

FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ
Katedra biologických a biochemických věd

**SLEDOVÁNÍ ÚČINKŮ PŘÍRODNÍCH
SLOUČENIN A TVORBU BIOFILMU
U MIKROORGANISMŮ KONTAMINUJÍCÍCH
EJAKULÁTY KANCŮ**

Bc. Lucie Kopáčová

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Kopáčová**
Osobní číslo: **C11765**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Sledování účinků přírodních sloučenin a tvorbu biofilmu u mikroorganismů kontaminujících ejakuláty kanců**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

1. Vypracujte literární rešerši týkající se antibakteriální aktivity vybraných přírodních látek a tvorby bakteriálních biofilmů.
2. U přírodních látek zjistěte zkumavkovou diluční metodou nejnižší koncentraci inhibující růst bakteriálních kmenů vykultivovaných z ejakulátů kanců.
3. Modifikovanou Christensenovou metodou v mikrotitračních destičkách ověřte u vybraných bakteriálních kmenů tvorbu biofilmu.
4. Získané výsledky vyhodnoťte a porovnejte s publikovanými poznatky.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. MVDr. Jaroslava Mazurová, CSc.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

Mgr. Rudolf Kukla

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **1. října 2012**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2013**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2013

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6.5.2013

Bc. Lucie Kopáčová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří se mnou v průběhu mé diplomové práce spolupracovali a pomáhali mi. Děkuji především vedoucí diplomové práce doc. MVDr. J. Mazurové, CSc. za její podporu a profesionální metodickou pomoc při zpracování diplomové práce. Dále patří poděkování mému konzultantovi Mgr. R. Kuklovi, za jeho trpělivost a užitečné rady.

Na závěr bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za morální i finanční podporu při studiu.

SOUHRN

Diplomová práce je rozdělena do dvou na sebe navazujících souborů. V první části byly ověřovány inhibiční účinky přírodních látek na mikroorganismy vykultivované z kančích ejakulátů. Ve druhé části sledována schopnost tvorby mikrobiálního biofilmu těchto mikroorganismů.

Cílem bylo ověření antimikrobiálních účinků a stanovení minimální inhibiční koncentrace přírodních látek α -pinenu, β -pinenu, karvakrolu, eugenolu, kyseliny gallové, *p*-cymenu a thymolu zkumavkovou diluční metodou v Mueller-Hintonově bujónu při různých teplotách a s různou koncentrací bakteriálních buněk v inokulu. Sloučeniny byly rozpouštěny ve 24% etanolu.

Antimikrobiální aktivita byla ověřována u kmenů *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus sp.*, *Candida lipolytica* a *Staphylococcus epidermidis*.

Nejnižší účinné koncentrace byly zjištěny u thymolu, jejich hodnota byla 150-600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a karvakrolu s minimální inhibiční koncentrací 150-1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro všechny kmeny.

Tvorba biofilmu byla zjišťována modifikovanou Christensenovou metodou v mikrotitrační destičce v mozko-srdcovém bujónu u druhů *Aeromonas sp.*, *Candida lipolytica*, *Enterococcus durans*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Morganella morganii*, *Proteus sp.*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus porcinus*. Většina kmenů byla vykultivována z kančího ejakulátu, pouze *Enterococcus sp.* pocházel ze sbírky katedry biologických a biochemických věd.

Schopnost tvorby biofilmu byla prokázána u *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.*, *Providencia stuartii* a *Candida lipolytica*.

klíčová slova: antimikrobiální účinky přírodních sloučenin, zkumavková diluční metoda, minimální inhibiční koncentrace, přírodní látky, bakteriální biofilm, modifikovaná Christensenova metoda, *Enterococcus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Proteus sp.*

SUMMARY

The thesis is divided into two consecutive sections. In the first part inhibitory effects of natural substances were examined on microorganisms isolated from boar semen. The second part was focused on the evaluation of the microbial biofilm formation of these microorganisms.

The aim of the first part of this work was to verify the antimicrobial effects and to determine minimum inhibitory concentration of α -pinene, β -pinene, carvacrol, eugenol, gallic acid, *p*-cymene and thymol using broth tube dilution assay in Mueller-Hinton broth at different temperatures and with varying concentration of bacterial cells in the inoculum. Natural compounds were dissolved in 24% ethanol.

Antimicrobial activity was tested on strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus sp.*, *Candida lipolytica* and *Staphylococcus epidermidis*.

The most effective concentration has been observed for the thymol their value was 150-600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and carvacrol with minimum inhibitory concentration 150-1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for all tested strains.

Biofilm formation was measured by modified Christensen method in microtiter plates in Brain Heart Infusion broth. Tested microorganisms were *Aeromonas sp.*, *Candida lipolytica*, *Enterococcus durans*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Morganella morganii*, *Proteus sp.*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus porcinus*. Most strains were isolated from boar semen, only *Enterococcus sp.* came from the collection of the Department of Biological and Biochemical Science.

Ability of biofilm formation was established for *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.*, *Providencia stuartii* and *Candida lipolytica*.

keywords: antimicrobial activity natural substances, broth dilution bioassay, minimum inhibitory concentration, essential oils, bacterial biofilm, modified Christensen method, *Enterococcus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Proteus sp.*

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AGR	accessory Gene Regulator
BHI	Brain Heart Infusion bujón
C.	<i>Candida</i>
CFU	colony-forming unit
DMSO	dimethylsulfoxid
E.	<i>Escherichia</i>
EPS	extracelulární polysacharidová substance
FFHK	farmaceutická fakulta v Hradci Králové
G-	gramnegativní
G+	grampozitivní
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KBBV	katedra biologických a biochemických věd
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MHB	Mueller-Hintonův bujón
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	meticilin rezistentní kmeny <i>Staphylococcus aureus</i>
OD	optická denzita
PBS	pufrovaný fyziologický roztok
Ps.	<i>Pseudomonas</i>
QS	quorum sensig
SFME	mikrovlná extrakce
sp.	<i>species</i>
St.	<i>Staphylococcus</i>
Str.	<i>Streptococcus</i>
VAN	vankomycin rezistentní

OBSAH

ÚVOD.....	12
A. PŘÍRODNÍ LÁTKY	
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	13
1.1 VÝZNAM STUDIA PŘÍRODNÍCH LÁTEK	13
1.1 ZDROJE PŘÍRODNÍCH LÁTEK A ZPŮSOBY JEJICH SEPARACE	14
1.3 MECHANISMUS ÚČINKU PŘÍRODNÍCH LÁTEK NA BAKTERIE A KVASINKY	16
1.4 VYBRANÉ SKUPINY PŘÍRODNÍCH LÁTEK S ANTIMIKROBIÁLNÍMI ÚČINKY	19
1.4.1 Alkaloidy	19
1.4.2 Fenoly a polyfenoly	19
1.4.2.1 Jednoduché fenoly a fenolové kyseliny	19
1.4.2.2 Chinony	20
1.4.2.3 Flavonoidy	20
1.4.3 Terpeny	21
1.4.4 Glykosidy.....	22
1.4.5 Silice	22
1.5 VLASTNOSTI TESTOVANÝCH PŘÍRODNÍCH LÁTEK	23
1.5.1 Thymol	23
1.5.2 Karvakrol	25
1.5.3 Eugenol	27
1.5.4 Kyselina gallová	28
1.5.5 α-pinen	29
1.5.6 β-pinen	30

