenciální oleje a jejich aktivní látky mají antimikrobní účinky a mohou sloužit jako přírodní antimikrobní činidla proti různým patogenům. Uvádí se, že působení těchto látek vůči grampozitivním a gramnegativním bakteriím je rozdílné. Dle Chouhan *et al.*, (2017) mohou být grampozitivní bakterie citlivější než grampozitivní bakterie, což bylo prokázáno i v této práci. Oussalah *et al.*, (2007) uvádějí, že fenolické sloučeniny, jako karvakrol a thymol obecně patří mezi nejúčinnější antibakteriální látky esenciálních olejů. Výsledky této práce se s tímto shodují, neboť karvakrol a thymol měly největší inhibiční účinek.

Manu (2016) popisuje tvrzení, že za antimikrobní aktivitu cinnamaldehydu je zodpovědná karbonylová skupina v molekule. Při nízkých koncentracích je cinnamaldehyd schopen inhibovat různé enzymy podílející se na životních funkcích buněk. Při vyšších koncentracích působí jako inhibitor ATPázy a při smrtelných koncentracích pak narušuje cytoplasmatickou membránu. I přestože existuje mnoho studií o tom, že cinnamaldehyd interaguje cytoplasmatickou membránou, stále není zcela jasné, jak k narušení membrány dochází. Kwon, Yu a Park (2003) ve své studii testovali skořicový aldehyd na bakterie *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Salmonella enterica*. Zjistili, že nejcitlivější bakterií byl *Bacillus subtilis*, kdy koncentrace 100 mg/l této látky způsobila 8% inhibici růstu, koncentrace 200 mg/l způsobila 70% inhibici růstu a v koncentraci 400 mg/l už nebyl zaznamenán žádný růst. U bakterie *Salmonella enterica* způsobila tato koncentrace 87% inhibici růstu. V našem případě byla použita koncentrace 500 mg/l, která zcela inhibovala růst *Bacillus subtilis* a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420. Ooi *et al.* (2012) hodnotili antimikrobní efekt cinnamaldehydu proti *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*, kdy MIC pro gramnegativní kmeny byla stanovena na 250 mg/l a pro *Staphylococcus aureus* na 600 mg/l. V naší práci byla MIC gramnegativních kmenů stanovena na 100 mg/l. Dunn, Davidson a Critzer (2016) se zabývali antimikrobní účinností cinnamaldehydu proti bakteriím mléčného kvašení. Minimální baktericidní koncentrace (MBC) byla stanovena v rozmezí 500 – 1000 mg/l, což se shoduje s výsledky naší práce. Pro zvýšení antimikrobní aktivity se složky esenciálních olejů kombinují s jinými antibakteriálními látkami. Moleyar a Narasimham, (1992) prokázali synergický účinek cinnamaldehydu a eugenolu, kdy v koncentracích 250 mg/l a 500 mg/l tato směs zcela inhibuje růst *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp. a *Enterobacter* sp. V naší práci bylo, v případě obou látek, dosaženo úplné inhibice růstu

bacilů až v koncentraci 500 mg/l. Albano *et al.* (2019) potvrdili schopnost cinnamaldehydu inhibovat růst komenzální bakterie lidské kůže *Staphylococcus epidermidis* a inhibovat tvorbu biofilmu. Minimální baktericidní koncentrace byla stanovena na 500 mg/l, k eradikaci předem vytvořeného biofilmu pak bylo zapotřebí 4krát větší koncentrace než koncentrace potřebná k inhibici růst planktonické fáze. Tím se tedy potvrzuje tvrzení Schulte, Wingender a Flemming (2005), že biofilmy jsou 10krát až 1000krát odolnější než odpovídající planktonické buňky, a že pro inhibici biofilmu jsou zapotřebí dvojnásobně až čtyřnásobně vyšší koncentrace esenciálních olejů než v případě planktonických buněk. Na základě prostudovaných článků lze říci, že spousta autorů se zabývá účinkem esenciálních olejů a jejich aktivních látek na již předem vytvořené biofilmy, a proto je v mnoha člancích uvedena mnohem vyšší koncentrace než koncentrace potřebná k inhibici růstu planktonu. Dle mého názoru, je mnohem efektivnější se zabývat prevencí tvorby biofilmu. Ali *et al.* (2020) se zabývali účinkem cinnamaldehydu na biofilm *Enterococcus faecalis*. Tato aktivní látka v koncentraci 500 mg/l dokázala snížit metabolickou aktivitu biofilmu během 24 hodin. V naší práci tohoto výsledku bylo dosaženo již v koncentraci 250 mg/l, protože nejvyšší koncentrace zcela inhibovala růst bakterie. Rozdíl dosaženého výsledku může být dán odlišností použitého kmene, a tedy lze odvodit, že tvorba biofilmu je kmenově specifická vlastnost.

