

Účinky esenciálních olejů na růst vybraných bakterií

Bc. Pavlína Suchá

Diplomová práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavlína Suchá**
Osobní číslo: **T11150**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Účinky esenciálních olejů na růst vybraných bakterií**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. V teoretické části vypracujte literární rešerši na zadané téma.
2. Věnujte se charakteristice esenciálních olejů, jejich vlastnostem a využití.
3. V další části se zaměřte na antibakteriální účinky esenciálních olejů a metody stanovení antibakteriální aktivity.
4. Dále se zaměřte na mikroemulze a jejich přípravu.

II. Praktická část

1. V praktické části sledujte antibakteriální účinky esenciálních olejů pomocí difúzní metody.
2. Připravte mikroemulze obsahující stejné esenciální oleje a stanovte jejich antibakteriální aktivitu pomocí difúzních i dilučních metod.
3. Získané výsledky zpracujte a vyhodnoťte. Srovnajte účinky samotných esenciálních olejů a olejů v mikroemulzi.
4. Srovnajte výsledky získané difúzními a dilučními metodami.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. BASER, K. H. C., BUCHBAUER, G. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. 1 st ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. 975 p. ISBN 978-1-4200-6315-8.
2. BERGER, R. G. Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. 1 st ed. Heidelberg: Springer, 2007. 648 p. ISBN 978-3-540-49338-9.
3. BAKKALI, F., AVERBECK, S., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. Food and Chemical Toxicology. 2008, 46, p. 446-475.
4. BASSOLÉ, I. H. N., JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules. 2012, 17, p. 3989-4006.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Iva Hauerlandová

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

11. února 2013

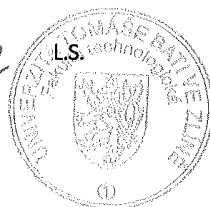
Termín odevzdání diplomové práce:

22. května 2013

Ve Zlíně dne 11. února 2013



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan



doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: *SUCHA PAULINA*

Obor: *CHTP KS*

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou 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);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně *5.5.2013*

..... *Sucha*

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:
(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) *Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlázení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.*

(3) *Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.*

²⁾ *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, § 35 odst. 3:*

(3) *Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).*

³⁾ *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, § 60 Školní dílo:*

(1) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.*

(2) *Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.*

(3) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na esenciální oleje, jejich antibakteriální účinky a možnosti využití. Teoretická část pojednává o chemickém složení esenciálních olejů, o metodách jejich získávání a o vlastnostech, které jsou pro jednotlivé oleje typické. Dále jsou charakterizovány mikroemulze, možnosti přípravy a metody jejich stanovení. Esenciální oleje jsou zkoumány pro široké možnosti jejich využití v potravinářství, farmacii a kosmetice. Praktická část je věnována studiu antibakteriálních účinků esenciálních olejů za pomoci difúzní diskové metody. Dále je zaměřena na přípravu mikroemulzí a měření antibakteriální aktivity olejů v mikroemulzi za pomoci difúzní a diluční metody. Esenciální oleje i mikroemulze z nich vytvořené byly testovány na grampozitivních a gramnegativních bakteriích a byl sledován jejich vliv na růst a množení těchto mikroorganismů.

Klíčová slova: esenciální olej, mikroemulze, mikroorganismus, antibakteriální aktivita.

ABSTRACT

The thesis is focused on essential oils, their antibacterial activity and their possible applications. The theoretical part deals with the chemical composition of essential oils, production methods and properties that are typical of each oil. The following part is devoted to microemulsions, their characteristics, determination and preparation. Essential oils are investigated for a wide range of applications in food, pharmaceutical and cosmetics. The practical part of the thesis deals with the evaluation of antibacterial effect of essential oils by disc diffusion method. Subsequently micro-emulsions with essential oils were prepared and determination of their antibacterial activity was carried out using diffusion and dilution methods. Essential oils and microemulsions were tested for their effect on the growth and reproduction of Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Keywords: essential oil, microemulsion, microorganism, antibacterial activity.

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Ivě Hauerlandové, Ph.D., za cenné rady, připomínky, vstřícný přístup a ochotu. Dále bych ráda poděkovala doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc., za pomoc při provedení a vyhodnocení praktické části práce. Můj dík patří všem laborantkám, rodině a blízkým.

Motto:

„Když už člověk jednou je, tak má koukat aby byl. A když kouká, aby byl, a je, tak má být to, co je, a nemá být to, co není, jak tomu v mnoha případech je.“

Jan Werich

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	
1 ESENCIÁLNÍ OLEJE.....	13
1.1 CHEMICKÁ CHARAKTERISTIKA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ.....	14
1.1.1 TERPENOIDNÍ UHLOVODÍKY.....	14
1.1.2 NETERPENOIDNÍ UHLOVODÍKY.....	16
1.2 VÝROBA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ.....	16
1.2.1 DESTILACE VODNÍ PAROU.....	16
1.2.2 LISOVÁNÍ.....	17
1.2.3 EXTRAKCE.....	18
1.3 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ.....	19
1.3.1 HŘEBÍČKOVÝ OLEJ.....	19
1.3.2 SKOŘICOVÝ OLEJ.....	19
1.3.3 CITRONOVÝ OLEJ.....	20
1.3.4 MÁTOVÝ OLEJ.....	20
1.3.5 EUKALYPTOVÝ OLEJ.....	21
1.3.6 LEVANDULOVÝ OLEJ.....	21
1.3.7 ANTIBAKTERIÁLNÍ SLOŽKY JEDNOTLIVÝCH ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ.....	21
1.4 ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ.....	22
1.4.1 ANTIVIROVÁ AKTIVITA.....	25
1.5 DALŠÍ BIOLOGICKÉ ÚČINKY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ.....	25
1.5.1 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA.....	25
1.5.2 ANALGETICKÁ AKTIVITA.....	26
1.5.3 DALŠÍ VÝZNAMNÉ ÚČINKY.....	26
2 METODY STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ.....	28
2.1 DILUČNÍ METODY.....	28
2.1.1 AGAROVÁ DILUČNÍ METODA.....	29
2.1.2 DILUČNÍ METODA V TEKUTÉM MÉDIU.....	29
2.2 DIFÚZNÍ METODY.....	29
2.2.1 DISKOVÁ DIFÚZNÍ METODA.....	30
2.2.2 EPSILON TEST CITLIVOSTI (E-TEST).....	30
3 EMULZE.....	31
3.1 KLASIFIKACE EMULZÍ.....	31

3.1.1	EMULZE DLE POLÁRNOSTI DISPERZNÍHO PODÍLU A PROSTŘEDÍ	31
3.1.2	EMULZE DLE KONCENTRACE DISPERZNÍHO PODÍLU	31
3.1.3	EMULZE DLE VELIKOSTI ROZPTÝLENÝCH ČÁSTIC	32
3.2	PŘÍPRAVA EMULZÍ	33
3.3	MIKROEMULZE	34
3.3.1	KLASIFIKACE MIKROEMULZÍ	35
3.3.2	PŘÍPRAVA MIKROEMULZÍ	36
II	PRAKTICKÁ ČÁST	
4	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	39
4.1	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	39
4.2	MATERIÁL	39
4.3	KULTIVAČNÍ MÉDIA	40
4.3.1	MUELLER HINTON AGAR	40
4.3.2	MASOPEPTONOVÝ AGAR (MPA)	41
4.3.3	MASOPEPTONOVÝ BUJÓN (MPB)	41
4.4	MODELOVÉ MIKROORGANIZMY	42
4.5	DEKONTAMINACE A LIKVIDACE MATERIÁLU	42
5	METODIKA	43
5.1	PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍ SUSPENZE	43
5.2	PŘÍPRAVA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	43
5.3	PŘÍPRAVA MIKROEMULZÍ	44
5.4	POZOROVÁNÍ ÚČINKU ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA VYBRANÉ BAKTERIE	45
5.5	POZOROVÁNÍ ÚČINKU ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ V MIKROEMULZÍCH NA VYBRANÉ BAKTERIE	46
5.5.1	METODA DIFÚZNÍ	46
5.5.2	METODA DILUČNÍ	46
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	48
6.1	DIFÚZNÍ METODA - VLIV ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA G⁺ BAKTERIE	48
6.1.1	VLIV OLEJŮ NA BAKTERII <i>BACILLUS CEREUS</i>	49
6.1.2	VLIV OLEJŮ NA BAKTERII <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	50
6.1.3	VLIV OLEJŮ NA BAKTERII <i>MICROCOCCUS LUTEUS</i>	51
6.1.4	VLIV OLEJŮ NA BAKTERII <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	52
6.2	DIFÚZNÍ METODA - VLIV ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA G⁻ BAKTERIE	53

6.2.1	VLIV OLEJŮ NA BAKTERII <i>ENTEROBACTER AEROGENES</i>	53
6.2.2	VLIV OLEJŮ NA BAKTERII <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i>	54
6.2.3	VLIV OLEJŮ NA BAKTERII <i>SERRATIA MARCESCENS</i>	55
6.2.4	VLIV OLEJŮ NA BAKTERII <i>PROTEUS VULGARIS</i>	56
6.2.5	VLIV OLEJŮ NA BAKTERII <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i>	57
6.2.6	VLIV OLEJŮ NA BAKTERII <i>ESCHERICHIA COLI</i>	58
6.3	DIFÚZNÍ METODA - VLIV EMULZÍ S ESENCIÁLNÍMI OLEJI NA BAKTERIE	60
6.3.1	VLIV EMULZÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA GRAMPOZITIVNÍ (G ⁺) BAKTERIE.....	60
6.3.2	VLIV EMULZÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA GRAMNEGATIVNÍ (G ⁻) BAKTERIE	62
6.4	DILUČNÍ METODA	63
6.4.1	VLIV EMULZÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA GRAMPOZITIVNÍ (G ⁺) BAKTERIE	64
6.4.2	VLIV EMULZÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA GRAMNEGATIVNÍ (G ⁻) BAKTERIE.....	65
	ZÁVĚR	66
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	79
	SEZNAM OBRÁZKŮ	80
	SEZNAM TABULEK	82
	SEZNAM PŘÍLOH	83

ÚVOD

Důvody zkoumání esenciálních olejů pramení především ze značných možností jejich využití. Řada autorů se zabývá esenciálními oleji pro jejich účinky a to především účinky antibakteriální, antivirové, analgetické, antimutagenní, antikarcinogenní nebo protizánětlivé. Jejich využití je stále předmětem mnoha studií. Jako efektivní se jeví využití ve farmacii, kosmetice nebo potravinářství. Oleje jsou zamýšleny jako možná prevence nebo léčba infekčních onemocnění nebo dokonce jako možná náhrada antibiotik, z důvodu zvyšující se rezistence bakterií k těmto chemickým látkám. Předmětem výzkumu jsou také přímé a nepřímé následky použití olejů a jejich jednotlivých těkavých složek. Otázkou zůstává, zda je jejich využití bezpečné k prodloužení doby udržitelnosti potravin a zda negativně neovlivní jejich organoleptické vlastnosti. K tomu je zapotřebí provést další studie.

Esenciální oleje jsou směsi těkavých látek, které jsou syntetizovány živými organizmy. Existuje mnoho způsobů jejich získávání, především lisování nebo destilace. Z literatury je známo, že složení oleje jednoho rostlinného druhu se může lišit v závislosti na zeměpisném původu pěstování, způsobu sklizně nebo metodě izolace. To může do značné míry ovlivnit účinky oleje a způsobit variabilitu v jeho složení.

Cílem této práce bylo zhodnotit antibakteriální účinnost vybraných esenciálních olejů. Dále pak vyrobit mikroemulze testovaných olejů. Studie byla provedena metodou difúzní diskovou a metodou diluční. Dalším cílem této diplomové práce bylo porovnat účinky esenciálních olejů a olejů v mikroemulzním systému. Antibakteriální účinek byl testován na gram-pozitivních a gramnegativních bakteriích.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ESENCIÁLNÍ OLEJE

Esenciální oleje (nazývány také jako éterické oleje či esence, EO) jsou komplexní směsi těkavých složek a jsou syntetizovány živými organismy. Tyto látky jsou nejčastěji rostlinného původu a mohou být izolovány různými metodami, zejména však destilací (vodní, parní, suchou) anebo lisováním (především z citrusových plodů) [1,2]. Za esenciální oleje obvykle nejsou považovány látky získané z rostlinných materiálů extrakcí organickými rozpouštědly. Některé esenciální oleje jsou také živočišného původu, např. spermacet vorvaňů (rod *Physeter*) či pižmo kabary pižmového (*Moschus moschiferus*). Dále jsou esenciální oleje produkovány také mikroorganismy [2].

Význam produkce esenciálních olejů rostlinnými buňkami a jejich biologická funkce nebyly doposud zcela objasněny. Z dostupné literatury však vyplývá, že esenciální oleje mohou působit například jako obranné látky poskytující rostlině ochranu proti škůdcům a okusu, dále se některé složky esenciálních olejů mohou podílet na komunikaci mezi rostlinami, nebo mohou sloužit jako tzv. vnitřní poslové. Často se jedná o produkty sekundárního metabolismu [3-8].

Obecně vzato mají všechny rostliny schopnost produkovat těkavé látky, mnohdy ovšem pouze ve stopovém množství [3]. Rostliny, které jsou využívány pro komerční produkci esenciálních olejů lze rozdělit do dvou skupin. Jedna skupina představuje rostliny produkující unikátní směs těkavých látek, které vytváří charakteristickou vůni dané rostliny (např. růže či jasmín). Tyto těkavé látky jsou přes epidermální vrstvy uvolňovány do okolního prostředí. Z takových rostlin lze získat pouze malé množství oleje a kromě destilace se používají i další metody pro zachycení těkavých vonných látek, například tzv. enfleuráž [3,9]. Pro druhou skupinu rostlin je typická schopnost akumulace těkavých látek ve specializovaných anatomických strukturách, což vede k vyšším koncentracím esenciálních olejů v dané rostlině. Mezi takové anatomické struktury patří například sekreční idioblasty, kavity nebo žláznaté trichomy [3,10].

Příkladem rostlinných čeledí, které produkují esenciální oleje, jsou: *Apiaceae* (miříkovité), *Asteraceae* (hvězdnicovité), *Cupressaceae* (cypřišovitě), *Hypericaceae* (třezalkovité), *Lamiaceae* (hluchavkovité) nebo *Pinaceae* (borovicovité) [2].

Esenciální oleje, stejně jako jejich frakce a izoláty jsou hojně využívány v mnoha odvětvích průmyslu. Jako vonné a chuťové látky jsou používány v potravinách a

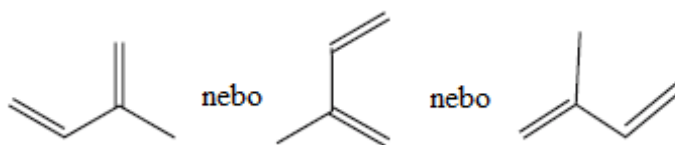
kosmetice. Mnohé oleje či jejich složky nachází uplatnění také ve farmaceutickém průmyslu. Antimikrobiální aktivita EO a jejich jednotlivých složek je základem rozmanitých produktů jako jsou ústní vody, antiseptika či konzervační systémy [11]. Samostatnou oblastí využití EO je aromaterapie. Esenciální oleje jsou používány v čistém i zředěném stavu [1,2,12,13].

1.1 Chemická charakteristika esenciálních olejů

Z hlediska chemického jsou esenciální oleje komplexní směsí látek, které obsahují zpravidla 20 až 60 různých komponent. Každý olej je tvořen ze dvou až tří majoritních složek, které jsou přítomny ve vysokých koncentracích, a z různého počtu minoritních složek přítomných ve stopovém množství. Například esenciální olej získaný z máty peprné může obsahovat až 60 % mentholu a téměř 20 % menthonu [10]. Složky esenciálních olejů jsou většinou lipofilní látky o malé molekulové hmotnosti. Jedná se o různé uhlovodíky a jejich kyslíkové deriváty. Mimo tyto sloučeniny mohou esenciální oleje obsahovat i další deriváty, a to zejména dusíkaté či sirné, ty se však vyskytují spíše v minoritním množství. Složky esenciálních olejů lze rozdělit do dvou skupin na terpenoidní a neterpenoidní komponenty. Většina složek má skelet složený z izoprenových jednotek a patří tudíž mezi terpeny [2,8,14]. Je známo, že složení esenciálních olejů získaných ze stejných druhů rostlin se může lišit v závislosti na jejich původu, klimatických podmínkách a způsobu sklizně. Různé chemické složení těchto olejů se pak může projevit i variabilitou jejich vlastností. Příkladem může být antibakteriální aktivita, která se může lišit u olejů získaných ze stejných rostlinných druhů pěstovaných v různých klimatických podmínkách [15,16].

1.1.1 Terpenoidní uhlovodíky

Terpenoidní uhlovodíky (nazývány také izoprenoidy) jsou tvořeny přesmykem jedné či více izoprenových jednotek (obr. 1). Terpenoidní uhlovodíky jsou děleny dle počtu izoprenových jednotek na monoterpeny (dvě jednotky; $C_{10}H_{16}$), seskviterpeny (tři jednotky; $C_{15}H_{24}$) a diterpeny (čtyři izoprenové jednotky; $C_{20}H_{32}$). Jedná se o nejpočetnější skupinu vonných látek. Ze živých organismů (mikroorganismy, rostliny, živočichové) se podařilo izolovat více než 30 000 různých terpenoidů [2].



Obr. č. 1 Izoprenová jednotka [upraveno podle 2]

Monoterpeny jsou tvořeny ze dvou izoprenových jednotek. Vyskytují se v acyklické či lineární formě (např. β -myrcen) nebo také v cyklické formě (např. p-cymen) [4,17]. Aromatické monoterpeny obsahující benzenové jádro (např. p-cymen, karvakrol, tymol) jsou častými složkami esenciálních olejů (např. oregáno, tymián) [2].

Seskviterpeny jsou tvořeny třemi izoprenovými jednotkami. Existují lineární, rozvětvené a také cyklické seskviterpeny (monocyklické, bicyklické či bicyklické). Tato skupina látek patří mezi nejrozmanitější skupinu těkavých terpenoidních látek [2,18].

Diterpeny obsahují ve své molekule čtyři izoprenové jednotky. Obecně můžeme tyto sloučeniny najít v pryskyřicích (abietová kyselina, pimarová kyselina) či esenciálních olejích (např. phytol). Další skupinou látek jsou C_{13} norterpenoidy, což je obsáhlá skupina C_{13} sloučenin, které vznikají degradací karotenoidů či katabolickým metabolismem kyseliny abscisové. Tyto látky se nachází např. v mučence purpurové (*Passiflora edulis*), v čaji (*Thea sinensis*) a v některých esenciálních olejích [2].

Fenylpropanoidy jsou látky syntetizované metabolickou drahou kyseliny shikimové (název dle japonského květu – shikimi). Tyto sloučeniny mají ve své struktuře na aromatickém jádře navázaný řetězec se třemi atomy uhlíku. Základní molekulou této skupiny je tedy fenylpropan. Tyto látky tvoří vedle terpenů jednu z nejdůležitějších součástí esenciálních olejů. Složkami esenciálních olejů bývají většinou jednoduché fenylpropanoidy. Mezi významné látky vyskytující se v esenciálních olejích z této skupiny patří eugenol, cinnamaldehyd či vanilin [2].

Laktony jsou cyklické estery kyseliny mléčné ($C_3H_6O_3$). Obsahují heterocyklicky navázaný kyslík vedle karbonylové funkční skupiny v pěti či šestičlenných nasycených nebo nenasyčených kruzích. Laktony obsahující ve své molekule pětičlenný kruh se nazývají γ -laktony, laktony obsahující šestičlenný kruh se nazývají δ -laktony. Jsou to složky několika esenciálních olejů a přírodních těkavých látek [2].

1.1.2 Neterpenoidní uhlovodíky

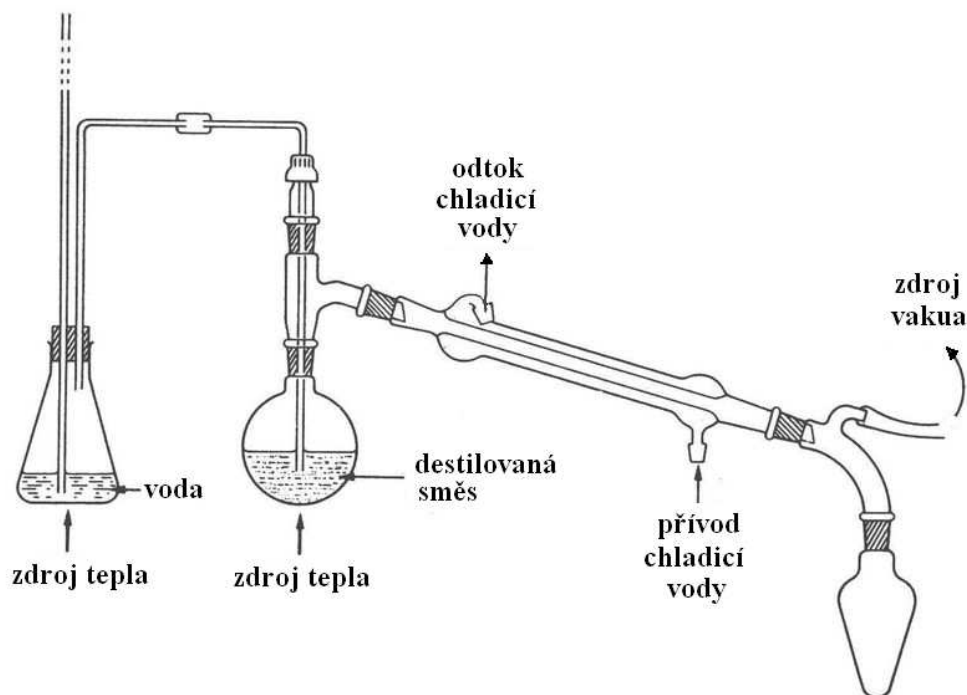
Neterpenoidní uhlovodíky vznikají metabolickou přeměnou anebo degradací fosfolipidů a mastných kyselin. Jedná se většinou o alkoholy s krátkým řetězcem či aldehydy. Tyto látky mohou ve svém řetězci obsahovat také síru, kyslík či dusík [19].

1.2 Výroba esenciálních olejů

Silice jsou významnými surovinami v kosmetickém, farmaceutickém, ale také potravinářském průmyslu. Tyto látky jsou získávány z různých částí rostlin [1-3]. Mohou být získávány z květů (např. růže či jasmín), stonků (např. levandule, máta), plodů či semen (např. jalovec, pepř), kořenů či oddenků (např. iris), plodů (např. citrusy), listů (např. petitgrainová silice), pryskyřic (např. myrthová silice) nebo dřeva (např. cedr). Nezbytným faktorem procesu získávání silic je především vhodně zvolená metoda a postup izolace těchto látek, který významnou měrou ovlivňuje kvalitu získaných esenciálních olejů [14-22]. Existují tři základní metody získávání těchto látek, které se postupem času a s moderní technologií inovují a zdokonalují. Mezi tyto metody patří: destilace vodní parou, lisování a extrakce [23-26].

1.2.1 Destilace vodní parou

Destilace vodní parou (obr. 2) je nejčastěji používanou metodou produkce esenciálních olejů. Principem tohoto postupu je zahřívání rostlinného materiálu v destilační aparatuře. Materiál je zde buď zalit vodou, anebo je vodní pára přiváděna do aparatury z odděleného zdroje. Vodní pára z rostlinného substrátu strhává uvolňující se silici a ta se v jímaném destilátu usazuje jako olejová vrstva. Ta se následně odděluje a dále zpracovává. Při výrobě dražších olejů (např. destilovaný růžový olej či olej z pomerančových květů) se obvykle extrahují navíc i tzv. destilační vody, což vede ke vzniku vyššího zisku oleje. Takto získané extrakty se nazývají silice z kohobačnických (destilovaných) vod [23].



