

Protimikrobní vlastnosti N-alkylpyrrolidonů vůči potravinářsky významným druhům mikroorganismů

Marika Lhotská, DiS.

Bakalářská práce
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Marika Lhotská, DiS.**
Osobní číslo: **T14727**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Protimikrobní vlastnosti N-alkylpyrrolidonů vůči potravinářsky významným druhům mikroorganismů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. N-Oktylpyrrolidon: vlastnosti, rozpustnost, toxicita.
2. Použití NOP.
3. Protimikrobní vlastnosti NOP a látek strukturně blízkých.
4. Protimikrobní vlastnosti NOP studované na FT UTB ve Zlíně.

II. Praktická část

1. Výběr mikrobiálních kultur.
2. Použitá živná média.
3. Postupy testů pro zjištění minimální inhibiční koncentrace (MIC) oktylpyrrolidonu.
4. Postupy testů srovnání testování v tekutých médiích a na agarových živných půdách.
5. Výsledky zjištěných hodnot MIC.
6. Výsledky srovnání testování v tekutých médiích a na agarových živných půdách.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] SALAČ Jan: Protibakteriální účinky 1 - oktyl 2 - pyrrolidonu a fenoxýethanolu.

Diplomová práce, 2015. FT UTB ve Zlíně.

[2] PÉRIAMÉ M., PAGES J.M., DAVIN-REGLI A.: Enterobacter gergoviae adaptation to preservatives commonly used in cosmetic industry. Internation Journal of Cosmetic Science, 2014, 36, s. 386-395.

[3] SAURAV K., KANNABIRAN K.: In vitro activity of 5-(24-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one extracted from marine Streptomyces VITSVK5 spp. against fungal and bacterial human pathogens. Revista Iberoamericana de Micología 2012, 29, s. 29-33.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

3. února 2017

Termín odevzdání bakalářské práce:

5. května 2017

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

ředitel ústavu

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. 2017


.....

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 nahlížení 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 užít 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

Tato bakalářská práce se zabývá protimikrobními účinky N-oktylpyrrolidonu vůči potravinářsky významným druhům mikroorganismů, především proti laktobacilům a laktokokům, běžně využívaných v potravinářském průmyslu. Byla zjišťována minimální inhibiční koncentrace N-oktylpyrrolidonu vůči těmto mlékařským kulturám, a to metodou v tekutých živných médiích a na agarových živných půdách. Bylo provedeno srovnání a vyhodnocení těchto dvou metod.

Bylo prokázáno, že N-oktylpyrrolidon má protimikrobní vlastnosti vůči testovaným kulturám. Koncentrace N-oktylpyrrolidonu, potřebná k úplné inhibici růstu mikrobiálních kultur, byla v tekutém médiu (až na kulturu *Pediococcus* sp. CCDM 396) vždy větší nebo stejná než na agarové živné půdě.

Klíčová slova: N-oktylpyrrolidon, minimální inhibiční koncentrace

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with antimicrobial effects of N-octylpyrrolidone against microbial species important in foodstuff industry, especially against *lactobacilli* and *lactococci* commonly used in the dairy industry. I was determined minimal inhibitory concentrations of N-octylpyrrolidone against dairy strains using two methods – under cultivation in liquid nutrient broth and on nutrient agar media. The results obtained by the methods were evaluated and a comparison of both methods was performed.

It was found that N-octylpyrrolidone possesses antimicrobial activity against most test strains. The concentrations of N-octylpyrrolidone, required for complete inhibition of the strains growth, were in liquid nutrient broth always higher or equal than those obtained on the nutrient agar media, excepting the results in strain *Pediococcus* sp. CCDM 396.

Keywords: N-octylpyrrolidone, minimal inhibitory concentration

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady, vstřícnost při konzultacích a umožnění práce v mikrobiologické laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat i své rodině za trpělivost.

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

Dne 5. 5. 2017 ve Zlíně

Podpis:

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 N-OKTYLPYRROLIDON.....	12
1.1 VLASTNOSTI.....	12
1.2 TOXICITA	13
2 POUŽITÍ NOP.....	14
3 PROTIMIKROBNÍ VLASTNOSTI NOP A LÁTEK STRUKTURNĚ BLÍZKÝCH	15
4 PROTIMIKROBNÍ VLASTNOSTI NOP STUDOVANÉ NA FT UTB VE ZLÍNĚ.....	16
5 POTRAVINÁŘSKY VÝZNAMNÉ DRUHY MIKROORGANISMŮ.....	18
5.1 ROD <i>LACTOBACILLUS</i>	18
5.2 ROD <i>LACTOCOCCUS</i>	19
5.3 ROD <i>STREPTOCOCCUS</i>	19
5.4 ROD <i>PEDIOCOCCUS</i>	20
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	21
6 VÝBĚR MIKROBIÁLNÍCH KULTUR.....	22
7 POUŽITÁ ŽIVNÁ MÉDIA A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	23
7.1 CHEMIKÁLIE A ŽIVNÁ MÉDIA.....	23
7.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	23
8 POSTUPY TESTŮ PRO ZJIŠTĚNÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE NOP	24
8.1 PŘÍPRAVA TEKUTÝCH MÉDIÍ A PEVNÝCH MÉDIÍ	24
9 POSTUPY TESTŮ A SROVNÁNÍ TESTOVÁNÍ V TEKUTÝCH MÉDIÍCH A NA AGAROVÝCH ŽIVNÝCH PŮDÁCH	26
9.1 TESTOVÁNÍ V TEKUTÝCH MÉDIÍCH	26
9.2 TESTOVÁNÍ NA AGAROVÝCH PŮDÁCH	27
10 VÝSLEDKY ZJIŠTĚNÝCH HODNOT MIC	28
10.1 VÝSLEDKY HODNOT MIC ZJIŠTĚNÉ V TEKUTÉM MÉDIU	28
10.2 VÝSLEDKY ZJIŠTĚNÝCH HODNOT MIC NA AGAROVÝCH ŽIVNÝCH PŮDÁCH.....	47
11 VÝSLEDKY SROVNÁNÍ TESTOVÁNÍ V TEKUTÝCH MÉDIÍCH A NA AGAROVÝCH ŽIVNÝCH PŮDÁCH	48
ZÁVĚR	50
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	51
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	54

SEZNAM OBRÁZKŮ	55
SEZNAM TABULEK.....	56

ÚVOD

Používání správných čistících a dezinfekčních přípravků v potravinářství má velký význam při zabezpečení hygienické úrovně celé výroby a tím i dosažení hygienické nezávadnosti potravin. Vzhledem k velké rozmanitosti mikroorganismů v prostředí je stále potřeba hledat nové typy dezinfekčních přípravků. Obecně se doporučuje střídát dezinfekční prostředky s různými chemickými skupinami, aby se tak zabránilo vzniku rezistence mikroorganismů na často používané čistící a dezinfekční prostředky.

N-oktylpyrrolidon patří mezi méně známé látky ze skupiny alkylypyrrolidonů a má jisté protimikrobní účinky. Díky jeho chemické stabilitě, nekorozivním a smáčivým vlastnostem je N-oktylpyrrolidon potencionálně použitelný jako součást čistících a dezinfekčních prostředků. Nicméně jeho protimikrobní vlastnosti byly doposud ověřeny pouze proti omezené škále mikroorganismů, tudíž je třeba ověřit účinnost i proti bakteriím mléčného kvašení.

Bakterie mléčného kvašení jsou velmi významnými mikroorganismy využívané v potravinářství. Pokud se ale ovšem vyskytnou tam, kde nemají, mohou se při výrobě snadno stát významnými kontaminanty. Bakterie mléčného kvašení jsou největšími kontaminanty v pivovarnické a vinařské výrobě, kde způsobují kažení a znehodnocení produktů. Z tohoto důvodu se náplní bakalářské práce stalo ověření účinnosti N-oktylpyrrolidonu vůči bakteriím mléčného kvašení.

