

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**Inhibiční účinky přírodních látek**  
**na *Mycoplasma hominis***

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**AUTOR PRÁCE: Bc. Alexandra Jantovská**

**VEDOUCÍ PRÁCE: Mgr. Markéta Vydržalová, Ph.D.**

**2009**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra biologických a biochemických věd  
Akademický rok: 2008/2009

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Alexandra JANTOVSKÁ**

Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**

Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: **Inhibiční účinky přírodních látek na Mycoplasma hominis**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracování literární rešerše zaměřené na Mycoplasma hominis a metody testování citlivosti.
2. Zpracování veškerých dostupných informací ke zvoleným přírodním látkám.
3. Zavedení diluční zkumavkové metody pro stanovení minimální inhibiční koncentrace přírodních látek u kmenů Mycoplasma hominis.
4. Vyhodnocení výsledků a porovnání s publikovanými údaji.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**podle pokynu vedoucího diplomové práce**

Vedoucí diplomové práce:

**Mgr. Markéta Vydržalová, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

**1. října 2008**

Termín odevzdání diplomové práce:

**7. května 2009**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice

V Pardubicích dne 30. dubna 2009

Bc. Alexandra Jantovská

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Markétě Vydržalové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce. Zároveň děkuji za pomoc a ochotu se kterou se mi věnovala.

Dále mé poděkování patří Doc. RNDr. L. Opletalovi, CSc. z Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za poskytnutí testovaných přírodních látek.

## SOUHRN

Cílem práce bylo zjištění nejnižší koncentrace přírodních látek, která je schopna inhibovat růst vybraných kmenů *Mycoplasma hominis*. Určení minimální inhibiční koncentrace jsme prováděli zkumavkovou diluční metodou v PPLO bujónu. Pro potvrzení růstu *Mycoplasma hominis* jsme jednotlivé kmeny kultivovali na PPLO agaru.

Testovali jsme 10 kmenů *Mycoplasma hominis*, které byly vykultivovány ze stěrů krčku děložního žen.

Z přírodních látek jsme testovali: karvakrol, thymol, arbutin, tea tree oil, katechin hydrát, limonen, hydrochinon monomethylether, *p*-cymen, methylgallát, ethylgallát, *Lavandulae aetheroleum*, *Rosmarini aetheroleum*, *Carvi aetheroleum*, *Eucalypti aetheroleum* a *Foeniculi aetheroleum*. Látky jsme rozpouštěli v 96% nebo 24% ethanolu nebo 2,5% dimethylsulfoxidu, popř. jsme použili kombinaci obou rozpouštědel. U látek vytvářejících emulze jsme zvolili postup přímého pipetování čistých přírodních látek do jednotlivých zkumavek. Bylo nutné zjistit zda jsou mykoplazmata rezistentní vůči výsledným koncentracím rozpouštědel, proto jsme stanovili taktéž inhibiční koncentraci ethanolu a dimethylsulfoxidu.

Nejnižší inhibiční koncentrace jsme zaznamenali u karvakrolu, bakteriální kmeny inhiboval při koncentraci 300 µg/ml při rozpouštění v 24% ethanolu a 59,2-236,7 µg/ml při rozpouštění v PPLO bujónu. Výsledky byly ovlivněny rozpustností přírodních látek v použitých rozpouštědlech.

Klíčová slova: *Mycoplasma hominis*, přírodní látky, zkumavková diluční metoda, minimální inhibiční koncentrace

## SUMMARY

The aim of this study was to determine the lowest concentration of natural substances inhibiting the growth of selected strains of *Mycoplasma hominis*. The minimum inhibitory concentration was determined by the tube dilution method in PPLO broth. For confirmation of growth we cultivated strains of *Mycoplasma hominis* on PPLO agar.

We tested ten strains of *Mycoplasma hominis*, which were isolated from female genital tract.

The following natural substances we tested: carvacrol, thymol, arbutin, tea tree oil, catechin hydrate, limonene, hydroquinone monomethylether, *p*-cymene, methylgallate, ethylgallate, *Lavandulae aetheroleum*, *Rosmarini aetheroleum*, *Carvi aetheroleum*, *Eucalypti aetheroleum* and *Foeniculi aetheroleum*. We dissolved substances in 96% or 24% ethanol or in 2.5% dimethylsulfoxid, eventually we used combination of these solvents. Natural substances which formed emulsions were added straight to each tube. It was necessary to find if mycoplasmas are resistant to used concentration of the solvents. We determined inhibitory concentration of ethanol and dimethylsulfoxid too.

The lowest inhibitory concentration was found for carvacrol. Bacterial strains were inhibited concentration 300 µg/ml after dissolving in 24% ethanol and 59.2-236.7 µg/ml after dissolving in PPLO broth. The results were affected by solubility of natural substances in used solvents.

Keywords: *Mycoplasma hominis*, natural substances, tube dilution method, minimum inhibitory concentration

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATB	antibiotikum
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Can.</i>	<i>Candida</i>
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
č. š.	číslo šarže
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ELISA	enzymová imunoanalýza (enzyme-linked immunosorbent assay)
<i>Euc.</i>	<i>Eucalyptus</i>
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
<i>H.</i>	<i>Helicobacter</i>
HCl	kyselina chlorovodíková
HPLC-APCI-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí s chemickou ionizací za atmosférického tlaku
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>My.</i>	<i>Mycobacterium</i>
NaOH	hydroxid sodný
NH <sub>3</sub>	amoniak
<i>Ori.</i>	<i>Origanum</i>
<i>P.</i>	<i>Paeonia</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce



PID	zánětlivé onemocnění pávne (pelvic inflammatory disease)
PPLO	pleuropneumonii podobné organismy (pleuro-pneumonia like organismus)
<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i>
RNA	ribonukleová kyselina
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Sal.</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Sat.</i>	<i>Satureja</i>
sp.	species
ssp.	subspecies
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>T.</i>	<i>Thymus</i>

# OBSAH

<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>- 12 -</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>- 13 -</b>
<b>2.1 VÝZNAM A ZÍSKÁVÁNÍ PŘÍRODNÍCH LÁTEK.....</b>	<b>- 13 -</b>
<b>2.2 VYBRANÉ SKUPINY PŘÍRODNÍCH LÁTEK .....</b>	<b>- 14 -</b>
2.2.1 Fenoly a polyfenoly .....	- 14 -
2.2.1.1 Jednoduché fenoly a fenolové kyseliny .....	- 14 -
2.2.1.2 Chinony.....	- 14 -
2.2.1.3 Flavonoidy .....	- 14 -
2.2.1.4 Třísloviny.....	- 14 -
2.2.2 Terpeny .....	- 15 -
2.2.3 Glykosidy.....	- 15 -
2.2.4 Alkaloidy .....	- 15 -
2.2.5 Silice .....	- 15 -
<b>2.3 CHARAKTERISTIKA TESTOVANÝCH PŘÍRODNÍCH LÁTEK- 17 -</b>	
2.3.1 Thymol.....	- 17 -
2.3.2 Karvakrol .....	- 18 -
2.3.3 <i>p</i> -cymen .....	- 19 -
2.3.4 Arbutin.....	- 20 -
2.3.5 Katechin hydrát.....	- 21 -
2.3.6 Hydrochinon monomethylether .....	- 22 -
2.3.7 Methylgallát .....	- 23 -
2.3.8 Ethylgallát.....	- 24 -
2.3.9 <i>Melaleuceae aetheroleum</i> (tea tree oil) .....	- 24 -
2.3.10 <i>Rosmarini aetheroleum</i> (rozmarýnová silice).....	- 25 -
2.3.11 <i>Eucalypti aetheroleum</i> (eukalyptová silice) .....	- 26 -
2.3.12 <i>Lavandulae aetheroleum</i> (levandulová silice).....	- 26 -
2.3.13 <i>Carvi aetheroleum</i> (kmínová silice) .....	- 27 -
2.3.13.1 Limonen .....	- 27 -
2.3.14 <i>Foeniculi aetheroleum</i> (fenyklová silice).....	- 28 -

<b>2.4</b>	<b>METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI MIKROORGANISMŮ K ANTIMIKROBIÁLNÍM LÁTKÁM</b> .....	<b>29 -</b>
2.4.1	Kvalitativní metody .....	29 -
2.4.1.1	Disková difúzní metoda .....	29 -
2.4.1.2	Agarová difúzní metoda.....	30 -
2.4.2	Kvantitativní metody .....	30 -
2.4.2.1	Bujónová diluční metoda .....	30 -
2.4.2.2	Agarová diluční metoda.....	31 -
<b>2.5</b>	<b>MYCOPLASMA HOMINIS</b> .....	<b>32 -</b>
2.5.1	Charakterizace rodu <i>Mycoplasma</i> .....	32 -
2.5.2	Ultrastruktura buněk <i>Mycoplasma hominis</i> .....	32 -
2.5.3	Adheze na hostitelské buňky .....	33 -
2.5.4	Výskyt <i>Mycoplasma hominis</i> v genitálním ústrojí .....	33 -
2.5.5	Onemocnění vyvolaná <i>Mycoplasma hominis</i> .....	34 -
2.5.6	Citlivost k antimikrobiálním látkám .....	35 -
2.5.7	Kultivace .....	35 -
2.5.8	Detekce a identifikace.....	36 -
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>37 -</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIÁL</b> .....	<b>37 -</b>
3.1.1	Bakteriální kmeny .....	37 -
3.1.2	Přírodní látky .....	37 -
3.1.3	Kultivační média.....	38 -
3.1.4	Složky pro přípravu kultivačním médií .....	39 -
3.1.5	Přístroje a pomůcky .....	40 -
<b>3.2</b>	<b>PRACOVNÍ POSTUP</b> .....	<b>41 -</b>
3.2.1	Testované kmeny <i>M. hominis</i> .....	41 -
3.2.2	Ředění přírodních látek.....	41 -
3.2.3	Zkumavková diluční metoda .....	41 -
3.2.4	Zkumavková diluční metoda – přímé pipetování přírodní látky .....	42 -
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>43 -</b>

4.1 ÚČINNÉ KONCENTRACE PŘÍRODNÍCH LÁTEK NA KMENY <i>MYCOPLASMA HOMINIS</i> .....	- 43 -
5 DISKUSE A ZÁVĚR.....	- 55 -
PŘÍLOHA.....	- 62 -
SEZNAM LITERATURY.....	- 64 -

# 1 ÚVOD

*Mycoplasma hominis* je mikroorganismus vyskytující se v urogenitálním traktu mužů i žen. Může být součástí běžné genitální mikroflóry nebo se podílí na vzniku různých onemocnění genitálního traktu. *Mycoplasma hominis* je nejčastěji spojováno s bakteriální vaginózou. Bývá izolováno také při endometritidách, salpingitidách a z krve při horečkách po porodu nebo potratu. U mužů bývá dáváno do souvislosti s uretritidou, epididimitidou a chronickou prostatitidou. Vzhledem k objevující se rezistenci *Mycoplasma hominis* na antibakteriální léčiva by bylo vhodné využít antibakteriálního účinku přírodních látek.

Biologická aktivita přírodních látek je častým předmětem zkoumání v mnoha laboratořích. Některé rostlinné extrakty nebo jejich složky mají prokázané antimikrobiální účinky. Přírodní látky by bylo možné využít k léčebným účelům jako náhradu antibiotik, případně využít jejich vzájemnou kombinaci. Látky přírodního původu jsou pro organismus mnohem menší zátěží, jsou méně toxické a snadněji se odbourávají.

Kromě antimikrobiálních účinků mohou mít i účinky antioxidační, protizánětlivé nebo antikancerózní.

Další uplatnění nacházejí jako konzervační prostředky ve farmaceutickém průmyslu, jako aditiva v potravinářském průmyslu a v neposlední řadě se využívají v průmyslu kosmetickém.

Jsou obsaženy v mnoha běžně se vyskytujících rostlinách, jsou izolovány a identifikovány moderními analytickými metodami.

Cílem diplomové práce je zjištění antimikrobiálních účinků vybraných přírodních látek na kmeny bakterie *Mycoplasma hominis*.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 VÝZNAM A ZÍSKÁVÁNÍ PŘÍRODNÍCH LÁTEK

Přírodní látky mají potenciální biologický účinek, nejen antibiotický, antikarcinogenní, ale i tlumivý účinek proti stresu. Používají se také v potravinách jako přírodní antioxidanty (Hong a kol., 2004).

Rostliny mají prakticky neomezenou možnost syntetizovat aromatické látky. Většina z těchto látek jsou fenoly nebo jejich deriváty. Často se jedná o sekundární metabolity. V mnoha případech tyto látky slouží rostlině jako obranný mechanismus proti útoku mikroorganismů, hmyzu a býložravců (Cowan, 1999.)

Rostlinné oleje jsou směsí mnoha látek. Jedná se hlavně o terpeny, zejména monoterpeny a seskviterpeny. Dále se mohou vyskytovat nízkomolekulární alifatické uhlovodíky (lineární, rozvětvené, nasycené a nenasycené), kyseliny, alkoholy, aldehydy, acyklické estery nebo laktony, sloučeniny obsahující atomy dusíku nebo síry, kumariny a homology fenylpropanoidu (Dorman a Deans, 2000).

Přírodní látky jsou izolovány z nedřevnatých částí rostlin nejčastěji destilačními metodami, obvykle se jedná o destilaci s vodní parou (Dorman a Deans, 2000). Dalším způsobem izolace je methanolová či ethanolová extrakce (Cowan, 1999).

Pro analyzování jednotlivých složek nebo celých směsí se používají metody chromatografické (plynová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie), hmotnostní spektrometrie, tandemová hmotnostní spektrometrie, kapilární zónová elektroforéza, nukleární magnetická rezonance nebo rentgenová krystalografie (Cowan, 1999).

## 2.2 VYBRANÉ SKUPINY PŘÍRODNÍCH LÁTEK

### 2.2.1 Fenoly a polyfenoly

#### 2.2.1.1 Jednoduché fenoly a fenolové kyseliny

Tyto látky mají substituovaný fenolický kruh. Mezi tyto látky patří např. kyselina kávová, katechol nebo pyrogallol. Bylo prokázáno, že s rostoucím počtem hydroxylových skupin roste toxicita. Fenolové kyseliny způsobují narušení cytoplazmatické membrány (Cowan, 1999).

#### 2.2.1.2 Chinony

Jedná se o fenolické látky obsahující 2 karbonylové skupiny. V přírodě se vyskytují zcela běžně, jsou barevné. Vytváří irreverzibilní komplex s nukleofilními aminokyselinami v proteinech. (Cowan, 1999).

#### 2.2.1.3 Flavonoidy

Jsou to deriváty fenylchromanu a odvozují se od 3 základních skeletů: flavan, isoflavan, neoflavan. Lze je nalézt pouze v rostlinné říši (Moravcová, 2006). Aktivita pravděpodobně spočívá ve schopnosti vytvářet komplexy s extracelulárními proteiny, mohou se také vázat na bakteriální buněčnou stěnu (Cowan, 1999).

#### 2.2.1.4 Třísloviny

Jedná se o polymerické fenolické sloučeniny. Existují 2 typy: hydrolyzovatelné a nehydrolyzovatelné. Cílovou strukturou v mikrobiálních buňkách jsou povrchové adheziny, polypeptidy buněčné stěny a membránově vázané enzymy (Cowan, 1999).

### 2.2.2 Terpeny

Základní chemická struktura je  $C_{10}H_{16}$ . Vyskytují se také jako diterpeny ( $C_{20}$ ), triterpeny ( $C_{30}$ ), tetraterpeny ( $C_{40}$ ), hemiterpeny ( $C_5$ ) a seskviterpeny ( $C_{15}$ ). Pokud tyto látky ve své molekule obsahují kyslík, nazývají se terpenoidy. Jsou účinné proti bakteriím a prvokům. Mechanismus účinku není dosud zcela objasněn, ale předpokládá se, že lipofilními součástmi porušují cytoplasmatickou membránu (Cowan, 1999).