Obr. 2: Schéma destilace vodní parou [27]

Tímto postupem je získáváno největší množství olejů. Destilací vodní parou se izolují např. kmínové, badyánové, mátové, eukalyptové, zázvorové, aj. oleje [23].

1.2.2 Lisování

Tento technologický postup je typický pro získávání olejů z citrusových plodů, resp. z jejich slupek (oplodí). Lisování silic probíhá při zpracování citrusů na šťávy. Citrusové plody jsou při tomto procesu zpracovány ve speciálním zařízení, které olej ze slupek uvolní. Ten je následně odplaven vodou. Po ukončení tohoto procesu jsou následně citrusy odšťaveny [20,25,26].

Oleje, které jsou získány pomocí destilace či lisování, jsou zpravidla následně technologicky upravovány. Většina získaných olejů je poměrně obtížně rozpustná v etanolu a to z důvodu vysokého podílu terpenických a seskviterpenických uhlovodíků. Tyto uhlovodíky v důsledku působení vzdušného kyslíku oxidují či polymerují a dochází tak k poklesu celkové kvality získaných olejů. Oleje, jež jsou následně použity k výrobě produktů s nižším obsahem etanolu (např. kosmetické výrobky či potravinářská aromata), jsou upravovány a to tak, aby došlo k odstranění těchto uhlovodíků. Ze silic jsou odstraňovány monoterpeny a pak se jedná o tzv. oleje prosté terpenů. Jsou-li odstraněny seskviterpeny, tak hovoříme o tzv. oleje prosté seskviterpenů. Souhrnně lze takové to oleje označit pojmem deterpeno-

vané silice. Takovéto silice jsou zpravidla stabilnější, obtížněji podléhají oxidaci a jsou lépe rozpustné v lihu [28].

Terpeny mohou být ze silic odstraňovány několika technologickými postupy. Mezi takové metody patří:

- azeotropická destilace zředěným lihem - je zřejmě nejstarší a také nejméně účinná metoda,
- moderní deterpenace - je založena na principu odlišné rozpustnosti jednotlivých složek silic ve dvou rozpouštědlech, která jsou vzájemně nemísitelná,
- kombinace obou metod,
- částečná deterpenace – za pomoci destilace za sníženého tlaku je využívána především u citrusových silic [24].

1.2.3 Extrakce

Nejstarší způsob získávání esenciálních olejů z rostlinných materiálů je extrakce. U tohoto procesu se vonné látky adsorbovaly nejprve do tuku či oleje. Dnes se tento technologický postup nazývá enflueuráž (= postup získávání vonných látek z květin extrakcí tukem při pokojové teplotě) [23,25,26,29].

Tato metoda je nejen náročná, ale také nákladná a proto se používala zejména při výrobě luxusních a nejdražších silic z květů (např. jasmínová silice, silice z pomerančových květů). Čerstvé květy byly pokladeny na tenkou vrstvu směsi tuků, která zachycovala odpařované silice. S postupným odpařováním vznikne pomáda, což je tuk nasycený silicemi. Pomáda je následně extrahována lihem. Výsledný výluh je vymražen a filtrován za vzniku tzv. laváže. Z laváže je poté oddestilován etanol a je získána tzv. absolutní silice [20,25,26].

V současné době jsou absolutní silice vyráběny extrakcí za pomoci nízkovroucích rozpouštědel, jako je například petroleter. Použité rozpouštědlo je následně oddestilováno za vzniku finálního produktu. Výsledný produkt má polotuhou, voskovitou konzistenci a nazývá se konkrét (tzv. konkrétní silice). Vzniklý konkrét obsahuje mimo vonných látek také vosky, z toho důvodu je konkrét rozmíchán v lihu, směs je vymrazena a přefiltrována. Stejně jako v předcházejícím případě je filtrát zpracován na absolutní silici [20,25].

1.3 Charakteristika vybraných esenciálních olejů

Esenciální oleje se od sebe liší především svým rostlinným původem, dále pak chemickým složením a dalšími vlastnostmi. V této kapitole jsou detailněji popsány vybrané esenciální oleje, a to olej hřebíčkový, skořicový, citronový, mátový, eukalyptový a levandulový. Tyto esenciální oleje byly využívány v experimentální části předkládané diplomové práce.

1.3.1 Hřebíčkový olej

Tento esenciální olej je získáván z rostliny *Eugenia caryophyllata* (čeleď *Myrtaceae*). Jedná se o zelený, asi dvacet metrů vysoký strom, který pochází ze střední Asie. Dnes se pěstuje především na Madagaskaru či Zanzibaru. Silice se získává destilací listů či suchých pupat vodní parou. Jedná se o kapalinu žluté až nahnědlé barvy, která s postupem času hnědne [14]. Silice z listů se vyznačuje kořenitou, suchou bylinnou vůní a není tak typická jako vůně oleje z plodů hřebíčku. Ta je pronikavá, sladce kořenitá. Olej vykazuje antiseptické a prohřívací účinky, dále podporuje trávení, působí proti infekcím v trávicím traktu a v dýchacích cestách. Silice z listů hřebíčku má širší spektrum antiseptického působení. Olej z plodů hřebíčku je kromě výše zmíněného vhodný také při únavě, průjmů, chladu, svalových a kloubních problémech. Esenciální olej z hřebíčku není vhodné používat na hypersenzitivní, poškozenou nebo nemocnou pokožku, dále při vysokém krevním tlaku a pro děti mladší tří let [30,31]. Hřebíčková silice obsahuje eugenol, eugenylacetát, amylmetylketon, β -karyofylen. Pokud je esenciální olej získán z pupenů, tak kromě předchozích látek obsahuje navíc α -pinen, metylbenzoát, heptanol, nonanol, benzylalkohol, 2-furfurylalkohol a metylsalicylát [14].

1.3.2 Skořicový olej

Silice je získávána z *Cinnamomum zeylanicum* (čeleď *Lauraceae*), což je stále zelený strom dorůstající do výšky deseti metrů. Tato rostlina má kopinaté listy a drobné květy, které se vyskytují v hroznech. Skořicový esenciální olej je získáván pomocí destilace vodní parou, a to z kůry či listů. Původ silice dále determinuje nejen její chemické složení, ale i její další vlastnosti [14]. Olej, který byl získán z kůry, vykazuje intenzivní kořenitou vůni a jedná se o červenohnědou kapalinu. Silice získaná z listů je typická svou jemnou hořkou vůní s kouřovým ovocným nádechem a jedná se o žlutou kapalinu. Skořicový esenciální olej získaný z kůry je silně prohřívací a posiluje srdeční činnost a trávení. Je vhodný při

močopohlavních infekcích a depresi. Silice získaná z listů je oproti tomu vhodným doplňkem při léčbě dýchacích cest. Skořicová silice by se neměla používat na hypersenzitivní, poškozenou či nemocnou pokožku, dále při vysokém krevním tlaku a také u dětí do tří let věku [32-34]. Jak již bylo řečeno výše, tak se jednotlivé silice liší svým původem a proto i chemické složení je odlišné. Olej z kůry obsahuje cinnamaldehyd, eugenol, felandner, α -pinen, β -karyofylen, *p*-cymen, linalool, 3-fenylpropanal, benzaldehyd, kuminaldehyd, furfural, nonanal, amylmethylketon. Oproti tomu olej z listů obsahuje α -pinen, felandreen, dipenten, linalool, geraniol, borneol, α -terpineol a jeho estery, cinnamaldehyd, benzylbenzoát, benzylaldehyd, cinnamylalkohol, menthenon, safrol, eugenol [14].

1.3.3 Citronový olej

Silice se získává ze stále zeleného stromu *Citrus limonum* (čeleď *Putaceae*), který kvete od února do října bílými květy. Plody stromu jsou oválné a žluté. Olej je získáván lisováním slupek kůry za studena, popřípadě destilací vodní parou. Silice je získávána jako vedlejší produkt při výrobě citronové šťávy. Jedná se o světle žlutou až nazelenalou kapalinu, která vykazuje typicky svěží citronovou vůni [14]. Tento éterický olej je považován za jeden z nejlepších olejů na celkové pročištění organismu, který má pozitivní vliv na celulitidu, obezitu, žlučnickové a močové kameny, dále cysty. Stimuluje lymfatický systém, čistí žaludek a střeva [35]. Hlavními složkami tohoto oleje jsou citral, D-limonen, α -pinen, myrcen, γ -terpinen, α -terpineol, linalool, geraniol, linalylacetát, geranylacetát, 6-methyl-5-hepten-2-on, nonanal, dekanal, citronellol, citropten. V amerických esenciálních olejích se vyskytují ještě další substituované kumariny [14].

1.3.4 Mátový olej

Máta peprná (*Mentha piperita*) je vytrvalá bylina z čeledi hluchavkovité (*Lamiaceae*), která kvete od července do září. Rostlina dorůstá 50 – 80 centimetrů, její květy jsou uspořádány v hustých lichopřeslenech a mohou být růžové až nafialovělé barvy. Tento druh vznikl zkřížením máty vodní (*Mentha aquatica*) a máty klasnaté (*Mentha spicata*) [14]. Éterický olej vykazuje výraznou svěží mátovou vůni s chladivým efektem. Snižuje práh bolestivosti, posiluje zažívání (zejména koliku, nevolnost, zácpu či nadýmání) a také nervový systém (závratě, migréna, špatná paměť a koncentrace). Byl prokázán protiinfekční účinek. V distribuční síti lze nalézt silice máty peprné, dále silice máty zelené (*Mentha viridis*)

a máty kadeřavé (*Mentha crispa*) [36]. Tato silice má vysoký obsah mentholu, dále jsou v něm zastoupeny: menthon, mentol acetát, menthofuran, sabinen, piperiton a 1,8-cineol [14]. V předkládané práci byl použit také mátový olej v biokvalitě.

1.3.5 Eukalyptový olej

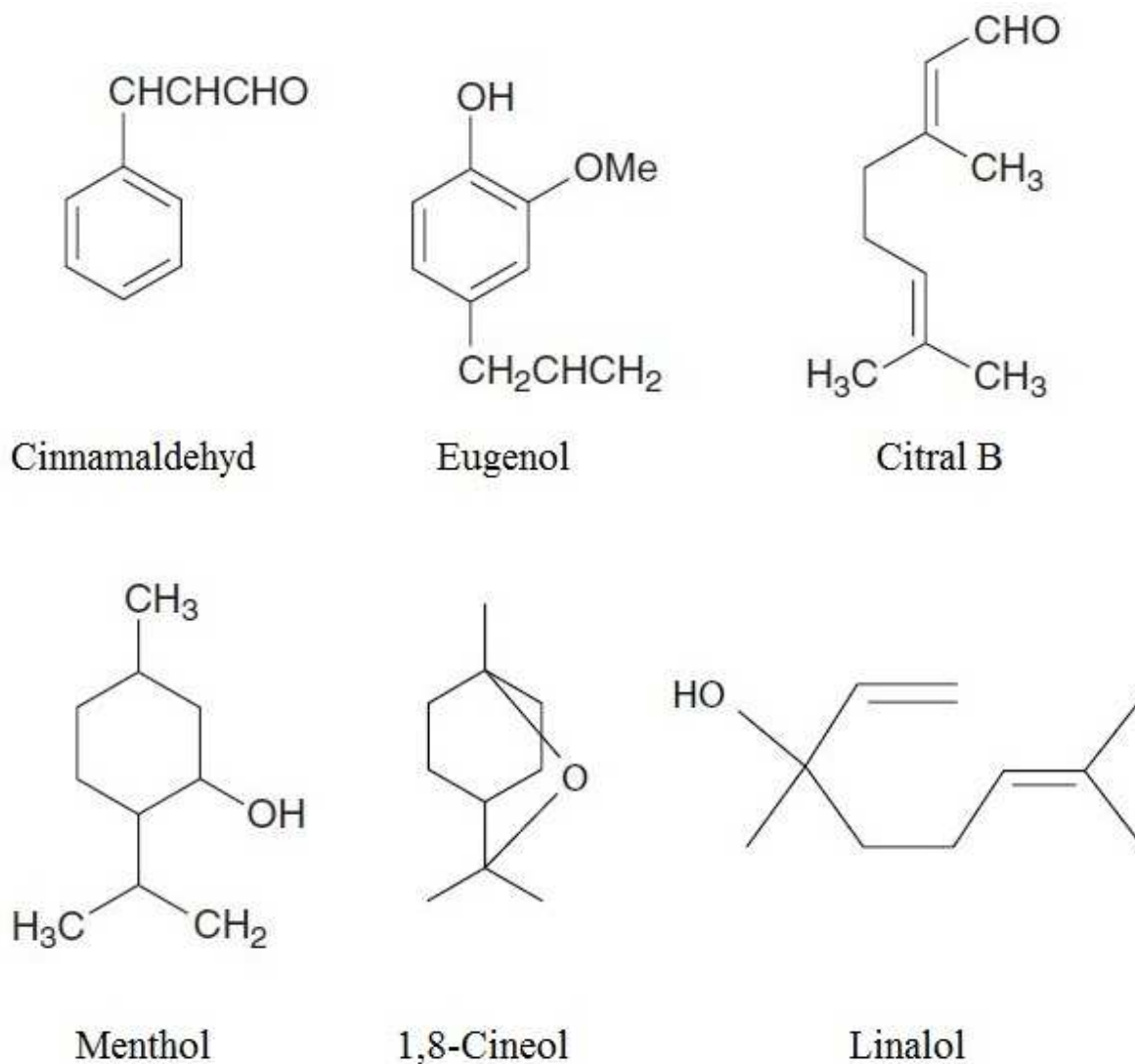
Eucalyptus (česky blahovičník) je rod, který obsahuje více než 700 druhů subtropických až tropických stromů nebo keřů z čeledi myrtovitých (*Myrtaceae*). Získává se destilací vodní parou. Pro tuto silici je typická kafrová vůně. Jedná se o jeden z neúčinnějších éterických olejů používaných při infekcích dýchacích či močových cest. Napomáhá vykašlávání, posiluje, je značně protivirový zejména v oblasti otorhinolaryngologie (lékařský obor zabývající se ušními, nosními a krčními chorobami). Je doporučován při akutních a chronických bronchitidách [37]. Významnými složkami silice je cineol (někdy nazýván eukalyptol), dále piperiton, citral, methylcinnamát, uranyl acetát. V praktické části byl použit esenciální olej z rostliny *Eucalyptus polybractea*.

1.3.6 Levandulový olej

Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*) je bohatě větvený polokeř, vysoký 20 – 60 centimetrů, který kvete mezi červnem a srpem šedofialovými květy [14]. Silice vykazuje sladce bylinnou, jemnou, lehce květinovou vůni. Éterický olej je vhodný k všestrannému využití, např. k ošetření oděrek, spálenin či různých kožních onemocnění (lupénka, ekzém). Zklidňuje a snižuje krevní tlak, pomáhá při bolestech, srdečních a nervových obtížích. Díky svým uklidňujícím účinkům není vhodný při nízkém krevním tlaku [38]. Květy obsahují 1 – 3 % silice, kterou tvoří linilacetát, linalool, izoborneol, borneol, geraniol, cineol, kafr a další složky). V nati je oproti tomu méně silice, ale více tříslovin.

1.3.7 Antibakteriální složky jednotlivých esenciálních olejů

Antimikrobiální látky jsou chemické sloučeniny, které zpomalují růst mikroorganismů či způsobují jejich usmrcení [39,40]. Vzorce vybraných antimikrobních látek obsažených v esenciálních olejích jsou zobrazeny na obrázku 3. Skořicový EO (*Cinnamomum zeylanicum*) obsahuje mezi hlavními komponenty (v sestupném pořadí) cinnamaldehyd, 1-linalool a eugenol. Hřebíčkový EO (*Syzygium aromaticum*) obsahuje eugenol a karyofylen.



Obr. 3: Chemické vzorce vybraných účinných složek esenciálních olejů (cinnamaldehyd, eugenol, citral B, mentol, 1,8-cineol, linalol) [upraveno podle 39]

1.4 Antimikrobiální aktivita esenciálních olejů

Existuje celá řada studií zabývajících se zkoumáním biologicky aktivních látek, které jsou obsaženy v esenciálních olejích. Tyto studie vznikají zejména z důvodu zvyšující se rezistence mikroorganismů vůči mnohým antimikrobiálním látkám. Antimikrobiální aktivita esenciálních olejů je dána jejich aktivními složkami, kterými jsou izopreny (monoterpeny, seskviterpeny), dále fenoly či uhlovodíky. Obecně lze uvést, že antimikrobiální aktivita jednotlivých složek EO klesá v následujícím pořadí:

fenoly > aldehydy > ketony > alkoholy > estery > uhlovodíky [41,42].

Z tohoto tvrzení vyplývá, že esenciální oleje, které obsahují látky fenolové povahy (např. thymol či karvakrol), jsou z hlediska antimikrobiální aktivity nejúčinnější. Odborná literatura uvádí, že tyto látky jsou aktivní vůči širokému spektru mikroorganismů [42].

Existuje celá řada studií, které klasifikují antimikrobiální aktivitu mnoha esenciálních olejů [39]. Zaika (1988) hodnotil antimikrobiální aktivitu vybraných látek [43]. Výše zmíněná studie uvádí, že oleje ze skořice a hřebíčku zde vykazovaly silné inhibiční účinky na růst mikroorganismů. Antimikrobiální aktivita skořicového a hřebíčkového oleje je připisována eugenolu a cinnamaldehydu, které představují hlavní složku esenciálních olejů těchto koření. Skořice obsahuje 0,5 - 1,0 % éterického oleje, který obsahuje 65 - 75 % cinnamaldehydu a 8 % eugenolu. Hřebíček obsahuje průměrně 17 % esenciálního oleje, a ten je tvořen z 93 % - 95 % eugenolem [39,44,45]. Je poměrně obtížné vzájemně srovnávat výsledky podobných studií, jelikož autoři používají k hodnocení antimikrobiální aktivity značné množství metod a různé kultivační podmínky. Většina prací se shoduje na výrazném antimikrobiálním účinku olejů s vyšším obsahem fenolických látek [39,43].

Deriváty fenolu jsou sloučeniny, které ve své struktuře obsahují molekulu fenolu a jeden či více substituentů. Bylo prokázáno, že tato chemická změna může vést ke zvýšení antimikrobiální aktivity fenolických sloučenin.

Tyto přirozeně se vyskytující fenoly a fenolové sloučeniny mohou být řazeny do následujících skupin:

- jednoduché fenoly a fenolové kyseliny (p-kresol, kyselina vanilová, kyselina galová, hydrochinon),
- deriváty kyseliny hydroxyskořicové,
- flavonoidy (flavonoidy),
- taniny (rostlinné fenoly, které jsou schopny srážet bílkoviny ve vodných roztocích) [39].

Jak již bylo zmíněno výše, některé z fenolických sloučenin mají široké antimikrobiální spektrum působení. Mezi tyto látky patří právě tymol, cinnamaldehyd a eugenol [39,46,47]. Antimikrobiální aktivita fenolických sloučenin byla prokázána proti mnohým bakteriím. Zároveň bylo zjištěno, že grampozitivní bakterie jsou na působení fenolických sloučenin citlivější [39].

Cinnamaldehyd a esenciální olej získaný z kůry skořice vykazuje silný inhibiční účinek i na eukaryotické mikroorganismy *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus versicolor* a *Aspergillus ochraceus* [39,48]. Inhibiční účinek pozoroval také Bullerman (1974), který ve studii uvádí, že obsah 1 - 2 % mleté skořice v tekutém médiu sice zcela nezamezilo růstu *Aspergillus parasiticus*, nicméně jejím působením došlo ke snížení produkce aflatoxinu o 99 %. Tentýž autor ve své další studii prokázal, že skořicový esenciální olej působil inhibičně na *Aspergillus parasiticus* již v koncentraci 200 ppm (parts per million) [49]. Hlavní součástí tohoto oleje je cinnamaldehyd, který vykazoval inhibiční účinky již na úrovni 150 ppm [39,50]. Další literatura uvádí, že cinnamaldehyd v subinhibičních koncentracích, tedy v koncentracích nižších než MIC (minimal inhibitory concentration), významně zpomaluje růst další toxinogenní plísně rodu *Aspergillus*, plísně *Aspergillus flavus* [39,51].

Poměrně zajímavá je otázka antimikrobního účinku esenciálních olejů, tedy směsí látek, a účinku jednotlivých izolovaných složek. Paster *et al.* (1995) uvádí, že látky karvakrol a tymol (látky obsažené v tymiánovém esenciálním oleji) mají menší inhibiční účinky na růst plísní oproti komplexním výtažkům z tymiánu [52]. Tento jev naznačuje, že antimikrobiální aktivita daného esenciálního oleje může být výsledkem synergického působení jednotlivých chemických složek, a to nejen fenolů, ale i dalších sloučenin. Tymiánový esenciální olej má dle odborné literatury značnou antimikrobiální aktivitu. Terpeny, jako je karvakrol, p-cymen a tymol jsou hlavní těkavé složky tohoto oleje, které se podílí na této aktivitě [39,43,53,54]. Tymiánový esenciální olej obsahuje 43 % tymolu a 36 % p-cymenu [39,53,54]. Bylo zjištěno, že mikroorganismy *Bacillus subtilis*, *Salmonella Enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgani* a *Escherichia coli* byly inhibovány karvakrolem a tymolem, a to v ředění 1:2000 [39]. Účinky tymolu zkoumali také Buchanan a Shepherd (1981), kteří zjistili, že 100 ppm tymolu potlačuje růst *Aspergillus parasiticus* při inkubaci 7 dní za teploty 28 °C [55]. Esenciální olej z tymiánu také působí inhibičně na *Vibrio parahaemolyticus* či *Staphylococcus aureus* [39,56].

I další autoři studovali vliv izolovaných složek esenciálních olejů na růst a množení mikroorganismů. Byl proveden výzkum, ve kterém byla testována antimikrobiální aktivita 32 fenolických sloučenin. V této studii je uváděno, že 0,05 % eugenolu, karvakrolu či tymolu v agaru působily inhibičně proti *Bacillus subtilis*, *Salmonella Enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgani* a *Escherichia coli*. Autoři také dospěli k závěru, že přítom-

nost hydroxylové skupiny je významným faktorem, který vede k posílení antimikrobiální aktivity, [10,11,39]

Některé esenciální oleje či jejich složky působí inhibičně i na sporulující bakterie, tedy na skupinu mikroorganismů vyznačující se značnou odolností k působení faktorů vnějšího prostředí. Eugenol, který je obsažen v hřebíčkovém i skořicovém oleji, je považován za jednu z nejúčinnějších antimikrobiálních látek rostlinného původu. Působením této látky v koncentracích 0,1 - 1,0 % po dobu 8 dní při teplotě 37 °C došlo ke snížení životaschopnosti spor bakterie *Bacillus subtilis* [39,57].

1.4.1 Antivirová aktivita

Stejně jako v předcházejícím případě, tak i zde platí, že dochází k postupnému zvyšování rezistence virů k antivirotikům, a z toho důvodu je potřeba hledat nové možnosti a nové látky, které jsou proti virovým infekcím účinné. Vhodnou volbou mohou být dle dostupné literatury právě esenciální oleje. Příkladem může být eukalyptový olej, který je používán při léčbě respiračních virových chorob. [42].