Eugenol, stejně jako karvakrol, thymol nebo cinnamaldehyd také patří mezi fenolické sloučeniny s antimikrobním účinkem. Ve studii Devi *et al.* (2013) byl pomocí diskové difúzní metody hodnocen antibakteriální účinek eugenolu na bakterii *Proteus mirabilis*. Roztok eugenolu o koncentraci 1 % způsobil zónu o velikost 8 mm a roztok o koncentraci 10 % způsobil zónu o velikosti 11 mm. V této práci byl použit 5% roztok eugenolu, který způsobil inhibiční zónu o velikosti 9 mm, takže náš výsledek je srovnatelný s výsledkem této studie. Dále byla stanovena MBC na 2500 mg/l. V této práci by tedy musela být použita pětikrát větší koncentrace, aby došlo k zastavení růstu této bakterie. Také zjistili, že významné zvýšení pH zvyšuje i antibakteriální aktivitu eugenolu, což je faktor, který může podpořit zvýšení účinnosti této látky. Dle Takahashi *et al.* (2021) je pro potlačení růstu *Enterococcus faecalis* zapotřebí koncentrace 2000 mg/l, což je 4krát více než bylo použito v této práci. V jiné experimentální studii byla hodnocena účinnost kombinace eugenolu s konvenčním antibiotikem. Byl prokázán synergický efekt, kdy eugenol způsobil 50% ztrátu integrity membrány a došlo tak ke zvýšení penetrace antibiotik (MOHAMMADI NEJAD, ÖZGÜNEŞ a BAŞARAN, 2017). Je také prokázáno, že eugenol vykazuje inhi-

biční účinky vůči biofilmům gramnegativních a grampozitivních bakterií včetně rodů *Porphyromonas*, *Salmonella*, *Escherichia* a *Listeria* (Walsh *et al.*, 2019). Utami *et al.* (2021) prokázali, že 1% eugenol má větší inhibiční účinky na orální polymikrobiální biofilmy než běžně komerčně dostupné ústní vody.

Karvakrol je také zkoumán kvůli účinkům na bakteriální biofilmy. V jedné studii byl testován účinek karvakrolu na dvoudruhový biofilm (*Staphylococcus aureus* a *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*). Úplné eradikce nebylo dosaženo u celé populace. Účinnost karvakrolu byla tedy zlepšena, a to zapouzdřením do povrchově aktivní látky, a testována proti *Escherichia coli* a *Listeria monocytogenes*. Tato metodika se jeví jako další alternativa vedoucí ke zvýšení účinnosti těchto látek (Suntres, Coccimiglio a Alipour, 2014). Burt *et al.*, (2014) se zabývali účinkem karvakrolu na tvorbu biofilmu a na již vytvořené biofilmy a zjistili, že karvakrol neměl téměř žádnou aktivitu vůči existujícímu biofilmu. Tato studie tedy dokazuje, že biofilm poskytuje ochranu před touto látkou a aktivita karvakrolu vůči tvorbě biofilmu je účinnější. V naší práci jsme se taktéž zabývali prevencí tvorby biofilmu, v níž jsme dokázali, že k potlačení tvorby biofilmu nejsou zapotřebí vysoké koncentrace. MIC karvakrolu vůči *Bacillus subtilis* stanovili Ben Arfa *et al.* (2006) na 250 mg/l. V naší práci byla tato koncentrace baktericidní a MIC byla stanovena na 100 mg/l. Důvodem dosažení rozdílných výsledků může být v odlišnosti použité metodiky, kdy autoři článku stanovovali MIC pouze vizuálně. Ultee, Bennik a Moezelaar (2002) však stanovili MIC růstu této bakterie na 110 mg/l, což už se shoduje s výsledky naší práce. MIC *Salmonella enterica* byla pak stanovena Miladi *et al.*, (2016) na 63 mg/l, což je velmi blízký výsledek tomu našemu. Námi dosažená MBC u *Enterococcus faecalis* CCM 424 se taktéž shoduje s výsledky této studie, v níž byla stanovena na 512 mg/l (Miladi *et al.*, 2016). Je taktéž prokázáno, že karvakrol potlačuje růst bakterií mléčného kvašení (Takahashi *et al.*, 2021).

Podle Alves *et al.*, (2016) by měl být linalool účinnější proti gramnegativním bakteriím. Herman *et al.*, (2016) testovali antimikrobiální účinky vybraných esenciálních olejů samostatně i v kombinaci s linaloleem na mikroorganismy *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Aspergillus brasiliensis*. Prokázali, že kombinace olejů, konkrétně hřebíčkového a tymiánového s linaloleem vykazovala vyšší antimikrobiální účinek a to proti *Pseudomonas aeruginosa* a *Aspergillus brasiliensis*. Liu *et al.* (2020) stanovili MIC růstu *Pseudomonas aeruginosa* na 431 mg/l a MBC na 862 mg/l. V naší práci bylo dosaženo podobných výsledků u gramnegativních bakterií *Salmonella*

enterica subsp. *enterica* CCM 4420 a *Proteus mirabilis* CCM 7188, u nichž byla MIC stanovena na 500 mg/l. Alves *et al.*, (2016) zkoumali inhibiční účinky oleje z koriandru na růst oportunního mikroorganismu *Acinetobacter baumannii*, který je schopen způsobovat nozokomiální infekce. V koriandrovém oleji je zastoupen linalool, α -pinen, p-cymen, kafr a geranyl acetát. Prokázali, že nejvyšší inhibiční účinek vykazoval linalool, kdy u difúzní diskové metody se vytvořily inhibiční zóny v rozmezí 20–63,5 mm. U diluční metody byla MIC a MBC stanovena na 2–8 μ l/ml.