### 2.2.3 Glykosidy

Glykosidy jsou deriváty sacharidů, u nichž je hydroxylová skupina v poloze 1 pyranosového nebo furanosového kruhu nahrazena zbytkem necukerné molekuly, tzv. aglykonem nebo geninem. Glykosidy jsou hojně rozšířené v celé rostlinné říši. Pro rostlinu má tvorba glykosidů pravděpodobně význam detoxikačního mechanismu (Moravcová, 2006).

### 2.2.4 Alkaloidy

Jedná se o heterocyklické dusíkaté sloučeniny (Cowan, 1999). Jsou lipofilní, ve vodě špatně rozpustné, většinou pevné a bezbarvé. Jsou obsaženy v různých částech rostlin, jejich obsah se mění zevními vlivy působícími na rostlinu (Moravcová, 2006). Antibakteriální účinky jsou předpokládány u vysoce aromatických planárních kvartérních alkaloidů jako je např. berberin, který je schopen se vmezeřit do bakteriální DNA (Cowan, 1999).

### 2.2.5 Silice

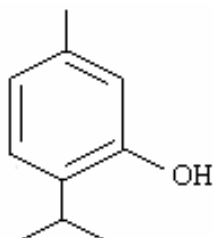
Silicí nazýváme komplex vonných a těkavých přírodních sloučenin přítomných v rostlinách, který je lipofilní, olejovitý a zpravidla ve vodě nerozpustný. Za normální teploty bývají tekuté konzistence. Jsou v nich zastoupeny sloučeniny snad všech chemických skupin, zejména nízkomolekulární a bez vazby na cukry.



V silicích většinou převládá obsah jednoho typu sloučenin (např. terpenické uhlovodíky), případ, že dominantní je jen jediná sloučenina, je vzácný (Moravcová, 2006). Mají antimikrobiální a antiinvazivní aktivitu (Opletal a Šimerda, 2005). Silice mohou inhibovat syntézu DNA, RNA, proteinů a polysacharidů v buňkách hub a bakterií. Např. tea tree oil denaturuje membránové proteiny, což má za následek prasknutí vnější membrány, dochází k úniku draselných iontů, inhibici buněčného dýchání a lýzi buňky (Kalemba a Kunicka, 2003.).

## 2.3 CHARAKTERISTIKA TESTOVANÝCH PŘÍRODNÍCH LÁTEK

### 2.3.1 Thymol



Sumární vzorec:  $C_{10}H_{14}O$

Molekulová hmotnost:  $150,22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**Obrázek 1** : strukturní vzorec thymolu

Synonyma: 2-isopropyl-5-methylfenol

5-methyl-2-isopropylfenol

5-methyl-2-(1-methylethyl)-fenol

(<http://sigmaaldrich.com>)

Thymol tvoří bezbarvé krystalky, je velmi těžce rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v 96% ethanolu a v etheru, snadno rozpustný v silicích a olejích, mírně rozpustný v glycerolu. Rozpouští se také ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů (Český lékopis, 3.díl, 1997). Jedná se o fenolický monoterpen získávaný přírodně z tymiánového oleje (nebo z jiných těkavých olejů). Je přítomen v řadě silic, jedná se zejména o silice získávané z rostlin rodů *Thymus* (tymián, mateřídouška) *Origanum* (dobromysl) a *Ocimum* (bazalka). Vyrábí se také synteticky. Je používán jako stabilizátor ve farmaceutickém průmyslu a má antiseptické, antibakteriální a antifungální účinky (<http://chemicalland21.com/lifescience/phar/THYMOL.htm>, staženo 21. 11. 2008; Opletal a Šimerda, 2005).

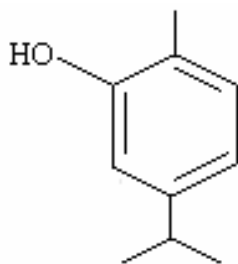
Hanbali a kol. (2005) provedli analýzu esenciálního oleje z kořene *Pulicaria odora* (blešník vonný) a identifikovali v něm 27 komponent. Thymol tvořil 47,83 %. Pomocí GC a GC-MS Angelini a kol. (2003) analyzovali silice získané z rozmarýnu, tymiánu a saturejky. Určili, že hlavní složkou *Thymus (T.) vulgaris*

(mateřídouška obecná) je thymol (44 %). Alma a kol. (2003) pomocí metody GC-MS stanovili obsah thymolu v *Syrian oreganum* (dobromysl syrská) na 2,12 %.

Sloučeniny s fenolickou strukturou, jako jsou karvakrol, eugenol a thymol jsou vysoce účinné proti mnoha mikroorganismům. Mohou působit baktericidně nebo bakteriostaticky, v závislosti na použité koncentraci. Poloha hydroxylové skupiny ve fenolické struktuře má souvislost s antibakteriálními účinky (Dorman a Deans, 2000).

Burt a kol. (2005) testovali účinek na *Escherichia (E.) coli* O157:H7, inhibiční koncentraci stanovili na 1,2 mmol/l. Olasupo a kol. (2003) uvádějí, že účinná koncentrace thymolu na *Salmonella (Sal.) enterica* serovar Typhimurium je 1 mmol/l a inhibiční koncentrace na *E. coli* je 1,2 mmol/l. I. Nostro a kol. (2007) zkoumali jeho účinky na biofilmy *Staphylococcus (S.) aureus* a *S. epidermidis*, inhibiční koncentraci stanovili 0,031-0,125 %. Kiskó a Roller (2005) zkoumali účinek thymolu na *E. coli* O157:H7 v jablečném džusu. Zjistili, že při koncentraci 1,25 mM redukoval bakteriální buňky na nedekovatelné množství.

### 2.3.2 Karvakrol



Sumární vzorec:  $C_{10}H_{14}O$

Molekulová hmotnost:  $150,22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**Obrázek 2:** strukturní vzorec karvakrolu

Synonyma: 5-isopropyl-2-methylfenol

(<http://sigmaaldrich.com>)

Jedná se o látku nerozpustnou ve vodě, je rozpustný v ethanolu a etheru. Za běžné teploty se vyskytuje v kapalném stavu.

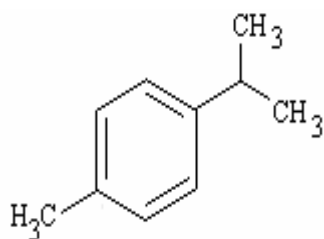
Karvakrol je přítomen v řadě silic, získaných především z nadzemních částí rostlin rodů *Thymus*, *Origanum* (*Ori.*) a *Ocimum*. V *T. herba-barona* je obsaženo 73-75,4 % karvakrolu, v *Ori. compactum* (dobromysl) je jeho obsah 49,52 %. Také se vyskytuje v listech *Lippia multiflora* (Opletal a Šimerda, 2005).

Skocibusić a Bezić (2004) provedli fytochemickou analýzu nadzemních částí rostlin *Satureja* (*Sat.*) *montana* (saturejka horská) a *Sat. cuneifolia* pomocí metody GC-MS. Jako hlavní složku *Sat. montana* stanovili karvakrol (45,7 %). Stejnou metodou analyzovali Angelini a kol. (2003) silice získané z tymiánu, rozmarýnu a saturejky. Zjistili, že hlavní složkou oleje z *Sat. montana* byl karvakrol (47 %). Zastoupení látek v silici ze *Syrian oreganum* zjišťovali pomocí GC-MS Alma a kol. (2003). Množství karvakrolu stanovili na 27,79 %.

Karvakrol je účinný na široké spektrum mikroorganismů. Wong a kol. (2008) uvádějí, že inhibiční koncentrace karvakrolu na *Mycobacterium* (*My.*) *avium* ssp. *paratuberculosis* je 72,2 µg/ml. Burt a kol. (2005) testovali účinnost karvakrolu na *E. coli* O157:H7, inhibiční koncentraci stanovili na 1,2 mmol/l. Nostro a kol. (2007) zkoumali účinnost na biofilmy *S. aureus* a *S. epidermidis*, inhibiční koncentraci stanovili 0,031-0,125 %.

Mechanismus účinku oregánového esenciálního oleje obsahujícího karvakrol a thymol na *Pseudomonas* (*Ps.*) *aeruginosa* a *S. aureus* je založen na porušení membránové integrity, úniku iontů a je zkoumán také vliv na vnitřní pH těchto mikrobů (Lambert a kol., 2001).

### 2.3.3 *p*-cymen



Sumární vzorec: C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>

Molekulová hmotnost: 134,22 g.mol<sup>-1</sup>

**obrázek 3:** strukturní vzorec *p*-cymenu

Synonyma: 1-isopropyl-4-methylbenzen

4-isopropyltoluen

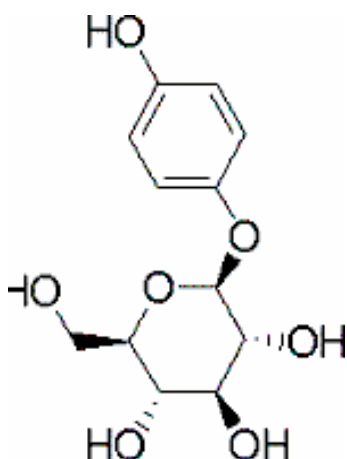
(<http://sigmaaldrich.com>)

*p*-cymen patří do skupiny monoterpenů, je nerozpustný ve vodě, ale je mísitelný s ethanolem a etherem. *p*-cymen je v přírodě nejběžněji se vyskytující forma cymenu (<http://chemicalland21.com/specialtychem/perchem/LIMONENE%20OXIDE.htm>, staženo 22. 12. 2008).

Gören a kol. (2004) stanovili pomocí GC-MS obsah *p*-cymenu v *Sat. thymbra* na 16,39 %. Stejnou metodou analyzovali Skocibusić a Bezić (2004) esenciální olej ze *Sat. montana*, obsah *p*-cymenu stanovili na 12,6 %. Salgueiro a kol. (2004) prokázali v silici z *Thymbra capitata* 7,5 % *p*-cymenu.

Burt a kol. (2005) zkoumali účinek *p*-cymenu na *E. coli* O157:H7, inhibiční koncentraci stanovili na >50mmol/l. Kiskó a Roller (2005) také testovali jeho účinek na *E. coli* O157:H7. Uvádějí, že při koncentraci 1,25 mM redukoval bakteriální buňky na nedekovatelné množství.

### 2.3.4 Arbutin



Sumární vzorec: C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>

Molekulová hmotnost: 272,25 g.mol<sup>-1</sup>

**Obrázek 4:** strukturní vzorec arbutinu

Synonyma: 4-hydroxyfenyl- $\beta$ -D-glukopyranosid

*p*-arbutin

hydroquinon  $\beta$ -D-glukopyranosid

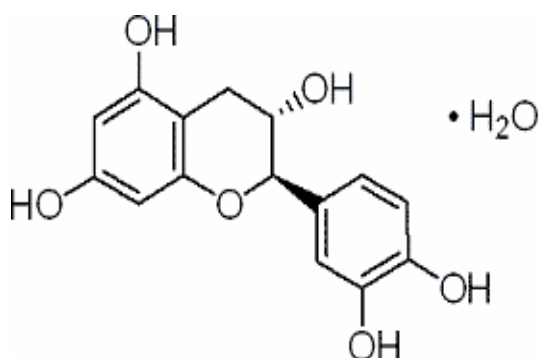
(<http://sigmaaldrich.com>)

Nachází se v listech volně rostoucí medvědice lékařské (*Arctostaphylos uva-ursi*) v množství 5-12 % (Moravcová, 2006).

Arbutin je bílý prášek, bez zápachu, je rozpustný ve vodě. Jedná se o glykosylovaný hydrochinon, působí jako antiseptická a antibakteriální látka zejména na sliznici močového ústrojí – v ledvinách je přeměněn na antibakteriálně působící hydrochinon, který se snadno oxiduje i vzdušným kyslíkem ale i působením oxidas a poskytuje černě zbarvené oxidační produkty. Působí také jako depigmentační činidlo – zabraňuje syntéze melaninu inhibicí tyrosinázové aktivity (<http://chemicalland21.com/lifescience/foco/ARBUTIN.htm>, staženo 21. 11. 2008 ; Moravcová, 2006 ).

Robertson a Howard (1987) testovali efekt arbutinu na růst *Mycoplasma (M.) hominis*. Zjistili, že v koncentraci 2,2 mM vykazoval inhibiční účinky, ale pouze na některé kmeny.

### 2.3.5 Katechin hydrát



Sumární vzorec:  $C_{15}H_{14}O_6$

Molekulová hmotnost:  $290,27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**Obrázek 5:** strukturní vzorec catechin hydrátu

(bezvodý)

Synonyma: *trans*-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan

*trans*-2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol

(<http://sigmaaldrich.com>)

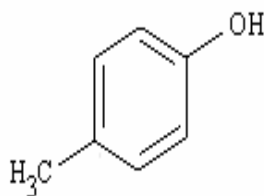
Katechin tvoří bezbarvé jehličkovité krystaly, dobře rozpustné v horké vodě a ethanolu, mírně rozpustné ve studené vodě a etheru (Český lékopis, 1. díl, 1997).

Řadí se do skupiny flavonoidů. Jedná se o polyfenolické sloučeniny syntetizované mnoha rostlinami. Je obsažen zejména v čajovníku. (<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/flavonoids/index.html>, staženo 25. 11. 2008).

Katechin vykazuje rozdílný účinek enantiomerů. (-)-katechin je allelochemické agens, vylučované kořeny chrpiny, plní roli fytoxinu, má širokou herbicidní aktivitu (postrádá antimikrobiální účinky). (+)-katechin není fytotoxický, má však antibakteriální aktivitu vůči agens napadajícím kořeny rostlin. Optická aktivita je významným faktorem určujícím antimikrobiální (antiinvazivní) aktivitu těchto polyfenolů (Opletal a Šimerda, 2005).

Mabe a kol. (1999) testovali účinnost katechinu na *Helicobacter (H.) pylori*, inhibiční koncentraci stanovili na 64 µg/ml.

### 2.3.6 Hydrochinon monomethylether



Sumární vzorec: C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 124,14 g.mol<sup>-1</sup>

**Obrázek 6:** strukturní vzorec hydroquinone monomethyetheru

Synonyma: 4-methoxyfenol

p-methoxyfenol

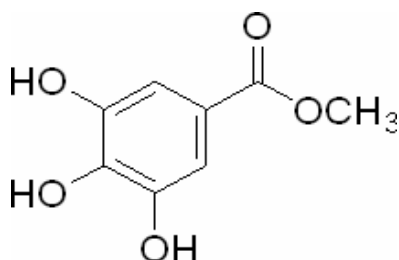
4-hydroxyanisol

(<http://sigmaaldrich.com>)

Jedná se o krystalickou látku vločkovitého charakteru, bílé až žlutohnědé barvy, s vůní po karamelu a fenolu. Je jen velmi málo rozpustný ve vodě, dobře však rozpustný v organických rozpouštědlech jako je 96% ethanol, ether nebo benzen (<http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/4-methoxyphenol/recognition.html>, staženo 15. 12. 2008).

Je používán jako inhibitor ve vinylových a akrylových monomerech, má antioxidační vlastnosti. Také je používán jako meziprodukt při výrobě stabilizátorů, barviv nebo léčiv (<http://chemicaland21.com/specialitychem/perchem/4-METHOXYPHENOL.htm>, staženo 15. 12. 2008).