1.5 Další biologické účinky esenciálních olejů

V posledních letech byly esenciální oleje komercializovány a zájem průmyslových odvětví byl zaměřen především na jejich biologickou aktivitu a další vlastnosti [20,25,26]. Oleje vykazují řadu účinků, pro které byly a do určité míry stále jsou, využívány jako složky farmaceutických suplementů [14]. Specifickou oblastí použití esenciálních olejů je aromaterapie. Pro aromaterapeutické účely se esenciální oleje zřídka používají v koncentrovaném stavu, častější je použití ředěného oleje. Mohou se inhalovat, aplikovat přímo na kůži či použít jako složky koupele. V důsledku proniknutí esenciálních olejů potom mohou působit na vnitřní orgány [58].

1.5.1 Antioxidační aktivita

Antioxidanty jsou látky, jejichž molekuly jsou schopny omezit aktivitu volných kyslíkových radikálů a snižovat tak pravděpodobnost jejich vzniku či je převádějí do méně reak-

tivních stavů. Tímto působením antioxidanty omezují proces oxidace v daném organizmu či prostředí, ve kterém se vyskytují. Reaktivní formy kyslíku působí na živé organizmy, mezi škodlivé účinky patří například dezintegrace buněčné membrány, porušení mitochondrií či narušení enzymatické aktivity membrány. Tyto reaktivní formy mohou být také faktorem vzniku některých degenerativních chorob. Běžnou formou reaktivního kyslíku je peroxid vodíku, který způsobuje například peroxidaci lipidů a také oxidativní změny deoxyribonukleové kyseliny (DNA) v buňkách [42]. Významnými antioxidanty, které se vyskytují v přírodě, jsou vitamíny či právě esenciální oleje [42,59].

1.5.2 Analgetická aktivita

Analgetikum je látka, která je používána k úlevě od bolesti a k dosažení analgezie, což je stav bez bolesti. Tyto látky snižují vnímání bolesti, ale neodstraňují její příčinu. Jedním z analgetik obsažených v esenciálních olejích je mentol, což je sloučenina charakteristická svou mentolovou (mátovou) vůní i chutí. Analgetický účinek této látky byl potvrzen US Food and Drug Administration, která jej klasifikuje jako analgetikum k lokálnímu použití. Při zevním použití mentol podporuje prokrvení, způsobuje mírné brnění a dodává chladivý pocit [42,60]. Analgetické účinky vykazují i další esenciální oleje, zejména ty, které byly získány z *Dodonaea angustifolia* či *Salvia africana lutea* [42].

1.5.3 Další významné účinky

Esenciální oleje vykazují i další významné charakteristiky, např. analeptické (povzbuzující), spasmolytické (uvolňující křeče), neurologické či antihistaminové účinky. Významné jsou účinky na hladké svalstvo a to konkrétně na žaludek (olej skořicový, mátový, levandulový a hřebíčkový). U některých esenciálních olejů byly prokázány pozitivní účinky na močové ústrojí (jalovcový olej), funkci štítné žlázy a produkci žluče. Nelze opomenout ani vliv esenciálních olejů na psychiku člověka. Poslední výzkumy ukazují, že čich je v této oblasti nejvýraznějším smyslovým orgánem [26]. Některé z olejů vykazují jasnou antimitagenní schopnost a ta je často spojována s antikarcinogenní aktivitou. Nedávné studie prokázaly, že prooxidační aktivita esenciálních olejů, nebo některých z jejich složek, je velmi účinná při snižování růstu místních nádorů a proliferaci nádorových buněk. Oleje způsobují apoptózu (programovanou buněčnou smrt) nádorových buněk, ale nevykazují žádné mu-

tagenní, toxické, nebo nežádoucí účinky na zdravé tkáně [61]. Podle Bakkaliho inhibuje eugenol proliferaci nádorových buněk [62].

2 METODY STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ

Metody, pomocí kterých lze sledovat případný antimikrobiální účinek esenciálních olejů, lze rozdělit do dvou skupin, na metody difúzní a diluční [63,64]. Difúzní metody jsou většinou používány díky své jednoduchosti a rychlosti provedení jako metody screeningové [11]. Diluční metody jsou vhodné i ke kvantitativnímu posouzení stupně citlivosti a ke stanovení hladiny MIC (minimální inhibiční koncentrace), což je nejnižší koncentrace, která viditelně inhibuje růst daného mikroorganismu. Minimální inhibiční koncentrace je nejčastějším vyjádřením míry antimikrobiálního působení. V některých studiích autoři používají i termín minimální baktericidní koncentrace (MBC), kterou lze definovat jako nejnižší koncentraci dané látky, která je potřebná k usmrcení mikroorganismů [65,66].

Testování různých mikrobiálních kultur je prováděno ve vhodných kultivačních médiích za optimálních podmínek, a to vzhledem k jednotlivým testovaným kmenům. Mikroorganismy, které jsou využívány k testování, jsou získávány ze sbírek čistých kultur anebo mohou být izolovány po odběru z prostředí (mléko, rostliny, aj.) [63]. Tyto metody jsou po určitých úpravách vhodné i pro pomalu rostoucí bakterie, ale také pro bakterie se speciálními nároky (např. anaerobní bakterie). Pro tyto druhy bakterií jsou vyvinuty speciální modifikace metod, půd a kultivačních podmínek [64,67].

2.1 Diluční metody

Tyto metody jsou prováděny za účelem stanovení stupně citlivosti (rezistence) testovaných mikroorganismů vůči daným antimikrobiálním látkám. Lze je také využít k taxonomickému zařazení mikroorganismů či pro laboratorní ověření inhibičních účinků u nových přípravků [68].

Podstatou dilučních metod je přidání přesného množství testované látky do kultivačního média. Antimikrobiální látky lze přidávat do pevných půd (agarů) i do půd tekutých (bujónů). Po zaočkování médií bakteriemi a kultivaci se hodnotí růst, respektive absence růstu, za přítomnosti dané koncentrace testované látky. V případě esenciálních olejů může být provedení testu v tekutém médiu problematické díky nízké rozpustnosti esenciálních olejů ve vodě [11,28].

Řešením může být použití rozpouštědel (např. dimetylsulfoxidu nebo etanolu) či detergentů (např. Tween 20), což ale může mít vliv na stanovení hodnoty MIC díky možným interakcím těchto látek se složkami esenciálního oleje či díky jejich vlivu na mikroorganismy [28,69,70].

2.1.1 Agarová diluční metoda

Principem tohoto stanovení je hodnocení MIC na agarových plotnách, které obsahují dané koncentrace inhibičních látek (většinou 12 - 15 koncentrací řaděných dvojnásobně geometrickou řadou). Na půdy je naočkováno inokulum testovaných mikroorganismů. Pro sledování běžně rostoucích bakterií se standardně využívá Mueller-Hinton agar. Tato metoda je referenční, lze vyšetřit vysoké množství kmenů za stejných (srovnatelných) podmínek, je spolehlivá při hodnocení nových antimikrobních látek a lze jí odhalit kontaminace kmene i heterorezistentní populaci [64,68,67].

2.1.2 Diluční metoda v tekutém médiu

Tato metoda také slouží ke stanovení MIC. Lze ji provádět ve zkumavkách s testovaným objemem větším než 1 ml i v mikromodifikaci s použitím mikrotitračních destiček. Sterilní mikrodiluční plastová destička, která v jednotlivých jamkách obsahuje různé koncentrace inhibičních látek v bujónu, je inokulována suspenzí sledovaných bakterií a dále inkubována za optimální teploty [64,67]. Hodnocení lze provést vizuálně, v takovém případě je stanovena jako MIC nejnižší koncentrace, při níž nedochází k viditelnému zakalení média. Další možností je turbidimetrické stanovení, měření absorbance nebo přímé stanovení počtu buněk pomocí počítačích komůrek [71-73].

2.2 Difúzní metody

Difúzní metody se provádí na pevných půdách, na jejichž povrch jsou naočkovány mikroorganismy a testovaná látka je buď dávkována na papírový disk, nebo do jamek vyhloubených do ztuhlé půdy. Podstatou metody je difúze testované látky z disku (jamky) do okolního média. Pokud je na testovanou látku mikroorganismus citlivý, dojde k vytvoření tzv. inhibiční zóny kolem disku (jamky), tedy zóny bez nárůstu buněk. Jelikož rychlost difúze je závislá na typu použité půdy, užívá se standardně Mueller-Hinton agar, který umožňuje dobrou difúzi a srovnání výsledků mezi jednotlivými laboratoři [28,64].

2.2.1 Disková difúzní metoda

Cílem této diagnostické metody je prokázání citlivosti nebo rezistence zkoumaných mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám. Jedná se tedy o metodu kvalitativní, nejde o měření stupně citlivosti [64,67]. Tato metoda je založena na inokulaci standardizovaným inokulem mikroorganismů na povrch média (nejčastěji Mueller Hinton agar) na Petriho miskách. Na povrch média jsou následně umístěny standardní papírové disky s inhibiční látkou. Za předpokladu, že jsou použity Petriho misky o průměru 9 cm, je doporučeno, aby sestava obsahovala maximálně 6 disků. Po ukončení předepsané doby kultivace je měřen průměr zón vzniklých kolem každého disku. Velikost vzniklých inhibičních zón je důležitá například pro terapeuticky dosažitelné hladiny léčiv v krvi při systémových onemocněních [64,67,68].

Tato metoda je vhodná ke stanovení rezistence zejména pro nenáročné rychle rostoucí mikroorganismy. Naopak, není doporučováno tuto metodu praktikovat u bakterií se speciálními kultivačními nároky (např. anaerobní mikroorganismy) či pomalu rostoucí mikroorganismy [64,67].

2.2.2 Epsilon test citlivosti (E-test)

Tato diagnostická metoda je poměrně novou technikou, která je podobná agarové difúzní metodě, ale tato metoda v sobě kombinuje difúzní i diluční metody pro stanovení citlivosti mikroorganismů *in vitro*. Na rozdíl od difúzní diskové metody je pomocí E-testu stanovena i hodnota MIC. Tato metoda je ovšem praktická pouze za předpokladu, že je potřeba otestovat pouze malé množství odlišných antimikrobních substancí, a to především z důvodu finanční náročnosti a vyšší míry pracnosti.

Na agarové plotny se standardním inokulem jsou aplikovány E-testové proužky, které na svých krajích obsahují gradient antimikrobní látky. Tato látka následně proniká do média a ovlivňuje růst sledovaného mikroorganismu. Antimikrobní látka difunduje do agaru a tím je vytvářen kontinuální koncentrační gradient právě dané antimikrobní látky podél strany E-proužku. Po uplynutí inkubační doby je vytvořena elipsoidní inhibiční zóna. Hodnota MIC je odečtena v místě, kde se prolíná okraj proužku s hranicí růstu bakterií. Touto metodou je možno stanovit široké spektrum koncentrace antimikrobní látky, jelikož tato technika umožňuje kontinuální ředění [67].

3 EMULZE

Emulze je definována jako heterogenní disperze, v níž jsou disperzní podíl i disperzní prostředí kapalné. Pro tvorbu emulzí platí, že kapaliny, které spolu emulzi vytváří, jsou vzájemně nemísitelné nebo jen omezeně mísitelné [74,75]. Emulze vzniká dispergováním vzájemně nemísitelných kapalin, kdy jedna z kapalin vytváří disperzní podíl (rozptýlený na drobné kapky) v kapalném disperzním prostředí druhé kapaliny. Velikost kapek bývá u emulzí v rozmezí 0,1 – 10 μm a mnohdy přesahuje koloidní rozměry, filmy mezi kapkami mohou být koloidních rozměrů [75].

3.1 Klasifikace emulzí

Emulze jsou členěny a tříděny dle několika hledisek, a to podle:

- polárnosti disperzního podílu a prostředí,
- koncentrace disperzního podílu,
- velikosti rozptýlených částic [75,76].

3.1.1 Emulze dle polárnosti disperzního podílu a prostředí

Tyto emulze jsou děleny na emulze přímé a emulze obrácené. Emulze přímé (tzv. prvního druhu) jsou označovány jako emulze o/v (olej ve vodě „o“ značí nepochopitelně fází, a to bez ohledu na to, zda je olejová konzistence či nikoliv; „v“ značí pochopitelně kapalínu).

Emulze obrácené (tzv. druhého druhu) jsou označovány jako emulze v/o (voda v oleji). Disperzním prostředím u tohoto typu emulze je méně polární kapalina [75].

Zdali se jedná o emulzi prvního či druhého druhu, lze určit podle její elektrické vodivosti, která je dána vodivostí disperzního prostředí (emulze o/v je vodivější než emulze v/o). Dále můžeme druh emulze stanovit podle schopnosti rozpouštět polární a nepochopitelně barviva, dle schopnosti mísit se s polárními nebo nepochopitelně rozpouštědly, pozorováním v UV světle (olejová fáze fluoreskuje) či podle smáčivosti (emulze o/v smáčí hydrofilní povrch, emulze v/o nikoliv).

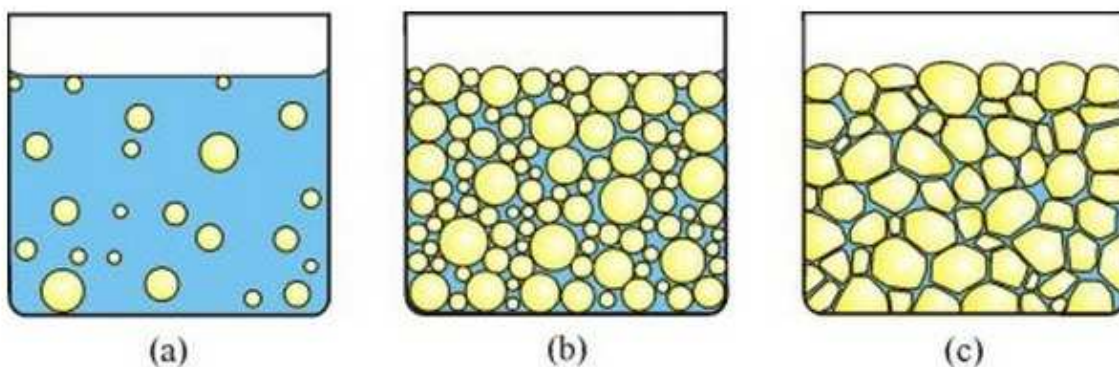
3.1.2 Emulze dle koncentrace disperzního podílu

Rozdělení emulzí dle disperzního podílu je následující: zředěné emulze, koncentrované emulze a gelovité emulze (nazývané též vysoce koncentrované emulze, obr. 4).

Zředěné emulze jsou takové heterogenní disperze, jejichž disperzní podíl zaujímá maximálně 2 % celkového objemu. Průměr kapiček v takovéto emulzi je obvykle řádově 10^{-7} m, což se blíží rozměru koloidních částic.

Koncentrované emulze jsou charakteristické tím, že disperzní podíl je tvořen nedeformovanými sférickými kapkami, které mohou v monodisperzních systémech dosáhnout koncentrace až 74 obj. %.

Gelovité (vysoce koncentrované) emulze jsou disperze, v nichž jsou částice disperzního podílu uloženy tak blízko sebe, že se vzájemně deformují a získávají tak tvar mnohostěnnů, které jsou od sebe odděleny tenkými filmy koloidních rozměrů (vrstvičkami disperzního prostředí a emulgátoru) [75].



Obr. 4: Typy emulzí dle koncentrace disperzního podílu

(a) zředěná emulze, (b) koncentrovaná emulze, (c) vysoce koncentrovaná (gelovitá) emulze

[upraveno podle 75]

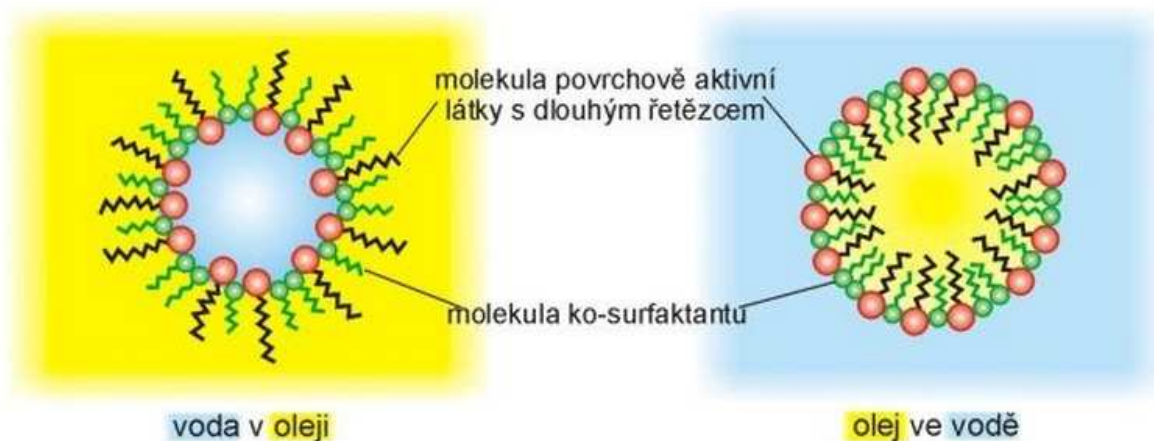
3.1.3 Emulze dle velikostí rozptýlených částic

Podle velikostí rozptýlených částic jsou emulze děleny na makroemulze, mikroemulze a nanoemulze.

Makroemulze jsou disperze s velikostí částic ≥ 100 nm, obvykle v rozmezí 100 – 1000 nm. Jedná se o kalné, mléčně zbarvené a termodynamicky nestabilní disperze, které jsou stabilizovány kineticky [74]. V důsledku tohoto jevu závisí stabilita těchto disperzí na velikosti částic a také na složení emulze [77].

Mikroemulze jsou disperze s velikostí částic 10 – 100 nm (obr. 5), které jsou čiré a termodynamicky stabilní [74]. Mikroemulze tvoří přechod mezi emulzemi a micelárními

koloidy. Vznikají spontánně při vysokých koncentracích povrchově aktivní látky a vysokém obsahu solubilizátu za přítomnosti ko-surfaktantu. Ko-surfaktant je povrchově aktivní látka, jejíž uhlovodíkový řetězec není dost dlouhý, aby mohl samostatně asociovat micely, ale může samostatně vstupovat do struktury micel asociativních koloidů. Příkladem mohou být alkoholy se střední délkou řetězce (např. hexanol) [78,79].



Obr. 5: Schematické znázornění kapky mikroemulze [upraveno podle 78]

Nanoemulze jsou průhledné disperze s velikostí částic 50 – 200 nm. Význam těchto emulzí roste v posledních letech zejména v oblasti zdravotnictví a kosmetiky [77].

3.2 Příprava emulzí

Emulze jsou připravovány procesem dispergace, což je proces rozptýlování jedné fáze (kapalně či tuhé) do fáze druhé (většinou kapalně). Emulze vzniká za předpokladu, že se jedna kapalina disperguje do druhé, přičemž jedna vytváří spojitě prostředí a druhá je v tomto prostředí dispergována ve formě relativně malých kapek [80,81]. Proces dispergace jedné kapaliny ve druhé se nazývá emulzifikace. Obvykle je emulzifikace prováděna dvoustupňovým způsobem, kdy probíhá nejprve primární emulzifikace (vznik hrubé emulze s relativně velkými částicemi dispergované fáze) a následně sekundární emulzifikace (úprava velikosti částic) [80,81,82].

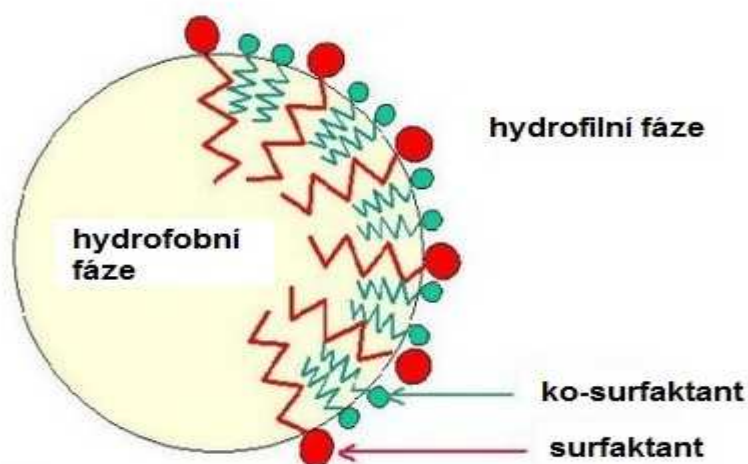
Výrobní proces emulzních systémů lze shrnout do tří po sobě následujících kroků: pre-emulzifikace, emulzifikace a stabilizace [81,83]. Pre-emulzifikace je proces, při kterém jsou fáze vody a oleje spojovány mícháním za zvýšené teploty. Výsledkem je vznik premixu (hrubé disperze) s obsahem velkých částic. Samotná emulzifikace je proces, v jehož

průběhu jsou velké částice premixu deformovány smykovými silami, čímž dojde ke snížení finální velikosti částic [83]. Externí smykové síly musí být dostatečně velké na to, aby byla překonána soudržná síla původní částice, a také je nezbytné, aby tyto síly působily dostatečně dlouhou dobu [82]. Nově vzniklá disperze je stabilizována proti shlukování (koalescenci) za použití emulgátorů [80,83]. Ty vytváří na povrchu částic ochrannou vrstvu a dále snižují mezipovrchové napětí, což usnadňuje samotný proces emulzifikace. Důležitým faktorem ovlivňujícím proces emulzifikace je teplota. Minimální hodnota teploty je dána bodem tání olejové fáze, jelikož v průběhu emulzifikace musí být olejová fáze v kapalném stavu. Při vyšší teplotě dochází ke snižování mezipovrchového napětí, dále se snižuje viskozita obou fází, což vede k usnadnění emulgace. Maximální hodnota použité teploty je stanovena na základě vlastností použitého emulgátoru, např. tepelnou stabilitou bílkovin [82].

3.3 Mikroemulze

Jak již bylo zmíněno výše, mikroemulze jsou čiré, termodynamicky stabilní a homogenní disperze dvou nemísitelných (či omezeně mísitelných) kapalin. Odborné publikace nejsou zcela jednotné ve tvrzení, že mikroemulze jsou termodynamicky stabilní, a mnohé z nich upřednostňují označení „spontánně vytvořené“, Garti & Yuli-Amar uvádějí, že mikroemulze jsou definovány jako systémy, které se skládají z olejových či vodných nanooblastí, které spolu existují v termodynamické rovnováze. Jiný pokus označit takové systémy, které nejsou termodynamicky stabilní, ale spíše kineticky stabilní, jako mikroemulze, je dle těchto autorů zavádějící a nepřesné. Pro skutečné mikroemulze je charakteristická nízká hodnota viskozity a velikost částic dispergované fáze v rozmezí 10 – 100 nm [84].

Mikroemulze (obr. 6) vytváří přechod mezi emulzemi a micelárními roztoky [85]. V odborné literatuře se vyskytují synonyma pro mikroemulze, například transparentní emulze, solubilizovaný olej či zbotnalé micely. Tyto disperze vykazují mnohé specifické vlastnosti. Jedná se o transparentní nebo mírně opalescentní systémy, což je způsobeno přítomností částic, jejichž velikost je menší než vlnová délka viditelného světla. Mikroemulze mají nízké hodnoty viskozity a mezifázového napětí [86].



Obr. 6: Mikroemulze [upraveno podle 87]

3.3.1 Klasifikace mikroemulzí

Základní charakteristiky, které odlišují mikroemulze od běžných emulzí, jsou následující: mikroemulze obsahují částice minimálně o řád menší než emulze běžné, jsou transparentní a polotransparentní, vznikají spontánně, jsou stabilní vůči separaci svých složek a množství surfaktantu k jejich přípravě je vyšší [88].