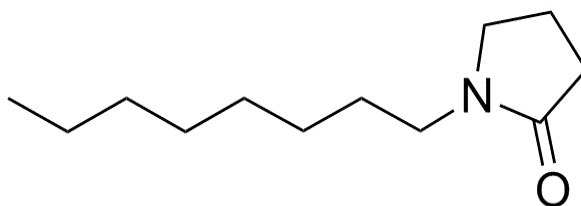
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 N-OKTYLPYRROLIDON

N-oktylpyrrolidon (NOP), také jinak 1-oktyl-2-pyrrolidon nebo 1-oktylpyrrolidon. Sumárním vzorcem $C_{12}H_{23}NO$ [1]. NOP je známý pod obchodním názvem Surfadone® - LP 100 [2].

1.1 Vlastnosti

NOP je substituovaná heterocyklická organická sloučenina [4]. Je to bezbarvá až nažloutlá kapalina s čpavkovým zápachem. Jeho molekulová hmotnost je $197,32 \text{ g.mol}^{-1}$, relativní hustota $0,92 \text{ g.cm}^{-3}$ při $20 - 25^\circ\text{C}$ a bod varu se pohybuje v rozmezí $306 - 307^\circ\text{C}$ [3]. Bod vzplanutí je 142°C v uzavřeném kelímku [1]. Ovšem druhý zdroj uvádí bod vzplanutí již při 113°C [4]. NOP je rozpustný v organických rozpouštědlech i ve vodě. Rozpustnost ve vodě je však výrazně nižší, udává se $1,36 \text{ g.l}^{-1}$ při 20°C [4]. NOP patří mezi povrchově aktivní látky díky delokalizovaným elektronům v laktamovém kruhu. Dokáže snížit povrchové napětí vody i při nízkých koncentracích [2]. Jeho hydrofilně – lipofilní rovnováha se rovná 6 [5]. Je chemicky stabilní při dodržení skladovacích podmínek, avšak nesmí se mísit se silnými oxidačními činidly [1].



Obr. 1. Chemická struktura N-oktylpyrrolidonu.

1.2 Toxicita

Testy toxicity byly prováděny na králících a krysách. U králíků došlo k silnému dráždění očí a u krys k patologickým změnám v zažívacím traktu. Akutní toxicita, vyjádřená hodnotou LD_{50} , byla u králíka při dermální expozici stanovena na $>2000 \text{ mg.kg}^{-1}$ a u krys LD_{50} při orální expozici 2050 mg.kg^{-1} [1]. LD_{50} (střední letální dávka) je dávka látky, která je smrtelná pro 50% testovaných organismů [6]. Test in vitro na mutagenitu v zárodečných buňkách u *S. typhimurium* byla negativní [1]. NOP je žíravá látka a může poleptat kůži, oči i dýchací cesty [3]. Mutagenita a karcinogenita pro lidský organismus nebyla prokázána. Byla zjištěna toxicita pro vodní organismy s dlouhodobými nepříznivými účinky [1]. U NOP nebyly prokázány biokumulativní účinky a v určitých koncentracích je snadno biologicky odbouratelný [4].

2 POUŽITÍ NOP

Pyrrolidon a jeho deriváty se používají jako meziprodukty pro syntézu agrochemikálií [7], léčiv, v textilním průmyslu, jako rozpouštědla, do speciálních inkoustů a nátěrových hmot [8]. NOP může také sloužit jako rozpouštědlo pro polymerní látky a jako meziprodukt při výrobě elektroniky [4]. Některé alkylované pyrrolidony jsou také vhodné k dezinfekci kontaktních čoček, kdy jsou přidávány k chlorhexidin glukonátu. Výhodou jsou alkylové skupiny s osmi, deseti nebo dvanácti atomy uhlíku, tedy –oktyl, –decyl nebo –dodecyl. Takové alkylnopyrrolidony mohou být použity ve formě roztoků anebo jsou k dispozici v podobě vodorozpustných tablet [9]. Dokáže také zvyšovat propustnost pro transdermální podávání léčiv a je součástí pesticidů [10,11]. NOP může být potenciálně použit pro extrakci některých antibiotik, jako je například rifampicin, penicilin V a tetracyklin [5], nebo použit jako efektivní změkčovač PVC [12].

3 PROTIMIKROBNÍ VLASTNOSTI NOP A LÁTEK STRUKTURNĚ BLÍZKÝCH

Protimikrobní vlastnosti NOP a jiných látek jsou obvykle vyjadřovány formou tzv. minimálních inhibičních koncentrací (MIC). Jsou to hodnoty, které umožňují srovnávání účinnosti různých látek, aktivních vůči mikroorganismům, a umožňují nastavení prakticky aplikovaných koncentrací.

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je nejnižší koncentrace antimikrobiálního činidla, která viditelně inhibuje růst určitého mikroorganismu v daném zkušebním období. Tyto testy jsou v bakteriologii zavedeny jako nejběžnější způsob stanovení MIC [13].

Antimikrobní vlastnosti NOP jsou částečně popsány v patentové literatuře. Nejprve Gu et al. [9] ohlásil letální účinek NOP vůči *Candida albicans*, v koncentracích 500 až 1000 mg.l⁻¹. Později prokázal antimikrobní vlastnosti NOP také Kabra [14], který zjistil, že NOP v koncentraci 500 mg.l⁻¹, doplněný o 18 g.l⁻¹ propylenglykolu, dokáže usmrtit jak gramnegativní, tak i grampozitivní bakterie během 6 hodin a *Candida albicans* během 7 dní.

Použití podobné heterocyklické látky, avšak s delším alkylovým řetězcem (N-dodecylpyrrolidonu), využitelné jako průmyslový mikrobicid a konzervační látka, bylo patentováno v roce 1993 [15]. V uvedeném patentu je dokladováno, že N-dodecyl-2-pyrrolidon vykázal minimální inhibiční koncentraci 1000 mg.l⁻¹ vůči *Enterobacter aerogenes* a 32 mg.l⁻¹ pro *Aspergillus niger*. Dvě další studie byly zaměřeny na zkoumání jiných derivátů pyrrolidonu. První z nich byla zaměřena na přípravu a testování chlorovaného N-dodecyl-N-hydroxypyrrolidonu a výsledky byly publikovány Demberelnyambou et al. [16]. Autoři zjistili, že MIC této látky pro *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* a *Chlorella regularis* je 8, 16, 4 a 8 mg.l⁻¹, v daném pořadí. Podobně Saurav a Kannabiran [17] popsali účinek 5-(2,4-dimethylbenzyl) pyrrolidinonu vůči lidským patogenům a zjistili, že gramnegativní bakterie byly citlivější než grampozitivní kmeny. MIC pro *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae* byla 187 a 220 mg.l⁻¹, v daném pořadí, zatímco MIC pro *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis* byly podstatně vyšší (>1000 a 850 mg.l⁻¹, v daném pořadí). Nicméně, 5-(2,4-dimethylbenzyl) pyrrolidinon vykazoval silný účinek vůči *Aspergillus niger*, kdy byla zjištěna hodnota MIC 1 mg.l⁻¹ [17].

4 PROTIMIKROBNÍ VLASTNOSTI NOP STUDOVANÉ NA FT UTB VE ZLÍNĚ

Studium protimikrobních vlastností NOP (1-oktyl-2-pyrrolidonu) vůči čistým bakteriálním kulturám probíhalo na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, Fakulty technologické ve Zlíně, v rámci diplomové práce Jana Salače v roce 2015.

Vůči čistým bakteriálním kulturám byly stanoveny hodnoty minimální inhibiční koncentrace metodou sledování růstu kultur v živném médiu v 96 jamkových mikrotitračních destičkách, s odstupňovanými koncentracemi sledované látky, případně její směsi. Stanovení MIC a MBC (minimální baktericidní koncentrace) probíhalo s použitím čtyř grampozitivních a čtyř gramnegativních kultur [18].