### 2.3.7 Methylgallát



Sumární vzorec:  $C_8H_8O_5$

Molekulová hmotnost:  $184,15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**Obrázek 7:** strukturní vzorec methylgallátu

Synonyma: methylester kyseliny gallové  
methyl-3,4,5-trihydroxybenzoát  
(<http://sigmaaldrich.com>)

Je to bílá krystalická látka dobře rozpustná v 96% ethanolu.

Řadí se mezi významné antioxidanty. Má protektivní účinek proti oxidativnímu stresu zprostředkovaném  $H_2O_2$ . Velmi účinný je zejména při dlouhodobější expozici při nízké koncentraci  $H_2O_2$  (Whang a kol., 2005).

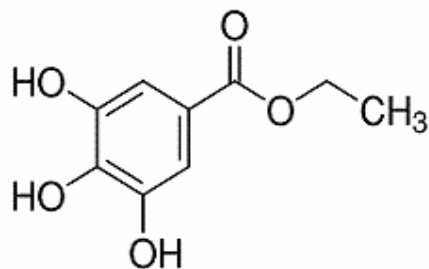
Kane a kol. (1988) testovali jeho aktivitu proti herpetickým virům. Je účinný proti viru Herpes simplex 2.

Choi a kol. (2008) testovali jeho účinky na bakterie rodu *Salmonella* z klinických izolátů. Uvádějí, že inhibiční koncentrace je v rozmezí 3,9-125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .



Kang a kol. (2008) stanovili účinnou koncentraci na orální bakterie na 1-8 mg/ml, a na biofilm *Streptococcus (Str.) mutans* na 1 mg/ml.

### 2.3.8 Ethylgallát



Sumární vzorec: C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>

Molekulová hmotnost: 198,17 g.mol<sup>-1</sup>

**Obrázek 8:** strukturní vzorec ethylgallátu

Synonyma: ethylester kyseliny gallové

ethyl-3,4,5-trihydroxybenzoát

(<http://sigmaaldrich.com>)

Jedná se o bílou krystalickou látku dobře rozpustnou v 96% ethanolu.

Ivanova a kol. (2002) izolovali ethylgallát z kořenů rostlin *Paeonia (P.) peregrina* (pivoňka balkánská) a *P. tenuifolia* (pivoňka úzkolistá). V *P. peregrina* se vyskytoval ve větším množství. Má protizánětlivé a antioxidační vlastnosti. Wang a kol. (2006) izolovali ethylgallát metodou HPLC-APCI-MS z rostliny *Rhodiola* (rozchodnice).

Johnstone a Little (1953) zkoumali účinnost ethylgallátu na *My. tuberculosis*, nad koncentrací 200 µg/ml vykazoval baktericidní účinky.

### 2.3.9 *Melaleuceae aetheroleum* (tea tree oil)

Tee tree oil je esenciální olej získávaný destilací s vodní parou z listů stromu *Melaleuca alternifolia*. Je složen z více než 100 látek, jedná se zejména o monoterpeny a seskviterpeny. Hlavní složkou je terpinen-4-ol (jeho obsah tvoří

30-40 %). Vykazuje antifungální, antiseptické, germicidní a antibakteriální vlastnosti (<http://chemicalland21.com/lifescience/foco/TEA%20TREE%20OIL.htm>, staženo 16. 12. 2008). Je bezbarvý až lehce nazelenalý, jeho vůně připomíná kafr (<http://www.wisegeek.com/what-is-tea-tree-oil.htm>, staženo 16. 12. 2008).

Tato silice má výbornou penetrační schopnost a lipoidní rozpustnost. Bylo pozorováno, že organická rozpouštědla a povrchově aktivní látky, často používané pro solubilizaci jsou nevýhodné, protože snižují její aktivitu. I když nepatří mezi nejaktivnější silice, má velmi široký rádius zásahu mikroorganismů. Účinkuje mj. na *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida (Can.) albicans*, *Clostridium perfringens* (Opletal a Šimerda, 2005).

Carson a kol. (2006) uvádějí jeho účinnost na mnoho bakterií. Růst *Bacillus (B.) cereus* inhiboval tea tree oil při 0,3% koncentraci, *S. aureus* (MRSA) při 0,04-0,35%, *E. coli* a *Proteus vulgaris* při 0,08-0,2%, *Enterococcus faecalis* při 0,5->8%, *Ps. aeruginosa* při 1-8%. Furneri a kol. (2006) zkoumali jeho aktivitu na *M. hominis*. Inhibiční koncentraci stanovili na 0,12 %. LaPlante (2007) testoval jeho účinek na methicilin-resistentní *S. aureus* (MRSA). Inhibiční koncentraci stanovil na 1024 mg/l. Mondello a kol. (2009) uvádějí, že inhibiční koncentrace tea tree oil na *Legionella pneumophila* je 0,125-0,5 %.

### 2.3.10 *Rosmarini aetheroleum* (rozmarýnová silice)

Je to bezbarvá až nažloutlá čirá kapalina, charakteristického pachu a aromaticky hořké chuti. Je velmi těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem, s etherem a oleji. Silice je izolovaná z listů druhu *Rosmarinus officinalis* (rozmarýn lékařský) destilací s vodní parou. Obsahuje 10-15 % volného i vázaného borneolu (Český lékopis, 3.díl, 1997).

Dalšími komponentami jsou kafr, 1,8-cineol,  $\alpha$ -pinen. Kromě monoterpenů obsahuje diterpenové fenolické látky karnosolovou kyselinu, karnosol, rosmarol a řadu jejich derivátů. Celkový biologický účinek je závislý na všech obsažených látkách, proto nejúčinnější je alkoholový extrakt. Silice je poměrně silně účinná proti řadě různých mikroorganismů (bakterie, kvasinky, mikromycety). Alkoholový extrakt je účinný proti *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Str. mutans*, *B. cereus*.

Celkový antibakteriální účinek je pravděpodobně z větší části způsoben diterpeny (Opletal a Šimerda, 2005).

Soylu a kol. (2006) zjišťovali její účinek na *Phytophthora infestans*, inhibiční koncentraci určili na 12,8 µg/ml. Mahady a kol. (2005) uvádějí, že extrakt z listů *Rosmarinus officinalis* účinkoval na *H. pylori* při koncentraci 25 µg/ml. Fu a kol. (2007) stanovili inhibiční koncentraci proti *Propionibacterium acnes* na 0,56 mg/l.

### 2.3.11 *Eucalypti aetheroleum* (eukalyptová silice)

Je to bezbarvá nebo světle žlutá kapalina aromatického pachu a pronikavé kafrové, později chladivé chuti. Silice blahovičnicku je získávána destilací s vodní parou a následnou rektifikací z čerstvých listů nebo čerstvých koncových větví různých druhů rodu *Eucalyptus* (*Euc.*), které jsou bohaté na 1,8-cineol (Český lékopis, 2.díl, 1997).

Hlavními zástupci jsou *Euc. globulus* (blahovičnick kulatoplodý), *Euc. fruticetorum*, *Euc. polybractea*, *Euc. smithii* (Opletal a Šimerda, 2005). 1,8-cineol (eukalyptol) je přítomen v množství 80-90 %, dalšími přítomnými látkami jsou *p*-cymen (2,7 %),  $\alpha$ -pinen (2,6 %), limonen (0,5 %), geraniol a kafr (Committee for veterinary medicinal products, 1998).

Tato silice má antimikrobiální účinky na *E. coli*, *Str. faecalis*, *S. aureus*, *Ps. aeruginosa* a zvláště vůči *My. avium*. Tlumí také růst některých mikromycet. Kromě antimikrobiálních efektů tlumí syntézu prostaglandinů, působí expektoračně, antitusicky a má povrchově smáčivý účinek (Opletal a Šimerda, 2005).

### 2.3.12 *Lavandulae aetheroleum* (levandulová silice)

*Lavandulae aetheroleum* je těkavý olej získávaný z *Lavandula angustifolia* (levandule úzkolistá) - trvalkovitý keř rostoucí ve středozevní oblasti. Rostlinný výtazek obsahuje hydroxykumariny (umbelliferon, herniarin), tanin, deriváty kyseliny kávové a těkavý olej (1-3 %). Hlavními složkami oleje jsou (-)-linalool (20-50 %) a linalyl acetát (30-40 %). Tyto dvě složky tvoří 60-75 % *Lavandulae*

*aetheroleum*. Dalšími složkami jsou levandulyl acetát, *cis*-ocimen, terpinen-4-ol a  $\beta$ -karyofylen (Committee for veterinary medicinal products, 1999).

D'Auria a kol. (2005) stanovili inhibiční koncentraci na *Can. albicans* 0,69-1,04 %. Mahady a kol. (2005) uvádějí, že inhibiční koncentrace extraktu z květů *Lavandula angustifolia* na *H. pylori* byla 100  $\mu\text{g/ml}$ . Soylu a kol. (2006) testovali její účinek na *Phytophthora infestans*, účinný byl při koncentraci 25,6  $\mu\text{g/ml}$ .

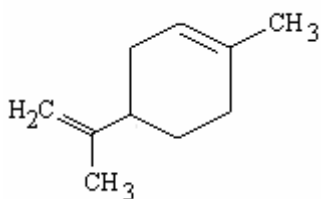
### 2.3.13 *Carvi aetheroleum* (kmínová silice)

Je to bezbarvá až nažloutlá čirá kapalina, charakteristického pachu a chuti. Je velmi těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem, s etherem a oleji. Jedná se o silici získávanou ze zralých plodů *Carum carvi* (kmín kořený) destilací s vodní parou (Český lékopis, 2.díl, 1997).

Hlavními složkami oleje jsou (S)-(+)-karvon (45-65 %) a limonen (30-40 %). Dále obsahuje 0,2-1,5 % terpenů, jako jsou myrcen,  $\alpha$ -felandren, *p*-cymen,  $\beta$ -karyofylen, *cis*- a *trans*-karveol, *cis*- a *trans*-dihydrokarvon a *trans*-dihydrokarveol (Committee for veterinary medicinal products, 1998).

Mahady a kol. (2005) uvádějí, že inhibiční koncentrace extraktu ze semen *Carum carvi* na *H. pylori* byla 100  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 2.3.13.1 Limonen



Sumární vzorec:  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$

Molekulová hmotnost: 136,23  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**Obrázek 9:** strukturní vzorec limonenu (( $\pm$ )-limonen)

Synonyma: ( $\pm$ )-Limonene

*p*-Mentha-1,8-diene

(<http://sigmaaldrich.com>)

Limonen je bezbarvá kapalina silně vonící po pomeranči a citrónu. Jedná se o chirální molekulu. (R)-enantiomer (d-limonen) je hlavní složkou extraktů z citrusové kůry. Narozdíl od citronové vůně d-limonenu, l-limonen zapáchá po terpentýnu. Racemická směs obou enantiomerů se nazývá dipenten (<http://chemicaland21.com/specialtychem/perchem/LIMONENE%20OXIDE.htm>, staženo 22. 12. 2008).

O'Bryan a kol. (2008) testovali účinek d-limonenu proti bakteriím rodu *Sallmonella*, jako účinnou koncentraci uvádějí 1 %.

### 2.3.14 *Foeniculi aetheroleum* (fenyklová silice)

Jedná se o bezbarvou až slabě nažloutlou čirou kapalinu. Má charakteristický pach, zprvu nasládlou a později hořkou chuť. Je velmi těžce rozpustná ve vodě, ale mísitelná s 96% ethanolem, etherem a mastnými oleji (Český lékopis, díl, 1997).

Tato silice se získává destilací s vodní parou ze zralých plodů *Foeniculum vulgare* Miller var. *vulgare* (fenykl obecný). Olej obsahuje *trans*-anethol (60-75 %), (+)-fenchon (12-30 %), estragol (2-7 %),  $\alpha$ -pinen, limonen, *p*-cymen a další terpeny v malém množství (Committee for veterinary medicinal products).

Opletal a Šimerda (2005) uvádějí, že fenyklová silice vykazuje účinnost proti *E. coli*, *Str. pyogenes*, *S. aureus*, *My. avium* a *B. cereus*. Účinné koncentrace zde však neuvádějí. Mahady a kol. (2005) testovali účinek extraktu ze semen *Foeniculi vulgare* na *H. pylori*. Inhibiční koncentraci stanovili na 100  $\mu\text{g/ml}$ .

## **2.4 METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI MIKROORGANISMŮ K ANTIMIKROBIÁLNÍM LÁTKÁM**

Při zjišťování účinnosti antimikrobiálních látek se využívají kvalitativní a kvantitativní metody stanovení.

Kvalitativní metody jsou metody difúzní, slouží k orientačnímu zjištění antimikrobiální aktivity dané látky. Jedná se o poměrně spolehlivé metody, kterými lze určit i semikvantitativní výsledky.

Mezi kvantitativní metody patří agarové a bujónové diluční metody. Tyto metody poskytují přesnější informace nejen o účinku antimikrobiální látky (baktericidní, bakteriostatický), ale i o množství účinné látky inhibující růst, případně zcela usmrcující testované mikroorganismy. Jsou však pracnější než metody difúzní (Vytřasová, Bílková, 1998).

Oba typy uvedených metod se využívají při stanovení účinnosti přírodních látek.

### **2.4.1 Kvalitativní metody**

#### **2.4.1.1 Disková difúzní metoda**

Zkoušený mikroorganismus se naočkuje na agarovou půdu v Petriho misce. Poté se na povrch agarové půdy přiloží papírové disky (impregnované předem přesně stanovenými koncentracemi antibiotika (ATB)). ATB difunduje z disků do okolí a vytváří na povrchu půdy různě velké kruhové zóny, v nichž je působením ATB potlačován růst mikroorganismu (tzv. inhibiční zóny). Ostatní půda na plotně je koloniemi testovaného mikroorganismu pravidelně porostlá (Vytřasová, Bílková, 1998).

Tento test se ke kvalitativnímu průkazu používá nejběžněji.

Alma a kol. (2003) diskovou difúzní metodou zkoumali účinnost oregánového esenciálního oleje. Wilkinson a Cavanagh (2005) touto metodou

zjišťovali účinnost tea tree oil. Aktivitu oleje, jehož hlavní složkou byl karvakrol, stanovovali tímto způsobem Unlü a kol. (2009).

#### 2.4.1.2 Agarová difúzní metoda

Je založena na stejném principu jako difúzní disková metoda. Rozdíl spočívá pouze v nanášení antimikrobiální látky, která se pipetuje přímo do jamek v agarové vrstvě (Jandová a Kotoučková, 1996).

Agarovou difúzní metodu použili Dorman a Deans (2000) při testování účinnosti několika esenciálních olejů. Venturini a kol. (2002) touto metodou testovali účinek thymolu a eugenolu.

### 2.4.2 Kvantitativní metody

#### 2.4.2.1 Bujónová diluční metoda

Do řady zkumavek s bujónem obsahujícím snižující se koncentraci daného ATB (ředění se provádí dvojkovou řadou) se naočkuje příslušný kmen. Po určité době inkubace se odečítají výsledky, hledá se zkumavka ve které již nedošlo k pomnožení mikroorganismu. Koncentrace v této zkumavce se nazývá minimální inhibiční koncentrace (MIC). Pro většinu mikroorganismů se používá Mueller-Hintonův bujón a pomnožení je charakterizováno vznikem sedimentu nebo zákalu. V případě *M. hominis* je používán PPLO bujón a růst je indikován změnou jeho zbarvení.

Zjištění MIC vyjadřuje přímo míru citlivosti daného mikroba (Bednář a kol., 1996). MIC je definována jako nejnižší koncentrace dané antimikrobiální látky, která zabrání růstu příslušného mikroba. Jako MIC 90 se označuje koncentrace, která potlačí růst 90 % testovaných kmenů daného druhu (Votava a kol., 2005).

Za citlivý se považuje kmen, jehož MIC je 2x-4x menší než koncentrace dosahovaná terapeuticky v krvi (breakpoint) (Čížek, 1999).