Thymol působí antibakteriálně na široké spektrum jak grampozitivních, tak gramnegativních bakterií. Patří mezi ně potravní bakterie jako *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Listeria* a *Bacillus* popřípadě některé patogeny podílející se na infekci dýchacích cest jako *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* a *Staphylococcus aureus*. Uvádí se, že MIC thymolu je stanovena na 3,13–6,25 mg/l (Salehi *et al.*, 2018). Thymol ovlivňuje propustnost cytoplasmatické membrány, inhibuje růst nebo ovlivňuje produkci bakteriálních toxinů (Gavaric *et al.*, 2015). Gavaric *et al.*, (2015) hodnotili antibakteriální účinky karvakrolu, thymolu a jejich kombinace na bakterie *Bacillus cereus*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* pomocí mikrodiluční metody. Prokázali, že 250 mg/l je schopno inhibovat všechny testované bakterie. V naší práci se taktéž podařilo koncentrací 250 mg/l inhibovat růst *Bacillus subtilis* a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420. Avšak synergický účinek thymolu a karvakrolu má vliv na snížení MIC, která byla stanovena na 62,5 μ g/ml u *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* a u *Bacillus cereus* a *Salmonella* na 125 μ g/ml. Kang *et al.*, (2018) hodnotili aktivitu tymiánového oleje, jehož součástí je thymol, vůči biofilmu *Bacillus cereus*. Zjistili, že koncentrace 125 mg/l inhibuje tvorbu biofilmu a v koncentraci 250 mg/l je biofilm eradikován. V naší práci byl použit *Bacillus subtilis*. Jeho tvorba biofilmu byla eradikována již v koncentraci 100 mg/l, protože vyšší koncentrace vykazovaly inhibici na růst. Aktivitu tymiánového oleje na růst a tvorbu biofilmu *Enterococcus faecalis* hodnotil Liu *et al.* (2020). MBC této bakterie byla stanovena na 512 mg/l a koncentrace 256 mg/l významně inhibovala po 72 hodinách tvorbu biofilmu. V naší práci tvořil *Enterococcus faecalis* CCM 4224 v koncentraci 250 mg/l velice slabý biofilm. Naměřená hodnota OD v této koncentraci po 72 hodinách byla téměř rovna hraniční hodnotě pro pozitivitu OD_H. Hodnota MBC byla v této práci stanovena na 500 mg/l, což se shoduje s výsledky této studie. Na základě výsledků bylo zaznamenáno, že thymol byl vůči růstu bakterií účinnější než karvakrol, čehož dosáhli ve své studii i Miladi *et al.*, (2016).

8 ZÁVĚR

I přesto, že jsou esenciální oleje považovány za relativně bezpečné, jejich použití v kosmetice a potravinářství je omezeno, protože vysoké koncentrace mohou ovlivňovat organoleptické vlastnosti kosmetických produktů a potravin, popřípadě způsobovat podráždění a alergie. Z tohoto důvodu je nutné stanovovat minimální inhibiční koncentrace nezbytnou k zabránění růstu nežádoucích patogenní mikroorganismů bez toho, aniž by došlo ke změně jakýchkoliv vlastností kosmetického produktu či potravin.

Nejprve byla v této práci stanovena citlivost bakterií k daným aktivním látkám esenciálních olejů. K tomuto byl použit koncentrovaný zásobní roztok a ke stanovení citlivosti nám posloužil diskový difúzní test. Největší inhibiční zóny se tvořili kolem disku s karvakolem a thymolem. Tímto testem bylo také zjištěno, že nejvíce citlivý vůči všem EO byl *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 a nejvíce odolný a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824.

Ke zjištění míry citlivosti či rezistence bakterií k aktivním látkám byl použit diluční test v mikrotitrační destičce s měřením absorbance a následným vyhodnocením MIC růstu. Všechny testované bakterie byly nejcitlivější na přítomnost cinnamaldehydu, kdy se inhibiční účinky na růst dostavily již při nízkých koncentracích. Byly také prokázány inhibiční účinky karvakrolu a thymolu, kdy tyto dvě látky byly schopné na rozdíl od cinnamaldehydu zastavit růst některých bakterií již v koncentraci 250 mg/l. Nejvíce vnímavý na přítomnost všech testovaných aktivních látek byl *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 a *Enterococcus faecalis* CCM 4224. Pro laktokoka byla MIC cinnamaldehydu stanovena na 6,25 mg/l, pro karvakrol na 50 mg/l a pro thymol na 25 mg/l. Pro enterokoka byla MIC cinnamaldehydu a karvakrolu stanovena na 6,25 mg/l a pro thymol na 50 mg/l. I přestože byl *Enterococcus faecalis* CCM 4224 vůči látkám velmi citlivý, dokázala tato bakterie růst v těch koncentracích, které byly pro ostatní bakterie inhibiční. Toho byl schopen i *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, jehož lze považovat za nejodolnější testovanou bakterii. Nejnižší inhibiční účinky vykazoval eugenol, kdy dokázal v nejvyšší koncentraci potlačit růst pouze *Bacillus subtilis* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48. Linalool nevykazoval vůbec žádnou antimikrobní aktivitu.

Dále byl proveden průkaz tvorby biofilmu v přítomnosti aktivních látek ve třech časových intervalech. Největší účinky na biofilm měl karvakrol a thymol. Thymol způsobil u *Bacillus subtilis* v koncentraci 100 mg/l časový posun tvorby biofilmu až na 72 hodin.

U *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CCM 4420 způsobil redukcí tvorby silného biofilmu na slabý již v koncentraci 50 mg/l. Karvakrol dokázal potlačit tvorbu biofilmu v koncentraci 250 mg/l u *Proteus mirabilis* CCM 7188, *Enterococcus faecalis* CCM 4224 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, i přestože bakterie byly schopné růstu. Cinnamaldehyd měl největší vliv na biofilm bakterií až v koncentraci 250 mg/l. Nejnižší účinky vykazoval eugenol a linalool, kdy v přítomnosti linaloolu všechny bakterie tvořily biofilm.