V průběhu studia mikroemulzí byly zkoumány fázové diagramy zachycující chování olejové a vodné fáze, dále ko-surfaktantu a surfaktantu. Dle těchto ternárních a kvartérních diagramů byly mikroemulze charakterizovány. Mikroemulze o/v je disperze olejové fáze uzavřené do vodné fáze a jsou označovány jako L_1 izotropní fáze. Tento typ je charakterizován jako micely zbotnalé v oleji. Za předpokladu, že je v jádru micel uzavřena vodná fáze, tak se jedná o L_2 fázi, která reprezentuje mikroemulzi v/o [84].

Dalším parametrem, podle něhož jsou mikroemulze členěny, je koncentrace surfaktantu. Pro nízké a střední hodnoty surfaktantu jsou známy tři druhy mikroemulzí, obecně označovány jako Winsor.

- mikroemulze typu Winsor I – jedná se o dvoufázový systém, ve kterém se vyskytují běžné micely (ve spodní části) v rovnováze s nadbytkem olejové fáze (v/o),
- mikroemulze typu Winsor II – reverzní micely (horní část) v rovnováze s nadbytkem vodné fáze (o/v),

- mikroemulze typu Winsor III – bikontinuální fáze s obsahem oleje, vody a povrchově aktivní látky, v rovnováze s nadbytkem vodní i olejové fáze (o/v plus v/o),
- mikroemulze typu Winsor IV – jednofázový mikroemulzní systém, ve kterém jsou voda i olej úplně solubilizovány v surfaktantové mikroemulzní fázi [84,89].

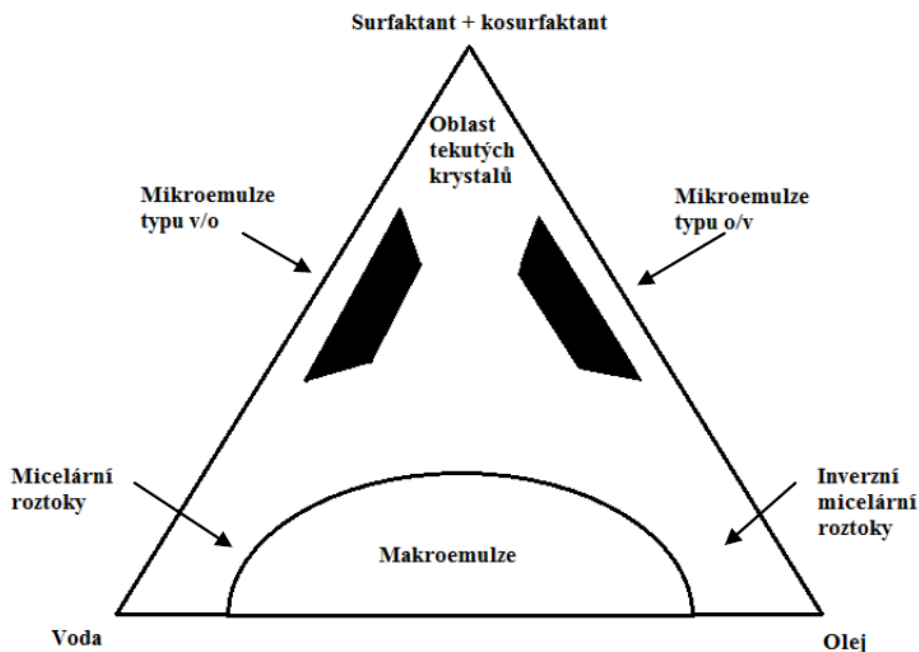
Ovlivněním vnějších podmínek může dojít k přeměně jednotlivých typů mikroemulzí, a to především v závislosti na typu použitých surfaktantů. Při použití ionických surfaktantů může dojít k přeměně typu I-II-II za předpokladu zvýšení koncentrace elektrolytu. Při použití neionických surfaktantů mohou změny teploty docílit změny jeho hydrofility. Narůstající koncentrace elektrolytu či teplota má za následek, že se povrchově aktivní látka stane hydrofobnější, což vede k většímu oddělení rozhraní voda-olej. Tento jev snižuje povrchové zakřivení filmu povrchově aktivní látky a také mezipovrchové napětí. Nulové zakřivení povrchu vede ke vzniku mikroemulze Winsor III. Pokud je v této mikroemulzi zvýšena koncentrace povrchově aktivní látky, pak dochází k přeměně na mikroemulzi Winsor IV. Dle literatury je považována za ideální mikroemulze typu Winsor III [84,89].

3.3.2 Příprava mikroemulzí

Příprava mikroemulzí vyžaduje zvětšení jednofázové oblasti, která představuje homogenní oblast, tak aby její příprava následně vyžadovala jen minimální množství surfaktantu. Při výrobě potravinářských komodit (např. margaríny), jenž vyžadují při své výrobě mikroemulze v/o, je nezbytné maximalizovat obsah vody, která je dispergována v rámci olejové fáze obsahující surfaktant. Oproti tomu u výrobků vyžadující mikroemulzi o/v (např. některé druhy nápojů) je potřeba dispergovat maximální množství olejové fáze ve směsích vody a surfaktantu. U obou výše zmíněných případů je možno výsledku dosáhnout s minimálním použitím surfaktantu [84].

Směsi, které vytvářejí izotropní oblasti s mikroemulzními disperzemi, byly charakterizovány za použití fázových diagramů hlavních složek – emulgátor, olej, voda. Tyto diagramy byly vytvořeny na základě titrační metody směsí surfaktantu a olejové fáze s vodou. Cílem této metody bylo vytvoření izotropních homogenních oblastí, které byly vytvořeny za současného vysokého nadbytku surfaktantu [84]. Mikroemulze jsou běžně připravovány sponánní emulzifikací a mohou být popsány právě pomocí fázových diagramů. Čtyřfázový dia-

gram (olej, voda, surfaktant, ko-surfaktant) je ovšem poměrně časově náročný, nejen z hlediska jeho vlastní přípravy, nýbrž i následné interpretace. S přihlédnutím k tomuto hledisku bývá častěji využíván nepravý, tzv. pseudo – třífázový diagram (obr. 7). Hlavními složkami tohoto digramu je surfaktant, voda a olej/ko-surfaktant. Tento typ fázového digramu je sestavován za účelem nalezení oblastí, ve kterých se vyskytují různé zóny (např. mikroemulzní zóny výskytu tekutých krystalů) [90,91].



Obr. 7: Třífázový diagram [upraveno podle 87]

Mikroemulze je také možno připravit kontrolovaným přidavkem nižších alkoholů (butanol, pentanol, hexanol) do běžných emulzí typu v/o či o/v. Přídavek těchto alkoholů má za následek pokles povrchového napětí mezi olejovou a vodnou fází, a to tak, že je jeho hodnota dostatečně nízká pro tvorbu mikroheterogenních systémů [92].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Při zpracování praktické části diplomové práce byla použita řada přístrojů, pomůcek a laboratorního zařízení, kterým se věnuji v následující kapitole.

4.1 Přístroje a pomůcky

- Digitální váhy, OHAUS, Švýcarsko.
- Autokláv Varioklav H+P, Německo.
- Vortex, (Heidolph REAX top), Německo.
- Automatické mikropipety Eppendorf.
- Biohazard box EUROFLOW (Clean air), dodavatel Schoeller.
- Biologický termostat BT 120, Česká republika.
- Mikroplate reader Benchmark (Bio-Rad), Velká Británie.
- Filtry k stříkačce o velikosti 0,22 μm , Millipore, Velká Británie.
- Laboratorní sklo (pipety, kádinky, zkumavky, hokejky, Petriho misky).
- Plastové pomůcky (lžičky, mikrotitrační destičky, špičky pro automatické mikropipety).
- Sterilní disky, očkovací kličky, pinzety a ostatní běžné laboratorní vybavení.

4.2 Materiál

Pro testování antimikrobních účinků byly vybrány tyto esenciální oleje:

- citronový olej (*Citrus limon*, země původu Itálie, výrobce Nobilis Tilia, Krásná lípa)
- mátový olej (*Mentha piperita*, země původu USA, výrobce Nobilis Tilia, Krásná lípa)
- levandulový olej (*Lavandula angustifolia*, země původu Francie, výrobce Nobilis Tilia, Krásná lípa)

- eukalyptový olej (*Eucalyptus polybractea*, země původu Austrálie, výrobce Nobilis Tilia, Krásná lípa)
- máťový olej v bio kvalitě (*Mentha piperita*, země původu Indie, výrobce Nobilis Tilia, Krásná lípa)
- skořicový olej (*Cinnamomum zeylanicum*, země původu Česká republika, výrobce Biomedica, Praha)
- hřebíčkový olej (*Eugenia caryophyllata*, země původu Slovenská republika, výrobce Slownatur, Bratislava)

Surfaktantem při přípravě mikroemulzí byl Tween 60 (Polyethylenglykol sorbitan monostearát), neionický surfaktant, HLB 14.9 (Sigma-Aldrich). Pro uvedené oleje byl použit jako ko-surfaktant etanol absolutní (Penta, Chrudim).

4.3 Kultivační média

Pro praktickou část DP bylo použito několik druhů kultivačních médií. Jejich výčet je uveden v jednotlivých podkapitolách.

4.3.1 Mueller Hinton agar

Pro kultivaci bakterií byla použita komplexní půda Mueller Hinton agar. Na digitálních vahách bylo naváženo 15,2 g směsi a doplněno destilovanou vodou (400 ml). Obsah lahve byl důkladně promíchán. Následovala sterilizace v autoklávu 20 min při 132 °C. Poté byl agar rozlit do sterilních Petriho misek. Podrobné složení je uvedeno v tab. 1:

Tab. 1. Složení Mueller Hinton agaru

Složka	Hmotnost [g]
Hovězí masová infuze	120,0
Kyselý hydrolyzát kaseinu	7,0
Škrob	0,6
Agar	6,8
Destilovaná voda	400,0

4.3.2 Masopeptonový agar (MPA)

Pro přeočkování bakterií ze zásobních bakteriálních kultur byl použit masopeptonový agar (MPA). Jeho příprava je shodná s Mueller Hinton agarem. Jednotlivé složky jsou naváženy, dolity vodou a sterilizovány v autoklávu. Složení je uvedeno v tab. 2:

Tab. 2. Složení masopeptonového agaru (MPA)

Složka	Hmotnost [g]
NaCl	1,2
Beef extrakt (BE)	1,2
Pepton	2,0
Agar	6,0
Destilovaná voda	400,0

4.3.3 Masopeptonový bujón (MPB)

Pro přípravu inokula bakteriálních buněk byl použit masopeptonový bujón (MPB). Jeho složení je uvedeno v tab. 3:

Tab. 3. Složení masopeptonového bujonu (MPB)

Složka	Hmotnost [g]
NaCl	1,2
Beef extrakt (BE)	1,2
Pepton	2,0
Destilovaná voda	400,0

Jednotlivé složky byly naváženy na digitálních vahách a doplněny destilovanou vodou. Bujón byl následně rozplněn do zkumavek a ty byly sterilovány v autoklávu. Sterilizace probíhala při 132 °C po dobu 20 min.

4.4 Modelové mikroorganismy

Pro hodnocení antimikrobní aktivity esenciálních olejů byly použity grampozitivní (G⁺) a gramnegativní (G⁻) bakterie, které byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM).

G⁺ bakterie:

- *Bacillus cereus* CCM 2010;
- *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062;
- *Micrococcus luteus* CCM 732;
- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953;

G⁻ bakterie:

- *Pseudomonas fluorescens* CCM 1969;
- *Enterobacter aerogenes* CCM 2531;
- *Serratia marcescens* CCM 303;
- *Proteus vulgaris* CCM 1956;
- *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420;
- *Escherichia coli* CCM 3954.

Výše uvedené bakteriální kmeny byly uchovávány na masopeptonovém agaru (MPA) na Petriho miskách při teplotě 4 ± 2 °C.

4.5 Dekontaminace a likvidace materiálu

Veškerý materiál, který byl použit k experimentu (Petriho misky, pipety, zkumavky, mikrotitrační destičky, kultivační média) byl likvidován nebo dekontaminován buď UV zářením, nebo po dobu 20 min v autoklávu při 132 °C. Kultivační média byla dekontaminována Chloraminem.

5 METODIKA

Experimentální část diplomové práce se skládá ze dvou částí. V první části byly testovány antimikrobní účinky samotných esenciálních olejů v různých koncentracích (ředění etanolem). Ve druhé části byly testovány antimikrobní účinky stejných esenciálních olejů s přídavkem surfaktantu (mikroemulze). V obou případech byl experiment proveden difúzní diskovou metodou. Závěrem byla mikroemulze testována diluční metodou v tekutém médiu za použití mikrotitračních destiček.

5.1 Příprava bakteriální suspenze

Suspenze testovaných bakterií byly připraveny očkováním vybraných mikroorganismů do 5 ml tekutého média (MPB). Mikroorganismy pocházely ze zásobních bakteriálních kultur uchovávaných na Petriho miskách. Následná kultivace probíhala při 30 °C po dobu 24 hodin u bakterií *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas fluorescens*. U ostatních mikroorganismů probíhala kultivace při 37 °C po dobu 24 hodin.

5.2 Příprava esenciálních olejů

Esenciální oleje byly ředěny etanolem do pěti koncentrací. Na Petriho miskách byl testován také 97% etanol a sterilní destilovaná voda. Poměr oleje a etanolu je uveden v tab. 4:

Tab. 4. Poměr esenciálního oleje:etanolu

Pipetovaný objem oleje [μ l]	Pipetovaný objem etanolu [μ l]	Poměr oleje:etanolu
200	0	neředěný
100	100	1:1
50	150	1:3
25	175	1:7
12,5	187,5	1:15

5.3 Příprava mikroemulzí

Pro přípravu mikroemulzí s esenciálními oleji byl použit postup popsany v bakalářské práci Bc. Ivany Slovákové. V uvedené bakalářské práci byly připravovány mikroemulze z různých esenciálních olejů, které se od olejů použitých v této diplomové práci liší druhem rostliny, ze kterých byl olej získán. Dále byly použity oleje od jiného výrobce či s odlišnou zemí původu. Předpokladem pro přípravu mikroemulzí v této diplomové práci je univerzalizita postupu navrženého v bakalářské práci Bc. Ivany Slovákové [93].

Postup přípravy mikroemulzí je popsán v následujícím textu.

Z esenciálního oleje a etanolu byla připravena směs (1:1), ke které bylo přidáno odpovídající množství surfaktantu (Tween 60) rozpuštěného v destilované vodě. Surfaktant bylo nutné před použitím zahřát na vodní lázni, z důvodu snížení viskozity. Směs Tweenu a vody byla filtrována přes sterilní stříkačkový filtr o průměru 0,22 μm pro eliminaci mikrobiální kontaminace během přípravy. Roztok byl filtrován do sterilní plastové zkumavky, která byla před použitím sterilizována UV zářením po dobu 30 min. Takto vzniklý roztok byl homogenizován (Vortex). Připravené mikroemulze byly hodnoceny vizuálním pozorováním. Byl hodnocen zákal výsledné mikroemulze. Množství jednotlivých složek v mikroemulzi bylo pro všechny oleje totožné a je uvedeno v tab. 5:

Tab. 5. Složení mikroemulze

Složka	Hmotnost [g]
Esenciální olej	0,2
Etanol	0,2
Tween 60	1,6
Destilovaná voda	18,0

Takto připravené mikroemulze byly následně zředěny masopeptonovým bujónem (MPB) do třech koncentrací. Poměr MPB a neředěné mikroemulze uvádí tab. 6:

Tab. 6. Ředění mikroemulzí

Koncentrace	Mikroemulze [ml]	MPB [ml]
1.	6,25	3,75
2.	5,0	5,0
3.	3,75	6,25

Antimikrobní účinky těchto koncentrací byly testovány jak metodou difúzní, tak i metodou diluční. V obou metodách byla testována i samotná mikroemulze v neředěném stavu, tedy bez přídavku kultivačního média MPB.

5.4 Pozorování účinku esenciálních olejů na vybrané bakterie

Připravené Petriho misky s Mueller Hinton agarem byly přehledně popsány a připraveny k inokulaci mikroorganismů standardizovaným inokulem. Na povrch Mueller Hinton agarů bylo pipetováno 100 µl daného inokula bakterií a tento objem byl rovnoměrně rozetřen po povrchu půdy pomocí sterilní skleněné hokejky. Na povrch takto připraveného média byly následně sterilní pinzetou umístěny sterilní papírové disky. Na ty byly následně aplikovány 3 µl esenciálního oleje pomocí automatické mikropipety. Bylo testováno 5 koncentrací esenciálního oleje (viz. Tab. 4), etanol a sterilní destilovaná voda. Disk s vodou sloužil jako negativní kontrola a nebyl zde očekáván vznik inhibiční zóny. Na jednu Petriho misku bylo tedy umístěno 7 sterilních disků. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 24 hodin pro *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas fluorescens*. Ostatní mikroorganismy byly kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Poté byl měřen průměr zón inhibice každého disku pomocí pravítka a hodnoty byly zaznamenány. Celý postup byl proveden za aseptických podmínek v boxu Biohazard EUROFLOW Clean Air. Bylo testováno 10 bakteriálních kmenů a 7 esenciálních olejů.

5.5 Pozorování účinku esenciálních olejů v mikroemulzích na vybrané bakterie

Vyrobené mikroemulze, jejichž složení je podrobněji popsáno v Tab. 5., byly testovány na antimikrobní aktivitu dvěma metodami.

5.5.1 Metoda difúzní

Na povrch Mueller Hinton agaru bylo pipetováno 100 μl inokula bakterií. Na povrch takto připraveného média byly sterilní pinzetou umístěny sterilní papírové disky. Na ty byly následně aplikovány 3 μl esenciálního oleje v mikroemulzi ve třech koncentracích pomocí automatické mikropipety. Na disky byla pipetována v množství 3 μl také neředěná mikroemulze, etanol a sterilní destilovaná voda. Na jednu Petriho misku bylo tedy umístěno 6 sterilních disků. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 24 hodin pro *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas fluorescens*, pro ostatní mikroorganismy proběhla kultivace při 37 °C po dobu 24 hodin. Poté byl měřen průměr zón inhibice každého disku pomocí pravítka. Celý postup byl opět proveden za aseptických podmínek v boxu Biohazard EUROFLOW Clean Air.

5.5.2 Metoda diluční

Mikroemulze esenciálních olejů byly dávkovány do sterilních zkumavek a doplněny odpovídajícím množstvím MPB do objemu 10 ml (viz Tab. 6). Poté byl obsah zkumavek promíchán na vortexu. Mikroemulze byly postupně pipetovány v objemu 200 μl do jamek mikrotitrační destičky. Každá destička obsahovala 12 sloupců a 8 řad. Na každou destičku byl do prvních dvou řad pipetován čistý MPB, který byl zaočkován 5 μl příslušného kmene bakterií pro daný sloupec. Tyto řady, ve kterých bakterie rostly pouze v čistém médiu bez přídavku EO, sloužily jako pozitivní kontrola. Do dalších řad byly pipetovány tři koncentrace dané emulze v sestupném pořadí. Pro každou koncentraci byly tudíž vymezeny 2 řady a každá bakteriální suspenze byla zaočkována do 2 sloupců, pro získání spolehlivějších výsledků. Koncentrace mikroemulzí jsou uvedeny v Tab. 6. Tyto byly zaočkovány 5 μl příslušného kmene bakterií, mimo první 2 sloupce. Ty sloužily jako negativní kontrola a jednalo se pouze o čistou mikroemulzi bez zaočkování bakteriální suspenzí. Na jedné mikrotitrační destičce bylo změřeno 5 bakterií, které byly testovány na 3 koncentrace mikroemulze. Takto připravené destičky byly vloženy do termostatu a ponechány 24 hodin

při teplotě 30 °C. Poté byly změřeny na přístroji Mikroplate reader Benchmark (Bio-Rad) a přístroj byl řízen pomocí programu Microplate Manager (Bio-Rad). Zde byl spektrofotometricky měřen zákal suspenze při 655 nm (tzv. optická denzita; OD 655) a každá destička byla před samotným měřením 10 sekund protřepávána. Poté byl z výsledků sestaven průměr a hodnoty růstu bakterií v MPB byly porovnány s růstem bakterií v přítomnosti mikroemulze. Výsledek byl vyhodnocen jako index růstu (IR).

$$IR (\%) = 100 - \left(\frac{OD_{655}}{OD_{PK} + OD_{NK}} * 100 \right) \quad (1)$$

Kde:

IR.....index růstu

OD₆₅₅.....hodnota zákalu suspenze testované kultury v médiu s příslušnou koncentrací miroemulze

OD_{NK}.....hodnota zákalu negativní kontroly pro příslušnou koncentraci mikroemulze

OD_{PK}.....hodnota zákalu pozitivní kontroly

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

V experimentální části předkládané diplomové práce bylo použito 7 esenciálních olejů a 7 olejů v mikroemulzi. Pro jejich možné antimikrobní účinky, které uvádí literatura, byly tyto oleje testovány na grampozitivních (G^+) a gramnegativních (G^-) bakteriích. Na každé Petriho misce byl testován také 97 % etanol a sterilní destilovaná voda. Etanol a destilovaná voda neprokázaly žádné inhibiční účinky na testované bakterie, sloužily pouze jako negativní kontrola.

V následujícím textu jsou výsledky experimentů uvedeny samostatně pro skupinu G^+ bakterií a pro skupinu G^- bakterií. Důvodem tohoto rozdělení jsou rozdíly v citlivosti k antimikrobním látkám mezi G^+ a G^- bakteriemi. Výzkumy, které provedl Burt, ukazují, že G^+ bakterie jsou více citlivé k účinkům esenciálních olejů než G^- bakterie. Jako důvod tohoto tvrzení uvádí rozdíly ve stavbě buněčné stěny bakterií a fakt, že buněčná stěna G^- bakterií je obklopena vnější membránou, která brání prostupu hydrofobních sloučenin [11]. Ke stejné teorii se přiklání i Dorman [94]. Esenciální olej nebo jeho složky mohou poškodit buněčnou membránu G^+ bakterií, což může způsobit její prasknutí, blokaci enzymů na membránu vázaných, nebo může dojít k narušení transport iontů [95]. Za velmi účinné antibakteriální složky olejů označil Burt především eugenol, cinnamaldehyd a kyselinu skořicovou [11].

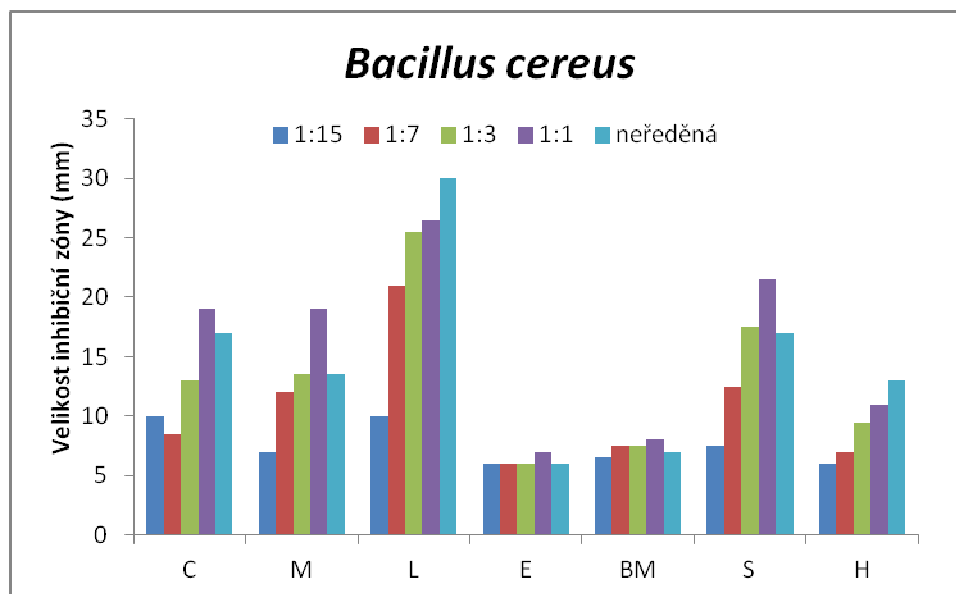
Většina autorů zabývajících se antibakteriální aktivitou EO potvrzuje odlišné působení olejů na G^+ a G^- bakterie. Tento rozdíl v citlivosti k esenciálním olejům však nebyl některými autory zaznamenán. Příkladem může být studie, kterou provedli Deans a Ritchie, kteří testovali 50 esenciálních olejů proti 25 mikroorganismům. Autoři neprokázali statisticky významné rozdíly v citlivosti k EO mezi G^+ a G^- druhy [15].