Bujónový diluční test se běžně provádí v polystyrénových mikrotitračních destičkách. Většinou se pro jedno ATB používá 8 koncentrací. Zjištěné výsledky se interpretují podle tabulek obsahujících hraniční koncentrace pro jednotlivá ATB a daného mikroba (Bednář a kol., 1996).

Bujónovou mikrodiluční metodou zkoumali Skocibusić a Bezić (2004) účinek saturejkového esenciálního oleje. Lambert a kol. (2001) testovali mikrodiluční metodou aktivitu thymolu a karvakrolu. Účinky thymolu a eugenolu bujónovou diluční technikou zkoumali i Venturini a kol. (2002).

### **2.4.2.2 Agarová diluční metoda**

Do řady Petriho misek se nalijí agarové půdy s různou koncentrací daného ATB. Na jednu agarovou půdu se bodově naočkuje jehlovým reziduem 30-40 kmenů najednou. Po inkubaci se odečítá růst ve formě uzavřené kolonie. Plotna, kde již není pozorován růst, obsahuje MIC ATB. Hodnoty se interpretují podle tabulkových hodnot. Agarová metoda platí jako referenční. Je přesnější, lépe se stanovuje inhibice růstu (Bednář a kol., 1996).

Účinky thymolu a karvakrolu testovali agarovou diluční metodou Nostro a kol. (2004). Venturini a kol. (2002) zkoumali touto metodou účinky thymolu a eugenolu.



## 2.5 *MYCOPLASMA HOMINIS*

### 2.5.1 Charakterizace rodu *Mycoplasma*

Mykoplazmata se řadí do třídy *Mollicutes* (mollis = měkký, cutis = kůže)(Kalban, 2005). Jsou to nejmenší mikroorganismy schopné samostatné replikace. Narozdíl od ostatních bakterií nemají pevnou buněčnou stěnu. Buňky jsou obaleny pouze třívrstevnou membránou, která je tvořena lipidy a proteiny. Významnou složkou membrány je cholesterol.

Pro buňky mykoplazmat je charakteristická různá velikost a pleomorfismus. Základní formou je malé kokovité tělíčko, ale zralé kultury obsahují i buňky větší, oválné, protáhlé a vláknité, někdy s větvením (Bednář a kol., 1996).

Díky nepřítomnosti kompletní buněčné stěny se metodou dle Grama prakticky nebarví (Votava a kol., 2003).

Mykoplazmata mají nejmenší genom ze všech bakterií. Nemohou proto syntetizovat řadu pro ně významných sloučenin. Jejich chování je proto parazitické, potřebné živiny získávají z hostitelské buňky.

Mykoplazmata jsou nejmenší mikroorganismy schopné růstu na bezbuněčných médiích (Kalban, 2005). *M. hominis* na agarových půdách vyrůstá v charakteristických koloniích vzhledu „sázeného vejce“ (příloha, obrázek 10).

### 2.5.2 Ultrastruktura buněk *Mycoplasma hominis*

Anderson a Barile (1965) studovali elektronovou mikroskopií *M. hominis* typu I. Zjistili, že morfologie je velmi variabilní a patrně závislá na stáří kultury. Vnitrobuněčné komponenty jsou také rozmanité – některé formy obsahují ribosomům podobná granula, některé mají nepravidelnou hustotu, jiné obsahují cytoplasmatická tělíčka podobná elementárním tělískům. Hlavně ve starších kulturách jsou viditelné vakuoly.

### 2.5.3 Adheze na hostitelské buňky

Schopnost osídlit organismus vazbou na specifické receptory hostitelské buňky je prvním a základním krokem k umožnění kolonizace hostitele. Receptory, na které se *M. hominis* váže, zejména v lidském urogenitálním traktu z něhož jsou velmi často izolovány, jsou hlavně, ne-li výhradně sulfatované glykolipidy (Olson a Gilbert, 1993).

Faktory zprostředkovávající adhezi jsou proteinové povahy. Jsou citlivé k proteolytickým enzymům, teple a formalínu (Henrich a kol., 1993). Tito autoři zkoumali mechanismus adheze *M. hominis* na hostitelské buňky urogenitálního traktu pomocí monoklonálních protilátek namířených proti povrchově lokalizovaným polypeptidům P50, P60, P80 a P100. Zjistili, že přinejmenším P100 a P50 jsou adheziny.

Vaa adhesin (variable adherence-associated adhesin) je povrchově lokalizovaný, membránově-asociovaný protein související s připojením k hostitelské buňce. Na povrchu buňky je velmi početný a vyskytuje se ve 2 formách (Boesen a kol., 2001).

### 2.5.4 Výskyt *Mycoplasma hominis* v genitálním ústrojí

*M. hominis* bývá izolováno z urogenitálního traktu i klinicky zdravých mužů a žen. Kolonizace tímto mikroblem stoupá po pubertě a úzce souvisí se sexuální aktivitou. Míra kolonizace se zvyšující se sexuální aktivitou stoupá více u žen než u mužů, ženy jsou tedy ke kolonizaci citlivější než muži (Imudia, 2008).

Elias a kol. (2005) zjišťovali jeho výskyt u skupiny asymptomatických žen. *M. hominis* izolovali pouze u 1 z 90 žen (1,1 %). Arya a kol. (2001) izolovali *M. hominis* u 31 z 249 (12 %) žen bez klinického nálezu. Castellano-González a kol. (2007) sledovali jeho výskyt u skupiny těhotných žen a žen bez probíhajícího těhotenství. U těhotných žen izolovali *M. hominis* v 10 % případů, u druhé skupiny se jednalo o 35,38 % pozitivních izolátů.

Takahashi a kol. (2006) zjišťovali jeho výskyt u asymptomatických mužů. Ze 100 testovaných mužů byly na *M. hominis* pozitivní 4%.

### 2.5.5 Onemocnění vyvolaná *Mycoplasma hominis*

Při uplatnění *M. hominis* v onemocnění člověka hraje nepochybně významnou roli celá řada podpůrných faktorů, jako je věk, pohlavní aktivita, počet sexuálních partnerů, sociálně-ekonomické zázemí apod. (Bednář a kol., 1996).

Mykoplazmové infekce urogenitálního traktu bývají často sdružovány s jinými bakteriálními onemocněními, především pak s infekty vyvolanými *Chlamydia trachomatis* a *Str. agalactiae* (Votava a kol., 2003).

*M. hominis* může být součástí abnormální poševní mikroflóry u žen s bakteriální vaginózou. Smayevsky a kol. (2001) prokázali u žen s tímto onemocněním *M. hominis* u 42 % žen, Mašata a kol. (2004) u 48-63 % žen a Arya a kol. (2001) prokázali přítomnost v 59 % případů.

Dále je *M. hominis* asociováno s intraamniální infekcí, poporodní endometritidou a zánětem pánve (PID - pelvic inflammatory disease). Také je možné, že usnadňuje ascendentní šíření infekce do horní části genitálního traktu. Vzácně je *M. hominis* diagnostikováno samostatně. Většinou je prokazováno s ostatními mikroorganismy, které jsou součástí abnormální mikroflóry (Mašata a kol., 2004).

Schlicht a kol. (2004) označují *M. hominis* za jednu z příčin vzniku potratu, předčasného porodu, respirační tísně novorozenců a neonatální meningitidy. Podle Cummingse a McCormacka (1990) je jednou z příčin akutní salpingitidy, a může způsobit endometritidu následovanou potratem nebo porodem. Dále je *M. hominis* asociováno s pyelonefritidou, chorioamnionitidou, s poporodními nebo popotratovými horečkami (Imudia a kol., 2008). Je izolováno asi u 1/5 případů negonokokových uretritid, ale není považováno za původce (Greenwood a kol., 1999).

V současné době je *M. hominis* často studováno jako potenciálně možná příčina neplodnosti.

Fenkei a kol. (2002) izolovali *M. hominis* u 8 % žen s infertilitou, Rodriguez a kol. (2001) prokázali její přítomnost u 4,8 % žen. Martens a kol. (1993) izolovali z cervikálních kultur *M. hominis* v 6 % případů. Møller a kol. (1985) stanovili u žen

s neplodností v 13,5 % případů protilátky proti *M. hominis*. Zda se skutečně podílí na vzniku infertility je stále předmětem zkoumání (Imudia a kol., 2008).

### 2.5.6 Citlivost k antimikrobiálním látkám

Jelikož mykoplazmata nemají buněčnou stěnu, nejsou citlivá na penicilin a ostatní ATB s obdobnou strukturou –  $\beta$ -laktamová ATB.

Jsou však citlivé k širokospektrým ATB. Většina z těchto antibiotik pouze inhibuje růst mykoplazmat, ale nezabíjí je (Taylor-Robinson a Bébéar, 1997).

Působí na ně ATB zasahující do syntézy proteinů. Jsou citlivá na linkomycin a klindamycin, chloramfenikol, rezistentní na erythromycin a rimfapin. Často používanými antimikrobiálními léčivy jsou tetracykliny. Cummings a McCormack (1990) však zjistili, že některé kmeny *M. hominis* jsou již rezistentní na toto antibiotikum. V některých oblastech je resistance na tetracykliny až 30 % (Taylor-Robinson a Bébéar, 1997). *M. hominis* je *in vitro* přirozeně rezistentní na erythromycin. Citlivé je však k moderním makrolidům jako je josamycin nebo miocamycin (Furneri a kol., 2000).

Waites a kol. (2008) testovali účinnost několika ATB. Nejúčinnějším antimikrobiálním léčivem byl klindamycin.

Byly testovány také účinky přírodních látek na *M. hominis*.

Furneri a kol. (2006) stanovili MIC tea tree oil na *M. hominis* na 0,12 %. MIC oleuropeinu (látky obsažené v olivovém oleji) stanovili Furneri a kol. (2002) na 20 mg/l. MIC hydroxytyrosolu (také látka obsažena v olivovém oleji) byla stanovena na 0,03  $\mu$ g/ml (Furneri a kol., 2004).

### 2.5.7 Kultivace

Kultivace se provádí na komplexních kultivačních médiích PPLO agaru nebo PPLO bujónu. Hlavními zdroji nutričních komponent jsou kvasničný extrakt a koňské sérum. Kvasničný extrakt je zdrojem vitamínů a aminokyselin. Koňské sérum je zdrojem cholesterolu, bílkovin a nenasycených mastných kyselin. Jako inhibiční složky se přidávají octan thalný a ATB zasahující do syntézy buněčné stěny

nežádoucích bakterií – např. ampicilin. Do PPLO bujónu se dále přidává L-arginin, který je *M. hominis* schopno využít a fenolová červeň jako acidobazický indikátor. *M. hominis* rozloží arginin za vzniku amoniaku NH<sub>3</sub>, tím dojde ke zvýšení pH a fenolová červeň změní barvu ze žluté na růžovou. Růžové zbarvení PPLO bujónu indikuje růst.

Inkubace se provádí při 37 °C za přítomnosti 5 % CO<sub>2</sub>.

### 2.5.8 Detekce a identifikace

Přítomnost mykoplazmat lze prokázat výše uvedenou kultivační metodou na PPLO agaru.

Dalším způsobem jejich identifikace jsou biochemické testy. Detekce je založena na specifických metabolických vlastnostech – v případě *M. hominis* je to hydrolýza argininu. Pro detekci genitálních mykoplazmat se používají komerčně dostupné testy Mycoplasma Duo. Ty využili např. Evans a kol. (2007) a uvádějí, že tyto testy mají vyšší míru detekce než kultivační metody. Kilic a kol. (2004) použili komerční testy Mycoplasma IST, kterými lze určit nejen typ mykoplazmat, ale také jejich citlivost k antimikrobiálním látkám.

Lze využít i sérologické typizace. Hirai a kol. (1991) využili pro průkaz *M. hominis* ve vaginálních stěrech metodu nepřímé imunoflorescence. Lin a kol. (1975) ho detekovali růstově inhibičním testem. Disky napuštěné antisérem s protilátkami proti prototypovým kmenům *M. hominis* inhibují růst mikroba na agarové půdě.

Velmi specifická je typizace molekulárně biologickými metodami. Jedná se zejména o PCR a její různé modifikace. Baczynska a kol. (2004) použili pro detekci *M. hominis* metodu real-time PCR.

Posledním typem je nepřímá diagnostika. Baczynska a kol. (2005) stanovovali protilátky proti *M. hominis* u infertálních žen metodou ELISA a immunoblottingem. Yang a kol. (1996) identifikovali *M. hominis* metodou nepřímé hemaglutinace. Dále lze použít test inhibice metabolismu nebo komplement fixační reakci.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 MATERIÁL

#### 3.1.1 Bakteriální kmeny

Testované kmeny *M. hominis* byly vykultivovány ze vzorků odebraných z genitálního ústrojí žen (Lysková, 2004). Kmeny pomnožené v PPLO bujónu byly uchovávány při teplotě -20 °C.

Ze souboru kmenů *M. hominis* jsme náhodně vybrali deset kmenů u kterých jsme zjišťovali citlivost k přírodním látkám.

#### 3.1.2 Přírodní látky

Antimikrobiální aktivitu jsme ověřovali u 15 přírodních látek. Většinu z nich jsme získali od Doc. RNDr. Lubomíra Opletala, CSc. z Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Ostatní látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich.

Seznam použitých přírodních látek a rozmezí testovaných koncentrací je uvedeno v tabulce I.

**Tabulka I:** Přehled testovaných přírodních látek a rozmezí použitých koncentrací

přírodní látka	číslo šarže	rozmezí koncentrací (µg/ml)
arbutin	17522388	6000-750
karvakrol	456690/1 21005279	473,4-7,4 600-9,375
<i>p</i> -cymen	S33159-386	38400-1200
<i>Carvi aetheroleum</i>	0329/1004/517	38400-600
ethylgallát	1160551 22005084	2400-75
<i>Eucalypti aetheroleum</i>	0337/1203/517	38400-600

Tabulka I: pokračování

<i>Foeniculi aetheroleum</i>	0045/0105/517	38400-600
hydrochinon monomethylether	221135 581	9600-150
katechin hydrát	86474	6000-375
<i>Lavandulae aetheroleum</i>	0180/0604/517	38400-600
limonen	1360549	38400-600
methylgallát	12313 EB/MNO 4453	2400-37,5
<i>Rosmarini aetheroleum</i>	0278/0904/517	38400-600
tea tree oil	neuvedeno	9600-600 38400-600
thymol	SUKL 2001 75	1200-9,375

### 3.1.3 Kultivační média

#### ❖ PPLO bujón

2,1 g Difco™ PPLO Broth (č.š. 5221158) jsme rozpustili ve 70 ml redestilované vody a sterilizovali jsme 15 min v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení na 50-60 °C jsme přidali další složky:

20 ml neinaktivovaného koňského séra

10 ml kvasničného extraktu

0,5 g argininu

0,5 ml ampicilinu

0,8 ml 10% roztoku octanu thalného

200 µl fenolové červeně

Po přidání všech složek jsme upravili pH pomocí 10% roztoků HCl a NaOH na 6,5-6,8. Bujónové médium jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Pro pomnožení kmenů *M. hominis* jsme používali PPLO bujón kompletního složení, pro testování přírodních látek jsme používali PPLO bujón bez přídavku ampicilinu a octanu thalného.

❖ **PPLO agar**

3,5 g Bacto™PPLO agaru (č.š. 2126603) jsme rozpustili v 70 ml redestilované vody, pH jsme upravili pomocí 10% roztoků HCl a NaOH na hodnotu 6,3. Poté jsme roztok sterilizovali v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Po ochlazení na teplotu 50-60 °C jsme přidali další složky:

20 ml neinaktivovaného koňského séra

10 ml kvasničného extraktu

0,5 ml ampicilinu

0,8 ml 10% roztoku octanu thalného

Připravenou půdu jsme rozlévali do polystyrenových Petriho misek o průměru 60 mm do výšky 4 mm a dále jsme skladovali v chladničce při 4 °C.