Na základě provedeného experimentu lze usoudit, že aktivní látky jsou vhodnou alternativou antimikrobních látek pro potravinářský a kosmetický průmysl. Velký potenciál se jeví v hledání nových alternativ vedoucích ke zvýšení účinnosti těchto látek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] A. SHAABAN, Hamdy, 2020. Essential Oil as Antimicrobial Agents: Efficacy, Stability, and Safety Issues for Food Application. SANTANA DE OLIVEIRA, Mozaniel, Wanessa
- [2] ALMEIDA DA COSTA a Sebastião GOMES SILVA, ed. *Essential Oils - Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications* [online]. IntechOpen [cit. 2020-11-07]. ISBN 978-1-83962-697-5. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.92305
- [3] ALBANO, Mariana *et al.*, 2019. Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. *Microbial Pathogenesis* [online]. **126**, 231-238 [cit. 2021-4-27]. ISSN 08824010. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2018.11.009
- [4] ALI, Babar *et al.*, 2015. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [online]. **5**(8), 601-611 [cit. 2020-11-04]. ISSN 22211691. Dostupné z: doi:10.1016/j.apjtb.2015.05.007
- [5] ALI, Islam A.A. *et al.*, 2020. Trans-cinnamaldehyde potently kills *Enterococcus faecalis* biofilm cells and prevents biofilm recovery. *Microbial Pathogenesis* [online]. **149** [cit. 2021-4-27]. ISSN 08824010. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2020.104482
- [6] ALVES, Susana *et al.*, 2016. Study of the major essential oil compounds of *Coriandrum sativum* against *Acinetobacter baumannii* and the effect of linalool on adhesion, biofilms and quorum sensing. *Biofouling* [online]. **32**(2), 155-165 [cit. 2020-12-10]. ISSN 0892-7014. Dostupné z: doi:10.1080/08927014.2015.1133810
- [7] AMORATI, Riccardo, Mario C. FOTI a Luca VALGIMIGLI, 2013. Antioxidant Activity of Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **61**(46), 10835-10847 [cit. 2020-11-07]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf403496k
- [8] ASHAKIRIN, Siti Nur *et al.*, 2017. *CHEMISTRY AND BIOACTIVITY OF CINNAMALDEHYDE: A NATURAL MOLECULE OF MEDICINAL IMPORTANCE* [online]. India: INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH, **8**(6), 2333-2340 [cit. 2020-11-28]. Dostupné z: doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.8(6).2333-40

- [9] BAPTISTE HZOUNDA FOKOU, Jean, Pierre MICHEL JAZET DONGMO a Fabrice FEKAM BOYOM, 2020. Essential Oil's Chemical Composition and Pharmacological Properties. A. EL-SHEMY, Hany, ed. *Essential Oils - Oils of Nature* [online]. IntechOpen [cit. 2020-11-10]. ISBN 978-1-78984-640-9. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.86573
- [10] BAŞER, K. Hüsnü Can a Gerhard BUCHBAUER, 2020. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. Third edition. Boca Raton: CRC Press. ISBN 9781351246460.
- [11] BEDNÁŘ, Marek, 1996. *Lékařská mikrobiologie bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6.
- [12] BEN ARFA, A. *et al.*, 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology* [online]. **43**(2), 149-154 [cit. 2021-4-30]. ISSN 0266-8254. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x
- [13] BOŽOVIĆ, Mijat *et al.*, 2017. Essential oils extraction: a 24-hour steam distillation systematic methodology. *Natural Product Research* [online]. **31**(20), 2387-2396 [cit. 2020-11-10]. ISSN 1478-6419. Dostupné z: doi:10.1080/14786419.2017.1309534
- [14] BURT, Sara A. *et al.*, 2014. The Natural Antimicrobial Carvacrol Inhibits Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum* and Reduces Bacterial Biofilm Formation at Sub-Lethal Concentrations. *PLoS ONE* [online]. **9**(4) [cit. 2020-11-16]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0093414
- [15] BURT, Sara, 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **94**(3), 223-253 [cit. 2020-11-04]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- [16] COOK, C.M. a T. LANARAS, 2016. Essential Oils: Isolation, Production and Uses. *Encyclopedia of Food and Health* [online]. Elsevier, s. 552-557 [cit. 2020-11-10]. ISBN 9780123849533. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00261-0
- [17] COCCHIARA, J. *et al.*, 2005. Fragrance material review on cinnamaldehyde. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **43**(6), 867-923 [cit. 2020-11-28]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2004.09.014