1.5.7	<i>p</i> -cymen	31
1.6	METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI BAKTERIÍ K ANTIMIKROBIÁLNÍM LÁTKÁM	32
1.6.1	Kvalitativní metody	32
1.6.1.1	Disková difúzní metoda	32
1.6.1.2	Agarová difúzní metoda	33
1.6.2	Kvantitativní metody	33
1.6.2.1	Agarová diluční metoda	34
1.6.2.2	Bujónová diluční metoda	35
1.6.2.3	Diluční mikrometoda	35
2.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
2.1	MATERIÁL A METODY	37
2.1.1	Přírodní látky	37
2.1.2	Bakteriální kmeny	38
2.1.3	Kultivační média	38
2.1.4	Roztoky a činidla	39
2.1.5	Pomůcky a přístroje	39
2.2	PRACOVNÍ POSTUP	40
2.2.1	ZJIŠŤOVÁNÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE PŘÍRODNÍCH LÁTEK	40
2.2.1.1	Příprava zásobního roztoku přírodní látky	40
2.2.1.2	Příprava bakteriální suspenze	40
2.2.1.3	Příprava ředící řady	40
2.3	VÝSLEDKY A DISKUZE	42

B. BAKTERIÁLNÍ BIOFILM

3. TEORETICKÁ ČÁST.....	55
3.1 BAKTERIÁLNÍ BIOFILM	55
3.2 TVORBA BIOFILMU	56
3.3 MOŽNOSTI PRŮKAZU TVORBY BIOFILMU	58
3.4 REZISTENCE BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK ŽIJÍCÍCH V BIOFILMU NA ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	59
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	61
4.1 MATERIÁL A METODY	61
4.1.1 Bakteriální kmeny	61
4.1.2 Kultivační média	61
4.1.3 Roztoky a činidla	62
4.1.4 Pomůcky a přístroje	62
4.2 PRACOVNÍ POSTUP-MODIFIKOVANÁ CHRISTENSENOVA METODA	63
4.3 VÝSLEDKY A DISKUZE	64
ZÁVĚR	67
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68
PŘÍLOHY	86

ÚVOD

Jedním z faktorů negativně ovlivňujících výsledky reprodukce v chovech prasat může být použití kontaminovaného spermatu k inseminaci prasnic.

V současnosti je dekontaminace ejakulátů prováděna antibiotiky. Z důvodu narůstající rezistence mikroorganismů na uvedená léčiva a omezování jejich používání mimo léčebné účely je snahou veterinární služby antibiotika nahradit.

Již po staletí jsou známé léčivé účinky látek obsažených v různých přírodních zdrojích, zejména rostlinách, mezi které patří i antimikrobiální účinky. Cílem diplomové práce bylo ověřit inhibiční účinky vybraných přírodních sloučenin na mikroorganismy vykultivované z kančích ejakulátů.

Významným faktorem virulence bakterií i kvasinek je schopnost vytvářet na pevných površích přisedlá, často i mnohvrstevná společenstva obalená mezibuněčnou polymerní substancí tzv. biofilm.

Růst ve formě biofilmu je pro mikroorganismy výhodný, neboť je chrání před nepříznivými vlivy včetně účinku antimikrobiálních látek. Tyto skutečnosti byly důvodem pro ověření schopnosti tvorby biofilmu u bakterií a kvasinek pocházejících z ejakulátu kanců, jelikož umožňují přežívání mikrobů v pomůckách a ve vybaveních používaných v provozu inseminačních stanic.

A. PŘÍRODNÍ LÁTKY

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 VÝZNAM STUDIA PŘÍRODNÍCH LÁTEK

Přírodní látky jsou získávány z přírodních zdrojů, mezi které patří rostliny, živočichové nebo mikroorganismy. Na zemi je známo 250 000 až 500 000 druhů rostlin. Rostliny mají téměř neomezenou schopnost syntetizovat aromatické látky, hlavně fenoly nebo jejich kyslíkaté deriváty. Většina přírodních látek získaných z rostlin má charakter isoprenoidů, fenylpropanoidů, alkaloidů nebo mastných kyselin (Dixon, 2001).

V mnoha zemích jsou používány léčivé rostliny pro jejich antibakteriální, antimykotické a antivirové účinky. Tyto látky slouží jako léčiva už celá staletí. Už naši předkové znali byliny, které ulevovaly od bolesti nebo urychlovaly hojení ran.

Mnoho dnes používaných přípravků, významných pro medicínu a zdravotnictví, je připraveno z přírodních produktů. Ne všechny však slouží jako léčiva. Některé přírodní látky jsou zneužívány jako drogy (Clark, 1996, Mohsenzadeh, 2007, Ji *et al.*, 2009).

Od poloviny 20. století, kdy se začala používat antibiotika, došlo k výraznému snížení používání rostlinných derivátů (Cowan, 1999). Vzhledem k narůstající rezistenci mikroorganismů na antibiotika, se opět zvyšuje zájem o studium antimikrobiálních účinků přírodních sloučenin.

1.2 ZDROJE PŘÍRODNÍCH LÁTEK A ZPŮSOBY JEJICH SEPARACE

Řadu let byly nejdůležitějšími zdroji přírodních sloučenin především rostliny a různí živočichové. Dnes se pozornost zaměřuje i na mořské produkty (Fullbeck *et al.*, 2006). Nejdůležitější zdroje přírodních sloučenin, ze kterých byla vyrobena různá léčiva, byly objeveny v letech 1800-1950 (Kupchan, 1971, Balandrin *et al.*, 1985). Jednalo se především o rostliny, v nichž se vyskytují účinné látky buď v celé rostlině nebo jen v některé z jejích částí.

Je známo, že rostliny syntetizují sloučeniny, které mají léčebné účinky, a některé z nich inhibují růst mikroorganismů. Terpeny jsou esenciální oleje, které určují charakteristické aroma rostlin a zároveň slouží k odpuzování hmyzu případně i býložravců. Jsou známy terpeny, které mají antimikrobiální účinky proti G+ i G- bakteriím a plísním (Trombetta *et al.*, 2005). Chinony a taniny jsou zodpovědné za rostlinný pigment (Cowan, 1999). U fenolových kyselin (skořicová, kávová) byly prokázány inhibiční účinky proti bakteriím, virům i houbám. Skupina glykosidů se u rostlin vyskytuje zejména ve formě zásobních a ochranných látek. Zatímco flavonoidní glykosidy patří mezi rostlinná barviva zodpovídající za zbarvení především květů.

Přehled některých rostlin obsahujících sloučeniny s antimikrobiálními účinky je vypracován v tabulce 1.