### 3.1.4 Složky pro přípravu kultivačním médií

❖ **Rozpouštění přírodních látek**

ethanol (96%, 50%, 24%,) – 50% a 24% připravován z 96% ethanolu (č.š. 301006) ředěním redestilovanou vodou

dimethylsulfoxid (DMSO, 2,5%) – 99,9% DMSO (Sigma-Aldrich, č.š. 41641) ředěn redestilovanou vodou

❖ **Kvasničný extrakt**

1 kg čerstvých pekárenských kvasnic jsme důkladně homogenizovali v 500 ml redestilované vody a následně doplnili do 1000 ml redestilovanou vodou. Suspenzi jsme za stálého míchání zahřivali na 80 °C po dobu 45 min. Po ochlazení jsme směs centrifugovali 30 min při 3000 otáčkách/min. Supernatant jsme opakovaně (3x) sterilizovali v autoklávu při teplotě 80 °C. Sterilní extrakt jsme skladovali v lahvičkách (80 ml) při -20°C.

❖ **Koňské sérum**

Koňské sérum bylo dodáno firmou MVDr. T. Krejčího. Neinaktivované KS jsme uchovávali v 80 ml sterilních lahvičkách při -20 °C.



**❖ roztok ampicilinu**

Do lahvičky ampicilinu (BIOTIKA, č.š. 0605005) o obsahu 1 g účinné látky jsme přidali 5 ml sterilní redestilované vody. Po důkladném rozpuštění jsme roztok skladovali při -20 °C.

**❖ 10% roztok octanu thalného**

V 50 ml sterilní redestilované vody jsme rozpustili 5 g octanu thalného (Sigma-Aldrich, č.š. 71K1395 ). Roztok jsme skladovali v chladničce při 4 °C.

**❖ 1% roztok fenolové červeně**

1 g fenolové červeně (firma LACHEMA) jsme rozpustili ve 25 ml 0,1 mol/l NaOH, v odměrné baňce jsme doplnili na objem 100 ml sterilní redestilovanou vodou a mírně jsme zahřívali do úplného rozpuštění. Roztok jsme sterilizovali v autoklávu 10 min při 115 °C. Dále jsme skladovali při laboratorní teplotě.

**❖ L-arginin (MERCK, č.š. K27674142 347)****❖ 10% roztok HCl (č.š. neuvedeno)****❖ 10% roztok NaOH (č.š. 030806)****3.1.5 Přístroje a pomůcky**

- ❖ Zkumavky, silikonové zátky, polystyrenové Petriho misky, automatické pipety, špičky, Erlenmayerovy baňky, kádinky, odměrné válce, lékovky, alobal, eppendorfky, stříčka, stojánky na zkumavky, plynový kahan
- ❖ pH metr (HANNA, pH 210), laminární box (Jouan, MSC 12), autokláv (BMT PS 20 A, Sterilab), horkovzdušný sterilizátor (BMT, Sterimat 5104.2), termostat s 5 % CO<sub>2</sub> (SalvisLab, Biocenter), světelný mikroskop (PZO, Warszawa), předvážky, analytické váhy, chladnička, mraznička, třepací vodní lázeň

## 3.2 PRACOVNÍ POSTUP

### 3.2.1 Testované kmeny *Mycoplasma hominis*

Testované kmeny *M. hominis*, které byly uchovávány při -20 °C, jsme nejprve rozmrazili a následně napipetovali 200 µl do 2 ml PPLO bujónu. Zkumavky jsme inkubovali při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 24-48 hodin. Během inkubace jsme sledovali změnu zabarvení acidobazického indikátoru v médiu z oranžové na tmavě růžovou, což je známkou pomnožení *M. hominis* využívajícího arginin.

Pomnožené kmeny jsme pipetovali do jednotlivých zkumavek každé ředící řady. Současně jsme kmeny naočkovali na PPLO agar pro potvrzení jejich životaschopnosti. Po inkubaci, která je shodná s inkubací tekutého média, jsme prohlíželi charakteristické kolonie *M. hominis* ve světelném mikroskopem při 150x zvětšení.

### 3.2.2 Ředění přírodních látek

Zásobní roztok přírodní látky jsme připravili rozpuštěním navážky testované látky ve vypočteném množství 96%, 24% ethanolu nebo v 2,5% DMSO (pro thymol jsme použili kombinaci 50% ethanol a 2,5% DMSO). Při rozpouštění v 96% ethanolu jsme tento roztok poté naředili redestilovanou vodou na 24% roztok. Rozpuštěnou látku jsme doplnili PPLO bujónem na příslušný objem. Tím vznikl zásobní roztok přírodní látky o nejvyšší testované koncentraci.

Pro látky vytvářející emulze jsme použili způsob přímého pipetování čistých látek do jednotlivých zkumavek ředící řady.

### 3.2.3 Zkumavková diluční metoda

Nejprve jsme připravili řadu sterilních zkumavek. Do první zkumavky jsme napipetovali 2 ml zásobního roztoku přírodní látky, do ostatních zkumavek jsme napipetovali 1 ml čistého PPLO bujónu. Poté jsme 1ml z první zkumavky přenesli

do druhé zkumavky, obsah jsme promíchali a opět jsme 1 ml přenesli do další zkumavky. Stejným způsobem jsme ředění prováděli až do poslední zkumavky, z níž jsme 1 ml odpipetovali do odpadu. Tímto způsobem vznikla tzv. dvojková ředící řada, v níž každá následující zkumavka měla poloviční koncentraci testované přírodní látky než zkumavka předcházející (příloha, obrázek č. 11).

Poté jsme do každé zkumavky ředící řady přidali 100  $\mu$ l testovaného kmene *M. hominis*.

Inkubace zkumavek probíhala v termostatu při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 24 hodin. Poté jsme vizuálně hodnotili růst *M. hominis*. Pomnožení kmene bylo provázeno změnou zbarvení indikátoru v médiu z oranžové na růžovou následkem zvýšení pH při utilizaci argininu (příloha, obrázek č. 12). Stejný způsob hodnocení jsme provedli ještě po 48 hodinách. V případě nejasného zbarvení jsme obsahy zkumavek naočkovali na PPLO agar. Po inkubaci jsme přítomnost *M. hominis* sledovali pod mikroskopem při 150x zvětšení.

Jako MIC jsme stanovili nejnižší koncentraci testované přírodní látky, která potlačila růst bakteriálního kmene, tj. první zkumavka ve směru vzrůstajících koncentrací kde nedošlo ke změně zbarvení.

#### **3.2.4 Zkumavková diluční metoda – přímé pipetování přírodní látky**

Připravili jsme si řadu sterilních zkumavek. Do každé zkumavky jsme napipetovali 1 ml čistého PPLO bujónu. Poté jsme do jednotlivých zkumavek přidali vypočtené množství čisté přírodní látky, každá následující zkumavka měla poloviční koncentraci přírodní látky než zkumavka předcházející. Následně jsme přidali 100  $\mu$ l testovaného kmene. Inkubaci a hodnocení jsme prováděli stejně jako u zkumavkové diluční metody.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 ÚČINNÉ KONCENTRACE PŘÍRODNÍCH LÁTEK NA KMENY *MYCOPLASMA HOMINIS*

Testovali jsme antimikrobiální účinky 15 vybraných přírodních látek na 10 kmenů bakterie *M. hominis* zkumavkovou diluční metodou.

Nejprve jsme zjistili citlivost *M. hominis* ke zvoleným koncentracím rozpouštědel. V PPLO bujónu jsme naředili ethanol tak, aby výsledné množství ethanolu bylo v rozmezí 0,094-6 %. Zjistili jsme, že část kmenů byla inhibována 3% roztokem ethanolu. Stejným způsobem jsme postupovali při testování inhibičního působení roztoku DMSO. Z testovaného rozmezí 0,625-10 % nám inhiboval kmeny *M. hominis* 5% roztok DMSO. Kompletní výsledky jsou uvedeny v tabulkách II a III.

Námi používané výsledné procentuální koncentrace rozpouštědel v PPLO bujónu byly výrazně nižší než stanovené procentuální hodnoty.

**Tabulka II:** Účinná procentuální koncentrace ethanolu na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou (testované procentuální koncentrace 0,094-6 %)

kmen <i>M. hominis</i>	x% roztok ethanolu*	
	24 hod	48 hod
21M	6	6
62M	3	3
77M	6	6
80M	6	6
82M	3	6
83M	3	6
89M	6	6
92M	3	3
99M	6	6
128M	3	6

\* objemová procenta

**Tabulka III:** Účinná procentuální koncentrace DMSO na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou (testované procentuální koncentrace 0,625-10 %)

kmen <i>M. hominis</i>	x% roztok DMSO*	
	24 hod	48 hod
21M	10	10
62M	5	5
77M	10	10
80M	10	10
82M	10	10
83M	5	10
89M	5	5
92M	10	10
99M	5	5
128M	5	5

\* objemová procenta

V tabulkách IV-XII jsou uvedeny nejnižší koncentrace přírodních látek testovaných zkumavkovou diluční metodou, které inhibovaly růst příslušných kmenů *M. hominis*. Karvakrol rozpuštěný pouze v čistém PPLO bujónu inhiboval růst testovaných kmenů nejlépe a to při koncentracích 59,2-236,7 µg/ml. Karvakrol rozpuštěný v 24% ethanolu inhiboval růst při 300 µg/ml. Z toho je zřejmé, že účinnost je ovlivněna použitým rozpouštědlem, karvakrol rozpuštěný pouze v PPLO bujónu vykazoval vyšší účinnost. Tea tree oil rozpuštěný v 24% ethanolu měl výrazně nižší antimikrobiální aktivitu, inhiboval růst při 9600 a > 9600 µg/ml. Methylgallát, ethylgallát a hydrochinon monomethylether rozpuštěny v 96% ethanolu vykazovali poměrně dobré antimikrobiální účinky. Methylgallát a ethylgallát inhibovali růst při 1200-2400 µg/ml, hydrochinon monomethylether při 2400 µg/ml. Thymol jsme rozpouštěli v 50% ethanolu a následně 2,5% DMSO. Jeho aktivita byla také velmi vysoká, inhiboval růst při 600-1200 µg/ml. Arbutin rozpuštěný v 2,5% DMSO neprojevil významnou antimikrobiální aktivitu. Jeho účinné množství nebylo stanoveno, neboť nejvyšší testovaná koncentrace 6000 µg/ml neinhibovala růst žádného kmene. Katechin hydrát jsme rozpouštěli v 2,5% DMSO, po 24 hod jsme MIC stanovili na 1500-3000 µg/ml, po 48 hod jsme

však inhibiční koncentraci nemohli stanovit, přesahovala nejvyšší testovanou koncentraci 6000 µg/ml. Katechin hydrát je tedy na *M. hominis* málo účinný.

**Tabuka IV:** Minimální inhibiční koncentrace karvakrolu rozpuštěného v PPLO bujónu na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou (testované koncentrace 7,4-473,4 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]	
	24 hod	48 hod
21M	118,4	118,4
62M	118,4	118,4
77M	118,4	118,4
80M	118,4	118,4
82M	59,2	59,2
83M	59,2	59,2
89M	118,4	118,4
92M	59,2	59,2
99M	118,4	118,4
128M	236,7	236,7

**Tabulka V:** Minimální inhibiční koncentrace karvakrolu rozpuštěného v 24% ethanolu na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou (testované koncentrace 9,375-600 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]	
	24 hod	48 hod
21M	300	300
62M	300	300
77M	300	300
80M	300	300
82M	300	300
83M	300	300
89M	300	300
92M	300	300
99M	300	300
128M	300	300

**Tabulka VI:** Minimální inhibiční koncentrace tea tree oil rozpuštěného v 24% ethanolu na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou (testované koncentrace 600-9600 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]	
	24 hod	48 hod
21M	>9600	>9600
62M	9600	>9600
77M	9600	>9600
80M	>9600	>9600
82M	9600	9600
83M	9600	9600
89M	>9600	>9600
92M	>9600	>9600
99M	>9600	>9600
128M	9600	>9600

**Tabulka VII:** Minimální inhibiční koncentrace methylgallátu rozpuštěného v 96% ethanolu na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou (testované koncentrace 37,5-2400 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]	
	24 hod	48 hod
21M	2400	2400
62M	1200	2400
77M	2400	2400
80M	2400	2400
82M	2400	2400
83M	2400	2400
89M	2400	2400
92M	1200	1200
99M	2400	2400
128M	2400	2400

**Tabulka VIII:** Minimální inhibiční koncentrace ethylgallátu rozpuštěného v 96% ethanolu na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou (testované koncentrace 75-2400 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]	
	24 hod	48 hod
21M	2400	2400
62M	2400	2400
77M	2400	2400
80M	2400	2400
82M	2400	2400
83M	2400	2400
89M	2400	2400
92M	1200	1200
99M	2400	2400
128M	1200	1200

**Tabulka IX:** Minimální inhibiční koncentrace hydrochinon monomethyletheru rozpuštěného v 96% ethanolu na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou (testované koncentrace 150-9600 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]	
	24 hod	48 hod
21M	2400	2400
62M	2400	2400
77M	2400	2400
80M	2400	2400
82M	2400	2400
83M	2400	2400
89M	2400	2400
92M	2400	2400
99M	2400	2400
128M	2400	2400



**Tabulka X:** Minimální inhibiční koncentrace thymolu rozpuštěného v 50% ethanolu a 2,5% DMSO na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou (testované koncentrace 9,375-1200 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]	
	24 hod	48 hod
21M	1200	1200
62M	1200	1200
77M	600	1200
80M	600	600
82M	600	600
83M	600	600
89M	1200	1200
92M	600	1200
99M	600	600
128M	600	600

**Tabulka XI:** Minimální inhibiční koncentrace arbutinu rozpuštěného v 2,5% DMSO na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou (testované koncentrace 750-6000 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]	
	24 hod	48 hod
21M	>6000	>6000
62M	>6000	>6000
77M	>6000	>6000
80M	>6000	>6000
82M	>6000	>6000
83M	>6000	>6000
89M	>6000	>6000
92M	>6000	>6000
99M	>6000	>6000
128M	>6000	>6000

**Tabulka XII:** Minimální inhibiční koncentrace katechin hydrátu rozpuštěného v 2,5% DMSO na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou (testované koncentrace 375-6000 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]	
	24 hod	48 hod
21M	3000	> 6000
62M	-	> 6000
77M	3000	> 6000
80M	1500	> 6000
82M	3000	> 6000
83M	3000	> 6000
89M	3000	> 6000
92M	3000	> 6000
99M	3000	> 6000
128M	3000	> 6000

V tabulkách XIII-XX jsou uvedeny nejnižší koncentrace přírodních látek, které inhibovali růst příslušných kmenů *M. hominis* při stanovení zkumavkovou diluční metodou s přímým pipetováním přírodních látek do jednotlivých zkumavek. Většina z takto testovaných látek vykazovala dobré antimikrobiální účinky. *Lavandulae aetheroleum* a *Carvi aetheroleum* inhibovali růst při koncentraci 1200 µg/ml. *Rosmarini aetheroleum* a *Foeniculi aetheroleum* vykazovali aktivitu při 1200-2400 µg/ml. *Eucalypti aetheroleum* se také projevil jako dobře účinný, inhibiční koncentraci jsme určili na 1200-4800 µg/ml. Naopak limonen nevykazoval výraznou antimikrobiální aktivitu, účinnou koncentraci jsme stanovili na 9600-38400 µg/ml, mezi testovanými kmeny byly tedy poměrně velké rozdíly. Aktivita tea tree oil stanovená touto metodou byla velmi dobrá, testované kmeny inhiboval při 1200-2400 µg/ml. Tato hodnota je podstatně nižší než při rozpuštění v 24% ethanolu. Účinky *p-cymenu* byly odlišné od všech předcházejících. Inhibiční koncentraci jsme stanovili až po 5-ti dnech inkubace na 2400-19200 µg/ml, do té doby nebylo možné nárůst *M. hominis* odečíst. I zde jsou významné rozdíly mezi testovanými kmeny.