Stanovené hodnoty MIC a MBC jsou uvedeny v následující tabulce v mg.l^{-1} .

Tab. 1. Tabulka stanovených hodnot MIC a MBC vůči testovaným kulturám.

Mikrobiální kultura	MIC [mg.l^{-1}]	MBC [mg.l^{-1}]
Grampozitivní		
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	250	250 – 500
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	250	250
<i>Rhodococcus erythropolis</i> FR6	100	100
<i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216 (prekultivovaný 72 hodin)	100	>1000
<i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216 (prekultivovaný 20 hodin)	100	100

Gramnegativní		
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	500	500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 4416	250	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	>2000	>2000
<i>Pseudomonas</i> sp. MP11	>1000	>1000
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MS1	>1000	>1000

Hodnoty MIC a MBC se (až na výsledek u *Klebsiella pneumoniae*) shodovaly, což také ukazuje na vyšší účinnost NOP inhibovat bakterie. Mezi testovanými mikroorganismy prokázaly vysokou schopnost odolávat NOP bakterie rodu *Pseudomonas*. Kromě kultury *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 byly na toxicitu NOP zkoumány také kultury *Pseudomonas aeruginosa* FT1, FT2 a FT4, *Pseudomonas fluorescens* MS1 a *Pseudomonas putida* FR3, a i tyto kultury prokázaly schopnost odolávat koncentraci NOP 1 g.l⁻¹.

Pozornost byla věnována sporulující bakterii *Bacillus subtilis* CCM 2216, která byla použita po dvojí prekultivaci, a to 20 a 72 hodin. Kultura prekultivovaná 72 hodin prokázala velkou schopnost odolávat i vysokým koncentracím NOP oproti kultuře prekultivované jen 20 hodin [18].

5 POTRAVINÁŘSKY VÝZNAMNÉ DRUHY MIKROORGANISMŮ

Práce byla zaměřena na zkoumání účinku NOP vůči běžným zástupcům mléčných bakterií, využívaných v potravinářství, a to především v mlékárenském průmyslu.

5.1 Rod *Lactobacillus*

Laktobacily jsou grampozitivní, chemoorganotrofní, nesporulující, kataláza-negativní mikroorganismy se striktně fermentativním typem metabolismu. Ve vztahu ke kyslíku jsou anaerobní nebo mikroaerofilní, většina laktobacilů je však ke kyslíku značně tolerantní [19,20].

Zkvašují glukózu a laktózu a hlavním produktem této fermentace je kyselina mléčná nebo její směs s kyselinou octovou, ethanolem a oxidem uhličitým. Nacházejí se ve fermentovaných rostlinných i živočišných materiálech a produktech. V hojném množství se vyskytují i v trávicím traktu zvířat a lidí.

Teplotní rozmezí pro růst rodu *Lactobacillus* je široké, kdy se pohybuje od 15°C do 45°C. Termofilní druhy tohoto rodu přežijí i teploty 55°C.

Optimální pH pro rod *Lactobacillus* je 4,5 až 6,4. Hodnoty teplot i pH závisí na druhu mikroorganismu. Laktobacily mohou růst i v prostředí s pH pod 5,0, zejména pokud jsou adaptované na podmínky např. v pivu [21].

Laktobacily jsou poměrně náročné na živiny v kultivačním médiu. Kromě glukózy také vyžadují přítomnost aminokyselin, nukleotidů, peptidů a některých vitamínů.

V potravinářství se laktobacily využívají z toho důvodu, že kyselina mléčná snižuje pH prostředí a tím zamezuje množení hnilobných a patogenních mikroorganismů. V mlékárenském průmyslu se používají hlavně *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei*.

Bakterie rodu *Lactobacillus* se kromě střevního traktu vyskytují i ve volné přírodě a v důsledku toho jsou i častou součástí potravy. Bylo popsáno celkem asi 128 druhů rodu *Lactobacillus*, ze kterých je několik využíváno pro své probiotické vlastnosti [22].

Laktobacily můžeme rozdělit podle toho, jakým způsobem zkvašují glukózu a to na:

- 1) obligátně homofermentativní, kdy je glukóza zkvašována pouze na kyselinu mléčnou (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius*)
- 2) fakultativně heterofermentativní, kdy je glukóza zkvašována na kyselinu mléčnou, kyselinu octovou a na plyn z glukonátu (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*)
- 3) obligátně heterofermentativní, kdy je glukóza zkvašována na kyselinu mléčnou, ethanol a oxid uhličitý. (*L. brevis*, *L. kefir*, *L. fermentum*) [23].

Pro stanovení počtu bakterií rodu *Lactobacillus* se používá diagnostická živná půda MRS (de Man Rogosa Sharpe agar) [24].

5.2 Rod *Lactococcus*

Rod *Lactococcus*, jinak také označován jako mléčná skupina rodu *Streptococcus*, zahrnuje řadu zástupců, jako např. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *hordinae*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus garvieae* a *Lactococcus plantarum*.

Laktokoky jsou grampozitivní bakterie, které se vyskytují v přírodě. Jsou často používány v produkci sýrů. *Lactococcus lactis* kolonizuje jako jeden z prvních střev novorozence, tvoří vitamín K a bakteriociny [25].

Pro kultivaci mléčných koků se používá diagnostická živná půda M17 [24].

5.3 Rod *Streptococcus*

Rod *Streptococcus* patří mezi grampozitivní, fakultativně anaerobní mikroorganismy. Buňky jsou kulaté nebo vejcovité. Vyskytují se v párech nebo řetízkách (dlouhých i krátkých) a většinou jsou nepohyblivé.

Jejich účinek spočívá ve fermentaci sacharidů, a to hlavně na kyselinu mléčnou. Některé druhy rodu *Streptococcus* fermentují i organické kyseliny a aminokyseliny. Nevyznačují se redukcí dusičnanů na dusitany.

Teplotní optimum pro růst rodu *Streptococcus* je 37°C, s výjimkou termofilního poddruhu *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

Rod zahrnuje druhy pro člověka komenzální, oportunně patogenní i patogenní. Saprofytické se vyskytují v přírodě a v potravinách a právě v potravinářském průmyslu

mají významné využití. Některé z těchto druhů jsou však již v současné době zahrnuty do nových rodů *Lactococcus* a *Enterococcus*.

Pro zástupce rodu *Streptococcus* jsou charakteristické vysoké nároky na živiny. Pro svůj růst potřebují kromě glukózy i aminokyseliny, peptidy, pyrimidiny a vitamíny [25].

5.4 Rod *Pediococcus*

Rod *Pediococcus* patří mezi grampozitivní koky. Nesporulující stejnoměrné koky se vyskytují samostatně, v párech nebo ve dvou rovinách s pravými úhly vytvářející tetrády. Tyto tetrády mohou být hůře pozorovatelné a často jsou zaznamenávány pouze páry nebo nepravidelné shluky.

Pediokoky patří mezi fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní a nepohyblivé mikroorganismy. Vyznačují se fermentativním metabolismem, kdy štěpí sacharidy na kyselinu mléčnou. Jsou často schopny produkovat bakteriociny.

Vyskytují se v rostlinném materiálu, mléku, masu a rybách. Používají se při výrobě fermentovaných potravin.

Rod *Pediococcus* roste při pH 4,2 až 8,0 a kultivace probíhá při optimální teplotě kolem 41°C. Ke kultivaci se využívá živné médium M17 [26].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 VÝBĚR MIKROBIÁLNÍCH KULTUR

V bakalářské práci byly k testování použity běžné mikrobiální kultury. Kultury označené CCDM (Culture Collection of Dairy Microorganisms) byly získány ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora® v Praze a uchovávány v mikrobiologické laboratoři Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, Fakulty technologické.