- [18] ČERMÁK, Pavel, c2008. *Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště*. Praha: Maxdorf. Jessenius. ISBN 978-80-7345-142-4.
- [19] ČESKO, 2009. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích. In: *Úřední věstník Evropské unie*. s. 59–209. ISSN 1725-5074. Dostupné z: doi:10.3000/17255074.L_2009.342.cze
- [20] ČSN EN ISO 17516. *Kosmetika – Mikrobiologie – Mikrobiologické limity*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2015.
- [21] ČSN EN ISO 22716. *Kosmetika – Správná výrobní praxe (SVP) – Směrnice pro správnou výrobní praxi*. Praha: Český normalizační institut, c2008.
- [22] DADASHI, Leila a Reza DEHGHANZADEH, 2016. Investigating incidence of bacterial and fungal contamination in shared cosmetic kits available in the women beauty salons. *Health Promotion Perspectives* [online]. **6**(3), 159-163 [cit. 2021-01-28]. ISSN 2228-6497. Dostupné z: doi:10.15171/hpp.2016.25
- [23] DAGLI, Namrata *et al.*, 2015. Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry* [online]. **5**(5) [cit. 2020-11-06]. ISSN 2231-0762. Dostupné z: doi:10.4103/2231-0762.165933
- [24] DE VINCENZI, M. *et al.*, 2004. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia* [online]. **75**(7-8), 801-804 [cit. 2020-11-16]. ISSN 0367326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.fitote.2004.05.002
- [25] DEVI, K. Pandima *et al.*, 2013. Eugenol alters the integrity of cell membrane and acts against the nosocomial pathogen *Proteus mirabilis*. *Archives of Pharmacal Research* [online]. **36**(3), 282-292 [cit. 2021-4-27]. ISSN 0253-6269. Dostupné z: doi:10.1007/s12272-013-0028-3
- [26] DHIFI, Wissal *et al.*, 2016. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines* [online]. **3**(4) [cit. 2020-11-04]. ISSN 2305-6320. Dostupné z: doi:10.3390/medicines3040025
- [27] DONLAN, Rodney M., 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* [online]. **8**(9), 881-890 [cit. 2020-10-30]. ISSN 1080-6040. Dostupné z: doi:10.3201/eid0809.020063

- [28] DONLAN, Rodney M., 2001. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clinical Infectious Diseases* [online]. **33**(8), 1387-1392 [cit. 2020-11-05]. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1086/322972
- [29] DUNN, Laurel L., P. Michael DAVIDSON a Faith J. CRITZER, 2016. Antimicrobial Efficacy of an Array of Essential Oils Against Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Science* [online]. **81**(2), M438-M444 [cit. 2021-4-26]. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/1750-3841.13181
- [30] ELSHAFIE, Hazem S. a Ippolito CAMELE, 2017. An Overview of the Biological Effects of Some Mediterranean Essential Oils on Human Health. *BioMed Research International* [online]. **2017**, 1-14 [cit. 2020-11-06]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2017/9268468
- [31] FLEMMING, Hans-Curt a Jost WINGENDER, 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **8**(9), 623-633 [cit. 2020-11-01]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2415
- [32] GAVARIC, Neda *et al.*, 2015. Chemical Profile, Antioxidant and Antibacterial Activity of Thyme and Oregano Essential Oils, Thymol and Carvacrol and Their Possible Synergism. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* [online]. **18**(4), 1013-1021 [cit. 2020-12-12]. ISSN 0972-060X. Dostupné z: doi:10.1080/0972060X.2014.971069
- [33] GRICE, Elizabeth A. a Julia A. SEGRE, 2011. The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **9**(4), 244-253 [cit. 2021-01-26]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2537
- [34] HASHEMI, Seyed Mohammad Bagher, Amin MOUSAVI KHANEGHAH a Anderson DE SOUZA SANT&APOS;ANA, ed., 2017. *Essential Oils in Food Processing* [online]. Wiley [cit. 2020-11-06]. ISBN 9781119149347. Dostupné z: doi:10.1002/9781119149392
- [35] HERMAN, Anna, Krzysztof TAMBOR a Andrzej HERMAN, 2016. Linalool Affects the Antimicrobial Efficacy of Essential Oils. *Current Microbiology* [online]. **72**(2), 165-172 [cit. 2020-12-10]. ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-015-0933-4

- [36] HEUER, Holger a Kornelia SMALLA, 2007. Horizontal gene transfer between bacteria. *Environmental Biosafety Research* [online]. **6**(1-2), 3-13 [cit. 2021-02-01]. ISSN 1635-7922. Dostupné z: doi:10.1051/ebr:2007034
- [37] CHEW, S.C. a L. YANG, 2016. Biofilms. *Encyclopedia of Food and Health* [online]. Elsevier, s. 407-415 [cit. 2020-10-30]. ISBN 9780123849533. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00069-6
- [38] CHOUHAN, Sonam, Kanika SHARMA a Sanjay GULERIA, 2017. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines* [online]. **4**(3) [cit. 2020-11-07]. ISSN 2305-6320. Dostupné z: doi:10.3390/medicines4030058
- [39] JAMAL, Muhsin *et al.*, 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association* [online]. **81**(1), 7-11 [cit. 2020-10-30]. ISSN 17264901. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcma.2017.07.012
- [40] KANG, Jiamu *et al.*, 2018. Effect of thyme essential oil against *Bacillus cereus* planktonic growth and biofilm formation. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **102**(23), 10209-10218 [cit. 2021-4-30]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-9401-y
- [41] KERÉKES, Erika-Beáta *et al.*, 2015. Essential oils against bacterial biofilm formation and quorum sensing of food-borne pathogens and spoilage microorganisms. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* [online]. Formatex Research Center, Badajoz: Microbiology Book Series, s. 429-437 [cit. 2020-11-07]. ISBN 978-84-942134-6-5. Dostupné z: <http://real.mtak.hu/80990/>
- [42] KIRMUSAOĞLU, Sahra, 2019. The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. KIRMUSAOĞLU, Sahra, ed. *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods* [online]. IntechOpen [cit. 2021-01-26]. ISBN 978-1-78985-789-4. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.84411
- [43] KLABAN, Vladimír, c2011. *Ekologie mikroorganismů: ilustrovaný lexikon biologie, ekologie a patogenity mikroorganismů*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-770-7.