Tab. 1: Přehled rostlin obsahujících sloučeniny s antimikrobiálními účinky

rostlina	účinná látka	třída	účinky
borovice lesní (<i>Pinus sylvestris L.</i>)	α -pinen, β -pinen	terpen	/
černý pepř (<i>Piper nigrum L.</i>)	piperin	alkaloid	antipyretické
dřišťál obecný (<i>Berberis vulgaris</i>)	berberin	alkaloid	antibakteriální
eukalyptus (<i>Eucalyptus</i>)	p-cymen	monoterpen	antibakteriální, antivirové, fungicidní
hřebíček (<i>Syzygium aromaticum L.</i>)	eugenol	fenol	antivirové, fungicidní
chilli papričky (<i>Chilies</i>)	kapsacin	terpenoid	antiflogistikum
nové koření (<i>Allspice</i>)	eugenol	fenol	antivirové, fungicidní
oregáno (<i>Origanum vulgare</i>)	thymol, karvakrol	fenol	antibakteriální, fungicidní
oříšky (<i>Nuces</i>)	kyselina gallová	karboxylová kyselina	antibakteriální
saturejka horská (<i>Satureja montana</i>)	karvakrol	fenol	antibakteriální, fungicidní
šalvěj lékařská (<i>Salvia officinalis L.</i>)	kafr	monoterpen	antibakteriální
tymián obecný (<i>Thymus vulgaris L.</i>)	thymol, karvakrol, cymen	fenol	antibakteriální, fungicidní

Možností separace přírodních sloučenin je několik. Nejčastěji používanou je destilace vodní parou. Navarro *et al.* (1996) a později Kalemba a Kunická (2003) používali metodu extrakce organickými nebo vodními rozpouštědly.

Při extrakci alkoholem jsou nejprve části rostliny usušeny a dále vyluhovány v metanolu nebo etanolu. Následuje filtrace a vysušení filtrátu za sníženého tlaku. Při extrakci jsou účinné látky eluovány do destilované vody (Cowan, 1999, Vaher a Koel, 2003).

Zastoupení účinných složek v esenciálních olejích identifikovali Kelen *et al.* (2008) později Demirci *et al.* (2012) metodou plynové chromatografie (GC).

Baser *et al.* (1993), Vardar-Unlu *et al.* (2002) a Oke *et al.* (2009) používali metodu plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

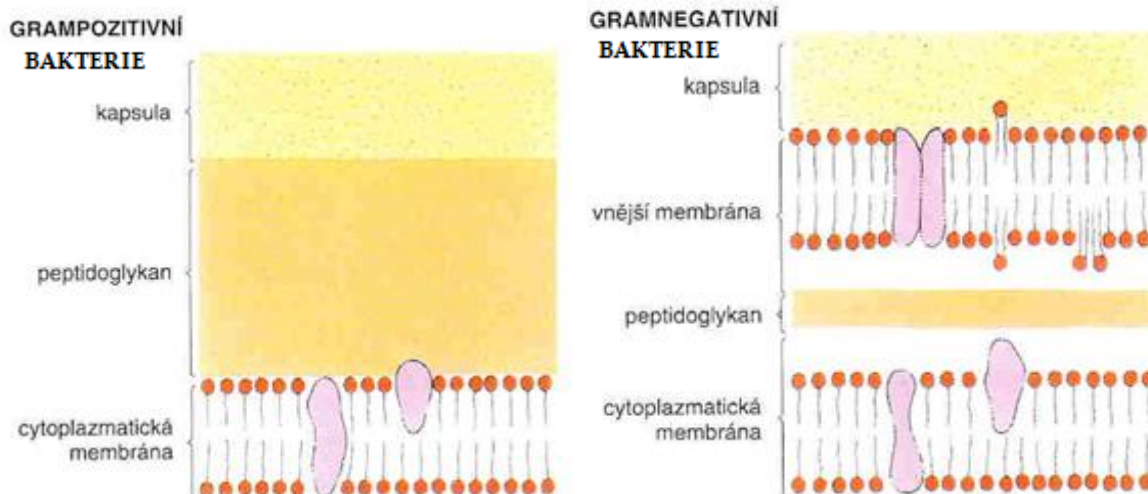
Analýzu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) popisují Chen *et al.* (2001). Burt *et al.* (2005) popisují k identifikování složek esenciálních olejů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s UV detekcí a kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí v tandemovém uspořádání.

Kromě chromatografických metod je využívána i kapilární zónová elektroforéza (Herrero *et al.*, 2005). Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, nukleární magnetickou rezonanci, chemickou ionizaci s hmotnostní detekcí a rentgenovou krystalografii publikují ve svých studiích Cowan (1999) a Kiddle *et al.* (2001).

1.3 MECHANISMUS ÚČINKU PŘÍRODNÍCH LÁTEK NA BAKTERIE A KVASINKY

Způsoby antimikrobiální aktivity sloučenin přírodního původu jsou již delší dobu předmětem výzkumu řady vědeckých pracovišť. Z publikovaných zpráv vyplývá, že inhibiční účinky těchto látek jsou ovlivňovány mnoha faktory.

V některých studiích je uváděna souvislost se strukturou buněčné stěny mikroba. Na základě barvitelnosti podle Grama jsou bakterie členěny do skupiny grampozitivně (G+)-modře a skupiny gramnegativně (G-)-červeně se barvicích buněk. Tyto rozdíly spočívají v rozdílném složení buněčné stěny. Jsou zřejmé z obrázku 1.



Obr. 1: Struktura buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií

Převzato: (http://biomach.wz.cz/mikrobiologie_bakterie.htm)

Buněčná stěna G⁺ bakterií obsahuje silnou vrstvu peptidoglykanu. Naopak u skupiny G⁻ bakteriálních buněk je tato vrstva tenká. Je uložena pod vnější membránou, tvořenou fosfolipidy a lipopolysachridy, která brzdí průnik antibakteriálních látek do buňky (Hynie, 2003).

Sdělení informující o nižší účinnosti přírodních sloučenin na G⁻ bakterie publikovali Navarro (1996) i Stojanovic (2005). Dorman a Deans (2000) však tento poznatek nepotvrdili. Autoři rozdíl v barvitelnosti přičítají vedle diagnostického významu rozdílné citlivosti na antibiotika. Nikaido (1996) i Kalemba a Kunická (2003) zjistili, že inhibiční účinky souvisejí také s hydrofilními a lipofilními vlastnostmi přírodních látek.

Účinnost terpenoidů, významných složek rostlinných silic a pryskyřic, podporuje jejich lipofilní charakter. Sloučeniny se vážou na lipidy vnější membrány, čímž negativně ovlivňují její integritu. S tím související porucha funkce membránových proteinů, inhibice dýchání a narušení iontové rovnováhy vede ke smrti bakteriální buňky (Cowan, 1999, Dorman a Deans, 2000, Marino *et al.*, 2001, Trombeta *et al.*, 2005)

Také sloučeniny s fenolickou strukturou, z nichž nejznámější jsou karvakrol, eugenol a thymol, které jsou hydrofobní, poškozují cytoplasmatickou membránu. Následné porušení transportu iontů a živin vede k zániku buňky (Helander *et al.*,

1998, Ultee, 1999, Lambert *et al.*, 2001, Marino *et al.*, 2001, Kalemba a Kunická, 2003, Bagamboula *et al.*, 2004, Oyedemi, 2009).