6.1 Difúzní metoda - vliv esenciálních olejů na G^+ bakterie

Pro spolehlivost výsledků byla difúzní metoda testována vždy na několika Petriho miskách. Průměrné hodnoty měření byly pro přehlednost vyneseny do grafů a jsou uvedeny v jednotlivých podkapitolách. Každá podkapitola znázorňuje vliv testovaných olejů na danou bakterii.

6.1.1 Vliv olejů na bakterii *Bacillus cereus*

Velikost inhibičních zón pro všechny použité esenciální oleje, testované na bakterii *Bacillus cereus*, je uvedena na obr. 8. Testovanou bakterii nejvíce inhiboval neředěný levandulový olej. U ostatních olejů více inhibovalo bakterii ředění 1:1. Důvodem vyšší inhibice při nižším ředění oleje je pravděpodobně vysoká viskozita tohoto oleje. V neředěném stavu olej špatně pronikal do sterilního disku a pravděpodobná je i pomalejší difúze oleje do kulturačního média. Toto tvrzení podporují některé studie, například práce Pauliho a kolektivu [96]. Autoři zde poukazují na některé nevýhody difúzních metod. V některých případech ukázaly výsledky difúzního agarového testu malou antimikrobní aktivitu některých látek, protože při testování téže látky jinou metodou má látka prokazatelný antimikrobní účinek. Tento jev byl zaznamenán zejména u látek s nízkou rozpustností ve vodě. Ty pak v difúzním testu vykazovaly mylně nízkou antimikrobní aktivitu [96]. Z uvedeného obrázku je patrné, že olej citronový a mátový vykazovaly největší inhibiční zóny ve výše uvedeném ředění 1:1. U eukalyptového oleje nebyl mezi různými ředěními oleje patrný rozdíl ve velikosti zón, podobně jako u oleje z máty v biokvalitě. Skořicový olej vykazoval po oleji levandulovém největší inhibiční zóny. Posledním z testovaných olejů byl olej hřebíčkový. Jeho inhibiční zóny v okolí disku rostly přímo úměrně s obsahem oleje ve směsi, největší inhibiční zóna byla detekována u neředěného hřebíčkového oleje. Studie, kterou provedl Burt, se zabývala měřením antibakteriálního účinku hřebíčkového a skořicového oleje na *Bacillus cereus*. Burt prokázal antibakteriální aktivitu těchto olejů a dospěl tak ke stejnému závěru [11].

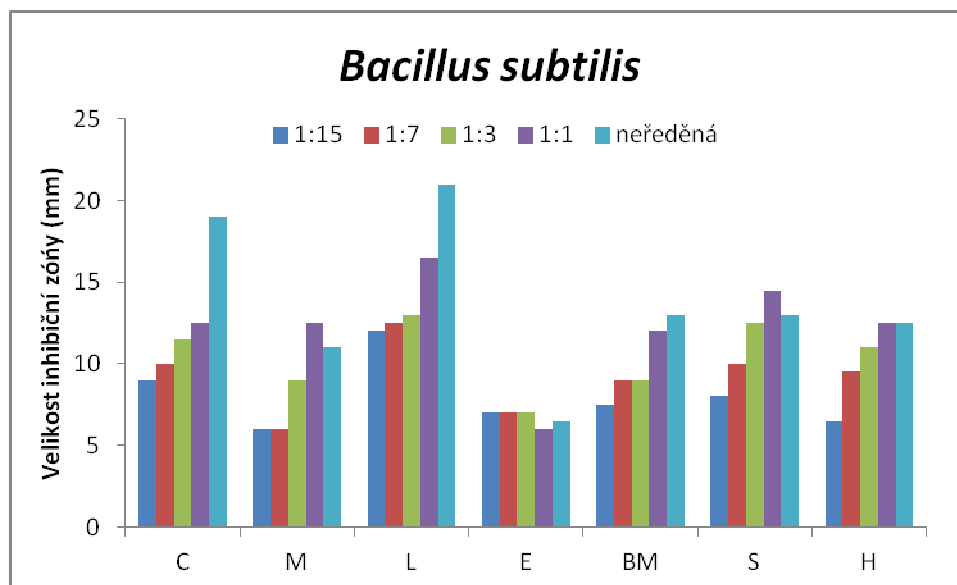


Obr. 8. Vliv esenciálních olejů na růst *Bacillus cereus*, ředění oleje je uvedeno jako poměr esenciálního oleje ku etanolu.

C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – mátový olej v biokvalitě; S – skořicový olej, H – hřebíčkový olej.

6.1.2 Vliv olejů na bakterii *Bacillus subtilis*

Nejmenší velikost inhibičních zón vykazoval na danou bakterii olej eukalyptový. Naopak největší antimikrobní účinky vykazovaly olej citronový a levandulový zejména pak byl-li na disku použit samotný olej bez ředění etanolem. Ke stejnému závěru dospěl Hanamanthagouda, který testoval levandulový olej na *Bacillus subtilis*. Antibakteriální účinek tohoto oleje se projevil inhibiční zónou o průměru 13 mm [97]. Důvodů, proč dospěl k jiné velikosti inhibiční zóny stejného oleje, je hned několik. Různé kmeny *Bacillus subtilis* mohou být různě citlivé k antimikrobním látkám. Další příčinou může být fakt, že složení oleje se může lišit dle zeměpisného původu, který autor článku neuvádí. Dalším důvodem může být odlišný způsob sklizně [15,16]. U eukalyptového oleje nebyl pozorován rozdíl mezi jednotlivými ředěními oleje. U všech ředění se velikost inhibiční zóny pohybovala okolo 7 mm. Olej z máty peprné v ředění 1:15 a 1:7 vykázal antimikrobní účinek zónou 6 mm. Největší schopnost inhibice *B. subtilis* prokázal tento olej v ředění 1:1. Olej z máty peprné v bio kvalitě, olej skořicový a hřebíčkový měly srovnatelně velké oblasti měřených zón. Výše uvedené je zobrazeno na obr. 9.

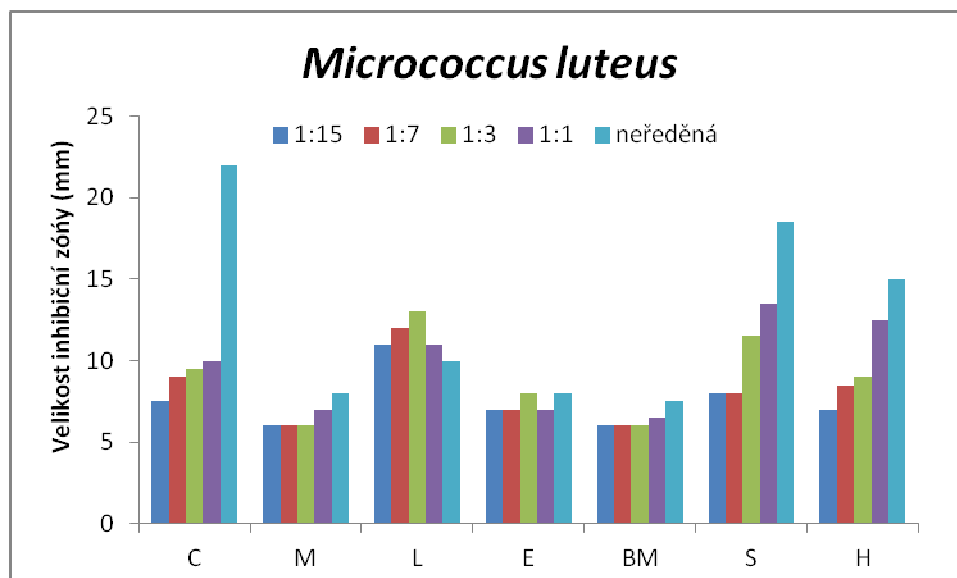


Obr. 9. Vliv esenciálních olejů na růst *Bacillus subtilis*, ředění oleje je uvedeno jakopoměr esenciálního oleje ku etanolu.

C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – mátový olej v biokvalitě; S – skořicový olej, H – hřebíčkový olej.

6.1.3 Vliv olejů na bakterii *Micrococcus luteus*

S výjimkou levandulového oleje tvořil největší inhibiční zóny neředěný olej. U levandulového oleje byla patrná největší zóna z testovaných olejů v nevyšším měřeném ředění (1:15). Levandulový olej na *Micrococcus luteus* testoval také Hanamanthagouda. Jeho změřená antibakteriální zóna byla v průměru 12 mm, což odpovídá výsledkům měření uvedených na obr. 10 [97]. U oleje mátového, eukalyptového a oleje z biomáty nebyl patrný výrazný rozdíl v antibakteriálním působení mezi různými ředěními olejů. Všechny vykazovaly inhibiční zónu o velikosti přibližně 7 mm. Velmi výrazná byla zóna neředěného citrusového oleje, obdobně tomu bylo i u oleje skořicového a hřebíčkového. Testované esenciální oleje tedy prokázaly antimikrobní účinky na *Micrococcus luteus*.

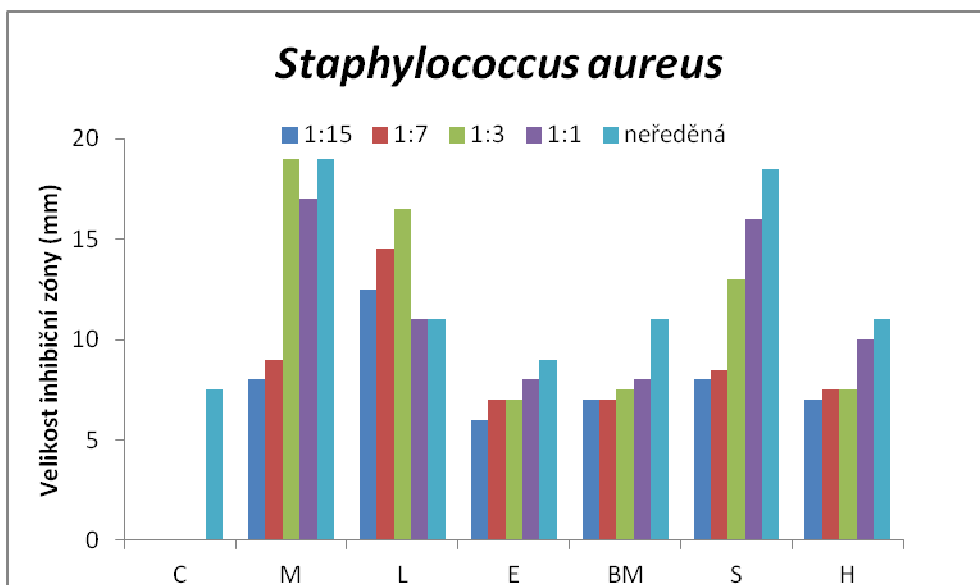


Obr. 10. Vliv esenciálních olejů na růst *Micrococcus luteus*, ředění oleje je uvedeno jako poměr esenciálního oleje ku etanolu.

C – citronový olej; M – máťový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – máťový olej v biokvalitě; S – skořicový olej, H – hřebíčkový olej.

6.1.4 Vliv olejů na bakterii *Staphylococcus aureus*

Naměřené výsledky velikostí inhibičních zón pro všechny testované oleje jsou uvedeny na obr. 11. Z obrázku je patrné, že největší inhibiční zóny byly zaznamenány u oleje máťového a levandulového. Ke stejnému výsledku dospěl Djamel Djenane, který testoval máťový a levandulový olej právě na *Staphylococcus aureus*. Djenane zkoumal pomocí chromatografické metody jednotlivé složky olejů a dospěl k závěru, že se poměry jednotlivých složek oleje výrazně liší v závislosti na oblasti pěstování, což může mít významný vliv na antibakteriální účinky těchto olejů [98]. Ke stejnému závěru se přiklání také Bakkali [10]. Dalším z testovaných olejů byl olej citronový, který vykazoval nulové antimikrobní účinky ve všech ředěních, mimo neředěného oleje. Eukalyptový olej a olej z biomáty měly se zvyšující se koncentrací oleje vyšší antibakteriální účinek. Stejně tak tomu bylo i v případě oleje hřebíčkového. Podle Elaissi a kolektivu je nejvíce citlivým druhem z testovaných G^+ bakterií právě *Staphylococcus aureus* [99]. Po vyhodnocení naměřených výsledků této práce se k tomuto tvrzení nelze přiklonit.



Obr. 11. Vliv esenciálních olejů na růst *Staphylococcus aureus*, ředění oleje je uvedeno jako poměr esenciálního oleje ku etanolu.

C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – mátový olej v biokvalitě; S – skořicový olej, H – hřebíčkový olej.

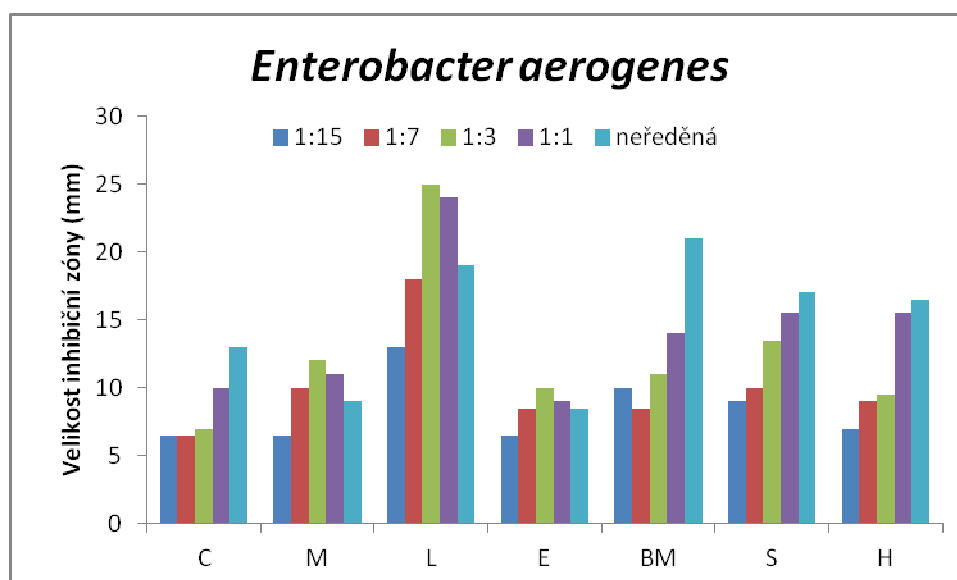
6.2 Difúzní metoda - vliv esenciálních olejů na G⁺ bakterie

Stejně jako u grampozitivních bakterií byly z průměrných hodnot měření inhibičních zón na Petriho misce sestaveny grafy. Následující podkapitoly se věnují jednotlivým testovaným bakteriím. U každého měření byla provedena negativní kontrola v podobě disku se sterilní destilovanou vodou. Vzhledem k tomu, že oleje byly ředěny v etanolu, který sám o sobě může působit antibakteriálně, součástí pokusu byly i disky napuštěné etanolem. Na žádnou ze studovaných bakterií neměl samotný etanol inhibiční účinek.

6.2.1 Vliv olejů na bakterii *Enterobacter aerogenes*

Z obr. 12. je patrné, že největší oblast inhibice bakterie *Enterobacter aerogenes* byla změřena u levandulového oleje a to ve všech testovaných ředěních. U oleje skořicového se s narůstající koncentrací oleje zvětšovala i velikost inhibičních zón. Skořicový olej vykazoval po oleji levandulovém největší antimikrobiální účinek. Nejmenší zóny byly naměřeny u citrusového, mátového a eukalyptového oleje. U oleje z máty peprné v biokvalitě byla změřena největší zóna u neředěného oleje. Basollé testoval na *Enterobacter aerogenes* kombinace účinných složek esenciálních olejů, konkrétně cinnamaldehyd a eugenol. Autor

dospěl k závěru, že kombinace těchto složek nemá synergický (podpurný) efekt, jak původně předpokládal, ale antagonistický (snižující) [100]. Podle výzkumu, který provedl Burt, se dá zlepšit antibakteriální účinnost esenciálních olejů v reálných maticích (např. v některých potravinách) pomocí úpravy fyzikálních a chemických podmínek v této matici. Konkrétně mýnil touto úpravou snížení pH, snížení teploty a snížení hladiny kyslíku. Tyto úpravy vnitřních a vnějších faktorů mohou mít s aplikací esenciálních olejů výrazný synergický účinek a tímto způsobem lze dosáhnout vyšší trvanlivosti potravin [11]. Za nejúčinnější z antibakteriálních složek esenciálních olejů jsou podle Fitzgeralda považovány fenolové sloučeniny [101]. Tyto fenolové složky napadají vnější membránu G⁻ bakterií a tím zvyšují propustnost cytoplazmatickou membránou [102].



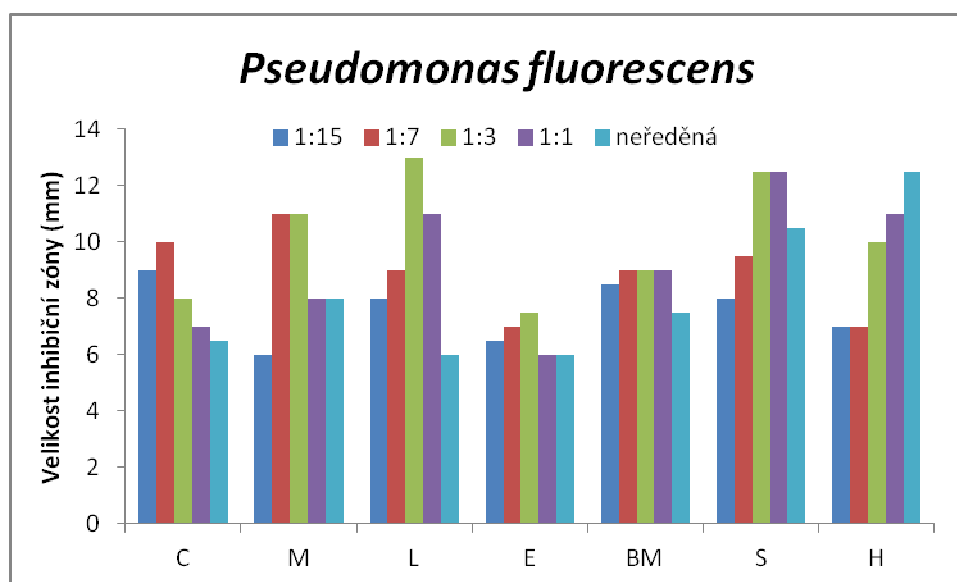
Obr. 12. Vliv esenciálních olejů na růst *Enterobacter aerogenes*, ředění oleje je uvedeno jako poměr esenciálního oleje ku etanolu.

C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – mátový olej v biokvalitě; S – skořicový olej, H – hřebíčkový olej.

6.2.2 Vliv olejů na bakterii *Pseudomonas fluorescens*

Průměrné hodnoty výsledků měření pro testované oleje na bakterii *Pseudomonas fluorescens* uvádí obr. 13. Z obrázku je patrné, že z testovaných olejů projevil největší antimikrobiální účinky mátový, levandulový, skořicový a hřebíčkový olej. Hanamanthagouda testoval levandulový olej na *Pseudomonas fluorescens*, výsledek jeho měření uvádí zónu o velikosti 7 mm [97]. Výsledky uvedené na obr. 13. nejsou v korelaci

s Hanamanthagoudou, zóna levandulového oleje je dvojnásobná v porovnání s jeho výsledky. Olej s nejmenšími zónami v oblasti sterilního disku byl olej eukalyptový. Nejvyšší inhibici růstu bakterií vykazovaly poměry 1:1 a 1:3. U oleje z biomáty nebyl pozorován výrazný rozdíl v ředěních, s výjimkou neředěného oleje, který díky vysoké viskozitě špatně difundoval do disku i agarového média. Stejně tomu bylo i u ostatních olejů s výjimkou oleje hřebíčkového, který naopak vykázal nejvyšší inhibici bakterie *Pseudomonas fluorescens* právě při použití neředěného oleje. Bakterie *Pseudomonas fluorescens* se projevila z G⁻ bakterií jako nejméně citlivá k esenciálním olejům. Stejný závěr výzkumu uvádí i Knobloch, Elaissi a Deans a Ritchie, kteří dospěli k závěru, že nejméně citlivé z gramnegativních bakterií jsou právě pseudomonády [15,16,99].



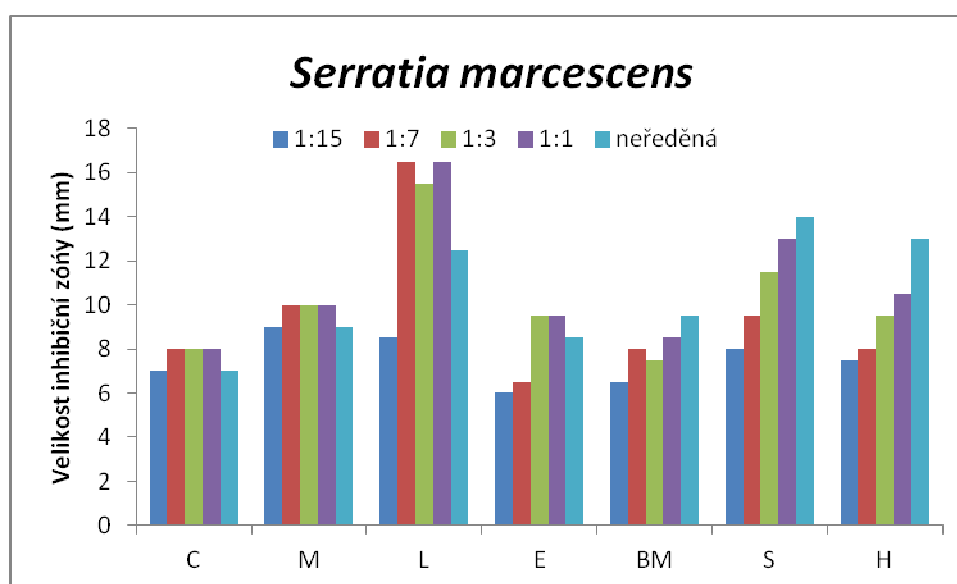
Obr. 13. Vliv esenciálních olejů na růst *Pseudomonas fluorescens*, ředění oleje je uvedeno jako poměr esenciálního oleje ku etanolu.

C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – mátový olej v biokvalitě; S – skořicový olej, H – hřebíčkový olej.

6.2.3 Vliv olejů na bakterii *Serratia marcescens*

Citronový olej vykázal ve všech testovaných ředěních inhibiční účinek. Ten byl srovnatelný s olejem mátovým. U nejnižšího a nejvyššího ředění byly u obou olejů hodnoty stejné. Ředění 1:7; 1:3 a 1:1 vykazovaly taktéž stejné hodnoty. Nejvyšší inhibice byla změřena u levandulového oleje. U eukalyptového oleje velikost inhibičních zón rostla s rostoucím obsahem oleje ve směsi, výjimkou byl opět neředěný olej, který měl díky vyšší viskozitě

menší inhibiční zónu než při ředění 1:1. Oleje z biomáty, skořicový a hřebíčkový inhibovaly růst *S. marcescens*. Výše uvedené je znázorněno na obr. 14. Citlivost bakterie byla jako u ostatních testovaných mikroorganismů závislá na druhu, složení i koncentraci oleje. Velký vliv na inhibiční účinky olejů mohla mít jejich viskozita a rozpustnost v použitých médiích. Djenane prokázal, že na účinky olejů má významný vliv také sezónní a intraspecifická změna složení. Obecně platí, že esenciální oleje vyrobené z bylin sklizené v púčehu, nebo ihned po odkvětu, vykazují nejsilnější antimikrobní aktivitu [98].