Použité mikrobiální kultury:

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 48

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* CCDM 823

Streptococcus thermophilus CCDM 126

Streptococcus thermophilus CCDM 128

Pediococcus sp. CCDM 396

Lactobacillus rhamnosus CCDM 157

Lactobacillus plantarum CCDM 375

Lactobacillus plantarum CCDM 381

Lactobacillus rhamnosus CCDM 148

7 POUŽITÁ ŽIVNÁ MÉDIA A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

7.1 Chemikálie a živná média

Chemikálie:

1-oktyl-2-pyrrolidon (Sigma Aldrich)

Živná média:

MRS médium (MERCK, Německo)

Složení (na 1 litr vody):

10 g peptonu; 4 g kvasničného extraktu; 8 g masového extraktu; 20 g glukózy; 2 g hydrogenfosforečnanu draselného; 5 g octanu sodného; 2 g citronanu amonného; 0,2 g síranu hořečnatého; 0,05 síranu manganatého; 1 g Tween 80.

Výsledné pH při 25°C je 5,7±0,2.

M17 médium (Hi-Media, Francie)

Složení (na 1 litr vody):

2,5 g hydrolyzát kaseinu, 2,5 g peptonu, 5 g sójového peptonu, 2,5 g kvasničného extraktu, 5 g masového extraktu, 0,5 g kyseliny askorbové, 0,25 g síranu hořečnatého, 5 g laktózy, 19 g glycerofosfátu sodného.

Výsledné pH při 25°C je 7,1±0,1.

7.2 Přístrojové vybavení

Pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací byly použity následující přístroje a vybavení:

Aseptické boxy Telstar BIO-II-A a Thermo – Scientific MSC 1.2; anaerostat SL – shel lab s atmosférou CO₂ s teplotou 30°C, Spektrofotometr Tecan SUNRISE pro 96 jamkové mikrotitrační destičky a běžné laboratorní vybavení pro mikrobiologickou práci.

8 POSTUPY TESTŮ PRO ZJIŠTĚNÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE NOP

Stanovení minimální inhibiční koncentrace 1-oktyl-2-pyrrolidonu vůči laktobacilům a laktokokům bylo provedeno v mikrotitračních destičkách a na pevných živných médiích. Pro testování laktobacilů bylo použito MRS médium a pro laktokoky M17 médium.

8.1 Příprava tekutých médií a pevných médií

Navážka média MRS byla dle návodu rozpuštěna v 1000 ml destilované vody a dokonale promíchána. Poté bylo médium rozplněno po 18 ml do 8 lahviček o objemu 100 ml a sterilováno v autoklávu. Zbylé médium bylo rozplněno po 100 ml do 8 lahví o objemu 250 ml a do každé láhve bylo přidáno 1,8 g agaru. Příprava média M17 probíhala analogicky.

Po sterilizaci byl asepticky přidán sterilní koncentrovaný NOP dle rozpisu uvedeného níže.

Do jednotlivých 18 ml dávek tekutého MRS a M17 bujonu byl asepticky přidán NOP, čímž vznikly níže uvedené koncentrace NOP v mg.l^{-1} :

0 mg.l^{-1} : do 18 ml MRS a M17 bujonu nebyl přidán NOP

50 mg.l^{-1} do 18 ml MRS a M17 bujonu přidáno 1,08 μl NOP

100 mg.l^{-1} do 18 ml MRS a M17 bujonu přidáno 2,17 μl NOP

175 mg.l^{-1} do 18 ml MRS a M17 bujonu přidáno 3,8 μl NOP

250 mg.l^{-1} do 18 ml MRS a M17 bujonu přidáno 5,4 μl NOP

375 mg.l^{-1} do 18 ml MRS a M17 bujonu přidáno 8,1 μl NOP

500 mg.l^{-1} do 18 ml MRS a M17 bujonu přidáno 10,8 μl NOP

750 mg.l^{-1} do 18 ml MRS a M17 bujonu přidáno 16,2 μl NOP

Do agarových MRS a M17 byl rovněž po sterilizaci a ochlazení na 55°C asepticky přidán NOP. Po dokonalém rozmíchání byla každá dávka rozlita na 6 Petriho misek. Vznikly tak koncentrace NOP v mg.l^{-1} :

0 mg.l^{-1} : do 100 ml MRS a M17 agaru nebyl přidán NOP

50 mg.l^{-1} : do 100 ml MRS a M17 agaru přidáno 5,4 μl NOP

100 mg.l^{-1} : do 100 ml MRS a M17 agaru přidáno 10,8 μl NOP

175 mg.l^{-1} : do 100 ml MRS a M17 agaru přidáno 18,9 μl NOP

250 mg.l^{-1} : do 100 ml MRS a M17 agaru přidáno 27 μl NOP

375 mg.l^{-1} : do 100 ml MRS a M17 agaru přidáno 40,5 μl NOP

500 mg.l^{-1} : do 100 ml MRS a M17 agaru přidáno 54 μl NOP

750 mg.l^{-1} : do 100 ml MRS a M17 agaru přidáno 81 μl NOP

9 POSTUPY TESTŮ A SROVNÁNÍ TESTOVÁNÍ V TEKUTÝCH MÉDIÍCH A NA AGAROVÝCH ŽIVNÝCH PŮDÁCH

9.1 Testování v tekutých médiích

Byly připraveny suspenze zkoumaných mikrobiálních kultur ve fyziologickém roztoku s hustotou inokula 2. stupně McFarlandovy stupnice.

Pro každou kulturu byla připravena jedna mikrotitrační destička, kde v řádcích bylo napipetováno 180 μl MRS (M17) bujonu se zvyšující se koncentrací NOP. Do prvních tří sloupců (1, 2, 3) bylo zaočkováno 20 μl suspenze zkoumané kultury a do posledních dvou sloupců (11, 12) suspenze zkoumané kultury zaočkována nebyla. Sloužily jako kontrola sterility, místo inokula byl do jamek dávkován sterilní fyziologický roztok.

Tab. 2. Rozpis koncentrací NOP v bujonu v mg.l^{-1} v mikrotitrační destičce.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0								0	0
B	50	50	50								50	50
C	100	100	100								100	100
D	175	175	175								175	175
E	250	250	250								250	250
F	375	375	375								375	375
G	500	500	500								500	500
H	750	750	750								750	750

Inkubace mikrotitrační destičky probíhala v termostatu při 30°C, 5 dnů, v anaerobních podmínkách. Po ukončení inkubace byla mikrotitrační destička zkontrolována jak vizuálně, tak proměřením v spektrofotometru, kde byla odečtena absorbance při vlnové délce 600 nm. Jako minimální inhibiční koncentrace byla odečtena hodnota nejnižší koncentrace NOP, při které již nedocházelo k růstu mikroorganismu ve všech třech paralelních jamkách.

9.2 Testování na agarových půdách

Každá kultura z připravených suspenzí, které byly použity pro očkování destiček, byly naočkovány sterilní očkovací kličkou na povrch všech MRS a M17 agarů (0 – 750 mg.l⁻¹). Byl proveden roztěr na polovině misky. Misky se inkubovaly společně s mikrotitračními destičkami v termostatu při 30°C, 5 dnů, v anaerobních podmínkách. Jako minimální inhibiční koncentrace byla označena hodnota nejnižší koncentrace NOP, při které již nedocházelo k viditelnému růstu mikroorganismu na živném médiu.

10 VÝSLEDKY ZJIŠTĚNÝCH HODNOT MIC

Stanovení minimální inhibiční koncentrace NOP v tekutém médiu bylo provedeno po proměření růstu kultur spektrofotometrem a po vizuální kontrole (tvorba zákalu), a to tak, že za MIC byla stanovena nejnižší z těch koncentrací, při které růst nenastal. U agarových živných půd byla minimální inhibiční koncentrace NOP stanovena vizuálně (viditelný růst mikroorganismů nenastal).