- [44] KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ, 2010. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky : vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1880-7.
- [45] KOROCH, Adolfina R., H. RODOLFO JULIANI a Julio A. ZYGADLO, 2007. Bioactivity of Essential Oils and Their Components. BERGER, Ralf Günter, ed. *Flavours and Fragrances* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 87-115 [cit. 2020-11-07]. ISBN 978-3-540-49338-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-49339-6_5
- [46] KWON, J.A., C.B. YU a H.D. PARK, 2003. Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology* [online]. **37**(1), 61-65 [cit. 2021-4-26]. ISSN 0266-8254. Dostupné z: doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01350.x
- [47] LEE, Kwang-Geun a Takayuki SHIBAMOTO, 2002. Determination of Antioxidant Potential of Volatile Extracts Isolated from Various Herbs and Spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **50**(17), 4947-4952 [cit. 2021-01-27]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf0255681
- [48] LIU, Fang *et al.*, 2020. Antibacterial and antibiofilm activities of thyme oil against foodborne multiple antibiotics-resistant *Enterococcus faecalis*. *Poultry Science* [online]. **99**(10), 5127-5136 [cit. 2021-5-2]. ISSN 00325791. Dostupné z: doi:10.1016/j.psj.2020.06.067
- [49] LIU, Xue *et al.*, 2020. Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis* [online]. **141** [cit. 2021-5-2]. ISSN 08824010. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2020.103980
- [50] LOPEZ, D., H. VLAMAKIS a R. KOLTER, 2010. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **2**(7), a000398-a000398 [cit. 2020-10-30]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a000398
- [51] LÓPEZ, Juana Fernández a Manuel Viuda MARTOS, 2018. Introduction to the Special Issue: Application of Essential Oils in Food Systems. *Foods* [online]. **7**(4) [cit. 2020-11-11]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods7040056

- [52] MADSEN, Jonas Stenlökke *et al.*, 2012. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* [online]. **65**(2), 183-195 [cit. 2021-02-01]. ISSN 0928-8244. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x
- [53] MAGI, Gloria, Emanuela MARINI a Bruna FACINELLI, 2015. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Frontiers in Microbiology* [online]. **6** [cit. 2020-11-16]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2015.00165
- [54] MAH, Thien-Fah C a George A O'TOOLE, 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* [online]. **9**(1), 34-39 [cit. 2020-11-15]. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/S0966-842X(00)01913-2
- [55] MALACHOVÁ, Kateřina, 2004. *Ekologie mikroorganismů*. Ostrava: Ostravská univerzita. ISBN 80-7042-996-8.
- [56] MANU, David Kareem, 2016. *Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde or Geraniol alone or Combined with High Pressure Processing to Destroy Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica in Juices*. Iowa, 160 s. Dostupné také z: <https://lib.dr.iastate.edu/etd/15969>. Dissertation. Iowa State University of Science and Technology.
- [57] MARCHESI, Anna *et al.*, 2016. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry* [online]. **210**, 402-414 [cit. 2021-5-12]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.111
- [58] MAZZOLI, Sandra, 2015. Biofilm. PARNHAM, Michael, ed. *Encyclopedia of Inflammatory Diseases* [online]. Basel: Springer Basel, s. 1-16 [cit. 2020-10-30]. ISBN 978-3-0348-0620-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-0348-0620-6_82-1
- [59] MCCARTY, Sara *et al.*, 2014. Wound Infection and Biofilms. *Biofilms in Infection Prevention and Control* [online]. Elsevier, s. 339-358 [cit. 2020-10-30]. ISBN 9780123970435. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-397043-5.00018-9
- [60] MILADI, Hanene *et al.*, 2016. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. *Microbial Pathogenesis* [online]. **99**,

- 95-100 [cit. 2021-4-30]. ISSN 08824010. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2016.08.008
- [61] MOHAMMADI NEJAD, Solmaz, Hilal ÖZGÜNEŞ a Nursen BAŞARAN, 2017. Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. **14**(2), 201-206 [cit. 2020-11-28]. ISSN 1304-530X. Dostupné z: doi:10.4274/tjps.62207
- [62] MOLEYAR, Venkataramana a Pattisapu NARASIMHAM, 1992. Antibacterial activity of essential oil components. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **16**(4), 337-342 [cit. 2020-12-10]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/0168-1605(92)90035-2
- [63] NOURBAKHSI, Fahimeh a Amirmorteza Ebrahimzadeh NAMVAR, 2016. Detection of genes involved in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hygiene and Infection Control* [online]. (11), 1-5 [cit. 2021-01-27]. ISSN 2196-5226. Dostupné z: doi:10.3205/dgkh000267
- [64] OOI, Linda S. M. *et al.*, 2012. Antimicrobial Activities of Cinnamon Oil and Cinnamaldehyde from the Chinese Medicinal Herb *Cinnamomum cassia* Blume. *The American Journal of Chinese Medicine* [online]. **34**(03), 511-522 [cit. 2021-4-26]. ISSN 0192-415X. Dostupné z: doi:10.1142/S0192415X06004041
- [65] OUSSALAH, Mounia *et al.*, 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157. *Food Control* [online]. **18**(5), 414-420 [cit. 2021-4-26]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2005.11.009
- [66] PANDEY, Abhay K. *et al.*, 2017. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. *Frontiers in Microbiology* [online]. **7** [cit. 2020-11-06]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.02161
- [67] RAGUSO, Robert A. a Eran PICHERSKY, 1999. New Perspectives in Pollination Biology: Floral Fragrances. A day in the life of a linalool molecule. *Plant Species Biology* [online]. **14**(2), 95-120 [cit. 2020-12-10]. ISSN 0913-557X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1442-1984.1999.00014.x