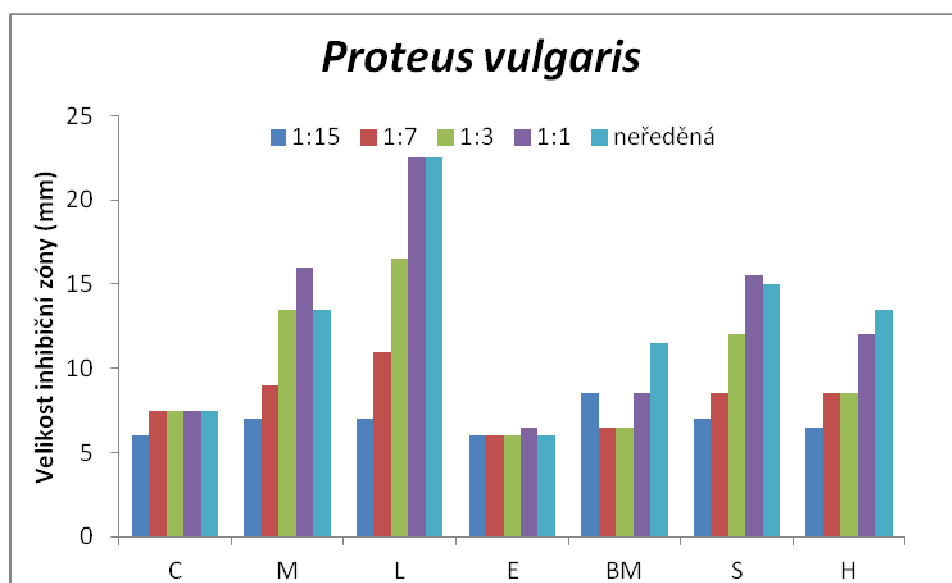
Obr. 14. Vliv esenciálních olejů na růst *Serratia marcescens*, ředění oleje je uvedeno jako poměr esenciálního oleje ku etanolu.

C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – mátový olej v biokvalitě; S – skořicový olej, H – hřebíčkový olej.

6.2.4 Vliv olejů na bakterii *Proteus vulgaris*

Na obr. 15. je zobrazena závislost velikosti inhibiční zóny na druhu testovaného esenciálního oleje. Z obrázku vyplývá, že nejvyšší inhibice se projevila opět u oleje levandulového, konkrétně v poměru 1:1 a u neředěného oleje. Citronový olej měl kromě nejvyššího ředění inhibiční zónu 7,5 mm. Mátový olej měl se zvyšující se koncentrací vzrůstající velikost inhibičních zón, mimo neředěného oleje. U eukalyptového oleje nebyl v testovaném rozmezí patrný rozdíl v koncentracích. U oleje pocházejícího z máty peprné v biokvalitě byla změřena v poměru 1:15 stejná inhibiční zóna, jako u 1:1. Inhibice bakterie *Proteus vulgaris* u skořicového a hřebíčkového oleje měla se zvyšující se koncentrací rostoucí tendenci.

Proteus vulgaris by podle naměřených výsledků mohl sloužit jako modelový mikroorganismus pro budoucí výzkum olejů a jejich složek v oblasti potravinářství. Začlenění některých esenciálních olejů do potravin může mít pozitivní vliv i na organoleptické vlastnosti. Jedna nebo více složek oleje může zajistit požadovanou antibakteriální účinnost, což může v budoucnosti zajistit delší dobu údržnosti potravin a zabránit jejímu kažení [11].



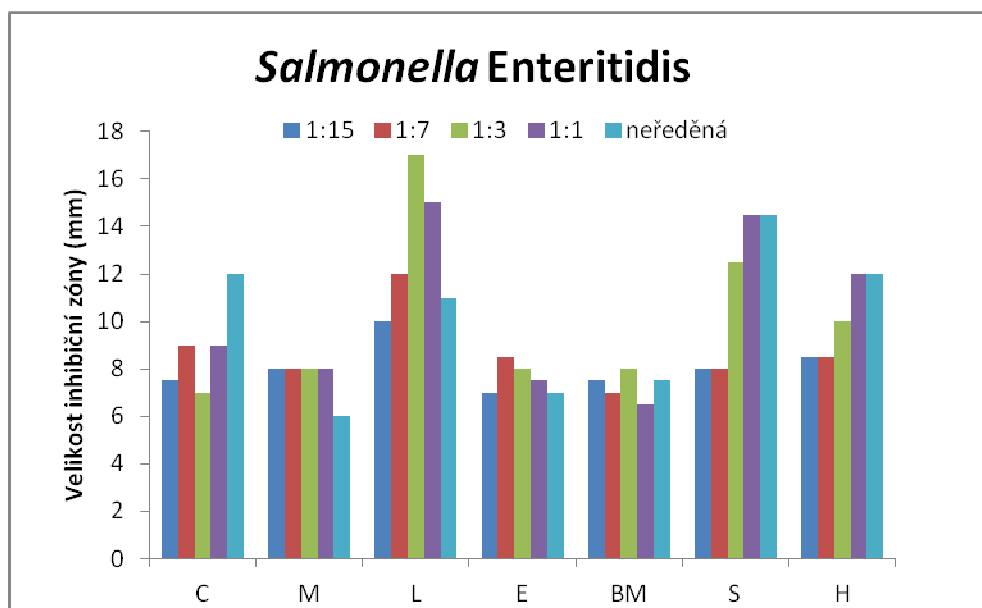
Obr. 15. Vliv esenciálních olejů na růst *Proteus vulgaris*, ředění oleje je uvedeno jako poměr esenciálního oleje ku etanolu.

C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – mátový olej v biokvalitě; S – skořicový olej, H – hřebíčkový olej.

6.2.5 Vliv olejů na bakterii *Salmonella Enteritidis*

Z obr. 16. je patrné, že největší inhibici k bakterii měly oleje levandulový a skořicový, dále pak olej hřebíčkový. Citronový olej dosáhl nejvyšší inhibice v neředěném stavu. U oleje z máty peprné nebyl pozorován v testovaném rozmezí rozdíl v ředění. U levandulového oleje byla největší inhibiční zóna změřena pro ředění oleje 1:3, olej ve vyšších i nižších koncentracích ovlivňoval růst salmonel méně. Při tomto poměru byl levandulový olej přítomen v dostatečném množství pro inhibici a zároveň měla směs oleje a etanolu dobrou viskozitu pro difuzi agarem. V testovaném rozmezí prokázal eukalyptový olej střední antibakteriální aktivitu. Mátu pepnou v biokvalitě lze taktéž řadit spíše k olejům s průměrnou antimikrobní aktivitou vůči *Salmonella Enteritidis*. Skořicový olej prokázal výrazné inhibiční účinky od ředění 1:3, které se ustálily v poměru 1:1 a u neředěného oleje. Inhibiční

zóny hřebíčkového oleje začínaly na 9 mm a se zvyšující se koncentrací rostly až do hodnoty 12 mm. Burt dospěl ve svém výzkumu v roce 2004 ke stejnému závěru, že hřebíčkový olej ve vhodných koncentracích potlačuje růst bakterie *Salmonella Enteritidis*. Testoval i jednotlivé složky oleje, které za antibakteriální účinek zodpovídají. [11].



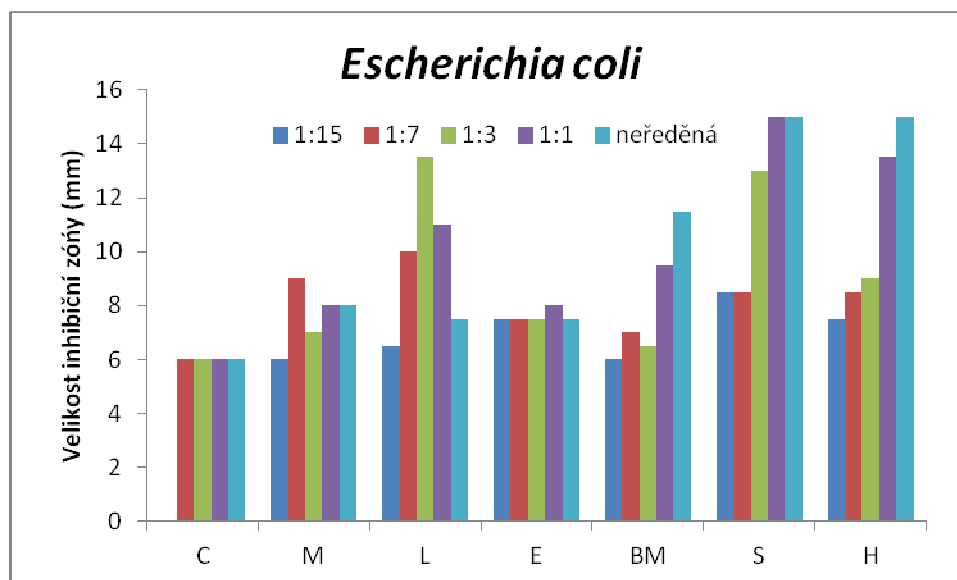
Obr. 16. Vliv esenciálních olejů na růst *Salmonella Enteritidis*, ředění oleje je uvedeno jako poměr esenciálního oleje ku etanolu.

C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – mátový olej v biokvalitě; S – skořicový olej, H – hřebíčkový olej.

6.2.6 Vliv olejů na bakterii *Escherichia coli*

Poslední z testovaných G⁻ bakterií byla *Escherichia coli*. Citronový olej působil ve všech ředěních stejně inhibičně na tuto bakterii, mimo poměru 1:15, kde nebyla žádná zóna vytvořena. U mátového oleje se nejvýrazněji projevilo ředění 1:7 a to zónou 9 mm. Stejně jako u předchozích testovaných mikroorganismů měl největší antibakteriální účinek olej levandulový, skořicový a hřebíčkový. Grafické znázornění vlivu levandulového oleje na růst bakterie *Escherichia coli* je totožné se *Salmonella Enteritidis*. U eukalyptového oleje nebyl v testovaném rozmezí patrný rozdíl v ředění. Postupnou vzrůstající tendenci, přímo úměrnou zvyšující se koncentraci, jsem zaznamenala u oleje z máty v biokvalitě. Skořicový olej dosáhl nejvyšší inhibice v zóně o průměru 15 mm a to v ředění 1:1 a v neředěném

oleji. Výrazná inhibice bakterie byla změřena u oleje hřebíčkového. Inhibice začínala u nejnižší koncentrace (poměr 1:15) na zóně 7 mm a měla vzrůstající charakter. Největší zóny v oblasti sterilního disku dosáhl neředěný hřebíčkový olej a to zónou o průměru 15 mm. Djenane provedl výzkum, ve kterém porovnával účinky mátového a levandulového oleje. Jako modelové bakterie použil *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Podle výsledků, které uvádí obr. 17, se k jeho zjištění mohou přiklonit. *Staphylococcus aureus* projevil k olejům větší citlivost než *Escherichia coli* [98]. Hanamanthagouda testoval levandulový olej proti bakterii *Escherichia coli*. Olej prokázal inhibiční zónou o průměru 10 mm [97]. Podle obr. 17 by tato zóna odpovídala ředění 1:7, ne oleji v neředěném stavu. Hanamanthagouda označil levandulový olej jako mírně inhibiční proti této bakterii [97].



Obr. 17. Vliv esenciálních olejů na růst *Escherichia coli*, ředění oleje je uvedeno jako poměr esenciálního oleje ku etanolu.

C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – mátový olej v biokvalitě; S – skořicový olej; H – hřebíčkový olej.

6.3 Difúzní metoda - vliv emulzí s esenciálními oleji na bakterie

K přípravě mikroemulzí s esenciálními oleji byl použit postup popsáný v bakalářské práci Bc. Ivany Slovákové [93]. V této diplomové práci bylo zjištěno, že výše uvedený postup není univerzálně použitelný pro všechny esenciální oleje, které se liší svým původem a složením. V praktické části diplomové práce byly tedy připraveny pouze emulze s esenciálními oleji, postup však pro oleje použité v této práci neumožnil přípravu mikroemulzí. Mikroemulze obsahují částice minimálně o řád menší než emulze běžné, jsou transparentní či polotransparentní [88]. Emulze vyrobené v rámci experimentální části diplomové práce byly homogenní, měly však mléčné zabavení a lze tedy konstatovat, že částice těchto emulzí měly velikost odpovídající spíše emulzím. Vzhledem k tomu, že připravené emulze byly homogenní a práce nebyla zaměřena na formulace mikroemulzí, byly pro testování antibakteriálních účinků vyrobené emulze použity.

Emulze esenciálních olejů byly testovány difúzní metodou na Mueller Hinton agaru ve třech koncentracích (ředění je uvedeno v tab. 6). Na každé Petriho misce byla testována také neředěná emulze (EM). Emulze byly testovány na G^+ a G^- bakteriích.

6.3.1 Vliv emulzí esenciálních olejů na grampozitivní (G^+) bakterie

Pro spolehlivost výsledků byla každá koncentrace testována několikrát pro každý olej. Průměrné výsledky naměřených hodnot uvádí tab. 7.

Tab. 7. Antimikrobní účinky esenciálních olejů v emulzi (difúzní disková metoda)

Mikroorganismus	Poměr EM ¹ :MPB ²	Esenciální olej						
		C ³	M ⁴	L ⁵	E ⁶	BM ⁷	S ⁸	H ⁹
<i>Bacillus cereus</i>	Neředěná	0	0	0	0	0	6	0
	5:3	0	0	0	0	0	0	0
	1:1	0	0	0	0	0	0	0
	3:5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	Neředěná	0	0	6	0	6	6	6
	5:3	0	0	6	0	6	0	0
	1:1	0	0	0	0	0	0	0
	3:5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus luteus</i>	Neředěná	7,75	6,5	7	6	0	6	0
	5:3	8	6,5	7,75	0	0	0	0
	1:1	0	0	0	0	0	0	0
	3:5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	Neředěná	6	0	6,5	6,5	7	6	0
	5:3	6	0	6,5	0	0	6,5	0
	1:1	0	0	6,5	0	0	0	0
	3:5	0	0	0	0	0	0	0

Z tabulky je patrné, že u většiny emulzí k inhibici testovaných bakterií docházelo pouze tehdy, když byly na disky dávkovány čisté, tedy neředěné emulze. Při ředění emulze bujónem se inhibiční účinek snižoval, nebo nebyl vůbec zaznamenán. Na bakterii *Bacillus cereus* působil inhibičně pouze olej skořicový v neředěné emulzi. Z ostatních olejů nepůsobil žádný inhibičně. Testované emulze se vůči bakterii projeví jako antimikrobně neúčinné. Větší antibakteriální aktivita byla detekována u *Bacillus subtilis*, kde neředěná emulze prokázala inhibici u levandulového oleje, oleje z biomáty, skořicového oleje

¹ EM – emulze

² MPB - masopeptonový bujón.

³ C – citronový olej

⁴ M – mátový olej

⁵ L – levandulový olej

⁶ E – eukalyptový olej

⁷ BM – mátový olej v biokvalitě

⁸ S – skořicový olej

⁹ H – hřebíčkový olej

a hřebíčkového oleje. Olej citronový, mátový, levandulový, eukalyptový a skořicový vykázal na bakterii *Micrococcus luteus* inhibiční účinek v neředěné emulzi. Citronový, mátový a levandulový olej se projevil jako účinné i při ředění 5:3. *Micrococcus luteus* byl rezistentní k emulzi v ředění 1:1 a 3:5. Na *Staphylococcus aureus* působily nejvíce oleje citronový, levandulový a skořicový. Nepůsobily oleje mátový a hřebíčkový. Na grampozitivní bakterie měl největší účinek olej levandulový. Stejný závěr výzkumu uvedl Djenane v roce 2012, který prokázal antibakteriální aktivitu tohoto oleje in vitro [98]. Dále vykazovaly nejvyšší účinky oleje citronový, skořicový a olej z biomáty. Nižší účinky měly oleje mátový a hřebíčkový. Nejmenší inhibiči na grampozitivní bakterie prokázal olej eukalyptový. Elaissi prokázal, že eukalyptový olej je účinný proti bakterii *Staphylococcus aureus*. Proto se tento olej často používá k léčbě poruch dýchacího systému, jako jsou např. bronchitida nebo sinusitida [103].

6.3.2 Vliv emulzí esenciálních olejů na gramnegativní (G-) bakterie

Jak je patrné z tab. 8, všechny testované G⁻ bakterie projevil podobnou citlivost k mikroemulzím testovaných olejů. Účinek olejů byl prokázán v neředěné emulzi a při ředění 5:3 (EM:MPB). Největší citlivost k testovaným emulzím vykazovala bakterie *Enterobacter aerogenes*. Ta byla inhibována všemi testovanými oleji ve všech ředěních emulze, mimo nejvyššího ředění (3:5). Bakterie *Pseudomonas fluorescens* byla rezistentní vůči oleji mátovému, ostatní oleje vykázaly v neředěné emulzi a v ředění 5:3 inhibiční zóny o průměrné hodnotě 6 - 7 mm. *Serratia marcescens* se projevila jako nejodolnější z testovaných gramnegativních bakterií. Mátový, eukalyptový, skořicový a hřebíčkový olej nevytvořily inhibiční zónu v oblasti sterilního disku ani v přítomnosti neředěné emulze. Z naměřených výsledků vyplývá, že *Proteus vulgaris* projevila odolnost pouze k oleji eukalyptovému a skořicovému. Všechny testované oleje prokázaly v neředěné emulzi a v ředění 5:3 antimikrobní účinek na *Salmonella Enteritidis* a *Escherichia coli*. Nejméně odolnou bakterií byl *Enterobacter aerogenes*. S výjimkou oleje levandulového, eukalyptového a skořicového na ni působily všechny z testovaných olejů a to i v ředění 1:1. Rodrigues v roce 2012 testoval antimikrobní účinky esenciálních olejů a dospěl k výsledku, že nejvyšší aktivita olejů se projevila u *Escherichia coli*. K tomuto tvrzení se nemohu přiklonit. Prokázal, že komplexní směsi olejů jsou účinnější než jednotlivé složky těchto olejů testované samostatně [104].

Tab. 8. Antimikrobní účinky esenciálních olejů v emulzi (difúzní disková metoda)

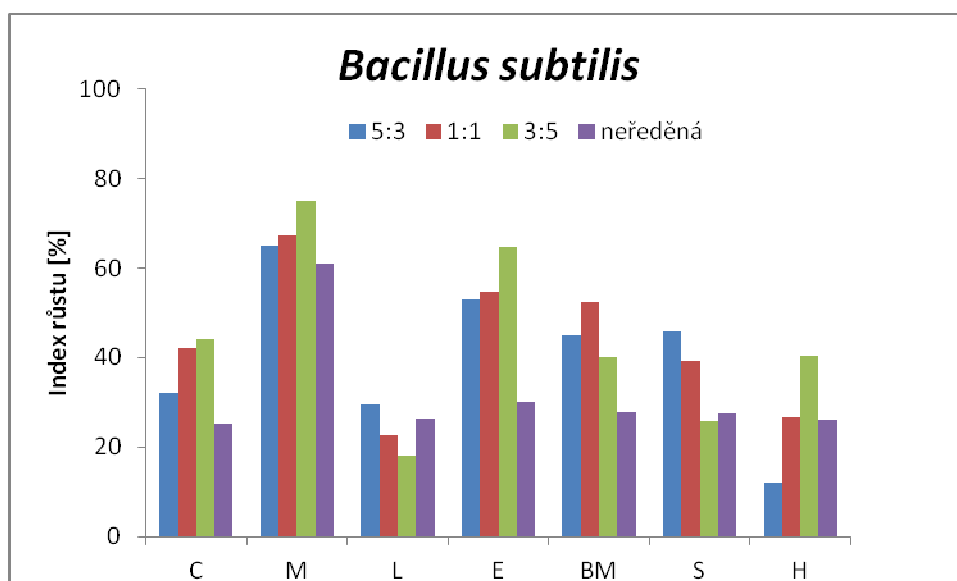
Mikroorganismus	Poměr EM:MPB	Esenciální olej						
		C	M	L	E	BM	S	H
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Neředěná	6,25	0	7	6	6,5	6	6
	5:3	6,25	0	6,5	6	0	0	6
	1:1	0	0	0	0	0	0	0
	3:5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	Neředěná	6,25	0	6,5	0	6	0	0
	5:3	6,25	0	6,5	0	0	0	0
	1:1	0	0	0	0	0	0	0
	3:5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	Neředěná	6,5	6	6	0	6	0	6,5
	5:3	6	6,25	6	0	6,5	0	6
	1:1	0	0	0	0	0	0	0
	3:5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella Enteritidis</i>	Neředěná	6,75	6	6	6,5	6	6,5	6,5
	5:3	6	6	6	6,25	6	6	6,5
	1:1	0	0	0	0	0	0	0
	3:5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	Neředěná	6,75	6	6,5	6	6,5	6	7,5
	5:3	6	6,25	7	6	6	6,5	6
	1:1	0	0	0	0	0	0	0
	3:5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Neředěná	6,25	7,25	6	6,5	6	6,5	6,5
	5:3	6,5	6,25	6	6	6	6,5	6
	1:1	6,25	6	0	0	6	0	6
	3:5	0	0	0	0	0	0	0

6.4 Diluční metoda

Vyrobené emulze esenciálních olejů byly pro srovnání jejich účinků testovány i diluční metodou ve třech ředěních (uvedeno v tab. 6) a v neředěné emulzi. Výsledky byly vyhodnoceny jako index růstu IR [%] a jsou diskutovány v následujících podkapitolách.

6.4.1 Vliv emulzí esenciálních olejů na grampozitivní (G^+) bakterie

Z obr. 18 je názorné, že bakterii *Bacillus subtilis* nejvíce inhibovaly oleje levandulový, skořicový a hřebíčkový. Na všechny testované grampozitivní bakterie vykázal nejvyšší antibakteriální účinek levandulový olej. Výsledky diluční metody se v tomto případě shodují s výsledky získanými difúzní metodou. Růst bakterie *Bacillus subtilis* byl v emulzním systému tohoto oleje výrazně potlačen (IR \square 30 %) a to ve všech testovaných ředěních. *Bacillus subtilis* prokázal nejvyšší odolnost k mátovému a eukalyptovému oleji. Obdobně tomu bylo i u dalších testovaných grampozitivních bakterií. Kompletní výsledky a vyhodnocení diluční metody je zobrazeno v Příloze P I. U *Bacillus cereus* byl růst redukován v ředění 5:3 a v neředěné emulzi. Se zvyšujícím se ředěním se zvyšovala i hodnota indexu růstu (IR), tzn. že bakterie byly inhibovány méně při větším ředění emulze. Největší účinnost olejů se projevila při použití neředěné emulze. Výsledek je tak v korelaci s difúzní metodou.