Cowan (1999) a Ipek *et al.* (2005) prokazali, že poloha a počet hydroxylových skupin úzce souvisí s antimikrobiální aktivitou uvedených fenolických sloučenin. Zvýšení hydroxylace má za následek vyšší toxicitu sloučeniny. Tento poznatek potvrdili Dorman a Deans 2000, Veldhuizen *et al.* 2006 i Afra *et al.* 2006.

Studie zabývající se inhibičními účinky thymolu a mentolu na kmeny *Staphylococcus (St.) aureus* a *Escherichia (E.) coli* potvrdily, že mentol byl ve srovnání s thymolem účinnější na *E. coli* a naopak thymol lépe inhiboval růst *St. aureus* (Trombetta *et al.*, 2005).

Mechanismus účinku eugenolu spočívá v inhibici funkce cytoplazmatické membrány (Oyedemi *et al.*, 2009). Nedávná studie popisuje mechanismus účinku karvakrolu a eugenolu při léčbě orální kandidózy vyvolané *Candida (C.) albicans* u potkanů se sníženou imunitou. Výsledky *in vitro* ukázaly, že karvakrol a eugenol lze považovat za možná antimykotika (Chami *et al.*, 2005).

Quercetin je významným zástupcem skupiny flavonoidů, jehož mechanismus účinku je založen na inhibici enzymu DNA gyrázy. Tento enzym je důležitý pro správný průběh replikace DNA (Cushnie *et al.*, 2005, Opletal a Šimerda, 2005).

Isochinolinový alkaloid berberin je považován za DNA ligand, schopný vmezeřit se do DNA bakterií (Cowan, 1999). V publikované studii informují Boberek *et al.* (2010) o možném inhibičním účinku berberinu na FtsZ protein, který je klíčem při dělení bakteriálních buněk.

1.4 VYBRANÉ SKUPINY PŘÍRODNÍCH LÁTEK S ANTIMIKROBIÁLNÍMI ÚČINKY

1.4.1 Alkaloidy

Alkaloidy tvoří nejpočetnější skupinu sekundárních metabolitů rostlin. Jedná se o organické sloučeniny zásadité povahy, obsahující dusíkaté heterocykly. Většinou jsou bezbarvé, krystalické povahy, ve vodě málo rozpustné, ale dobře v alkoholu, chloroformu, éteru. S organickými kyselinami tvoří soli.

Mají výrazné farmakologické účinky. Ve větších dávkách působí jako prudké jedy, v malých dávkách se používají jako léčiva, z nichž nejznámější je morfin. Tato sloučenina byla izolovaná z Máku setého (*Papaver somniferum*) již v 19. století a je nejčastěji používaná k tlumení bolesti.

Jedním z významných zástupců této skupiny je berberin, který je získáván z Dřišťálu obecného (*Berberis vulgaris*). Mechanismus jeho účinku spočívá ve schopnosti pronikání do DNA bakteriální buňky (Cowan, 1999, Vondrážka, 2002).

Podle chemické struktury jsou rozlišovány alkaloidy s pyridinovým cyklem, z nichž nejznámější je nikotin. Mezi alkaloidy s tropanovým cyklem patří kokain. Opium je tzv. fenantrenový alkaloid. Nejvýznamnějším zástupcem alkaloidů s purinovým cyklem je kofein (Ashihara *et al.*, 2004).

1.4.2 Fenoly a polyfenoly

1.4.2.1 Jednoduché fenoly a fenolové kyseliny

Základem těchto sloučenin je benzenové jádro, na kterém jsou navázané substituenty. Antibakteriální účinky byly prokázány také u thymolu, karvakrolu, kyseliny gallové a eugenolu. Je dokázáno, že s polohou a počtem hydroxylových skupin ve fenolické struktuře souvisí jejich toxicita. (Cowan *et al.*, 1999, Ipek *et al.*, 2005). Mezi významné zástupce této široké skupiny přírodních látek patří kyseliny skořicová a kávová obsažené v Mateřídoušce obecné (*Thymus serpyllum L.*), Tymiánu obecném

(*Thymus vulgaris*), Estragonu (*Artemisia dracuncululus*) a dalších rostlinách. Jsou účinné proti bakteriím, virům i houbám (Cowan, 1999).

Mechanismus účinku těchto látek spočívá v poškozování cytoplazmatické membrány bakteriálních buněk a v inhibici enzymové aktivity (Cowan, 1999, Dorman a Deans, 2000).

1.4.2.2 Chinony

Chinony jsou vysoce reaktivní přírodní sloučeniny odvozené od aromatických uhlovodíků. Vyskytují se v kůře stromů a rostlin. Jedná se o nejrozšířenější skupinu přírodních barviv (Cowan, 1999). Patří sem deriváty *p*-benzochinonu, 1,4-nafchochinonu a antrachinonu.

Benzochinony jsou především barviva hub. Významným zástupcem je fumigatin z kropidláku nebo spinulopsin ze štětičkovce.

Zástupcem skupiny naftochinonů je junon vyskytující se ve slupkách Ořešáku královského (*Juglans regia*) (<http://bioweb.webshake.cz/2-chinonova-barviva/>).

Alizarin je červené barvivo ze skupiny antrachinonů, používané v textilním průmyslu.

Oxidací aminokyseliny tyrosinu vznikají melaniny (<http://bioweb.webshake.cz/2-chinonova-barviva/>, Cowan, 1999, Vodrážka, 2002).

O antimikrobiální aktivitě chinonů informovali Moujir *et al.* v roce 1990. Chinony izolované z *Schaefferia cuneifolia* a *Maytenus horrida* vykazovaly účinky proti G+ bakteriím a kvasinkám, ale na G- bakterie byly neúčinné (Moujir *et al.*, 1990).

Cowan (1999) uvádí, že chinony se ireverzibilně váží na nukleofilní aminokyseliny, což má za následek inaktivaci proteinů.

1.4.2.3 Flavonoidy

Jedná se o rozsáhlou skupinu rostlinných fenolů. V současné době je známo více než 4000 flavonoidních látek a jejich počet se stále zvyšuje. Mají antibakteriální, antimykotické a antivirotické účinky (Cowan, 1999, Cushnie *et al.*, 2005, Fang *et al.*, 2007).

Strukturu flavonoidů tvoří flavan, složený ze dvou benzenových kruhů spojených heterocyklickým pyranem (Cowan, 1999, Vodrážka, 2002).

Nejznámějším flavonoidem je netoxický rutin, který se vyskytuje i v zaživacím traktu, kde zastává určitou antimikrobiální funkci (Opletal a Šimerda, 2005). Významným zástupcem skupiny flavonoidů je quercetin, který má vedle antioxidačních a protizánětlivých účinků také antimikrobní účinky. (<http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/quercetin.php>).