**Tabulka XIII:** Minimální inhibiční koncentrace *Lavandulae aetheroleum* na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou s přímým pipetováním přírodních látek do jednotlivých zkumavek (testované koncentrace 600-38400 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]	
	24 hod	48 hod
21M	1200	1200
62M	1200	1200
77M	1200	1200
80M	1200	1200
82M	1200	1200
83M	1200	1200
89M	1200	1200
92M	1200	1200
99M	1200	1200
128M	1200	1200

**Tabulka XIV:** Minimální inhibiční koncentrace *Eucalypti aetheroleum* na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou s přímým pipetováním přírodních látek do jednotlivých zkumavek (testované koncentrace 600-38400 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]	
	24 hod	48 hod
21M	2400	4800
62M	1200	1200
77M	1200	1200
80M	1200	1200
82M	1200	2400
83M	1200	2400
89M	1200	1200
92M	2400	2400
99M	1200	1200
128M	2400	2400

**Tabulka XV:** Minimální inhibiční koncentrace *Rosmarini aetheroleum* na kmeny

*M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou s přímým pipetováním přírodních látek do jednotlivých zkumavek (testované koncentrace 600-38400 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]	
	24 hod	48 hod
21M	2400	2400
62M	2400	2400
77M	1200	2400
80M	1200	1200
82M	1200	1200
83M	1200	1200
89M	2400	2400
92M	1200	1200
99M	1200	1200
128M	1200	1200

**Tabulka XVI:** Minimální inhibiční koncentrace *Carvi aetheroleum* na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou s přímým pipetováním přírodních látek do jednotlivých zkumavek (testované koncentrace 600-38400 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]	
	24 hod	48 hod
21M	1200	1200
62M	1200	1200
77M	1200	1200
80M	1200	1200
82M	1200	1200
83M	1200	1200
89M	netestováno	netestováno
92M	1200	1200
99M	1200	1200
128M	1200	1200

**Tabulka XVII:** Minimální inhibiční koncentrace limonenu na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou s přímým pipetováním přírodních látek do jednotlivých zkumavek (testované koncentrace 600-38400 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]	
	24 hod	48 hod
21M	19200	19200
62M	19200	19200
77M	19200	19200
80M	19200	19200
82M	19200	19200
83M	9600	9600
89M	38400	38400
92M	9600	9600
99M	9600	9600
128M	38400	38400

**Tabulka XVIII:** Minimální inhibiční koncentrace *Foeniculi aetheroleum* na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou s přímým pipetováním přírodních látek do jednotlivých zkumavek (testované koncentrace 600-38400 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]	
	24 hod	48 hod
21M	1200	1200
62M	1200	1200
77M	1200	1200
80M	1200	1200
82M	1200	1200
83M	2400	2400
89M	1200	1200
92M	2400	2400
99M	1200	1200
128M	2400	2400

**Tabulka XIX:** Minimální inhibiční koncentrace tea tree oil na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou s přímým pipetováním přírodních látek do jednotlivých zkumavek (testované koncentrace 600-38400 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]	
	24 hod	48 hod
21M	1200	1200
62M	1200	1200
77M	1200	1200
80M	1200	1200
82M	1200	1200
83M	1200	1200
89M	1200	1200
92M	1200	1200
99M	1200	1200
128M	2400	2400

**Tabulka XX:** Minimální inhibiční koncentrace *p*-cymenu na kmeny *M. hominis* stanovené zkumavkovou diluční metodou s přímým pipetováním přírodních látek do jednotlivých zkumavek (testované koncentrace 600-38400 µg/ml)

kmen <i>M. hominis</i>	MIC [µg/ml]
	5 dní
21M	2400
62M	4800
77M	4800
80M	4800
82M	4800
83M	9600
89M	4800
92M	9600
99M	19200
128M	19200

**Tabulka XXI:** Rozpustnost a vzhled rozpuštěných testovaných látek

přírodní látka	rozpouštědlo	rozpustnost	vzhled
karvakrol	24% ethanol	dobře rozpustný	bezbarvý roztok
tea tree oil	24% ethanol	špatně rozpustný	bezbarvá emulze
methylgallát	96% ethanol	dobře rozpustný	nažloutlý roztok
ethylgallát	96% ethanol	dobře rozpustný	bezbarvý roztok
hydrochinon monomethylether	96% ethanol	dobře rozpustný	bezbarvý roztok
thymol	50% ethanol a 2,5% DMSO	dobře rozpustný	bezbarvý roztok
arbutin	2,5% DMSO	dobře rozpustný	bezbarvý roztok
katechin hydrát	2,5% DMSO	špatně rozpustný	běžová suspenze
karvakrol	PPLO bujón	špatně rozpustný	neovlivnil zbarvení PPLO bujónu

**Tabulka XXII:** Vzhled testovaných látek po přímém pipetování do jednotlivých zkumavek

přírodní látka	vzhled
<i>Lavandulae aetheroleum</i>	všechny látky vytvořili emulze neovlivňující barvu PPLO bujónu
<i>Eucalypti aetheroleum</i>	
<i>Rosmarini aetheroleum</i>	
<i>Carvi aetheroleum</i>	
<i>Foeniculi aetheroleum</i>	
tea tree oil	
limonen	

## 5 DISKUSE A ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zjištění antimikrobiálních účinků vybraných přírodních látek na kmeny *M. hominis*. Testovali jsme účinek 15ti přírodních látek na 10 různých kmenů *M. hominis*. Všechny testované kmeny byly vykultivovány ze stěrů krčku děložního žen.

Při testování zkumavkou diluční metodou jsme vybrané látky rozpouštěli v ethanolu nebo DMSO. Abychom zajistili, že výsledná koncentrace obou použitých rozpouštědel nebude ovlivňovat růst *M. hominis*, stanovili jsme nejprve inhibiční procentuální koncentraci obou solventů. Výsledné použité koncentrace rozpouštědel v PPLO bujónu nijak neovlivňovali růst *M. hominis* a tedy ani stanovení antimikrobiální aktivity testovaných látek.

Při testování látek vytvářejících emulze jsme použili způsob přímého pipetování čistých látek do jednotlivých zkumavek. Tím jsme zajistili, že v každé zkumavce byla přesně požadovaná koncentrace dané látky. Při testování diluční metodou, tedy při ředění emulze, bychom si nemohli být jisti, že skutečná koncentrace odpovídá koncentraci požadované.

Zjištěné inhibiční koncentrace byly ovlivněny použitým rozpouštědlem a metodou testování. Srovnání účinnosti daných látek v různých rozpouštědlech nebylo předmětem této práce. U dvou testovaných látek lze však provést srovnání při testování s použitím rozpouštědla a bez něj. U obou látek jsme bez použití rozpouštědla zjistili vyšší antimikrobiální aktivitu.

Porovnání výsledků s již publikovanými údaji o antimikrobiální aktivitě přírodních látek na *M. hominis* bylo možné jen u tea tree oil a arbutinu. Studie zabývající se antibakteriálním účinkem ostatních námi testovaných přírodních látek na bakterii *M. hominis* jsme v dostupné literatuře nenalezli. Výsledky jsme tedy porovnali alespoň s antimikrobiální aktivitou daných přírodních látek proti různým druhům mikroorganismů. Toto srovnání je však pouze orientační.



Jako nejúčinnější se projeví fenolické monoterpeny karvakrol a thymol. Dorman a Deans (2000) uvádějí, že antimikrobiální aktivita těchto sloučenin závisí na poloze hydroxylových skupin v molekule.

**Karvakrol** byl v 24% ethanolu poměrně dobře rozpustný a vytvářel bezbarvý roztok. Všechny námi testované kmeny inhiboval při koncentraci 300 µg/ml.

V čistém PPLO bujónu se karvakrol rozpouštěl poměrně špatně, ale jeho inhibiční koncentrace byla nižší, pohybovala se v rozmezí 59,2–236,7 µg/ml. Většina kmenů byla inhibována při koncentraci 118,4 µg/ml.

Wong a kol. (2008) uvádějí, že účinná koncentrace karvakrolu na *My. avium* ssp. *paratuberculosis* je 72,2 µg/ml. Testování prováděli bujónovou diluční metodou, použité rozpouštědlo však neuvádějí. Burt a kol. (2005) testovali účinnost karvakrolu na *E. coli* O157:H7, MIC stanovili na 1,2 mmol/l. Nostro a kol. (2007) zkoumali účinnost na biofilmy *S. aureus* a *S. epidermidis*, inhibiční koncentraci stanovili 0,031-0,125 %.

Velmi dobře účinný byl také **thymol**. V 50% ethanolu a 2,5% DMSO se rozpouštěl poměrně dobře, ale po přidání DMSO se vytvořila mírná emulze.

Účinná koncentrace se pohybovala v rozmezí 600-1200 µg/ml. Většina kmenů byla inhibována při koncentraci 600 µg/ml.

Olasupo a kol. (2003) uvádějí, že účinná koncentrace thymolu na *Sal. enterica* serovar Typhimurium je 1 mmol/l a inhibiční koncentrace na *E. coli* je 1,2 mmol/l. Burt a kol. (2005) testovali účinek na *E. coli* O157:H7, inhibiční koncentraci stanovili na 1,2 mmol/l. Tyto údaje jsou nižší než námi zjištěné inhibiční koncentrace na *M. hominis*. Nostro a kol. (2007) zkoumali jeho účinky na biofilmy *S. aureus* a *S. epidermidis*, inhibiční koncentraci stanovili 0,031-0,125 %. Kiskó a Roller (2005) zkoumali účinek thymolu na *E. coli* O157:H7 v jablečném džusu. Zjistili, že při koncentraci 1,25 mM redukoval bakteriální buňky na nedetekovatelné množství.

**Methylgallát** se v 96% ethanolu rozpouštěl velmi dobře, došlo ke vzniku mírně nažloutlého roztoku.

Námi zjištěná účinnost byla poměrně dobrá, testované kmeny *M. hominis* inhiboval při koncentracích 1200-2400 µg/ml. Pouze 1 kmen byl inhibován při 1200 µg/ml, ostatní při 2400 µg/ml.

Choi a kol. (2008) testovali jeho účinky na bakterie rodu *Salmonella* z klinických izolátů. Uvádějí, že inhibiční koncentrace je v rozmezí 3,9-125 µg/ml. Kang a kol. (2008) stanovili účinnou koncentraci na orální bakterie na 1-8 mg/ml, a na biofilmy *Str. mutans* na 1 mg/ml.

**Ethylgallát** se v 96% ethanolu také rozpouštěl velmi dobře, vznikl bezbarvý roztok.

Námi zjištěná účinnost byla stejná jako u methylgallátu, tedy 1200-2400 µg/ml. Téměř všechny testované kmeny byly inhibovány při 2400 µg/ml, pouze 2 při koncentraci 1200 µg/ml.

Johnstone a Little (1953) zkoumali účinnost ethylgallátu na *My. tuberculosis*, nad koncentraci 200 µg/ml vykazoval baktericidní účinky. Jiné publikace zabývající se inhibičními účinky ethylgallátu jsme nenalezli.

**Hydrochinon monomethylether** se v 96% ethanolu dobře rozpouštěl a vytvářel bezbarvý roztok.

Jeho zjištěná účinnost byla poměrně dobrá, všechny testované kmeny inhiboval při koncentraci 2400 µg/ml.

V dostupné literatuře jsme nenalezli žádné publikace zabývající se inhibičními účinky hydrochinon monomethyletheru.

**Arbutin** jsme rozpouštěli v 2,5% DMSO, jeho rozpustnost byla velmi dobrá, vytvářel bezbarvý roztok.

Námi zjištěná inhibiční aktivita byla poměrně nízká. Hodnota byla vyšší než nejvyšší testovaná koncentrace 6000 µg/ml.

Robertson a Howard (1987) testovali efekt arbutinu na růst *M. hominis*. Zjistili, že v koncentraci 2,2 mM vykazoval inhibiční účinky, ale pouze na některé

kmeny. Jiné studie zabývající se účinkem arbutinu na jakékoliv jiné mikroby jsme nenalezli.

**Katechin hydrát** se v 2,5% DMSO rozpouštěl poměrně špatně, ani po zahřátí nedošlo k úplnému rozpuštění, vznikla mírně nahnědlá suspenze.

Námi zjištěný účinek byl poměrně nízký. Po 24 hodinové inkubaci jsme stanovili inhibiční koncentraci na 1500-3000 µg/ml, po 48 hod však u všech kmenů stoupla nad nejvyšší testovanou koncentraci 6000 µg/ml.

Mabe a kol. (1999) testovali účinnost katechinu na *H. pylori*, MIC 90 stanovili na 64 µg/ml. Jiné publikace týkající se katechinu jsme v dostupné literatuře nenalezli.

Při použití zkumavkové diluční metody s přímým pipetováním do jednotlivých zkumavek všechny testované látky vytvářely bezbarvé emulze, resp. emulze nijak nezměnili vzhled PPLO bujónu. V dostupné literatuře jsme nenalezli žádné publikace, v nichž by autoři využili přímého pipetování testovaných látek bez předchozího rozpouštění. Proto zde není možné porovnání námi zjištěných účinků na *M. hominis* s účinky na jiné bakterie. Pro představu zde uvádíme alespoň účinnosti přírodních látek na různé bakterie při použití jiných testovacích metod.

**Tea tree oil** se v 24% ethanolu rozpouštěl poměrně špatně. Námi určená inhibiční aktivita nebyla vysoká. Růst dvou testovaných kmenů potlačoval při koncentraci 9600 µg/ml, u ostatních kmenů nebyla inhibiční koncentrace stanovena, přesahovala hodnotu 9600 µg/ml.

Při testování metodou přímého pipetování do jednotlivých zkumavek byla jeho antimikrobiální aktivita výrazně vyšší, růst testovaných kmenů inhiboval při koncentraci 1200-2400 µg/ml.

Furneri a kol. (2006) zkoumali jeho aktivitu na *M. hominis*. MIC 90 stanovili 0,12 %. LaPlante (2007) testoval jeho účinek na methicilin-resistentní *S. aureus* (MRSA). Inhibiční koncentraci stanovil na 1024 mg/l. Mondello a kol. (2009) uvádějí, že inhibiční koncentrace tea tree oil na *Legionella pneumophila* je 0,125-0,5 %. Carson a kol. (2006) uvádějí jeho účinnost na mnoho bakterií. Růst *B. cereus*

inhiboval tea tree oil při 0,3% koncentraci, *S. aureus* (MRSA) při 0,04-0,35%, *E. coli* a *Proteus vulgaris* při 0,08-0,2%, *Enterococcus faecalis* při 0,5->8%, *Ps. aeruginosa* při 1-8%.

Inhibiční účinnost *Lavandulae aetheroleum* byla při použití metody přímého pipetování jednotlivých zkumavek velmi dobrá, u všech kmenů jsme ji stanovili na 1200 µg/ml.

Soylu a kol. (2006) testovali jeho účinek na *Phytophthora infestans*, účinný byl při 25,6 µg/ml. D'Auria a kol. (2005) stanovili inhibiční koncentraci na *Can. albicans* 0,69-1,04 %. Mahady a kol. (2005) uvádějí, že inhibiční koncentrace extraktu z květů *Lavandula angustifolia* na *H. pylori* byla 100 µg/ml.

*Eucalypti aetheroleum* byl také dobře účinný, jeho inhibiční koncentraci jsme stanovili na 1200-4800 µg/ml.