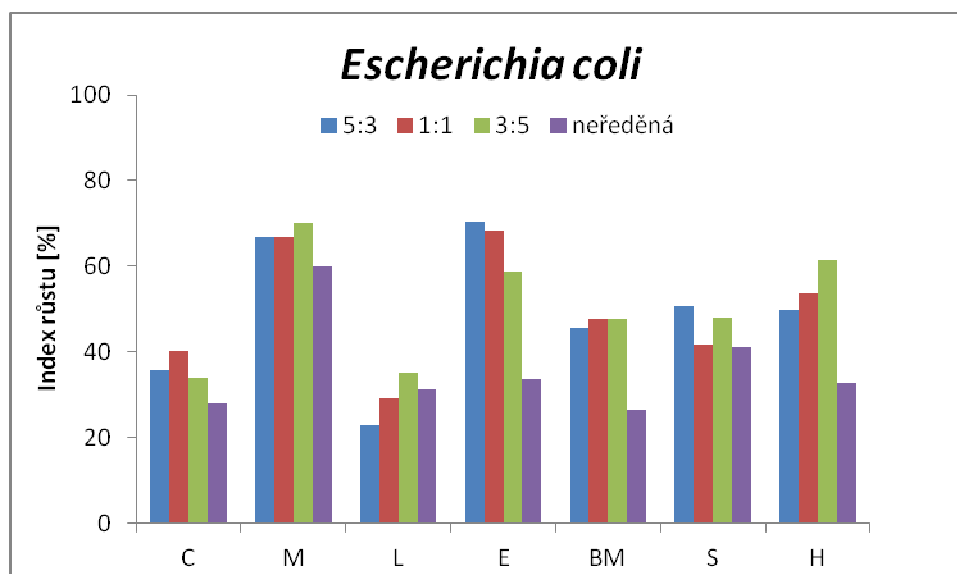


Obr. 18. Vliv esenciálních olejů v mikroemulzním systému na *Bacillus subtilis*, poměr uvádí EM ku MPB.

C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – mátový olej v biokvalitě; S – skořicový olej, H – hřebíčkový olej.

6.4.2 Vliv emulzí esenciálních olejů na gramnegativní (G⁻) bakterie

Na testované gramnegativní bakterie vykázal největší inhibici levandulový olej. Index růstu bakterie *Escherichia coli* byl v emulzním systému tohoto oleje potlačen na IR \square 40 %. Nejméně účinnými oleji byly podle obr. 19 oleje máťový a eukalyptový (IR = 70 %), stejně jako u G⁺ bakterií (IR \square 80 %). *Escherichia coli* vykazovala nízkou odolnost vůči působení citronového oleje v emulzním systému, což je v souladu s metodou diskovou difúzní. Index růstu oleje skořicového a hřebíčkového se pohyboval v oblasti kolem 50 %, což odpovídá difúzní diskové metodě, kde tyto oleje inhibovaly bakterie *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Enteritidis. Výsledky diluční metody pro výše zmíněné G⁻ bakterie jsou zobrazeny v Příloze P II této diplomové práce. Po vyhodnocení obou metod se jeví diluční metoda jako citlivější pro hodnocení účinků esenciálních olejů v emulzním systému. Jsou zde eliminovány některé negativní vlivy, jako je například viskozita olejů, která do značné míry ovlivňuje výsledky metody difúzní.



Obr. 19. Vliv esenciálních olejů v mikroemulzním systému na *Escherichia coli*, poměr uvádí EM ku MPB.

C – citronový olej; M – máťový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – máťový olej v biokvalitě; S – skořicový olej; H – hřebíčkový olej.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo studovat antibakteriální účinnost esenciálních olejů a to konkrétně oleje citronového, levandulového, eukalyptového, mátového, mátového v biokvalitě, skořicového a hřebíčkového. Tyto oleje a jejich vliv na růst mikroorganismů byly testovány agarovou difúzní diskovou metodou. Dalším cílem této diplomové práce bylo vyrobit mikroemulzní systémy a porovnat účinky esenciálních olejů v mikroemulzi metodou diluční a diskovou difúzní. Antibakteriální účinek byl testován na grampozitivních a gramnegativních bakteriích.

Bylo zjištěno, že uvedená metoda přípravy mikroemulzí není univerzální pro esenciální oleje o různém původu. Oproti původnímu záměru vyrobit mikroemulze, proto byly vyrobeny pouze homogenní emulze a ty pak byly testovány z hlediska antimikrobních vlastností.

Obecně lze říci, že největší antimikrobní účinek na testované bakterie měly neředěné emulze s esenciálními oleji. Z naměřených výsledků lze jednoznačně určit, že citlivější k působení olejů v emulzi byly G^+ bakterie, u kterých došlo k významnému poklesu indexu růstu u všech testovaných druhů (IR pod 40 %). Gramnegativní bakterie byly k testovaným olejům odolnější. Největší odolnost vykazoval *Enterobacter aerogenes* (IR = 70 %). Dále pak *Pseudomonas fluorescens*. Z gramnegativních druhů byly nejvíce inhibovány bakterie *Proteus vulgaris*, *Salmonella Enteritidis* a *Serratia marcescens*. Důvodem snížené citlivosti G^- bakterií k působení esenciálního oleje je zřejmě rozdílná stavba buněčné stěny těchto bakterií. Gramnegativní bakterie mají oproti grampozitivním druhům další ochrannou vrstvu buněčné stěny, takzvanou vnější membránu.

Z esenciálních olejů vykázal nejvyšší antimikrobní účinek ke všem testovaným druhům bakterií levandulový olej. Velmi výrazné inhibiční účinky měly oleje citronový, hřebíčkový a skořicový. Při použití mátového oleje a mátového oleje v biokvalitě, nebyly zaznamenány významné rozdíly v antibakteriálním působení. Ze studovaných olejů měl eukalyptový olej nejnižší schopnost inhibice růstu bakterií.

Byl prokázán antimikrobní účinek esenciálních olejů i olejů v emulzním systému. Použití těchto olejů pro eliminaci patogenů je předmětem mnoha studií. Esenciální oleje jsou zamýšleny jako vhodná náhrada antibiotik či jiných antimikrobních agens, vzhledem ke zvyšující se rezistenci bakterií a virů k těmto látkám. Esenciální oleje a jejich využití jako

konzervačních látek v potravinářském průmyslu a kosmetice se jeví jako jako velmi slibná alternativa, která ovšem vyžaduje intenzivní ověřování účinnosti olejů a jejich vlivu na vlastnosti potraviny či kosmetického prostředku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DEWICK, Paul M.: *Medicinal Natur products: A biosynthetic Approach*, 3rd edn., 2009, Wiley, Chichester, ISBN 978-0-470-74168-9.
- [2] BAŞER, Kemal Hüsnü Can, a Fatih DEMIRCI: *Chemistry of Essencial Oils*, In: BERGER, Ralf Günter: *Flavours and fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* (2007), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, s. 42-64, ISBN 978-3-540-49338-9.
- [3] SELL, Charles: *Chemistry of Essencial Oils*, In: BAŞER, Kemal Hüsnü Can, a Gerhard BUCHBAUER: *Handbook of Essencial Oils: Science, technology and Application*, (2010), Florida: CRC Press, Boca Raton, ISBN 978-1-4200-6315-8.
- [4] BELITZ, Hans-Dieter, HD, GROSCH, Werner a Peter SCHIEBERLE: (2004) *Food Chemistry*, (2004), 3rd edn. Berlin: Springer Heidelberg, s.970-984, ISBN 3-540-40818-5.
- [5] HARREWIJN, Paul., van OOSTEN Adriaan, M a Paul G.M. PIRON: *Natural terpenoids as Messenger: a multidisciplinary study of their production, biological functions, and practical applications*, (2001), Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, ISBN 0-7923-6891-6.
- [6] HAY, R.K.M. a P.G. WATERMAN: *Volatile Oil Crops: their biology, biochemistry and production* (1993). Burnt Mill: Longman Science & Technology Publications, ISBN 0-582-00557-4.
- [7] DVOŘÁKOVÁ, Marcela, Irena VALTEROVÁ a Tomáš VANĚK. MONOTERPENY V ROSTLINÁCH. *Chem. Listy*. 2011, č. 105, s. 839-845
- [8] DUDAREVA, N., PICHERSKY, E., GERSHENZON, J. Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiology*, 2004, 135, p. 1893-1902.
- [9] BERGOUGNOUX, V., J.C. CAISSARD, F. JULLIEN, J.L. MAGNARD, G. SCALLIET, J.M. COCK, P. HUGUENEY, a S. BAUDINO: Both the adaxial and abaxial epidermal layers of the rose petal emit volatile scent compounds, (2007), *Planta*, 226, s.835-866, ISSN 1432-2048.

- [10] BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46, p. 446-475.
- [11] BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 94, p. 223-253.
- [12] CROTEAU, R.J.: Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the essential oils, In: CRAKER, Lyle, E. a James, E. SIMON (eds) *Herbs, Spices, and Medicinal Plants: Recent Advances in Botany, Horticulture, and Pharmacology*, vol 1. (1986) Oryx Press Food Products, New York, s. 81–133, ISSN 0890-6653.
- [13] Anonymous (2000) Natural Sources of Flavourings. Report no 1. Council of Europe Publishing, Strasbourg
- [14] VONÁŠEK, František, Emilie TREPKOVÁ a Ladislav NOVOTNÝ. *Látky vonné a chuťové*. Praha: SNTL-Nakladatelství technické literatury, 1.vyd., 1987.
- [15] Deans, S.G., Ritchie, G., 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 5, 165– 180
- [16] Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H.-M., Vogenschow, H., 1986. Action of terpenoids on energy metabolism. In: Brunke, E.J. (Ed.), *Progress in Essential Oil Research: 16th International Symposium on Essential Oils*. De Gruyter, Berlin, pp. 429– 445.
- [17] WISE, M.L. a R. CROTEAU: *Monoterpene biosynthesis*. In: Barton D, Nakanishi K (eds), *Comprehensive Natural Product Chemistry: Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids* (1999), Oxford: Elsevier Science, s.97-153. ISBN 0-08-043154-2.
- [18] BARTON, Derek, METH-COHN, Otto a Koji NAKANISHI: *Comprehensive natural products chemistry: Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*, vol 2. (1999) Oxford: Elsevier Science, s.97-153. ISBN 0-08-043154-2.

- [19] SCHMIDT, Erich: *Production of Essencial Oils*, In: BAŞER, Kemal Hüsnü Can, a Gerhard BUCHBAUER: *Handbook of Essencial Oils: Science, technology and Application*, (2010), Florida: CRC Press, Boca Raton, ISBN 978-1-4200-6315-8.
- [20] BAUER, K. a J. PANTEN. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. 2nd ed. (1990). New York: Wiley-VCH.
- [21] CHISVERT, Alberto a Amparo SALVADOR. *Analysis of Cosmetics Products* (2007), Elsevier, ISBN 978-0-444-52260-3.
- [22] SELL, S. Charles. *The chemistry of fragrances: From Perfumer to Customer*, 2nd ed. Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry, 1999. ISBN 0-8504-528-7.
- [23] SURBURG, Horst a Johannes PANTEN. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. 5th completely revised and enlarged edition. (2006). Weinheim: Wiley-VCH. ISBN 3-527-31315-X.
- [24] TREPKOVÁ, Emilie a František VONÁŠEK. *Vůně a parfémy: Tajemství přitažlivosti*. Praha: Maxdorf, 1997, ISBN 80-85800-48-9.
- [25] PYBUS, H. David. *The History of Aroma Chemistry and Perfume*. In: SELL, S. Charles. *The chemistry of fragrances: From Perfumer to Customer*, 2nd ed. Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry, 1999. ISBN 0-8504-528-7.
- [26] LANGMAIER, Ferdinand. *Základy kosmetických výrob*. Zlín: UTB, 2001. ISBN 8073180162.
- [27] Studijní materiály, Pedagogická fakulta, MU, Brno; citováno: 29.10.2012
[http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtechold/soubory/operace/separacni_metody/destilace.pdf]
- [28] BAŞER, Kemal Hüsnü Can, a Gerhard BUCHBAUER: *Handbook of Essencial Oils: Science, technology and Application*, (2010), Florida: CRC Press, Boca Raton, ISBN 978-1-4200-6315-8.
- [29] PETRÁČKOVÁ, Věra a Jiří KRAUS. *Akademický slovník cizích slov*, Praha: Academia, 2001. ISBN 978-8-0200-0982-1.
- [30] Nobilis Tilia, informace o výrobku „Éterický olej hřebíček, plody“, citováno 29.10.2012 [<http://www.nobilis.cz/zbozi/etericky-olej-hrebicek-plody-109>]

- [31] Nobilis Tilia, informace o výrobku „Éterický olej hřebíček, listy“, citováno 29.10.2012 [<http://www.nobilis.cz/zbozi/etericky-olej-hrebicek-listy-110>]
- [32] Nobilis Tilia, informace o výrobku „Éterický olej skořice, kůra“, citováno 29.10.2012 [<http://www.nobilis.cz/zbozi/etericky-olej-skorice-kura-168>]
- [33] Nobilis Tilia, informace o výrobku „Éterický olej skořice, plody“, citováno 29.10.2012 [<http://www.nobilis.cz/zbozi/etericky-olej-skorice-plody-211>]
- [34] Nobilis Tilia, informace o výrobku „Éterický olej skořice, plody“, citováno 29.10.2012 [<http://www.nobilis.cz/zbozi/etericky-olej-tymian-174>]
- [35] Nobilis Tilia, informace o výrobku “Éterický olej citron”, citováno 19.4.2013 [<http://eshop.nobilis.cz/3/4/Etericke-oleje/etericke-oleje-A-F/ETERICKY-OLEJ-CITRON.html>]
- [36] Nobilis Tilia, informace o výrobku “Éterický olej máta peprná”, citováno 19.4.2013 [<http://eshop.nobilis.cz/3/4/Etericke-oleje/etericke-oleje-M-P/ETERICKY-OLEJ-MATA-PEPRNA.html>]
- [37] Nobilis Tilia, informace o výrobku “Éterický olej eukalyptus”, citováno 19.4.2013 [<http://eshop.nobilis.cz/3/4/Etericke-oleje/etericke-oleje-A-F/ETERICKY-OLEJ-EUKALYPTUS-1.html>]
- [38] Nobilis Tilia, informace o výrobku “Éterický olej levandule”, citováno 19.4.2013 [<http://eshop.nobilis.cz/3/4/Etericke-oleje/etericke-oleje-G-L/ETERICKY-OLEJ-LEVANDULE.html>]
- [39] LÓPEZ-MALO, Aurelio, PALOU, Enrique a Stella M., ALZAMORA. *Naturally Occurring Compounds – Plant Sources*. In: DAVIDSON, P., Michael, SOFOS, N. John a Alfred, Larry BRANEN. *Antimicrobials in Food*, 3rd.ed. Florida: CRC Press, Boca Raton, 2005. ISBN 978-0-8247-4037-5.
- [40] LÓPEZ-MALO, Aurelio, ALZAMORA, Stella, M. a S. GUERRERO. Natural antimicrobials from plants. In: ALZAMORA, Aurelio, TAPIA, Maria, Soledad. a Aurelio, LÓPEZ-MALO. *Minimally Processed Fruits and Vegetables. Fundamentals Aspects and Applications*. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, (2000), s. 237–264. ISBN 978-0834216723

- [41] SOBKOVÁ, Kristýna. *Antibakteriální účinky přírodních látek*. Pardubice, 2009. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce doc. MVDr. Jaroslava Mazurová, CSc.
- [42] KOROCH, R. Adolfin, JULIANI, H. Rudolfo a Julio, A. ZYGADLO. *Bioactivity of Essential Oils and Their Components*. In: BERGER, Ralf Günter: *Flavours and fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* (2007), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, s. 42-64, ISBN 978-3-540-49338-9.
- [43] ZAIKA, L. Laura. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, (1988), vol.9, s. 97-118. ISSN 1745-4565.
- [44] CONNER, D. E. a L.R. BEUCHAT, L. R. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of Food Science*, (1984), 49, s. 429–434. ISSN 1750-3841.
- [45] FARRELL, T. Kenneth. *Spices, Condiments and Seasonings*. 2nd ed. New York: Capman&Bell, 1990. ISBN 0-412-12281-2.
- [46] BEUCHAT, L. R. a D.A. GOLDEN, D. A. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*, 1989, 43(1), 134–142. ISSN 0015-6639.
- [47] DAVIDSON, P. Michael. *Parabens and phenolic compounds*. In: DAVIDSON, P., Michael, a Alfred, Larry BRANEN. *Antimicrobials in Food*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc., s. 263-305, 1993. ISBN 978-0-8247-8906-0.
- [48] HITOKOTO, H., MoOROZUMI, S., WAUKE, T., SAKAI, S., a KURATA, H. 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, (1980), 39, s.818–822. ISSN 1098-5336.
- [49] BULLERMAN, L. B. Inhibition of aflatoxin production by cinnamon. *Journal of Food Science*, (1974) 39, s.1163–1167. ISSN 1750-3841.
- [50] BULLERMAN, L. B., LIEU, F. Y., a SEISER, S. A. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils. Cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of Food Science*, (1977), 42, s.1107–1109, 1116. ISSN 1750-3841.

- [51] MAHMOUD, A. L. E. Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. *Letters in Applied Microbiology*, (1994), 19, s.110–113. ISSN 1472-765.
- [52] PASTER, N., MENASHEROV, M., RAVID, U., a JUVEN, B. Antifungal activity of oregano and thyme Essentials oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection*, (1995), 58, s. 81–85. ISSN 0362-028.
- [53] BEUCHAT, L. R. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *Journal of Food Science*, (1976), 41, s.899–902. ISSN 1750-3841.
- [54] FARAG, R. S., DAW, Z. Y., HEWEDI, F. M., a EL-BAROTY, G. S. A. Anti-microbial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection*. (1989), 52, s. 665–667. ISSN 0362-028.
- [55] Buchanan, R. L. and Shepherd, A. J. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by thymol. *Journal of Food Science*, (1981), 46, s. 976–977. ISSN 1750-3841.
- [56] SOFOS, J. N., BEUCHAT, L. R., DAVIDSON, P. M., a JOHNSON, E. A. *Naturally Occurring Antimicrobials in Food*. Council for Agricultural Science and Technology. Task Force Report No 132, CAST, Ames, IA. 1998.
- [57] AL-KHAYAT, M. A. a BLANK, G. Phenolic spice components sporostatic to *Bacillus subtilis*. *Journal of Food Science*, (1985), 50, s. 971–974, 980. ISSN 1750-3841.
- [58] FARRER-HALLISOVÁ, Gill. *Aromaterapie od A do Z: Podrobný průvodce světem esenciálních olejů*. Praha: Metafora, 2007. ISBN 978-80-7359-086-4. (přeložila Bártová, V.)
- [59] KALÁČ, Pavel. *Funkční potraviny: kroky ke zdraví*, České Budějovice: Dona, 2003. ISBN 80-7322-029-6.
- [60] US Food and Drug Administration , Federal Register 46:5852, 1983.
- [61] Schwartz, J.L., 1996. The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effects on tumor cell growth. *J. Nutr.* 126, 1221S–1227S.
- [62] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., Baudoux, D., Idaomar, M., 2006. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces*

- cerevisiae) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. *Mutat. Res.* 606, 27–38.
- [63] KALEMBA, D. a A. KUNICKA. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, (2003), 10, s. 813-829. ISSN 0929-8673.
- [64] Vzdělávací portál UTB – cepac – Obecná mikrobiologie – distanční text II – Základy fyziologie mikroorganismů [http://utb.cepac.cz/Screens/Explorer.aspx?id=18]
- [65] HARVEY, R. A., CHAMPE, P. C., FISHER, B. D. *Microbiology*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 438 p. ISBN 978-0-781-782-159.
- [66] CANILLAC, N., MOUREY, A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*, 2001. 18, p. 261– 268
- [67] POKLUDOVÁ, Lucie. *Základy problematiky terapie antibiotiky*. Studijní text Masarykovy Univerzity v Brně.
- [68] PAULI, Alexander a Heinz SCHICHER: *In Vitro* Antimicrobial Activities of Essential Oil Monographed in the European PHarmacopoeia 6th Edition. In: BAŞER, Kemal Hüsnü Can, a Gerhard BUCHBAUER: *Handbook of Essential Oils: Science, technology and Application*, (2010), Florida: CRC Press, Boca Raton, ISBN 978-1-4200-6315-8.
- [69] HAMMER, K. A., CARSON, C. F., RILEY, T. V. Influence of organic matter, cations and surfactants on the antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology*. 1999, 86, p. 446-452.
- [70] HILL, P., EVANS, C. S., VENESS, R. G. Antimicrobial action of essential oils: The effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in Applied Microbiology*. 1997, 24, p. 269-275.
- [71] GUILLIER, L., NAZER, A. I., DUBOIS-BRISSONNET, F. Growth response of *Salmonella* Typhimurium in the presence of natural and synthetic antimicrobials: Estimation of MICs from three different models. *Journal of Food Protection*. 2007, 10, p. 2243-2250.

- [72] TEIXEIRA, B., MARQUES, A., RAMOS, C., NENG, N. R., NOGUEIRA, J. M. F., SARAIVA, J. A., NUNES, M. L. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*. 2013, 43, p. 587-595.
- [73] BASSOLE, I. H. N., OUATTARA, A. S., NEBIE, R., OUATTARA, C. A. T., KABORE, Z. I., TRAORE, S. A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry*. 2003, 62, p. 209-212.
- [74] VELÍŠEK Jan a Jana HEŠLOVÁ. *Chemie potravin 2*, Tábor: Osis, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [75] Emulze – VŠCHT, citováno 18.11.2012 online: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/emulze.html]
- [76] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*, Praha: VŠCHT Praha, 2005. ISBN 80-7080-579-X.
- [77] EL-AASSER, M., LACK, C., VANDERHOFF, J. a F. FOWKES. The miniemulsion process -different form of spontaneous emulsification. *Colloids and Surfaces*, (1988), 29, s. 103-118. ISSN 0927-7757.
- [78] Mikromulze – VŠCHT, citováno 18.11.2012 online: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/mikroemulze.html]
- [79] Ko-surfaktant – VŠCHT, citováno 18.11.2012 online: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/ko-surfaktant.html]
- [80] IM-EMPSAP, Wandee a Jurgen SIEPMANN. *Disperse System*. In: BANKER, Gilbert, S. a RHODES, T. Christopher. *Modern Pharmaceutics*, 4th ed., s. 260-261, NY: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN 0-203-90883-X.
- [81] ECCLESTON, G. M.; *Emulsion and Microemulsions* In: SWARBRICK, James nad James C. BOYLAN: *Encyklopedia of Pharmaceutical technology*, Vol.2, 2nd ed., s. 1080-1085. NY: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN 0-824-72823-8.
- [82] Laboratoř vybraných procesů a fyzikálních vlastností potravin – VŠCHT, citováno 27.11.2012 online: [http://www.vscht.cz/tmt/studium/lvpfvp/LVPFVP_Homogenizace.pdf]

- [83] BRUMMER, Rüdiger. *Rheology Essentials of Cosmetics and Food Emulsion*. Berlín: Springer, 2006. ISBN 3-540-25553-2.
- [84] GARTI, N., YULI-AMAR, I. *Micro- and nano-emulsions for delivery of functional food ingredients*. In.: Garti, N. Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals Taylor and Francis, Inc. 384 s., 2008. ISBN 978-14-2007-4369.
- [85] HEUSCHKEL Sandra., GOEBEL Alexandra a Reinhart, H.H. NEUBERT. Microemulsions - Modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008, vol. 97, is. 2, p. 603-631. ISSN 1520-6017.
- [86] LINH, D.vDo, WITHAYYPAYANON, H. Anradee, HARWELL, H. Jeffrey a David, A. SABATINI. Environmentally Friendly Vegetable Oil Microemulsions Using Extended Surfactant and Linkers, *Journal of Surfactants and Detergents*, 2009, 12, s. 91-99. ISSN 1558-9293.
- [87] PATEL, R.Mrunali, PATEL, Rashin, B., PARIKH, Jolly, R., BHATT, Kashyap, K. a Aliasgar, J., KUNDAWALA. Microemulsion: As Novel Drug Delivery Vehicle. *Pharmaceutical Information*, 2007, 5 – online (citováno 27.11.2012) [<http://www.pharmainfo.net/reviews/microemulsions-novel-drug-delivery-vehicle>]
- [88] HEINMENZ, Paul, C. a Raj RAJAGOPALAN. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, 3rd ed. NY: Marcel Dekker, Inc., 1997. ISBN 978-0824793975.
- [89] LINH D, Do, GRADZIELSKI, M., HOFFMANN, H. Environmentally Friendly Vegetable Oil Microemulsions Using Extended Surfactant and Linkers, *Journal of Physical Chemistry*, 1994, 98, s. 2613.
- [90] AZEEM, Adnan, Mohammad RIZWAN, Farhan J. AHMAD, Zeenat I. KHAN, Roop K. KHAR, Mohammed AQIL a Sushama TALEGAONKAR. *Emerging Role of Microemulsions in Cosmetics*. 2008, s. 278-289. ISSN 1872-2113/08.
- [91] GARTI, Nissim. *Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals.*, Fla: CRC Press Boca Raton, 2008. ISBN 978-142-0074-369.