10.1 Výsledky hodnot MIC zjištěné v tekutém médiu

Tab. 3. Vizuální stanovení MIC u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 48 v mikrotitrační destičce.

											Kontrola sterility	
Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	+	+	+								-	-
50	+	+	+								-	-
100	+	+	+								-	-
175	+	+	+								-	-
250	+	+	+								-	-
375	-	-	-								-	-
500	-	-	-								-	-
750	-	-	-								-	-

+ zákal

- bez zákalu



Obr. 2. Růst kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 48.

Tab. 4. Spektrofotometrické stanovení MIC u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 48 v mikrotitrační destičce.

Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	Absorbance [1]										Kontrola sterility	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	0,478	0,726	0,671								0,106	0,105
50	0,705	0,661	0,733								0,106	0,092
100	0,1	0,382	0,467								0,101	0,112
175	0,5	0,459	0,434								0,102	0,102
250	0,296	0,222	0,366								0,092	0,097
375	0,105	0,098	0,108								0,101	0,111
500	0,1	0,11	0,097								0,099	0,096
750	0,095	0,121	0,1								0,091	0,107

Kultura *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 48 tvořila jemný zákal. Jako MIC byla odečtena hodnota 375 mg.l⁻¹. Vizuální i spektrofotometrické vyhodnocení se shodovalo. Kontrola sterility byla bez růstu.

Tab. 5. Vizuální stanovení MIC u *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 823 v mikrotitrační destičce.

											Kontrola sterility	
Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	+	+	+								-	-
50	+	+	+								-	-
100	+	+	+								-	-
175	+	+	+								-	-
250	-	-	-								-	-
375	-	-	-								-	-
500	-	-	-								-	-
750	-	-	-								-	-

+ zákal - bez zákalu



Obr. 3. Růst kultury *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 823.

Tab. 6. Spektrofotometrické stanovení MIC u *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 823 v mikrotitrační destičce.

Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	Absorbance [1]										Kontrola sterility	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	0,847	0,664	0,772								0,087	0,105
50	0,765	0,573	0,821								0,079	0,102
100	N	0,385	0,461								0,104	0,092
175	0,574	N	N								0,091	0,089
250	0,098	0,093	0,083								0,091	0,123
375	0,102	0,104	0,102								0,101	0,092
500	0,092	0,1	0,097								0,095	0,092
750	0,115	0,111	0,114								0,097	0,088

N – nehodnoceno

Kultura *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 823 tvořila jemný zákal. V jamce 1C, 2D a 3D došlo pravděpodobně ke kontaminaci, neboť charakter zákalu média vůbec neodpovídal ostatním jamkám s rostoucí kulturou, tudíž se hodnoty nebraly v potaz. Kontaminace nám však nijak neovlivnila výsledky. Jako MIC byla odečtena hodnota 250 mg.l⁻¹. Vizuální i spektrofotometrické vyhodnocení se shodovalo. Kontrola sterility byla bez růstu.

Tab. 7. Vizuální stanovení MIC u *Streptococcus thermophilus* CCDM 126 v mikrotitrační destičce.

											Kontrola sterility	
Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	+	+	+								-	-
50	+	+	+								-	-
100	+	+	+								-	-
175	+	+	+								-	-
250	+	+	+								-	-
375	-	-	-								-	-
500	-	-	-								-	-
750	-	-	-								-	-

+ zákal

- bez zákalu

Obr. 4. Růst kultury *Streptococcus thermophilus* CCDM 126.

Tab. 8. Spektrofotometrické stanovení MIC u *Streptococcus thermophilus* CCDM 126 v mikrotitrační destičce.

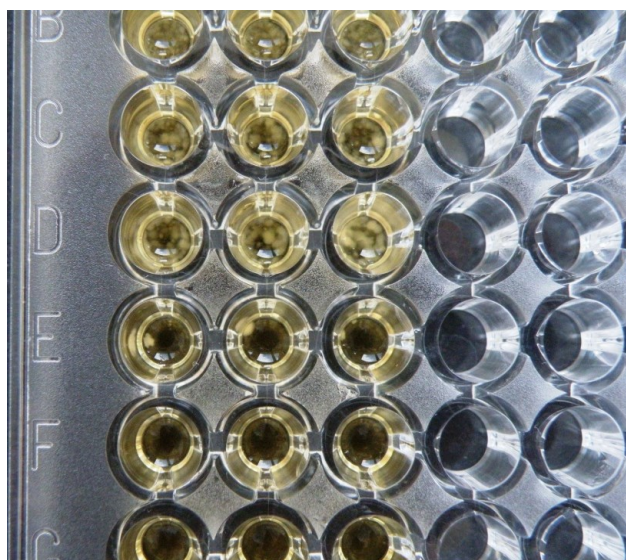
Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	Absorbance [1]										Kontrola sterility	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	1,312	1,516	1,424								0,074	0,092
50	1,421	1,443	1,343								0,087	0,105
100	1,481	1,485	1,594								0,079	0,102
175	1,609	1,268	1,534								0,08	0,097
250	1,43	1,523	1,469								0,092	0,087
375	0,104	0,107	0,105								0,097	0,093
500	0,106	0,099	0,1								0,09	0,083
750	0,098	0,097	0,1								0,096	0,097

Kultura *Streptococcus thermophilus* CCDM 126 tvořila velmi silný zákal a sediment s bílým povlakem na povrchu. Jako MIC byla odečtena hodnota 375 mg.l⁻¹. Vizuální i spektrofotometrické vyhodnocení se shodovalo. Kontrola sterility bez růstu.

Tab. 9. Vizuální stanovení MIC u *Streptococcus thermophilus* CCDM 128 v mikrotitrační destičce.

											Kontrola sterility	
Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	+	+	+								-	-
50	+	+	+								-	-
100	+	+	+								-	-
175	+	+	+								-	-
250	+	+	+								-	-
375	-	-	-								-	-
500	-	-	-								-	-
750	-	-	-								-	-

+ zákal - bez zákalu



Obr. 5. Růst kultury *Streptococcus thermophilus* CCDM 128.

Tab. 10. Spektrofotometrické stanovení MIC u *Streptococcus thermophilus* CCDM 128 v mikrotitrační destičce.

Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	Absorbance [1]										Kontrola sterility	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	0,614	0,654	0,707								0,089	0,077
50	0,639	0,734	0,609								0,095	0,075
100	0,604	0,312	0,352								0,104	0,092
175	0,311	0,511	0,554								0,091	0,089
250	0,094	0,101	0,098								0,091	0,123
375	0,093	0,095	0,091								0,092	0,107
500	0,097	0,101	0,099								0,089	0,084
750	0,096	0,1	0,097								0,09	0,085

Kultura *Streptococcus thermophilus* CCDM 128 tvořila vločkovitý sediment. Jako MIC byla vizuálně odečtena hodnota 375 mg.l⁻¹, ale MIC odečtená pomocí spektrofotometrického vyhodnocení byla 250 mg.l⁻¹. Z vizuálního hodnocení je však jasně vidět, že kultura při koncentraci 250 mg.l⁻¹ sediment tvořila, ale spektrofotometr jej nezaznamenal, díky okrajovému růstu v jamkách řádku E. Za správnou hodnotu MIC je tak nutno považovat 375 mg.l⁻¹. Kontrola sterility bez růstu.

Tab. 11. Vizuální stanovení MIC u *Pediococcus* sp. CCDM 396 v mikrotitrační destičce.

											Kontrola sterility	
Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	+	+	+								-	-
50	+	+	+								-	-
100	+	+	+								-	-
175	+	+	+								-	-
250	+	+	+								-	-
375	+	+	+								-	-
500	-	-	-								-	-
750	-	-	-								-	-

+ zákal

- bez zákalu

Obr. 6. Růst kultury *Pediococcus* sp. CCDM 396.

Tab. 12. Spektrofotometrické stanovení MIC u *Pediococcus* sp. CCDM 396 v mikrotitrační destičce.

Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	Absorbance [1]										Kontrola sterility	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	0,586	0,304	0,314								0,08	0,097
50	0,393	0,33	0,366								0,092	0,087
100	0,279	0,129	0,201								0,097	0,093
175	0,192	0,195	0,14								0,09	0,083
250	0,13	0,094	0,088								0,096	0,097
375	0,117	0,1	0,088								0,077	0,097
500	0,118	0,096	0,087								0,089	0,086
750	0,106	0,11	0,109								0,083	0,073

Kultura *Pediococcus* sp. CCDM 396 tvořila jemný sediment, který byl soustředěn k okraji, pravděpodobně díky mírně nakloněné destičce při kultivaci. Jako MIC při vizuálním stanovení byla odečtena hodnota 500 mg.l⁻¹. Stanovení MIC spektrofotometricky nebylo možné, díky nepřesnému proměření nepravidelného sedimentu. Tudíž bylo upřednostněno vizuální hodnocení. Kontrola sterilita bez růstu.

Tab. 13. Vizuální stanovení MIC u *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 157 v mikrotitrační destičce.

											Kontrola sterility	
Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	+	+	+								-	-
50	+	+	+								-	-
100	+	+	+								-	-
175	+	+	+								-	-
250	+	+	+								-	-
375	+	+	+								-	-
500	+	+	+								-	-
750	+	+	+								-	-

+ zákal

- bez zákalu

Obr. 7. Růst kultury *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 157.

Tab. 14. Spektrofotometrické stanovení MIC u *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 157 v mikrotitrační destičce.

Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	Absorbance [1]										Kontrola sterility	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	1,413	1,434	1,439								0,176	0,19
50	1,419	1,432	1,423								0,089	0,086
100	1,353	1,36	1,348								0,165	0,177
175	1,069	1,141	1,124								0,18	0,17
250	1,06	1,039	1,085								0,165	0,158
375	0,849	0,937	0,801								0,168	0,174
500	0,339	0,336	0,318								0,169	0,166
750	0,425	0,484	0,48								0,169	0,167

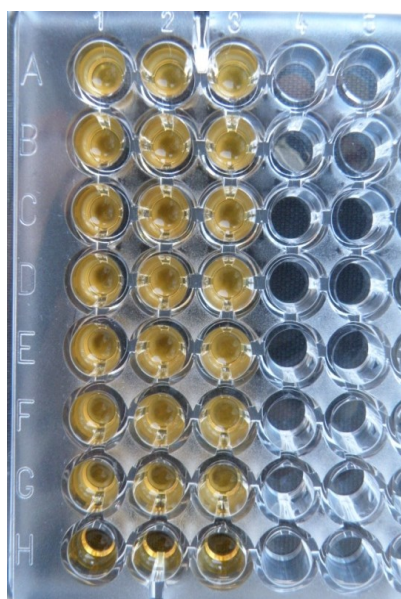
Kultura *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 157 tvořila silný zákal. V rámci testovaných koncentrací nebyla hodnota MIC stanovena, je tedy vyšší než 750 mg.l⁻¹. Od hodnoty 375 mg.l⁻¹ sice docházelo k viditelnému slábnutí intenzity růstu kultury, avšak i při nejvyšší použité koncentraci byly hodnoty zákalu výrazně vyšší než hodnoty kontrol. Kontrola sterility byla bez růstu.

Tab. 15. Vizuální stanovení MIC u *Lactobacillus plantarum* CCDM 375 v mikrotitrační destičce.

											Kontrola sterility	
Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	+	+	+								-	-
50	+	+	+								-	-
100	+	+	+								-	-
175	+	+	+								-	-
250	+	+	+								-	-
375	+	+	+								-	-
500	+	+	+								-	-
750	-	-	-								-	-

+ zákal

- bez zákalu

Obr. 8. Růst kultury *Lactobacillus plantarum* CCDM 375.

Tab. 16. Spektrofotometrické stanovení MIC u *Lactobacillus plantarum* CCDM 375 v mikrotitrační destičce.

Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	Absorbance [1]										Kontrola sterility	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	0,784	0,674	0,681								0,175	0,174
50	0,618	0,707	0,629								0,166	0,165
100	0,657	0,646	0,731								0,175	0,177
175	0,582	0,697	0,665								0,168	0,164
250	0,756	0,628	0,847								0,169	0,169
375	0,784	0,804	0,806								0,167	0,166
500	0,664	0,633	0,748								0,167	0,164
750	0,177	0,184	0,174								0,168	0,168

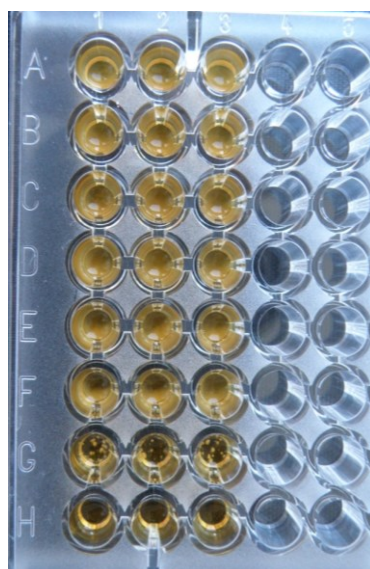
Kultura *Lactobacillus plantarum* CCDM 375 tvořila silný zákal. Jako MIC byla odečtena hodnota 750 mg.l⁻¹. Vizuální i spektrofotometrické vyhodnocení se shodovalo. Kontrola sterility byla bez růstu.

Tab. 17. Vizuální stanovení MIC u *Lactobacillus plantarum* CCDM 381 v mikrotitrační destičce.

											Kontrola sterility	
Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	+	+	+								-	-
50	+	+	+								-	-
100	+	+	+								-	-
175	+	+	+								-	-
250	+	+	+								-	-
375	+	+	+								-	-
500	+	+	+								-	-
750	-	-	-								-	-

+ zákal

- bez zákalu

Obr. 9. Růst kultury *Lactobacillus plantarum* CCDM 381.

Tab. 18. Spektrofotometrické stanovení MIC u *Lactobacillus plantarum* CCDM 381 v mikrotitrační destičce.

Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	Absorbance [1]										Kontrola sterility	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	1,023	0,948	1,158								0,198	0,192
50	1,083	1,08	1,076								0,171	0,165
100	1,053	1,125	0,99								0,179	0,184
175	1,074	1,083	1,008								0,166	0,165
250	0,85	0,9	0,874								0,171	0,169
375	0,528	0,577	0,719								0,17	0,166
500	0,404	0,228	0,333								0,166	0,166
750	0,168	0,193	0,181								0,174	0,168

Kultura *Lactobacillus plantarum* CCDM 381 tvořila zákal. Ovšem v řádku G tvořila vločky. Jako MIC byla odečtena hodnota 750 mg.l⁻¹. Vizuální i spektrofotometrické vyhodnocení se shodovalo. Kontrola sterility byla bez růstu.

Tab. 19. Vizuální stanovení MIC u *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 148 v mikrotitrační destičce.

											Kontrola sterility	
Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	+	+	+								-	-
50	+	+	+								-	-
100	+	+	+								-	-
175	+	+	+								-	-
250	+	+	+								-	-
375	-	-	-								-	-
500	-	-	-								-	-
750	-	-	-								-	-

+ zákal - bez zákalu

Obr. 10. Růst kultury *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 148.

Tab. 20. Spektrofotometrické stanovení MIC u *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 148 v mikrotitrační destičce.

Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]	Absorbance [1]										Kontrola sterility	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	0,991	1,032	1,048								0,193	0,169
50	0,944	0,943	0,971								0,177	0,145
100	1,125	1,016	0,999								0,185	0,188
175	0,552	0,866	0,785								0,126	0,264
250	0,488	0,526	0,626								0,17	0,168
375	0,188	0,203	0,209								0,17	0,162
500	0,191	0,202	0,198								0,165	0,165
750	0,172	0,195	0,176								0,158	0,148

Kultura *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 148 tvořila zákal s drobnými vločkami. Jako MIC byla odečtena hodnota 375 mg.l⁻¹. Vizualní i spektrofotometrické hodnocení se shodovalo. Kontrola sterility byla bez růstu.