Opletal a Šimerda (2005) uvádějí, že tato silice má *in vitro* významný antimikrobiální účinek vůči *E. coli*, *Str. faecalis*, *S. aureus*, *Ps. aeruginosa* a zvláště na *My. avium*, tlumí také růst některých mikromycet.

*Rosmarini aetheroleum* vykazoval dobrou aktivitu, jeho inhibiční koncentrace byla také velmi dobrá, růst testovaných kmenů zabraňoval při koncentraci 1200-2400 µg/ml.

Soylu a kol. (2006) zjišťovali jeho účinek na *Phytophthora infestans*, inhibiční koncentraci určili na 12,8 µg/ml. Mahady a kol. (2005) uvádějí, že extrakt z listů *Rosmarinus officinalis* účinkoval na *H. pylori* při koncentraci 25 µg/ml. Prabussenivasan a kol. (2006) zjišťovali jeho účinky agarovou diluční metodou na několik bakterií. Koncentrace inhibující růst *S. aureus* a *Klebsiella pneumoniae* byla >12,8 mg/l, u *B. subtilis*, *E. coli* a *Proteus vulgaris* byla >6,4 mg/l. Fu a kol. (2007) stanovili aktivitu proti *Propionibacterium acnes* na 0,56 mg/l.

*Carvi aetheroleum* se také projevil jako dobře účinný, všechny testované kmeny *M. hominis* inhiboval při 1200 µg/ml.

Mahady a kol. (2005) uvádějí, že inhibiční koncentrace extraktu ze semen *Carum carvi* na *H. pylori* byla 100 µg/ml. Jiné publikace zabývající se účinností kmínové silice jsme v dostupné literatuře nenalezli.

***Foeniculi aetheroleum*** vykazoval podobné účinky jako ostatní testované esenciální oleje, růst kmenů inhiboval při koncentraci 1200-2400 µg/ml.

Opletal a Šimerda (2005) uvádějí, že fenyklová silice vykazuje účinnost proti *E. coli*, *Str. pyogenes*, *S. aureus*, *My. avium* a *B. cereus*. Účinné koncentrace zde však neuvádějí. Mahady a kol. (2005) testovali účinek extraktu ze semen *Foeniculi vulgare* na *H. pylori*. Inhibiční koncentraci stanovili na 100 µg/ml. Jiné studie zabývající se antimikrobiální aktivitou fenyklové silice jsme v dostupné literatuře nenalezli.

Limonen a *p*-cymen se projeví jako látky poměrně málo účinné.

**Limonen**, resp. R(+)-limonen inhiboval růst testovaných kmenů v poměrně širokém rozmezí koncentrací, 9600-38400 µg/ml. Růst poloviny kmenů byl inhibován při 19200 µg/ml, u ostatních limonen zabránil růstu při koncentracích 9600 µg/ml nebo 38400 µg/ml.

O'Bryan a kol. (2008) testovali účinek d-limonenu proti *Sallmonella* sp., jako účinnou koncentraci uvádějí 1 %.

Při testování ***p*-cymenu** musela být inkubační doba prodloužena na 5 dní, neboť do té doby se výsledky růstu nedaly odečíst. Po této době jsme inhibiční koncentraci stanovili na 2400-19200 µg/ml. I zde byly poněkud výraznější rozdíly mezi jednotlivými testovanými kmeny.

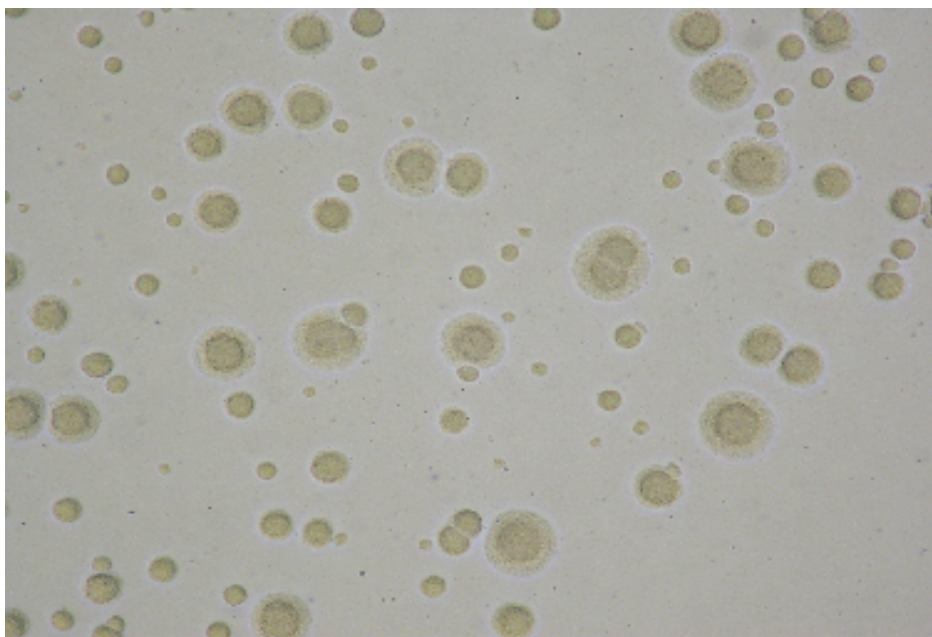
Kiskó a Roller (2005) testovali účinek *p*-cymenu na *E. coli* O157:H7 v jablečném džusu. Uvádějí, že koncentrace 1,25 mM redukovala počet bakteriálních buněk. Burt a kol. (2005) také zkoumali jeho účinek na *E. coli* O157:H7, inhibiční koncentraci stanovili na >50mmol/l.

Hledáním přírodních látek s antimikrobiální aktivitou a testováním citlivosti mikrobů k těmto látkám se v současnosti zabývá mnoho laboratoří po celém světě. Přírodní látky by totiž bylo vhodné využít k léčebným účelům jako náhradu antibiotik, případně využít jejich vzájemnou kombinaci.

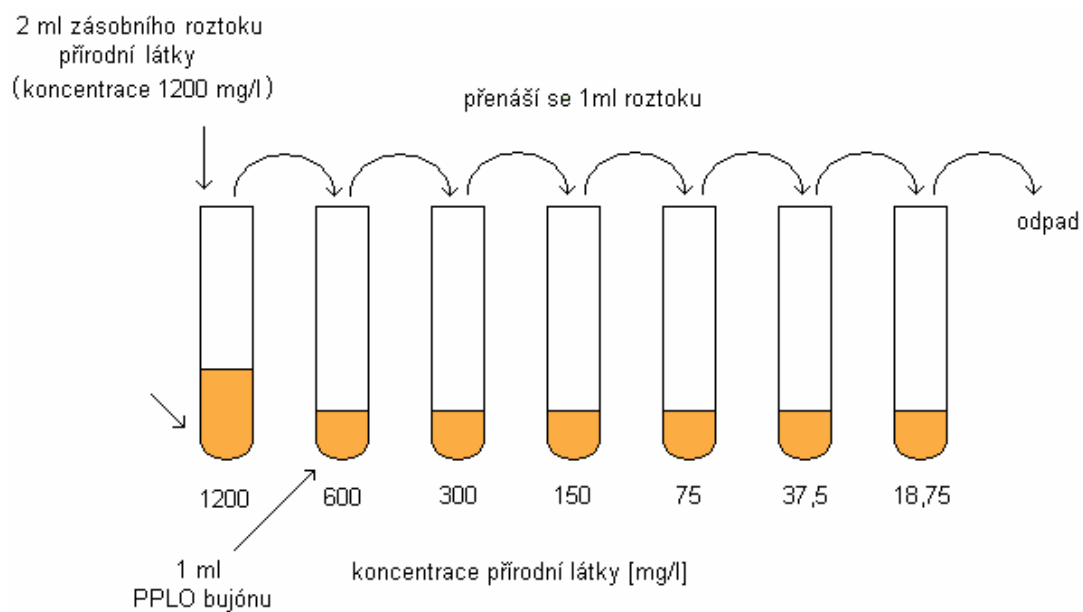
Důvodů pro pokračování v těchto studiích je hned několik. Jedním z nejdůležitějších je, že v současné době je velkým problémem vzrůstající rezistence mikrobů na antibiotika. Významné je také hledisko nežádoucích dopadů na organismus. Antibiotika jsou pro lidský organismus poměrně toxická. Oproti tomu jsou přírodní látky mnohem menší zátěží, jsou méně toxické a snadněji se odbourávají. Přírodní látky jsou také poměrně snadno dostupné, neboť jsou obsaženy ve velkém množství rostlin.

## PŘÍLOHA

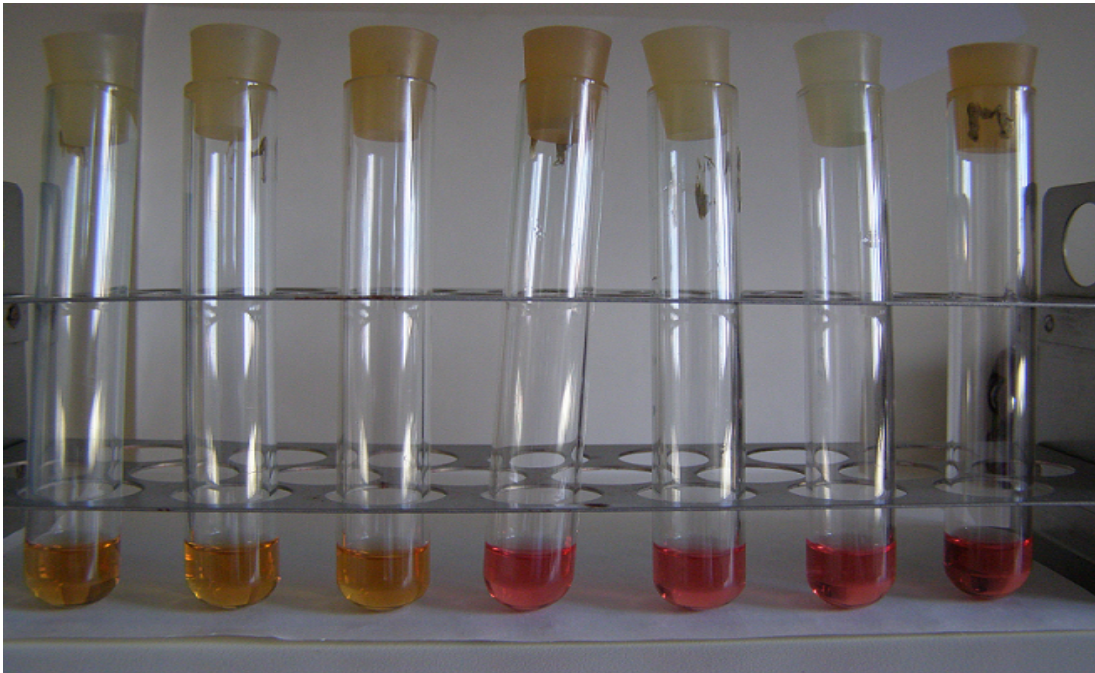
**Obrázek 10:** Růst *M. hominis* na PPLO agaru (vzhled charakteristického „sázeného vejce“, zvětšení 150x)



**Obrázek 11:** Ředění přírodní látky v PPLO bujónu



**Obrázek 12:** Inhibice růstu *M. hominis* ve zkumavkách s klesající koncentrací přírodní látky





**SEZNAM LITERATURY**

*Arbutin* [online] [cit. 2008-11-21]. Dostupné z:  
<<http://chemicalland21.com/lifescience/foco/ARBUTIN.htm>>

*Flavonoids* [online] [cit. 2008-11-25]. Dostupné z:  
<<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/flavonoids/index.html>>

*Hydroquinone monomethylether* [online] [cit. 2008-12-15]. Dostupné z:  
<<http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/4-methoxyphenol/recognition.html>>

*Hydroquinone monomethylether* [online] [cit. 2008-12-15]. Dostupné z:  
<<http://chemicalland21.com/specialtychem/perchem/4-METHOXYPHENOL.htm>>

*Limonene* [online] [cit. 2008-12-22]. Dostupné z:  
<<http://chemicalland21.com/specialtychem/perchem/LIMONENE%20OXIDE.htm>>

*Melaleuca alternifolia* [online] [cit. 2008-12-16]. Dostupné z:  
<<http://chemicalland21.com/lifescience/foco/TEA%20TREE%20OIL.htm>>

*Thymol* [online] [cit. 2008-11-21]. Dostupné z:  
<<http://chemicalland21.com/lifescience/phar/THYMOL.htm>>

*Tea tree oil* [online] [cit. 2008-12-16]. Dostupné z:  
<<http://www.wisegeek.com/what-is-tea-tree-oil.htm>>

<<http://sigmaaldrich.com>>

ALMA, M. H.; MAVI, A.; YILDIRIM, A.; DIGRAK, M., HIRATA, T.: Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum Syriacum* L. growing in Turkey. *Biol. Pharm. Bull.*, 2003, roč. 26, č.12, s. 1725-9

ANDERSON, D. R.; BARILE, M. F.: Ultrastructure of *Mycoplasma hominis*. *J. Bacteriol.*, 1965, roč. 90, č. 1, s. 180-92

ANGELINI, L. G.; CARPANESE, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I.; MACCHIA, M.; FLAMINI, G.: Essential oils from Mediterranean lamiaceae as weed germination inhibitors. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, roč. 51, č. 21, s. 6158-64

ARYA, O. P.; TONG, C. Y.; HART, C. A.; PRATT, B. C.; HUGHES, S.; ROBERTS, P.; KIRBY, P.; HOWEL, J.; McCORMICK, A.; GODDARD, A. D.: Is *Mycoplasma hominis* a vaginal pathogen?. *Sex Transm. Infect.*, 2001, roč. 77, č. 1, s. 58-62

BACZYNSKA, A.; FRIIS SVENSTRUP, H.; FEDDER, J.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G.: The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycoplasma hominis* antibodies in infertile women serum samples. *Hum. Reprod.*, 2005, roč. 20, č. 5, s. 1277-85

BACZYNSKA, A.; SVENSTRUP, H. F.; FEDDER, J.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G.: Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. *BMC Microbiol.*, 2004, roč. 4, s. 35

BEDNÁŘ, M.; FRAŇKOVÁ, V.; SCHINDLER, J.; SOUČEK, A.; VÁVRA, J.: *Lékařská mikrobiologie*, Marvil, 1996, s. 169-170, 319-323

BOESEN, T.; FEDOSOVA, N. U.; KJELDGAARD, M.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G.: Molecular design of *Mycoplasma hominis* Vaa adhesin. *Protein Sci.*, 2001, roč. 10, č. 12, s. 2577-86

BURT, S. A.; VLIELANDER, R.; HAAGSMAN, H. P.; VELDHUIZEN, E. J.: Increase in activity of essential oils components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. *J. Food Prot.*, 2005, roč. 68, č. 5, s. 919-26

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V.: *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006, roč. 19, č. 1, s. 50-62

CASTELLANO-GONZÁLES, M.; GINESTRE-PÉREZ, M.; PEROZO-MENA, A.; ALAÑA, F.; FERNÁNDEZ-BRAVO, M.; RINCÓN-VILLALOBOS, G.: Vaginal colonization by genital mycoplasmas in pregnant and non-pregnant women. *Invest. Clin.*, 2007, roč. 48, č. 4, s. 419-29

COWAN, M. M.: Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999, roč. 12, č. 4, s. 564-82

CUMMINGS, M. C.; McCORMACK, W. M.: Increase in resistance of *Mycoplasma hominis* to tetracyclines. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1990, roč. 34, č. 12, s. 2297-9

ČÍŽEK, A: Praktika z veterinární bakteriologie a mykologie, Ústav mikrobiologie a imunologie FVL VFU Brno, 1999, s. 31-32