- [92] PAUL, Bidyut K. a Satya P. MOULIK. Uses and applications of microemulsions. *Current Science*, 2001, 80 (8). ISSN 0011-3891.
- [93] SLOVÁKOVÁ, Bc. Ivana. *Mikroemulze obsahem esenciálních olejů*. Zlín, 2012. [www.stag.utb.cz] Bakalářská. UTB. Vedoucí práce doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.
- [94] DORMAN, H. J. D., Deans, S. G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308–316.
- [95] SANDRI, I. G., J. ZACARIA, F. FRACARO, A. P. L. Delamare, S. Echeverrigaray. *Food Chem.* 2007, 103, 823.
- [96] PAULI A., H. Schilcher. In Vitro antimicrobial activities of essential oils monographed in the European Pharmacopoeia, 6th edn. In *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*, K. H. C. Baser, G. Buchbauer (eds.), Taylor & Francis: Boca Raton, 2010, pp. 353–547.
- [97] HANAMANTHAGOUDA, M. S., Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities *Food Chemistry* 118 (2010) 836–839. [journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem]
- [98] DJENANE, D., Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Science* 92 (2012) 667-674. [journal homepage: www.elsevier.com/locate/meatsci]
- [99] ELLAISSI, A., Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species' essential oils, *Food chemistry* 129 (2011), 1427-1434 [journal homepage www.elsevier.com/locate/foodchem]
- [100] BASSOLÉ, Imaël Henri Nestor, a H. Rodolfo JULIANI. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. DOI: 10.3390/molecules17043989. [www.mdpi.com/journal/molecules]

- [101] FITZGERALD, D. J., STRATFORD, M., & Narbad, A. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin (2003). *International Journal of Food Microbiology*, 86, 113–122.
- [102] MARINO, M., Bersani, C., & Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae, Compositae. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 187–195.
- [103] ELAISSI, A., Chemical composition of 8 eucalyptus species'essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities, Elaissi et al. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2012, 12:81 [<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/12/81>]
- [104] RODRIGUES, Chemical composition and antibacterial activity of the Essentials oils from the medicinal plant *Mentha cervina* L. grown in Portugal Leandra Rodrigues: 17 March 2011 / Accepted: 31 October 2011 / Published online: 20 November 2011. *Med Chem Res* (2012) 21:3485–3490 DOI 10.1007/s00044-011-9858-z.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

EO	Esenciální olej.
G ⁺	Grampozitivní bakterie.
G ⁻	Gramnegativní bakterie.
C	Citronový olej.
M	Mátový olej.
L	Levandulový olej.
E	Eukalyptový olej.
BM	Mátový olej v biokvalitě.
S	Skořicový olej.
H	Hřebíčkový olej.
EM	Emulze.
MPB	Masopeptonový bujón.
MPA	Masopeptonový agar.
CCM	Česká sbírka mikroorganismů.
IR	Index růstu.
o/v	System olej ve vodě.
v/o	System voda v oleji.

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Izoprenová jednotka [upraveno podle 2]</i>	15
<i>Obrázek 2: Schéma destilace vodní parou [27]</i>	17
<i>Obrázek 3: Chemické vzorce vybraných účinných složek esenciálních olejů (cinnamaldehyd, eugenol, citral B, mentol, 1,8-cineol, linalol) [upraveno podle 39]</i>	22
<i>Obrázek 4: Typy emulzí dle koncentrace disperzního podílu [upraveno podle 75]</i>	32
<i>Obrázek 5: Schematické znázornění kapky mikroemulze [77]</i>	33
<i>Obrázek 6: Mikroemulze [upraveno podle 87]</i>	35
<i>Obrázek 7: Třífázový diagram [upraveno podle 87]</i>	37
<i>Obrázek 8: Vliv esenciálních olejů na růst Bacillus cereus</i>	50
<i>Obrázek 9: Vliv esenciálních olejů na růst Bacillus subtilis</i>	51
<i>Obrázek 10: Vliv esenciálních olejů na růst Micrococcus luteus</i>	52
<i>Obrázek 11: Vliv esenciálních olejů na růst Staphylococcus aureus</i>	53
<i>Obrázek 12: Vliv esenciálních olejů na růst Enterobacter aerogenes</i>	54
<i>Obrázek 13: Vliv esenciálních olejů na růst Pseudomonas fluorescens</i>	55
<i>Obrázek 14: Vliv esenciálních olejů na růst Serratia marcescens</i>	56
<i>Obrázek 15: Vliv esenciálních olejů na růst Proteus vulgaris</i>	57
<i>Obrázek 16: Vliv esenciálních olejů na růst Salmonella Enteritidis</i>	58
<i>Obrázek 17: Vliv esenciálních olejů na růst Escherichia coli</i>	59
<i>Obrázek 18: Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na růst Bacillus subtilis</i>	64
<i>Obrázek 19: Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na růst Escherichia coli</i>	65
<i>Obrázek 20: Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na růst Bacillus cereus</i>	84
<i>Obrázek 21: Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na růst Staphylococcus aureus</i>	84

<i>Obrázek 22: Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na růst <i>Micrococcus luteus</i>.....</i>	85
<i>Obrázek 23: Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na růst <i>Enterobacter aerogenes</i>.....</i>	86
<i>Obrázek 24: Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na růst <i>Pseudomonas fluorescens</i>.....</i>	86
<i>Obrázek 25: Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na růst <i>Proteus vulgaris</i>.....</i>	87
<i>Obrázek 26: Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na růst <i>Salmonella Enteritidis</i>.....</i>	87
<i>Obrázek 27: Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na růst <i>Serratia marcescens</i>.....</i>	88

SEZNAM TABULEK

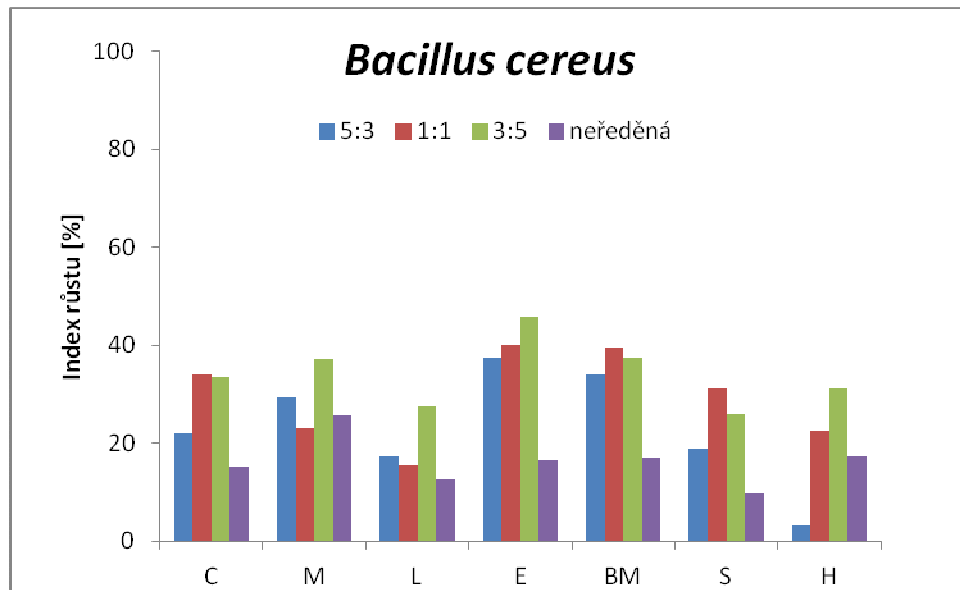
<i>Tabulka 1: Složení Mueller Hinton agaru.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabulka 2: Složení masopeptonového agaru (MPA).....</i>	<i>41</i>
<i>Tabulka 3: Složení masopeptonového bujónu (MPB).....</i>	<i>41</i>
<i>Tabulka 4: Poměr esenciálního oleje:etanolu.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabulka 5: Složení mikroemulze.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabulka 6: Ředění mikroemulzí.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabulka 7: Antimikrobní účinky esenciálních olejů v emulzi.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabulka 8: Antimikrobní účinky esenciálních olejů v emulzi.....</i>	<i>63</i>

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na grampozitivní bakterie (diluční metoda)

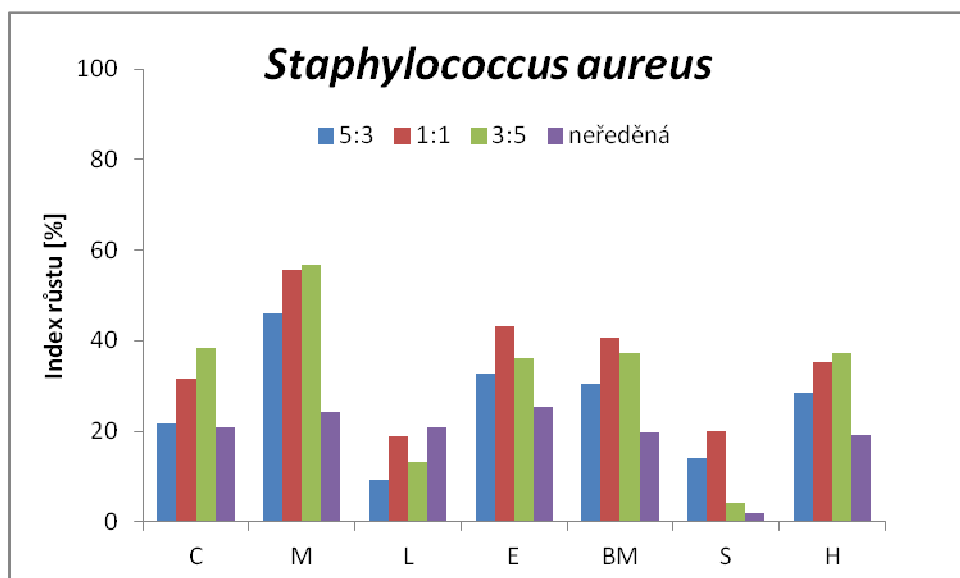
Příloha P II: Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na gramnegativní bakterie (diluční metoda)

PŘÍLOHA P I: VLIV ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ V EMULZNÍM SYSTÉMU NA GRAMPOZITIVNÍ BAKTERIE (DILUČNÍ METODA)



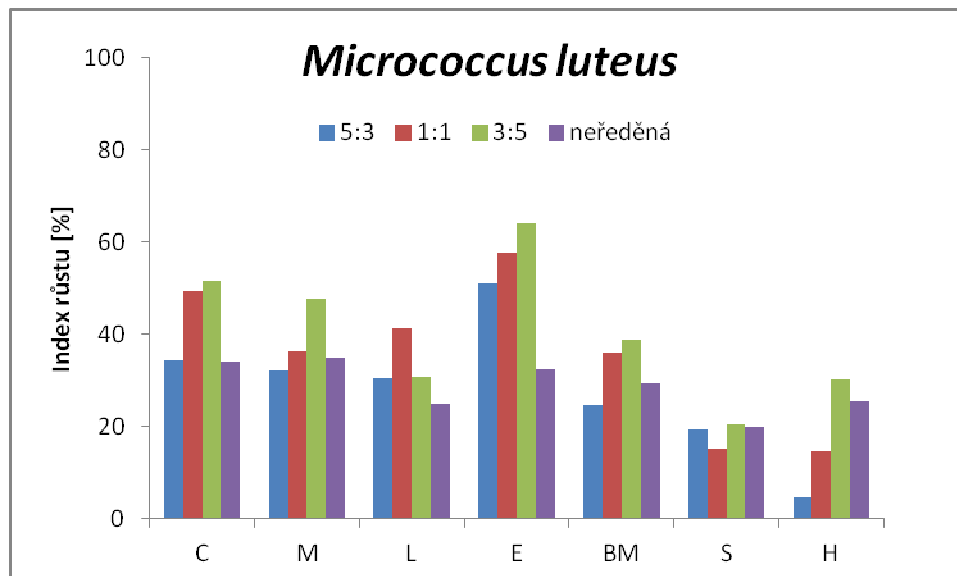
Obr. 20. Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na *Bacillus cereus*, poměr uvádí EM ku MPB.

C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – mátový olej v biokvalitě; S – skořicový olej, H – hřebíčkový olej.



Obr. 21. Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na *Staphylococcus aureus*, poměr uvádí EM ku MPB.

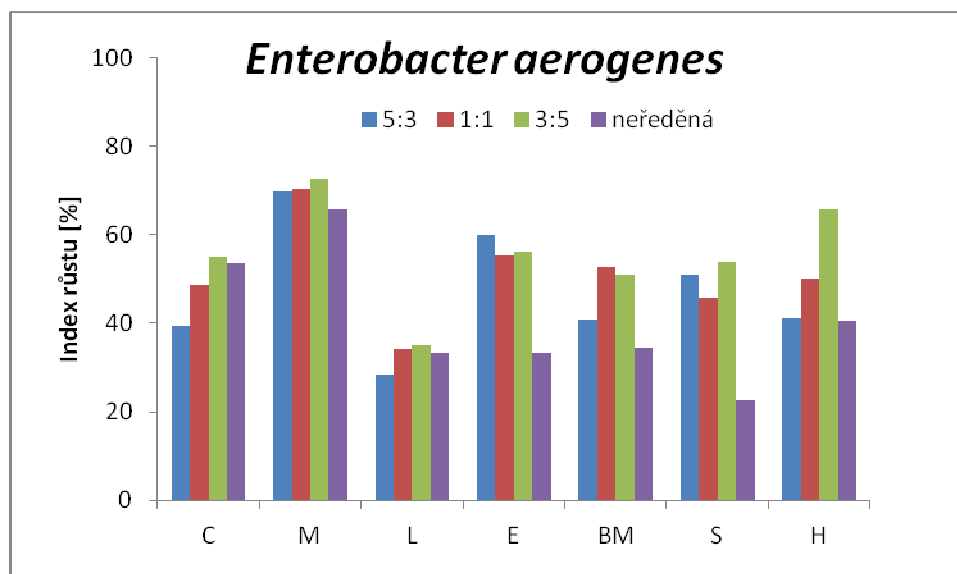
C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – máto-
vý olej v biokvalitě; S – skořicový olej, H – hřebíčkový olej.



Obr. 22. Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na *Micrococcus luteus*, poměr uvádí EM ku MPB.

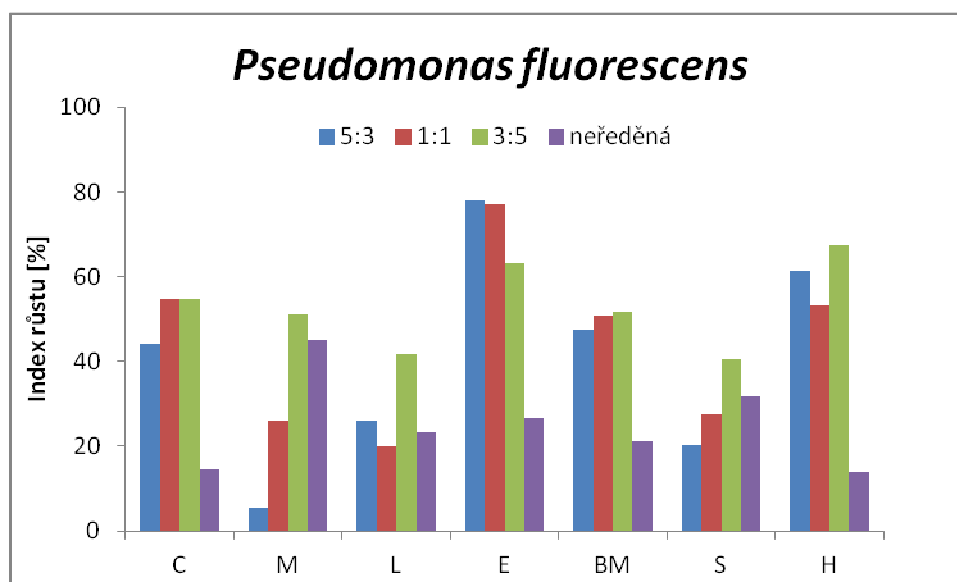
C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – máto-
vý olej v biokvalitě; S – skořicový olej, H – hřebíčkový olej.

PŘÍLOHA P II: VLIV ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ V EMULZNÍM SYSTÉMU NA GRAMNEGATIVNÍ BAKTERIE (DILUČNÍ METODA)



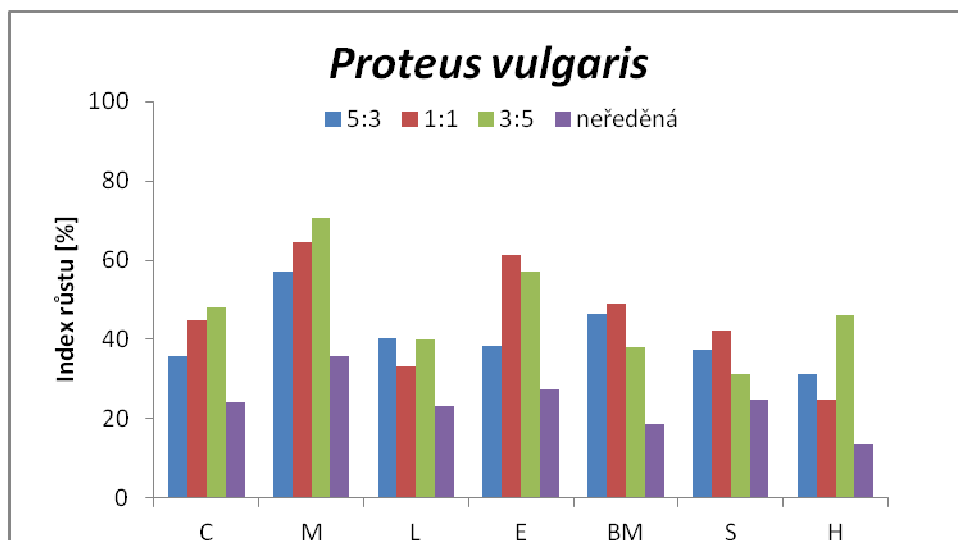
Obr. 23. Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na *Enterobacter aerogenes*, poměr uvádí EM ku MPB.

C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – mátový olej v biokvalitě; S – skořicový olej; H – hřebíčkový olej.



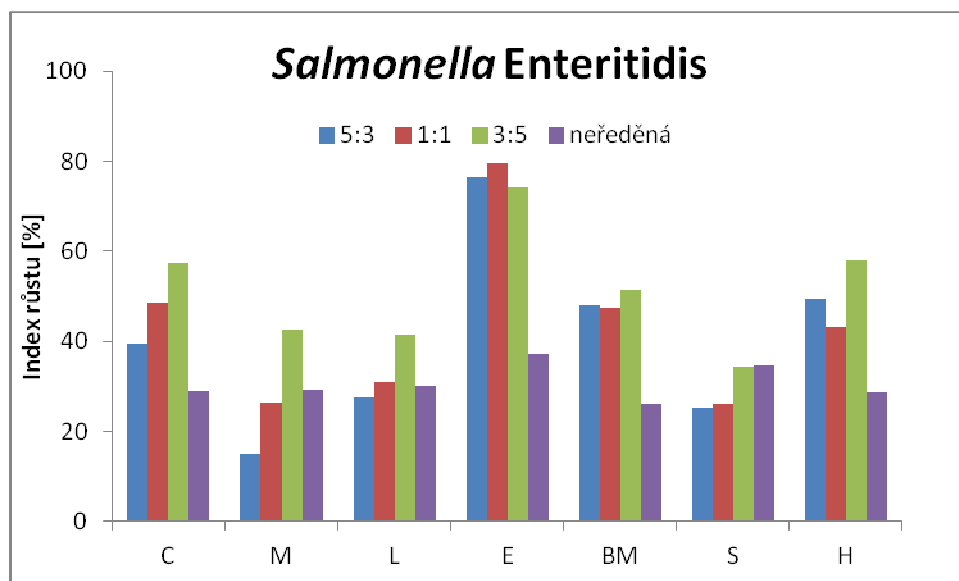
Obr. 24. Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na *Pseudomonas fluorescens*, poměr uvádí EM ku MPB.

C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – mátový olej v biokvalitě; S – skořicový olej; H – hřebíčkový olej.



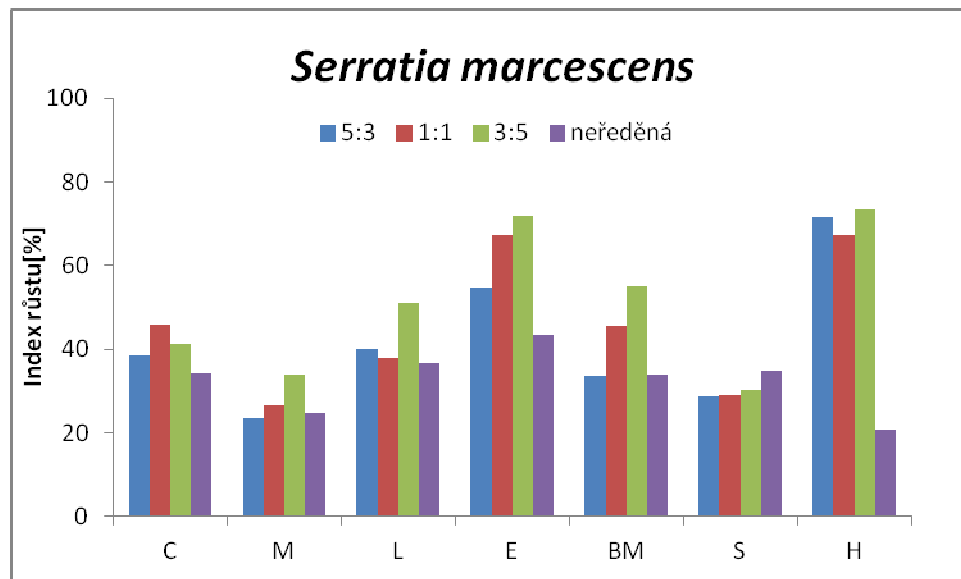
Obr. 25. Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na *Proteus vulgaris*, poměr uvádí EM ku MPB.

C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – mátový olej v biokvalitě; S – skořicový olej, H – hřebíčkový olej.



Obr. 26. Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na *Salmonella Enteritidis*, poměr uvádí EM ku MPB.

C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – mátový olej v biokvalitě; S – skořicový olej, H – hřebíčkový olej.



Obr. 27. Vliv esenciálních olejů v emulzním systému na *Serratia marcescens*, poměr uvádí EM ku MPB.

C – citronový olej; M – mátový olej; L – levandulový olej; E – eukalyptový olej; BM – mátový olej v biokvalitě; S – skořicový olej, H – hřebíčkový olej.