Antimikrobiální aktivita flavonoidů je stále předmětem výzkumu. Cushnie *et al.* (2005) uvádějí, že mechanismus jejich účinků spočívá v porušování cytoplazmatické membrány bakteriální buňky a inhibici enzymatické aktivity. Nejznámější sloučeninou je quercetin, který inhibuje enzym DNA gyrázu, nezbytnou pro správný průběh replikace DNA. Antimikrobiální účinky propolisu, jsou přičítány vysokému obsahu flavonoidů (Pietta, 2000, Cushnie *et al.*, 2005, Opletal a Šimerda, 2005)

1.4.3 Terpeny, terpenoidy

Terpeny představují významnou skupinu organických sloučenin, které jsou součástí rostlinných silic a pryskyřic. Jejich strukturu tvoří pětiuhlíkový isopren. Lineárním spojováním isoprenových jednotek vznikají monoterpeny (např. geraniol), diterpeny (např. geranylgeraniol), triterpeny (např. skvalen), seskviterpeny (např. farnesol). Pokud je přítomna heterogenní molekula kyslíku, jedná se o terpenoidy (Cowan, 1999, Vodrážka, 2002, Dorman *et al.*, 2005, Trombetta *et al.*, 2005, Bakkali *et al.*, 2008).

Terpeny mají inhibiční účinky proti širokému spektru G+ i G- bakterií včetně plísní. K nejúčinnějším se řadí thymol a karvakrol. Jejich mechanismus účinku spočívá ve vazbě na lipidy cytoplazmatické membrány a následné poruše její funkce (Cowan, 1999, Trombetta *et al.*, 2005, Bayati, 2009).

Známými terpenoidy jsou kafr a mentol. Mentol je bílá krystalická látka, která inhibuje růst především G+ bakterií. Na *Pseudomonas (Ps.) aeruginosa* je neúčinný (Bayati, 2009). Trombetta *et al.* (2005) prokázali inhibici růstu kmene *E. coli*.

1.4.4 Glykosidy

Jedná se o deriváty sacharidů obsahujících jednu nebo více monosacharidových jednotek a alespoň jednu nesacharidovou složku, tzv. aglykon nebo také genin. Podle struktury aglykonu dělíme glykosidy do různých skupin na fenolové glykosidy, kumariny a jejich deriváty, flavonoidové glykosidy, kardioaktivní glykosidy, saponiny a další. (<http://www.biotox.cz/naturstoff/chemie/ch-gly.html>, Vodrážka, 2002).

Glykosidy se vyskytují zejména v rostlinné říši jako zásobní a ochranné látky. Některé mohou být syntetizovány i živočichy a mikroorganismy. Většina z nich je jedovatých. (<http://www.biotox.cz/naturstoff/chemie/ch-gly.html>).

Flavonoidní glykosidy patří mezi rostlinná barviva odpovědná za žluté, červené či modré zbarvení především květů.

1.4.5 Silice

Silice jsou těkavé, většinou bezbarvé intenzivně vonící lipofilní sloučeniny obtížně rozpustné ve vodě. Zpravidla jsou tvořeny terpeny, zejména monoterpenickými uhlovodíky, aldehydy, alkoholy, ketony, kyselinami, estery nebo seskviterpeny. Mohou obsahovat i fenylypropanoidy (Trombetta *et al.*, 2005).

Během skladování mohou následkem oxidace tmavnout a pryskyřičnatět. Některé silice mají přirozené zbarvení např. silice hřebíčková (*Oleum caryophylli*) je žlutá, heřmánková silice (*Oleum chamomillae*) obsahující azuleny je zbarvena do zelena až modra.

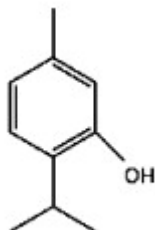
Silice se získávají z rostlinného materiálu různými metodami, nejčastěji destilace vodní parou. Použitý postup může ovlivnit i složení silice.

Významnou vlatností silic je jejich antimikrobiální aktivita, která je ovlivněna zastoupením jednotlivých složek. Nejvýraznější jsou tyto účinky u silic obsahujících thymol, eugenol, cineol a karvakrol (<http://www.biotox.cz/naturstoff/chemie/ch-silice.html>).

U některých silic byly potvrzeny i antivirové a antihelmintické účinky (Opletal a Šmidera, 2005).

1.5 VLASTNOSTI TESTOVANÝCH PŘÍRODNÍCH LÁTEK

1.5.1 Thymol



Synonyma: 6-isopropyl-m-cresol

2 isopropyl-5-methylphenol

3-p-Cymenol

Molekulová hmotnost: 150,22 g.mol⁻¹

Sumární vzorec: C₁₀H₁₄O

Obr. 2: Strukturální vzorec thymolu (Lei *et al.* 2010)

(<http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---T/Thymol.htm>)

Krystalická látka charakteristických vlastností byla objevena roku 1719 Casparem Neumanem. Její čistou formu syntetizoval v roce 1853 M. Lallemand a označil ji jako „Thymol.“

Je to monoterpenový hydrofobní derivát cymenu, který vytváří bezbarvé krystalky vonící jako kafr. Obsahuje jednu hydroxylovou skupinu, jež zvyšuje jeho hydrofilitu a napomáhá rozpouštění. Dobře se rozpouští v 96% etanolu, 1,0M NaOH, zředěných roztocích alkalických hydroxydů, éteru, parafinovém oleji, glycerolu a silicích, špatně ve vodě kde vytváří emulzi. Ve vyšších koncentracích dráždí sliznice a leptá povrchovou vrstvu pokožky (Stammati *et al.*, 1999, Pavia *et al.*, 2005, Trombetta *et al.*, 2005, Elissondo, 2008, Lee *et al.*, 2008, Archana *et al.*, 2011).

Ve směsi s dalšími sloučeninami se vyskytuje v Tymiánu obecném (*Thymus vulgaris*), Dobromysli obecné (*Origanum vulgare*), Mateřídoušce úzkolisté (*Thymus serpyllum*), Saturejce zahradní (*Satureja hortensis*), Prze arnice (*Arnica Montana*), Koriandru setém (*Coriandrum sativum*) a dalších rostlinách (Sagdic *et al.*, 2003, Ipek *et al.*, 2005).

Složení metanolových extraktů z Mateřídoušky hřebenité (*Thymus pectinatus*) ověřovali metodou GC-MS Vardar-Unlu *et al.* (2002). Autoři zjistili, že silice obsahovala 49,8% thymolu. Stejným postupem prokázali Alma *et al.* (2003) v silici z Dobromysli syrské (*Syrian oreganum*) pouze 2,1% thymolu. Větší množství thymolu (47,8%) zaznamenali Hanbali *et al.* (2005) v silici získané z kořene blešníku (*Pulicaria*

odora). Metodami destilace vodní parou a mikrovlné extrakce (SFME) získané esenciální oleje z Dobromysli (*Origanum glandulosum*) analyzovali Bendahou *et al.* (2008). Plynovou chromatografií prokázali obsah thymolu 46,1-81,1%. Autoři hodnotí metodu SFME jako selektivnější pro extrakci této sloučeniny.