D'AURIA, F. D.; TECCA, M.; STRIPPOLI, V.; SALVATORE, G.; BATTINELLI, L.; MAZZANTI, G.: Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essentials oil against *Candida albicans* yeast and mycelia form. *Med. Mycol.*, 2005, roč. 43, č. 5, s. 391-6

DORMAN, H. J.; DEANS, S. G.: Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 2000, roč. 88, č. 2, s. 308-316

ELIAS, M.; GRZEŚKO, J.; SIEJKOWSKI, R.; NOWICKA, J.; MACZYŃSKA, B.; GOLUDA, M.; ST GABRYŚ, M.: The presence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in the cervical canal of uterus. *Ginecol. Pol.*, 2005, roč. 76, č. 1, s. 28-32

EVANS, G. E.; ANDERSON, T. P.; SEAWARD, L. M.; MURDOCH, D. R.: Evaluation of the Mycoplasma Duo kit for the detection of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* from urogenital and placental specimens. *Br. J. Biomed. Sci.*, 2007, roč. 64, č. 2, s. 66-9

FENCKI, V.; YILMAZER, M.; AKTEPE, O. C.: Have *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* any significant effect on women fertility?. *Infez. Med.*, 2002, roč. 10, č. 4, s. 220-3

FU, Y.; ZU, Y.; CHEN, L.; EFFERTH, T.; LIANG, H.; LIU, Z.; LIU, W.: Investigation of antibacterial activity of rosemary essentials oil against *Propionibacterium acnes* with atomic force microscopy. *Planta. Med.*, 2007, roč. 73, č. 12, s. 1275-80

FURNERI, P. M.; PAOLINO, D.; SAIJA, A.; MARINO, A.; BISIGNANO, G.: In vitro antimycoplasmal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *J. Antimicrob. Chemoter.*, 2006, roč. 58, č. 3, s. 706-7

FURNERI, P. M.; PIPERINO, A.; SAIJA, A.; BISIGNANO, G.: Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 2004, roč. 48, č. 12, s. 4892-4

FURNERI, P. M.; MARINO, A.; SAIJA, A.; UCCELLA, N.; BISIGNANO, G.: In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 2002, roč. 20, č. 4, s. 293-6

FURNERI, P. M.; RAPPAZZO, G.; MUSUMARRA, M. P.; TEMPERA, G.; ROCCASALVA, L. S.: Genetic basis of natural resistance to erythromycin in *Mycoplasma hominis*. *J. Antimicrob. Chemoter.*, 2000, roč. 45, č. 4, s. 547-8

GÖREN, A. C.; TOPÇU, G.; BILSEL, G.; BILSEL, M.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H.: Analysis of essential oil of *Satureja thymbra* by hydrodistillation,

thermal desorber, and headspace GC/MS techniques and its antimicrobial activity. *Nat. Prod. Res.*, 2004, roč. 18, č. 2, s. 189-95

GREENWOOD, D.; STACK, R. C. B.; PEUTHERER, J. F. a kol.: Lékařská mikrobiologie, Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie, Grada Publishing, 1999, s. 396-398

HANBALI, F. E.; AKSSIRA, M.; EZOUBEIRI, A.; GADHI, C. E.; MELLOUKI, F.; BENHERRAF, A.; BLAZQUEZ, A. M.; BOIRA, H.: Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L.. *J. Ethnopharmacol.*, 2005, roč. 99, č. 3, s. 399-401

HENRICH, B.; FELDMANN, R. C.; HADDING, U.: Cytoadhesins of *Mycoplasma hominis*. *Infect. Immun.*, 1993, roč. 61, č. 7, s. 2945-51

HIRAI, Y.; KANATANI, T.; ONO, M.; MATSUSHITA, O.; KANEMASA, Y.: An indirect immunofluorescence method for detection of *Mycoplasma hominis* in vaginal smears. *Microbiol. Immunol.*, 1991, roč. 35, č. 10, s. 831-9

HONG, E. J.; NA, K. J.; CHOI, I. G.; CHOI, K. C.; JEUNG, E. B.: Antimicrobial and antifungal effects of essential oils from coniferous tree. *Biol. Pharm. Bull.*, 2004, roč. 27, č. 6, s. 863-6

CHOI, J.G.; KANG, O. H.; LEE, Y. S.; OH, Y. C.; CHAE, H. S.; JANG, H. J.; KIM, J. H.; SOHN, D. H.; SHIN, D. W.; PARK, H.; KWON, D. Y.: In vitro activity of methyl gallate isolated from galla rhois alone and in combination with ciprofloxacin against clinical isolates of *Salmonella*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, roč. 18, č. 11., s. 1848-52

IMUDIA, A. N.; DETTI, L.; PUSCHECK, E. E.; YELIAN, F. D.; DIAMOND, M. P.: The prevalence of *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections, and the Rubella status patients

undergoing an initial infertility evaluation. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2008, roč. 25, č. 1, s. 43-6

IVANOVA, A.; DELCHAVA, I.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.; KOSTOVA, I.: GC-MS analysis and anti-microbial activity of acidic fractions obtained from *Paeonia peregrina* and *Paeonia tenuifolia* roots. *Z. Naturforsch. [C]*, 2002, roč. 57, č. 7-8, s. 624-8

JANDOVÁ, B.; KOTOUČKOVÁ, L.: Praktikum z mikrobiologie, MU Brno, 1996, s. 34-58

JOHNSTONE, D. B.; LITTLE, J. E.: Bacteriostatic, bactericidal, and drug resistance studies of ethyl gallate on *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, 1953, roč. 66, č. 3, s. 320-323

KALBAN, V.: Ilustrovaný mikrobiologický slovník, Galén, 2005, s. 352

KALEMBA, D., KUNICKA, A.: Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.*, 2003, roč. 10, č. 10, s. 813-29

KANE, C. J.; MENNA, J. H.; YEH, Y. C.: Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxybenzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virus *in vitro*. I. Purification and characterization of methyl gallate from *Sapium sebiferum*. *Biosci. Rep.*, 1988, roč. 8, č. 1, s. 85-94

KANG, M. S.; OH, J. S.; KANG, I. C.; HONG, S. J.; CHOI, CH.: Inhibitory effect of methylgallate and gallic acid on oral bacteria. *J. Microbiol.*, 2008, roč. 46, č. 6, s. 744-50

KILIC, D.; BASAR, M. M.; KAYGUSUZ, S.; YILMAZ, E.; BASAR, H.; BATISLAM, E.: Prevalence and treatment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma*

*urealyticum*, and *Mycoplasma hominis* in patients with non-gonococcal urethritis. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2004, roč. 57, č.1, s. 17-20

KISKÓ, G.; ROLLER, S.: Carvacrol and *p*-cymene inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *BMC Microbiol.*, 2005, roč. 5, č. 1, s. 36

LAMBERT, R. J.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J.: A study of minimal inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 2001, roč. 91, č. 3, s. 453-62

LaPLANTE, K.L.: In vitro activity of lysostaphin, mupirocin, and tea tree oil against clinical methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2007, roč. 57, č. 4, s. 413-8

LIN, J. S.; ALPERT, S.; RADNAY, K. M.: Combined type-specific antisera in the identification of *Mycoplasma hominis*. *J. Infect. Dis.*, 1975, roč. 131, č. 6, s. 727-30

LYSKOVÁ, P.: Studie výskytu *Mycoplasma hominis* v genitálním ústrojí žen, diplomová práce, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2004

MABE, K.; YMADA, M.; OGUNI, I.; TAKAHASHI, T.: In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, roč. 43, č. 7, s. 1788-91

MAHADY, G. B.; PENDLAND, S. L.; STOJA, A.; HAMILL, F. A.; FABRICANT, D.; DIETZ, B. M.; CHADWICK, L. R.: In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytother. Res.*, 2005, roč. 19, č. 11, s. 188-91

MARTENS, M. G.; YOUNG, R. L.; URIBE, M.; BUTTRAM, V. C.; FARO, S.: Presence of *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and other bacteria in the upper

and lower genital tracts of fertile and infertile populations. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, 1993, roč. 1, č. 2, s. 85-90

MAŠATA, J.; JEDLIČKOVÁ, A. a kol.: Infekce v gynekologii a porodnictví, Maxdorf, 2003, s. 126

MONDELLO, F.; GIROLAMO, A.; SCATURRO, M.; RICCI, M. L.: Determination of *Legionella pneumophila* susceptibility to *Melaleuca alternifolia* cheet (tea tree) oil by an improved broth micro-dillution metod under vapour controlled conditions. *J. Microbiol. Methods.*, 2009

MORAVCOVÁ, J.: Biologicky aktivní přírodní látky, VŠCHT Praha, 2006, s. 11-78

MØLLER, B. R.; TAYLOR-ROBINSON, D.; FURR, P. M.; TOFT, B.; ALLEN, J.: Serological evidence that chlamydiae and mycoplasmas are involved in infertility women. *J. Reprod. Fertil.*, 1985, roč. 73, č. 1, s. 237-40

NOSTRO, A.; ROCCARO, A. S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M. A.; PIZZIMENTI, F. C.; CIONI, P. L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A. R.: Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Med. Microbiol.*, 2007, roč. 56, č. 4, s. 519-23

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V. FLAMINI, G.; MORELLI, I.; SUDANO ROCCARO, A.; ALONZO, V.: Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, roč. 230, č. 2, s. 191-5

O'BRYAN, C. A.; CRANDALL, P. G.; CHALOVA, V. I.; RICKE, S. C.: Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* ssp.. *J. Food. Sci.*, 2008, roč. 73, č. 6, s. M264-7



OLASUPO, N. A.; FITGERALD, D. J.; GASSON, M. J.; NARBAD, A.: Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica serovar typhimurium*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2003, roč. 37, č. 6, s. 448-51

OLSON, L. D.; GILBERT, A. A.: Characteristics of *Mycoplasma hominis* adhesion. *J. Bacteriol.*, 1993, roč. 175, č. 10, s. 3224-7

OPLETAL, L.; ŠIMERDA, B.: Antiinvazivní látky přírodního původu jako aditiva do krmiv, Ministerstvo zemědělství ČR – Vědecký výbor pro výživu zvířat, Výzkumný ústav pro výživu zvířat Praha – Uhřetěves, 2005, s. 27-39

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S.: In vitro antibacterial activity of some plant essentials oils. *BMC Complement Alter. Med.*, 2006, č.6, s. 39

ROBERTSON, J. A.; HOWARD, L. A.: Effect of carbohydrates on growth of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*. *J. Clin. Microbiol.*, 1987, roč. 25, č. 1, s. 160-1

RODRIGUEZ, R.; HERNANDEZ, R.; FUSTER, F.; TORRES, A.; PRIETO, P.; ALBERTSON, J.: Genital infection and infertility. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 2001, roč. 19, č. 6, s. 261-6

SALGUEIRO, L. R.; PINTO, E.; GONÇAVALES, M. J.; PINA-VAZ, C.; CAVALEIRO, C.; RODRIGUES, A. G.; PALMEIRA, A.; TAVARES, C.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.: Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Thymbra capitata*. *Planta. Med.*, 2004, roč. 70, č. 6, s. 572-5

SCHLICHT, M. J.; LOVRICH, S. D.; SARTIN, J. S.; KARPINSKY, P.; CALLISTER, S. M.; AGGER, W. A.: High prevalence of genital mycoplasmas

among sexually active young adults with urethritis or cervicitis symptoms in La Crosse, Wisconsin. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, roč. 42, č. 10, s. 4636-40

SKOCIBUSIĆ, M.; BEZIĆ, N.: Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytother. Res.*, 2004, roč. 18, č. 12, s. 967-70

SMAYEVSKY, J.; CANIGIA, L. F.; LANZA, A.; BIANCHINI, H.: Vaginal microflora associated with bacterial vaginosis in inpregnant women: reliability of sialidase detection. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, 2001, roč. 9, č. 1, s. 17-22

SOYLU, E. M.; SOYLU, S.; KURT, S.: Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia.*, 2006, roč. 161, č. 2, s. 119-28

TAKAHASHI, S.; TAKEYAMA, K.; MIYAMOTO, S.; ICHIHARA, K.; MAEDA, T.; KUNISHIMA, Y.; MATSUKAWA, M.; TSUKAMOTO, T.: Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Ureaplasma parvum* DNAs in urine from asymptomatic healthy young Japanese men. *J. Infect. Chemother.*, 2006, roč. 12, č. 5, s. 269-71

TAYLOR-ROBINSON, D.; BÉBÉAR, C.: Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1997, roč. 40, č. 5, s. 622-30

UNLÜ, M.; VARDAR- UNLÜ, G.; VURAL, N.; DÖNMEZ, E.; OZBAS, Z. Y.: Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Thymbra spicata* L. from Turkey. *Nat. Prod. Res.*, 2009, roč. 23, č. 6, s. 572-9

VENTURINI, M. E.; BLANCO, D.; ORIA, R.: In vitro antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*. *J. Food Prot.*, 2002, roč. 65, č. 5, s. 834-9

VOTAVA, M. a kol.: Lékařská mikrobiologie obecná, 2. přepracované vydání, Neptun, 2005, s. 236-300

VOTAVA, M. a kol.: Lékařská mikrobiologie speciální, Neptun, 2003, s. 169-172

VYTŘASOVÁ; BÍLKOVÁ: Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie, Univerzita Pardubice, 1998, s. 104

WAITES, K. B.; CRABB, D. M.; DUFFY, L. B.: Comparative in vitro activities of the investigational fluoroquinolone DC-159a and other antimicrobial agents against human mycoplasmas and ureaplasmas. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, roč. 52, č. 10, s. 3776-8

WANG, H.; LI, Y.; DING, CH.; ZHAO, X.; YOU, J.; SUO, Y.: Determination of five pharmacologically active compounds extracted from *Rhodiola* for natural product drug delivery with HPLC-APCI-MS. *Journal of Liquid Chromatography & related technologies*, 2006, roč. 29, č. 5-8, s. 857-868

WHANG, W. K.; PARK H. S.; HAM, I. H.; OH, M.; NAMKOONG, H.; KIM, H. K.; HWANG, D. W.; HUR, S. Y.; KIM, T. E.; PARK, Y. G.; KIM, J. R.; KIM, J. W.: Methyl gallate and chemicals structurally related to methyl gallate protect human umbilical vein endothelial cells from oxidative stress. *Exp. Mol. Med.*, 2005, roč. 37, č. 4, s. 343-52

WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M.: Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. *Phytother. Res.*, 2005, roč. 19, č. 7, s. 643-6

WONG, S. Y.; GRANT, I. R.; FRIEDMAN, M.; ELLIOT, C. T.; SITU, C.: Antibacterial activities of naturally occurring compounds against *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, roč. 73, č. 19, s. 5986-90

YANG, H. Y.; ZHOU, Z. D.; LU, H. Y.: Serological survey on mycoplasma infection among three populations in Yunnan province. *Zhonghua. Liu. Xing. Bing. Xue. Za. Zhi.*, 1996, roč. 17, č. 2, s. 91-94

Český lékopis, Grada Publishing, 1997, 1. díl, s. 531

Český lékopis, Grada Publishing, 1997, 2. díl, s. 1271-1733

Český lékopis, Grada Publishing, 1997, 3. díl, s. 2677-2853

Summary report: Committee for veterinary medicinal products, *Carvi aetheroleum*, EMEA, 1998, MRL/414/98-FINAL

Summary report: Committee for veterinary medicinal products, *Eucalypti aetheroleum*, EMEA, 1998, MRL/417/98-FINAL

Summary report: Committee for veterinary medicinal products, *Lavandulae aetheroleum*, EMEA, 1999, MRL/633/99-FINAL

Summary report: Committee for veterinary medicinal products, *Foenuculi aetheroleum*, EMEA, 1998, MRL/418/98-FINAL