- [68] RAY, Bibek a Arun K BHUNIA, 2014. *Fundamental food microbiology*. Fifth edition. Boca Raton: CRS Press, Taylor & Francis Group, an informa business. ISBN 978-1-4665-6443-5.
- [69] RÍOS, José-Luis, 2016. Essential Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* [online]. Elsevier, s. 3-10 [cit. 2020-11-04]. ISBN 9780124166417. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-416641-7.00001-8
- [70] RISS, T. L., 2018. Cell Viability Assays. SITTAMPALAM, G. S. *et al.*, ed. Assay Guidance Manual [online]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD), 1. 7. 2016, s. 357–388 [cit. 2021-01-27]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/pdf/Bookshelf_NBK53196.pdf
- [71] ROGERS, Kara, 2019. Horizontal gene transfer. *Encyclopedia Britannica* [online]. Encyclopaedia Britannica [cit. 2021-02-01]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/horizontal-gene-transfer>
- [72] RULÍK, Martin a Veronika HOLÁ, 2012. Mikrobiální biofilmy 1. Všudypřítomný a přítom málo známý fenomén. *Živa* [online]. **60**(3), 104-106 [cit. 2020-11-05]. ISSN 0044-4812. Dostupné z: <http://ziva.avcr.cz/2012-3/mikrobialni-biofilmy-1-vsudypritomny-a-pritom-malo-znamy-fenomen.html>
- [73] RULÍK, Martin, 2011. *Mikrobiální biofilmy*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-2747-8.
- [74] RULÍK, Martin, 2011. *Mikrobiální biofilmy*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-2747-8.
- [75] SALEHI, Bahare *et al.*, 2018. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy Research* [online]. **32**(9), 1688-1706 [cit. 2020-12-12]. ISSN 0951418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.6109
- [76] SARKIC, Asja a Iris STAPPEN, 2018. Essential Oils and Their Single Compounds in Cosmetics—A Critical Review. *Cosmetics* [online]. **5**(1) [cit. 2020-11-11]. ISSN 2079-9284. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics5010011
- [77] SCHINDLER, Jiří, 2001. Mikrobiální biofilm. *Vesmír*. (80(4), 203-206. ISSN 1214-4029. Dostupné také z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2001/cislo-4/mikrobialni-biofilm.html>

- [78] SCHINDLER, Jiří, 2008. *Ze života bakterií*. Praha: Academia. Průhledy (Academia). ISBN 978-80-200-1666-9.
- [79] SCHINDLER, Jiří, 2010. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3170-4.
- [80] SCHULTE, Simone, Jost WINGENDER a Hans-Curt FLEMMING, 2005. Fields of application: efficacy of biocides against biofilms. *Chemistry and materials science*. **10**(5), 93-120.
- [81] SOVOVÁ, Helena a Roumiana P. STATEVA, 2011. Supercritical fluid extraction from vegetable materials. *Reviews in Chemical Engineering* [online]. **27**(3-4) [cit. 2020-11-11]. ISSN 2191-0235. Dostupné z: doi:10.1515/REVCE.2011.002
- [82] SRIVASTAVA, Shilpi a Atul BHARGAVA, 2016. Biofilms and human health. *Biotechnology Letters* [online]. **38**(1), 1-22 [cit. 2021-01-30]. ISSN 0141-5492. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-015-1960-8
- [83] SUNTRES, Zacharias E., John COCCIMIGLIO a Misagh ALIPOUR, 2014. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. **55**(3), 304-318 [cit. 2020-11-16]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2011.653458
- [84] SWAMY, Mallappa Kumara, Mohd Sayeed AKHTAR a Uma Rani SINNIHA, 2016. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. **2016**, 1-21 [cit. 2020-11-04]. ISSN 1741-427X. Dostupné z: doi:10.1155/2016/3012462
- [85] ŠÍMA, Petr a Ilja TREBICHAŤSKÝ, 2006. Horizontální přenos genetické informace: Evoluce bakteriálních genomů. *Živa* [online]. **3**, 98-100 [cit. 2021-02-01]. Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/horizontalni-prenos-geneticke-informace-evoluce-ba.pdf>
- [86] TAKAHASHI, Hajime *et al.*, 2021. Evaluation of the antibacterial activity of allyl isothiocyanate, clove oil, eugenol and carvacrol against spoilage lactic acid bacteria. *LWT* [online]. **145** [cit. 2021-4-30]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2021.111263