10.2 Výsledky zjištěných hodnot MIC na agarových živných půdách

Odečítání růstu mikroorganismů z agarových živných půd probíhalo po anaerobní kultivaci při 30°C, 5 dnů. Byla odečtena minimální inhibiční koncentrace v mg.l⁻¹.

Testování na živném médiu M17:

CCDM 48 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* – MIC 375 mg.l⁻¹

CCDM 823 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* – MIC 250 mg.l⁻¹

CCDM 126 *Streptococcus thermophilus* – MIC 250 mg.l⁻¹

CCDM 128 *Streptococcus thermophilus* – MIC 250 mg.l⁻¹

CCDM 396 *Pediococcus* sp. – MIC 750 mg.l⁻¹

Testování na živném médiu MRS:

CCDM 157 *Lactobacillus rhamnosus* – MIC 500 mg.l⁻¹

CCDM 375 *Lactobacillus plantarum* – MIC 375 mg.l⁻¹

CCDM 381 *Lactobacillus plantarum* – MIC 500 mg.l⁻¹

CCDM 148 *Lactobacillus rhamnosus* – MIC 250 mg.l⁻¹

11 VÝSLEDKY SROVNÁNÍ TESTOVÁNÍ V TEKUTÝCH MÉDIÍCH A NA AGAROVÝCH ŽIVNÝCH PŮDÁCH

Tab. 21. Srovnání hodnot MIC v tekutém médiu a na agarech

Mikrobiální kultura	Koncentrace NOP [mg.l ⁻¹]		
	Tekuté médium		Agarová živná půda
	MIC	MBC	MIC
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 48	375	375	375
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 823	250	250	250
<i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 126	375	375	250
<i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 128	375	375	250
<i>Pediococcus</i> sp. CCDM 396	500	500	750
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 157	>750	>750	500
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 375	750	750	375
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 381	750	750	500
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 148	375	375	250

Ze srovnání výsledků v tabulce (Tab. 21.) je zřejmé, že koncentrace NOP, potřebná k inhibici růstu mikrobiální kultury byla v tekutém médiu (až na kulturu *Pediococcus* sp. CCDM 396) vždy větší nebo stejná než na agarové živné půdě. Obecně platí, že pro růst

mikrobiálních kultur je tekuté médium vhodnější než agarová půda, neboť u tekutých půd mají mikroorganismy velmi vhodné podmínky pro svůj růst (dostupnost živin, možnost pohybu, difúze odpadních produktů metabolismu apod.). U agarových půd navíc dochází po čase k částečnému vysychání média, a tím i ke zmenšování objemu a tedy i ke změně podmínek. Na základě této úvahy se proto jeví správnější brát jako směrodatné výsledky, získané testováním v tekutých médiích.

K posouzení účinnosti NOP vůči konkrétním kulturám je možné uvést, že nejcitlivější k NOP byla kultura *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 823, u níž byla zjištěna hodnota MIC 250 mg.l⁻¹. Naopak, nejméně citlivá k NOP byla kultura *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 157, pro niž byla hodnota MIC větší než 750 mg.l⁻¹. Kromě kultury *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 157 prokázaly zvýšenou odolnost vůči NOP i *Lactobacillus plantarum* CCDM 375 a *Lactobacillus plantarum* CCDM 381, pro které dosáhla MIC hodnoty 750 mg.l⁻¹.

Zároveň s MIC byla zjišťována i minimální baktericidní koncentrace (MBC), kdy se ve všech případech ukázalo, že hodnoty MIC jsou zároveň i hodnotami MBC. Pro stanovení MBC byly použity ty jamky mikrotitračních destiček, které po kultivaci nevykazovaly růst mikrobiální kultury. Tyto jamky byly sterilní kličkou důkladně promíchány a vyočkovány na příslušné živné médium MRS nebo M17. Petriho misky byly poté kultivovány za stejných podmínek jako mikrotitrační destičky. Jako MBC byla stanovena nejnižší hodnota koncentrace NOP, při které nedošlo k růstu příslušné kultury na živném médiu. Výsledky stanovení MBC tedy ukázaly, že NOP je v určité koncentraci schopen nejen zastavit růst testovacích kultur, ale že je vůči nim baktericidní.

ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce jsem se zabývala protimikrobními účinky NOP vůči potravinářsky významným druhům mikroorganismů a to především vůči běžným zástupcům mléčných bakterií, využívaných v potravinářství, hlavně v mlékárenském průmyslu. Zaměřila jsem se na testování těchto kultur, jelikož se testy na tuto skupiny mikroorganismů dosud nezaměřovaly.

Vůči zástupcům mléčných bakterií byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace NOP metodou sledování růstu v tekutých médiích a na agarových živných půdách.

NOP jasně prokázal protimikrobní vlastnosti vůči testovaným kulturám. Koncentrace NOP, potřebné k inhibici růstu mikrobiálních kultur, byly v tekutém médiu (až na kulturu *Pediococcus* sp. CCDM 396) vždy větší nebo stejné než na agarové živné půdě.

Nejcitlivější k NOP byla kultura *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 823, u níž byla zjištěna hodnota MIC 250 mg.l⁻¹. Naopak, nejméně citlivá k NOP byla kultura *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 157, pro niž byla hodnota MIC větší než 750 mg.l⁻¹. Kromě kultury *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 157 prokázaly zvýšenou odolnost vůči NOP i *Lactobacillus plantarum* CCDM 375 a *Lactobacillus plantarum* CCDM 381, pro které dosáhla MIC hodnoty 750 mg.l⁻¹.

Zároveň s MIC byla zjišťována i minimální baktericidní koncentrace (MBC), kdy se ve všech případech ukázalo, že hodnoty MIC jsou zároveň i hodnotami MBC. Pro stanovení MBC byly použity ty jamky mikrotitračních destiček, které po kultivaci nevykazovaly růst mikrobiální kultury. Výsledky stanovení MBC tedy ukázaly, že NOP je v určité koncentraci schopen nejen zastavit růst testovacích kultur, ale že je vůči nim baktericidní.

Můžeme tvrdit, že by se NOP díky svým chemickým vlastnostem a protimikrobním účinkům, mohl využívat jako mírný dezinfekční prostředek v potravinářském průmyslu. Ovšem jak se ukázalo z dřívějších testů, tak vysokou schopnost odolávat NOP mají bakterie rodu *Pseudomonas*, tudíž by tento rod v prostředí setrval i po dezinfekčním zákroku a muselo by se to brát v potaz. NOP by mohl být i účinnější v kombinaci s jinými látkami, což by bylo potřeba dále důkladně otestovat.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SIGMA-ALDRICH: *Bezpečnostní list.: 1-octyl-2-pyrrolidone* [online]. 2015 [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=332186&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F332186%3Flang%3Den>
- [2] SCRIBD: *Performance & Industrial Chemicals Reference Guide.: Pyrrolidones* [online]. 2005 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <https://www.scribd.com/document/297601625/Performance-Chemicals-Guide>
- [3] BASF THE CHEMICAL COMPANY, 2013. *Safety Data Sheet.* [N-Octyl-2-pyrrolidone dist.] In: *BASF CORPORATION* [online]. 11. 02. 2013, verze 1.0 [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA/Catalog/ChemicalsNAFTA/doc4/BASF/PRD/30036600/.pdf?title=&asset_type=msds/pdf&language=EN&validArea=US&urn=urn:documentum:ProductBase_EU:09007af8800937b1.pdf
- [4] ASHLAND: *Chemical intermediates and solvents* [online]. [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.ashland.com/search?q=pyrrolidone>
- [5] LOGIN, R.B., 1995. *Pyrrolidone-based surfactants* (a literature review). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 759-771.
- [6] Výkladový terminologický slovník některých pojmů používaných v analýze a hodnocení rizik pro účely zákona o prevenci závažných havárií [online]. Praha: Výzkumný ústav bezpečnosti práce, 2005. 55 s. Dostupný z WWW: http://www.vubp.cz/html_oppzh/metodiky/vykladovy_slovník_brezen05.pdf.
- [7] ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY: *Rules and Regulation.: N-(n-octyl)-2-pyrrolidone; Exemption From the Requirement of a Tolerance* [online]. 2014 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: https://www.regulations.gov/document?D=EPA_FRDOC_0001-15305
- [8] CHEMICALLAND 21: *N-octylpyrrolidone* [online]. [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.chemicalland21.com/industrialchem/IUH/N-OCTYL%20PYRROLIDONE.htm>
- [9] GU, B., BLIZNIK, K., SINGER, H., WARD, S., 1991. US Patent No. 5,035,859.