Thymol stejně i karvakrol a eugenol patří mezi sloučeniny s fenolickou strukturou. U těchto látek byly zjištěny inhibiční účinky na růst G+ i G- bakterií, kvasinek i vláknitých hub. V závislosti na koncentraci účinné látky působí bakteriostaticky až baktericidně. Sloučeniny poškozují cytoplazmatickou membránu, následně dochází k porušení transportu iontů a živin, což vede k zániku bakteriální buňky (Dirdy *et al.*, 1993, Helander *et al.*, 1998, Lambert *et al.*, 2001, Kalemba a Kunická, 2003, Hanbali *et al.*, 2005, Trombetta *et al.*, 2005, Kosar *et al.*, 2008, Silva a Fernandes, 2010).

Účinné koncentrace thymolu byly ověřovány převážně dilučními metodami. Janssen *et al.* (1986) zjistili, že kmeny *St. aureus*, *E. coli* a *Proteus vulgaris* byly inhibovány množstvím 125-5000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, *Ps. aeruginosa* 2000-4000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ živného média.

V roce 1993 uvedli Didry *et al.* hodnoty minimálních inhibičních koncentrací (MIC) thymolu pro *St. aureus* a *E. coli* 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro *Ps. aeruginosa* > 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Diluční metodou zjistili Consetino *et al.* (1999) minimální baktericidní koncentraci (MBC) 225 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u *St. aureus*. *Ps. aeruginosa* vyrůstal i v mediu obsahujícím 900 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Testování prováděli v živné půdě s 0,5% Tween 80.

Stejnou metodou stanovili MIC pro referenční kmeny *St. aureus* 140 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a *Ps. aeruginosa* 385 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Lambert *et al.* (2001). Podobné výsledky zaznamenali i Walsh *et al.* (2003).

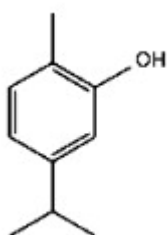
Ve svém sdělení publikovaném v roce 2005 uvedli Trombetta *et al.* inhibiční koncentraci thymolu pro referenční kmen *St. aureus* 310 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pro kmen *E. coli* 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Testování prováděli diluční mikrometodou a sloučeninu rozpouštěli v 5% Tweenu 20. Živným médiem byl Mueller-Hintonův bujón (MHB). Cristani *et al.* (2007) výsledky této studie potvrdili.

Burt *et al.* (2005) ověřovali inhibiční účinky thymolu, karvakrolu a jejich vzájemné kombinace na verotoxigenní *E. coli* O157 H7. Jednotlivé látky shodně inhibovaly kmeny v množství 180 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Při testování kombinace obou sloučenin nezaznamenali synergický ani antagonistický efekt.

Inhibiční účinky thymolu rozpouštěného ve 25% DMSO ověřovali Kosar *et al.* (2008). Růst Meticilin rezistentních kmenů *St. aureus* (MRSA) byl potlačen koncentrací 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. MIC *Ps. aeruginosa* přesahoval 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Také tito autoři používali MHB.

U polyrezistentních kmenů *St. aureus* (rezistence na ampicilin, penicilin, bacitracin) zjišťovali Palaniappan *et al.* (2010) citlivost k thymolu, rozpouštěném ve 25% etanolu. Mikrodiluční metodou v MHB stanovili účinnou koncentraci 1,25 mM.

1.5.2 Karvakrol



Synonyma: 5-isopropyl-2-methylphenol

Isothymol

Sumární vzorec: $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$

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

Obř. 3: Strukturñí vzorec karvakrolu (Lei *et al.* 2010)

(<http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---/carvacrol.htm>)

Karvakrol je kapalná látka bezbarvá až světle žlutá s charakteristickým štiplavým zápachem. Je přirozenou složkou silice aromatických rostlin. (Vincenzi *et al.*, 2004).

Patří mezi monoterpenické fenoly. Je hydrofobní, špatně rozpustný ve vodě, ale dobře v 96% etanolu a éteru (Veldhuizen *et al.*, 2006). Vaddi *et al.* (2002) uvádějí dobrou rozpustnost i v 50% etanolu. Peltzer *et al.* (2009) potvrzují, že karvakrol je významným antioxidantem a jeho rozpustnost je vyšší v oleji než ve vodě.

Karvakrol se vyskytuje ve směsi se sloučeninami, nejčastěji s thymolem v Dobromysli obecné (*Origanum vulgare*), Tymiánu obecném (*Thymus vulgaris*), Mateřídoušce úzkolisté (*Thymus serpyllum*), Saturejce zahradní (*Satureja hortensis*). Je obsažen také v Tymiánu bílém (*Thymus zygis*), Dobromysli (*Origanum dictamnus*), Majoránce (*Origanum majorana*) a dalších rostlinách (Vincenzi *et al.*, 2004, Liolios *et al.*, 2009).

Složení silice získané z Majoránky (*Origanum majorana*) testovali metodou GC-MS (Baser *et al.*, 1993). Autoři zjistili, že její základní složkou je karvakrol o obsahu 78,2%. Gormez *et al.* (2012) analyzovali silici extrahovanou ze Saturejky (*Satureja tymbra*), která obsahovala 52,6% karvakrolu. Metodou GC-MS ověřovali Oke *et al.* (2009) složení silice ze Saturejky klínolisté (*Satureja cuneifolia*) a zjistili, že obsahovala 45% karvakrolu. Silice extrahovaná z Tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*) Dafererem *et al.* (2000) obsahovala 2,2% karvakrolu a dále thymol, *p*-cymen a γ -terpinen. Kordali *et al.* (2008) zjistili plynovou chromatografií v silici z *Origanum acutidens* 87% karvakrolu a zároveň potvrdili jeho výraznou antimykotickou aktivitu. Stejnou metodu použili Ebrahimi *et al.* 2008 a zjistili, že silice z *Thymus caramanicus* obsahovala 58,9-68,9% karvakrolu. Eftekhar *et al.* 2009 výsledky této studie potvrdili.

Jak bylo uvedeno karvakrol, thymol i eugenol patří mezi fenolické sloučeniny, které porušují cytoplazmatickou membránu bakteriálních buněk. Následně dochází ke zvýšené propustnosti K^+ a H^+ iontů do buňky (Ultee a Smid, 2001, Pasqua *et al.*, 2007, Silva a Fernandes, 2010). Studie týkající se antimikrobiální aktivity karvakrolu prokázaly jeho inhibiční účinky na G+ i G- bakterie, houby, parazity a hmyz, ale jen slabé proti virům (Afra *et al.*, 2006). Veldhuizen *et al.* 2006 informovali, že karvakrol vykazuje nízkou aktivitu ve studiích mutagenity.

Olasupo *et al.* (2003) a Preuss *et al.* (2005) publikovali hodnoty minimálních inhibičních koncentrací (MIC) karvakrolu pro *Salmonella typhimurium* 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, *E. coli* 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a *St. aureus* 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

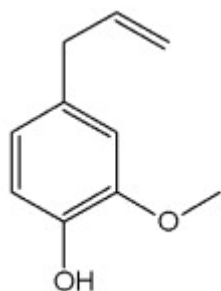
Diluční metodu publikovali Veldhuizen *et al.* (2006) a zároveň uvedli hodnoty MIC a MBC u *E. coli* a *St. aureus*. Pro *E. coli* byla MIC 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a MBC 1300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro *St. aureus* byla MIC 1700 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a MBC 1800 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Cristino *et al.* (2007) uvedli hodnoty MIC karvakrolu, zjištěné diluční mikrometodou v MHB pro kmeny *St. aureus* a *E. coli*. *St. aureus* 1250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro *E. coli* 2500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Sloučeninu rozpouštěli v 5% Tweenu 20.