- [87] TAO, Guoxin *et al.*, 2005. Eugenol and its structural analogs inhibit monoamine oxidase A and exhibit antidepressant-like activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. **13**(15), 4777-4788 [cit. 2021-5-12]. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2005.04.081
- [88] ULTEE, A. *et al.*, 2000. Antimicrobial Activity of Carvacrol toward *Bacillus cereus* on Rice. *Journal of Food Protection* [online]. **63**(5), 620-624 [cit. 2020-11-16]. ISSN 0362-028X. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X-63.5.620
- [89] ULTEE, A., M. H. J. BENNIK a R. MOEZELAAR, 2002. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **68**(4), 1561-1568 [cit. 2021-4-30]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002
- [90] UTAMI, DiyahTri *et al.*, 2021. Eugenol and thymol as potential inhibitors for polymicrobial oral biofilms: An in vitro study. *Journal of International Oral Health* [online]. **13**(1) [cit. 2021-4-27]. ISSN 0976-7428. Dostupné z: doi:10.4103/jioh.jioh_247_20
- [91] WALSH, Danica J. *et al.*, 2019. Antimicrobial Activity of Naturally Occurring Phenols and Derivatives Against Biofilm and Planktonic Bacteria. *Frontiers in Chemistry* [online]. **7** [cit. 2020-11-28]. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2019.00653
- [92] WANG, Tong-Hong *et al.*, 2016. Evaluation of the Antibacterial Potential of Liquid and Vapor Phase Phenolic Essential Oil Compounds against Oral Microorganisms. *PLOS ONE* [online]. **11**(9) [cit. 2020-11-16]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0163147
- [93] WHITCHURCH, C. B., 2002. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science* [online]. **295**(5559), 1487-1487 [cit. 2021-02-01]. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.295.5559.1487
- [94] ZIOSI, Paola *et al.*, 2010. Evaluating essential oils in cosmetics: Antioxidant capacity and functionality. *Cosmetics & Toiletries magazine*. **125**(6), 32-39.
- [95] ŽURKOVÁ, Lucie, 2019. *Inhibiční účinky vybraných mastných kyselin na biofilm pozitivní bakterie*. Zlín. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|--------|---|
| ATP | Adenosintrifosfát |
| BHI | Mozkosrdcová infuze |
| BTT | BioTimer test |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| EO | Aktivní látka esenciálního oleje |
| EPM | Extracelulární polymerní matrice |
| EU | Evropská unie |
| FISH | Fluorescenční in situ hybridizace |
| MBC | Minimální baktericidní koncentrace |
| MIC | Minimální inhibiční koncentrace |
| MTT | 3-[dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid |
| NK | Negativní kontrola |
| OD | Optická denzita |
| RT-PCR | Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase |
| SFE | Superkritická fluidní extrakce |
| SVP | Správná výrobní praxe |
| UV | Ultrafialové záření |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obrázek 1: Strukturní vzorec cinnamaldehydu (upraveno dle Ashakirin <i>et al.</i> , 2017) | 20 |
| Obrázek 2: Strukturní vzorec eugenolu (upraveno dle Tao <i>et al.</i> , 2005)..... | 21 |
| Obrázek 3: Strukturní vzorec karvakrolu (upraveno dle Ben Arfa <i>et al.</i> , 2006) | 21 |
| Obrázek 4: Strukturní vzorec linaloolu (upraveno dle Dhifi <i>et al.</i> , 2016)..... | 22 |
| Obrázek 5: Strukturní vzorec thymolu (upraveno dle Marchese <i>et al.</i> , 2016)..... | 22 |
| Obrázek 6: Tvorba biofilmu (upraveno dle Srivastava a Bhargava, 2016) | 25 |
| Obrázek 7: Schéma přípravy mikrotitrační destičky (upraveno dle Žurková, 2019) | 39 |
| Obrázek 8: Vliv cinnamaldehydu na růst A) <i>Bacillus subtilis</i> ; B) <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188 | 42 |
| Obrázek 9: Vliv cinnamaldehydu na růst C) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CCM 4420; D) <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224; E) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824; F) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48..... | 43 |
| Obrázek 10: Vliv eugenolu na růst A) <i>Bacillus subtilis</i> ; B) <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188; C) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CCM 4420; D) <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224; E) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824; F) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48..... | 44 |
| Obrázek 11: Vliv karvakrolu na růst A) <i>Bacillus subtilis</i> ; B) <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188; C) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CCM 4420; D) <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224 | 45 |
| Obrázek 12: Vliv karvakrolu na růst E) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824; F) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48 | 46 |
| Obrázek 13: Vliv linaloolu na růst A) <i>Bacillus subtilis</i> ; B) <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188. | 46 |
| Obrázek 14: Vliv linaloolu na růst C) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CCM 4420; D) <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224; E) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824; F) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48 | 47 |
| Obrázek 15: Vliv thymolu na růst A) <i>Bacillus subtilis</i> ; B) <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188; C) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CCM 4420; D) <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224; E) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824; F) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48 | 48 |
| Obrázek 16: Vliv cinnamaldehydu na tvorbu biofilmu A) <i>Bacillus subtilis</i> ; B) <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188; C) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CCM 4420; D) <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224; E) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824; F) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48 | 50 |
| Obrázek 17: Vliv eugenolu na tvorbu biofilmu A) <i>Bacillus subtilis</i> ; B) <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188..... | 51 |
| Obrázek 18: Vliv eugenolu na tvorbu biofilmu C) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CCM 4420; D) <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224; E) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824; F) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48..... | 52 |
| Obrázek 19: Vliv karvakrolu na tvorbu biofilmu A) <i>Bacillus subtilis</i> ; B) <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188; C) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CCM 4420; D) <i>Enterococcus faecalis</i> | |

| | |
|---|----|
| CCM 4224; E) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824; F) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48..... | 53 |
| Obrázek 20: Vliv linaloolu na tvorbu biofilmu A) <i>Bacillus subtilis</i> ; B) <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188; C) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CCM 4420; D) <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224..... | 54 |
| Obrázek 21: Vliv linaloolu na tvorbu biofilmu E) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824; F) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48..... | 55 |
| Obrázek 22: Vliv thymolu na tvorbu biofilmu A) <i>Bacillus subtilis</i> ; B) <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188; C) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CCM 4420; D) <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224; E) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824; F) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48..... | 56 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| Tabulka 1: Pipetované objemy pro přípravu pracovních roztoků aktivních látek..... | 38 |
| Tabulka 2: Průměry inhibičních zón na kultivační půdě | 41 |