- [10] NARAYANAN, K.S., CHAUDHURI, R.K., 1990. *N-alkyl pyrrolidone requirement for stable water based microemulsions*. In: Chasin, D.G., Borde, L.N. (Eds.), *Pesticide formulation and application systems*. American Society for Testing Materials, Philadelphia, pp. 85-104.
- [11] NARAYANAN, K.S., JON, D., PRETTYPAUL, D., 2000. US Patent No. 6,033,681.
- [12] KAYTAN, H., BONNET, M., 2008. *N-alkyl pyrrolidones as innovative PVC plasticisers*. *Plast. Rubber Compos.*, 37, 411-416.
- [13] BALOWS, A. *Manual of clinical microbiology*. 5th ed. /. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, c1991. ISBN 1555810292.
- [14] KABRA, B.P., 2008. US Patent application publication No. 2008/0095863 A1.
- [15] HOLLIS, C.H., RAYUDU, S.R., WHITTEMORE, M.S., 1993. US Patent No. 5,250,194
- [16] DEMBERELNYAMBA, D., KIM, K.S., CHOI, S., PARK, S.Y., et al., 2004. *Synthesis and antimicrobial properties of imidazolium and pyrrolidinium salts*. *Bioorgan. Med. Chem.*, 12, 853–857.
- [17] SAURAV, K., KANNABIRAN, K., 2012. *In vitro activity of 5-(2,4-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one extracted from marine Streptomyces VITSVK5 spp. against fungal and bacterial human pathogens*. *Rev. Iberoamer. Micol.*, 29, 29-33.
- [18] SALAČ, J. *Protibakteriální účinky fenoxoethanolu a 1-oktyl-2-pyrrolidonu*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2015, 107s. (120 988 znaků). Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/33529>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Růžička, Jan.
- [19] MATOULKOVÁ, D., KUBIZNIAKOVÁ P. *Mikrobiologie pivovarské výroby: Bakterie mléčného kvašení a kultivační metody pro jejich detekci – I. část. Kvasný průmysl* [online]. Lípová 15, 120 44 Praha: Mikrobiologické oddělení, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2015 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://kvasnyprumysl.cz/pdfs/kpr/2015/03/03.pdf>.
- [20] BACK, W., 2005: *Brewery*. In: Back W. (Ed.), *Colour atlas and handbook of beverage biology*. Verlag Hans Carl, Nürnberg, Germany, pp. 10–112.

- [21] SUZUKI, K., 2011: 125th *Anniversary Review: Microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria*. J. Inst. Brew. 117: 131– 155. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00454.x.
- [22] KREJSEK, J., KUNDLOVÁ, M., KOLÁČKOVÁ, M. *Nutrice, probiotika a imunitní systém II. část: Nutrice, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita. Pediatrie pro praxi*, 2007, roč. 8, č. 3, s. 126-127
- [23] BEIJERINCK, M.W, 1901, *Über oligonitrophile Mikroben, Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung II, Vol 7*, pp. 561–582
- [24] SPOLEČNOST MILCOM a.s. - *Závod Tábor: Živné půdy k mikrobiologickým rozborům* [online]. [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.milcom-as.cz/zavod-tabor/produkty/zivne-pudy.html>
- [25] GÖRNER, F., VALÍK, Ľ. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Bratislava: Malé centrum 2004, s. 133-135, 225-262, ISBN 80-967064-9-7)
- [26] MINIATLAS MIKROORGANISMŮ: *Rod Pediococcus* [online]. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/ped.htm>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
NOP	N-oktylpyrrolidon
LD ₅₀	Střední letální dávka
CCDM	Culture Collection of Dairy Microorganism
MRS	Živná půda de Man Rogosa Sharpe
PVC	Polyvinylchlorid
nm	Nanometr
mg.l ⁻¹	Miligram na litr
°C	Stupeň Celsia
mg.kg ⁻¹	Miligram na kilogram
g.l ⁻¹	Gram na litr
ml	Mililitr
l	Litr
μl	Mikrolitr
g	Gram

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Chemická struktura N-oktylpyrrolidonu.	12
Obr. 2. Růst kultury <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 48.....	29
Obr. 3. Růst kultury <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 823.....	31
Obr. 4. Růst kultury <i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 126.	33
Obr. 5. Růst kultury <i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 128.	35
Obr. 6. Růst kultury <i>Pediococcus</i> sp. CCDM 396.....	37
Obr. 7. Růst kultury <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 157.	39
Obr. 8. Růst kultury <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 375.	41
Obr. 9. Růst kultury <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 381.	43
Obr. 10. Růst kultury <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 148.	45

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Tabulka stanovených hodnot MIC a MBC vůči testovaným kulturám.	16
Tab. 2. Rozpis koncentrací NOP v bujonu v mg.l ⁻¹ v mikrotitrační destičce.	26
Tab. 3. Vizualní stanovení MIC u <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 48 v mikrotitrační destičce.	28
Tab. 4. Spektrofotometrické stanovení MIC u <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 48 v mikrotitrační destičce.	30
Tab. 5. Vizualní stanovení MIC u <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 823 v mikrotitrační destičce.	31
Tab. 6. Spektrofotometrické stanovení MIC u <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 823 v mikrotitrační destičce.	32
Tab. 7. Vizualní stanovení MIC u <i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 126 v mikrotitrační destičce.	33
Tab. 8. Spektrofotometrické stanovení MIC u <i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 126 v mikrotitrační destičce.	34
Tab. 9. Vizualní stanovení MIC u <i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 128 v mikrotitrační destičce.	35
Tab. 10. Spektrofotometrické stanovení MIC u <i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 128 v mikrotitrační destičce.	36
Tab. 11. Vizualní stanovení MIC u <i>Pediococcus</i> sp. CCDM 396 v mikrotitrační destičce.	37
Tab. 12. Spektrofotometrické stanovení MIC u <i>Pediococcus</i> sp. CCDM 396 v mikrotitrační destičce.	38
Tab. 13. Vizualní stanovení MIC u <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 157 v mikrotitrační destičce.	39
Tab. 14. Spektrofotometrické stanovení MIC u <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 157 v mikrotitrační destičce.	40
Tab. 15. Vizualní stanovení MIC u <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 375 v mikrotitrační destičce.	41
Tab. 16. Spektrofotometrické stanovení MIC u <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 375 v mikrotitrační destičce.	42
Tab. 17. Vizualní stanovení MIC u <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 381 v mikrotitrační destičce.	43

Tab. 18. Spektrofotometrické stanovení MIC u <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 381 v mikrotitrační destičce.	44
Tab. 19. Vizuální stanovení MIC u <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 148 v mikrotitrační destičce.	45
Tab. 20. Spektrofotometrické stanovení MIC u <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 148 v mikrotitrační destičce.	46
Tab. 21. Srovnání hodnot MIC v tekutém médiu a na agarech	48