Sleha *et al.* 2012 ověřovali inhibiční účinky karvakrolu na kmen *Mycoplasma hominis*. Autoři zjistili, že hodnota MIC 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je shodná s hodnotou MBC.

Kmeny *C. albicans* inhiboval karvakrol v množství 1250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U *Streptococcus (Str.) mutant*, *Str. mitis* a *Str. salivarius* byla hodnota MIC 2500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Botelho *et al.*, 2007).

1.5.3 Eugenol



Synonyma: 2-methoxy -4-allylphenol
4-(2-propenyl)phenol

Sumární vzorec: C₁₀H₁₂O₂

Molekulová hmotnost: 164,20 g.mol⁻¹

Obr. 4: Strukturální vzorec eugenolu (Hammer *et al.* 2012)

(<http://www.chemnet.com/dict/dict--97-53-0--cz.html>)

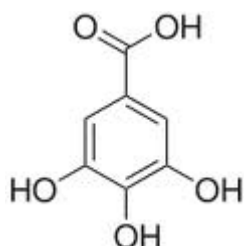
Eugenol patří mezi významné fenyylpropanoidy. Je to čirá až nažloutlá olejovitá kapalina příjemné kořeněné vůně. Velké uplatnění našel ve výrobě parfémů a zejména ve stomatologii, kde se používá jako tmel do zubních kanálků, k lokální dezinfekci i jako analgetikum (Cowan, 1999, Miller *et al.*, 2000, Bassolé *et al.*, 2010).

Je omezeně rozpustný ve vodě, ale dobře v etanolu a dalších organických rozpouštědlech.

Eugenol je obsažen v hřebíčkovém oleji (*Eugenia caryophyllata*), muškátovém oříšku (*Myristica fragrans*), bobkovém listu (*Laurus nobilis*), skořici (*Cinnamomum zeylanicum*) a také v cigaretovém kouři (LaVoie *et al.*, 1986).

Řada studií prokázala bakteriostatické, antimykotické a analgetické účinky eugenolu. Inhibiční účinky eugenolu spočívají v poškození cytoplazmatické membrány bakteriálních buněk (Cowan, 1999, Miller *et al.*, 2000, Olbert-Majkut *et al.*, 2008, Silva a Fernandes, 2010). Walsh *et al.* (2003) prokázali, že inhibiční účinek eugenolu u *E. coli* je 530 µg.ml⁻¹. Gill a Holley (2004) zjistili, že eugenol potlačuje růst *Listeria monocytogenes* a *Lactobacillus sakei*.

1.5.4 Kyselina gallová



Synonyma: monohdrát kyseliny 3,4,5-trihydroxybenzoové

Sumární vzorec: C₇H₆O₅

Molekulová hmotnost: 170,12 g.mol⁻¹

Obr. 5: Strukturní vzorec kyseliny gallové

(http://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/k/bezplist_569.pdf)

Kyselina gallová je organická kyselina s antioxidačními vlastnostmi. Bílá až světle nažloutlá krystalická látka, která je přítomna ve většině léčivých rostlin. Vyskytuje se ve dvou formách: konjugovaná s molekulou taninů, ze kterých se získává kyselou hydrolyzou nebo ve formě volné.

Kyselina gallová je fenolická sloučenina, která má na benzenovém jádře umístěné dva druhy funkčních skupin. Je to skupina hydroxylová a karboxylová (Kar *et al.*, 2000, Niho *et al.*, 2001, Strlič *et al.*, 2002). Inoue *et al.* (1995) zjistili, že tři sousedící hydroxylové skupiny jsou zodpovědné za cytotoxicitu a karboxylová skupina se může podílet na bujení normálních i nádorových buněk.

Kyselina gallová je dobře rozpustná ve vodě, 96% etanolu, metanolu, glycerolu a v ethylacetátu (Kar *et al.*, 1999). Daneshfar *et al.* (2008) potvrdili, že její rozpustnost stoupá s rostoucí teplotou.

Niho *et al.* (2001) prokázali, že se kyselina gallová váže na bílkoviny a klíčové minerální látky (železo, vápník, zinek) a ovlivňuje jejich biologickou aktivitu tím, že s nimi tvoří nerozpustné komplexy. Mutagenní účinky nebyly prokázány. V publikovaných studiích bylo uvedeno, že kyselina gallová indukuje buněčnou smrt (Strlič *et al.*, 2002, Ow YY *et al.*, 2003).

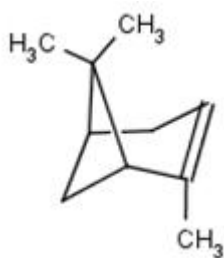
Kyselina gallová a její deriváty tvoří důležitou složku černého i zeleného čaje. Je obsažena v duběnkách, dubové kůře, ořeších, chmelu a dalších rostlinách. (Niho *et al.*, 2001, Strlič *et al.*, 2002).

Kromě ochrany před oxidačním stresem má kyselina gallová široké spektrum dalších účinků, mezi něž můžeme zařadit účinky kardioprotektivní, antivirové, antibakteriální, protiplísňové a protinádorové (Sergedien *et al.*, 1999). Kawada *et al.* (2001) zjistili, že kombinace kyseliny gallové s lékem proti rakovině může být účinná v léčbě rakoviny plic.

Chursi *et al.* (2001) zjišťovali MIC a MBC kyseliny gallové pro Meticilin rezistentní kmeny *St. aureus* (MRSA) a *St. aureus*. Hodnota MIC pro MRSA byla $600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. MBC u *St. aureus* byla shodná.

Diluční mikrometodou zjistili Kang *et al.* (2008) hodnoty MIC $8000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u *Str. mutans* a *Lacobacillus casei*. *Actinomyces viscosus* byl inhibován kyselinou gallovou v množství $4000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a *Lactobacillus acidophilus* vyrůstal i v médiu obsahujícím $8000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

1.5.5 α -pinen



Synonyma: 2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene

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

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

Obr. 6: Strukturní vzorec α -pinenu

(<http://www.chemnet.com/dict/dict--80-56-8--cz.html>)

α -pinen je nenasycený uhlovodík ze skupiny monoterpenů. Jedná se o bezbarvou olejovitou tekutinu, nemísitelnou s vodou s charakteristickým zápachem (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6402.html>).

Tato sloučenina se vyskytuje v pryskyřici jehličnatých stromů převážně borovic, ale i v Pelyňku velkém (*Artemisia tridentata*) a Rozmarýnu lékařském (*Rosmarinus officinalis*) (http://www.lekopis.cz/Kap_4_1_1.htm).

Metodou GC-MS prokázali Alma *et al.* 2003 složení silice z Dobromysli syrské (*Syrian oreganum*). Autoři zjistili, že silice obsahovala pouze 1,2% α -pinenu.

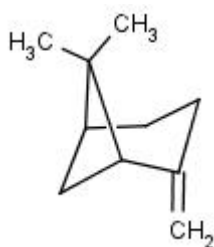
Parní destilací extrahovali Atti-Santos *et al.* (2005) silici z Rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*) a zjistili, že hlavní složkou byl α -pinen (40,6-45,1%) dále 1,8-cineol a kafr. Ostatní sloučeniny byly zastoupeny v množství menším než 2%.

V silici Tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*) zjistili Imelouane *et al.* (2009) metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a plynové chromatografie s plamenovou ionizační detekcí 9,3% α -pinenu. *In vitro* působí antibakteriálně na stafylokoky, *Ps. aeruginosa*, *E. coli* i některé druhy kvasinek.

Demirci *et al.* (2012) zjišťovali složení silice získané ze *Salvia cryptantha*. Jednotlivé složky identifikovali metodou plynové chromatografie. Mezi hlavní patřily 1,8-cineol (16-37%) a kafr (6-13%). α -pinen se vyskytoval v 1-12%.

Mechanismy antimikrobiálních účinků pinenů jsou stále zkoumány. Gao *et al.* (2011) uvedli souvislost s porušením cytoplazmatické membrány vazbou lipidy, neboť tato sloučenina je lipofilní.

1.5.6 β -pinen



Synonyma: 6,6-dimethyl-2-metylene-
bicyclo(3.1.1)heptan

Sumární vzorec: C₁₀H₁₆

Molekulová hmotnost: 136,23 g.mol⁻¹

Obr. 7: Strukturní vzorec β -pinenu

(<http://www.chemnet.com/cas/cz/127-91-3/beta-pinene.html>)

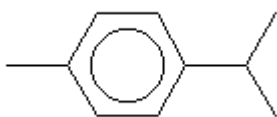
β -pinen je bezbarvá olejovitá kapalina, páchnoucí po terpentýnu, prakticky nerozpustná ve vodě, ale dobře rozpustná v etanolu a éteru. Stejně jako α -pinen je obsažen především v rostlinách s charakteristickou vůní (http://www.lekopis.cz/Kap_4_1_1.htm).

Kelen *et al.* (2008) zjistili chemické složení *Salvia aucheri*, *Salvia aramiensis* a *Salvia pilifera* metodou plynové chromatografie v silici *Salvia aucheri* β -pinen v množství 10,3%. Hlavní složkou této silice je kafr (49,6%) (Znini *et al.*, 2012).

Stejnou metodou testovali Cha *et al.* (2005) složení silice z *Artemisia scoparia* a *Artemisia capillaris*. Hlavní složkou silice *Artemisia scoparia* byl kafr (11%), zatímco u *Artemisia capillaris* β -pinen (9,4%).

Imelouane *et al.* (2009) zjistili v silice z Thymiánu obecného (*Thymus vulgaris*) pouze 3,9% β -pinenu, hlavní složku tvořil kafr (38,5%). Antibakteriální aktivita se shoduje s účinky α -pinenu.

1.5.7 *p*-Cymen



Synonyma: 1-methyl-4-isopropylbenzen

Sumární vzorec: C₁₀H₁₄

Molekulová hmotnost: 134,22 g.mol⁻¹

Obr. 8: Strukturní vzorec *p*-cymenu

(<http://www.caslab.com/4-Isopropyltoluene-p-Cymene.php5>)

p-cymen je alkyl-substituovaný aromatický uhlovodík, hojně se vyskytující v rostlinách (http://umbbd.ethz.ch/pcy/pcy_map.html). Jedná se o bezbarvou kapalinu, obtížně rozpustnou ve vodě, ale dobře v 96% etanolu a éteru (http://www.lekopis.cz/Kap_4_1_1.htm).

Princip mechanismu účinku na bakteriální buňky je založen na porušení cytoplazmatické membrány.

Oke *et al.* (2009) analyzovali metodou GC-MS silici extrahovanou ze Saturejky klínolisté (*Satureja cuneifolia*) a zjistili, že obsahovala 21,6% *p*-cymenu, hodnota MIC se pohybovala v rozmezí 600-1400 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Bassolé *et al.* (2010) zjistili, že *p*-cymen tvoří hlavní složku silice z listů čaje (*Lippia multiflora*), kde je zastoupen v množství 21,3%.

Diluční mikrometodou zjišťovali Cristani *et al.* (2007) inhibiční účinek *p*-cymenu na kmeny *St. aureus* a *E. coli*. Tito autoři zjistili, že *p*-cymen má větší inhibiční účinek na *E. coli* než na *St. aureus*. Hodnota MIC pro *St. aureus* byla 1250 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a pro *E. coli* 2500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Sloučeninu rozpouštěli v 5% Tweenu 20. Živným médiem byl MHB.

Bagamboula *et al.* (2004) uvádí, že *p*-cymen neprokazuje vůbec žádnou antimikrobiální aktivitu vůči *E. coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* a zároveň bylo prokázáno, že tymián obsahuje kromě thymolu ještě 36% *p*-cymenu.

Bendahou *et al.* (2008) metodami destilace vodní parou a SMFE analyzovali extrahované esenciální oleje z *Origanum glandulosum*. Plynovou chromatografií zjistili, že obsahuje 17,1% *p*-cymenu.

Chemické složení silice získané z *Origanum acutidens* analyzovali plynovou chromatografií Kordali *et al.* (2008) a zjistili, že obsah *p*-cymenu je 2%. Zároveň se prokázalo, že *p*-cymen má nízkou antimykotickou aktivitu.

1.6 METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI BAKTERIÍ K ANTIMIKROBIÁLNÍM LÁTKÁM

K průkazu účinnosti antimikrobiálních látek jsou v běžné praxi používány metody kvalitativní, které informují, zda je testovaný mikroorganismus citlivý na stanovené množství léčiva.

Metodami kvantitativními je zjišťováno množství účinné látky inhibující růst až usmrcující daný mikrob. Techniky provedení jsou difuzní a diluční.

1.6.1 Kvalitativní metody

1.6.1.1 Disková difuzní metoda

Tato metoda je založena na průniku antimikrobiální látky z papírového disku obsahujícího účinnou látku do agarového média, v němž se vytvoří klesající koncentrační gradient. Vhodným kultivačním médiem je nejčastěji Mueller-Hintonův agar, na který je naočkována stanovená koncentrace testovaného mikroorganismu. Během inkubace dochází k potlačení růstu bakterií na ploše s účinnou koncentrací léčiva a vytvoření tzv. „zóny inhibice“ v okolí disku. Naměřená hodnota průměru zóny je porovnávána s hodnotami pro citlivé kmeny uvedenými v tabulkách (Reller *et al.*, 2009).

Na výsledcích testů se významně podílí hustota tzv. inokula, což je koncentrace bakteriálních buněk v určitém množství tekutého média nebo fyziologického roztoku. Nejčastěji je používané množství $1,5-3 \cdot 10^8$ CFU.ml⁻¹, což odpovídá 0,5-1 stupni McFarlandovy zákalové stupnice.

Diskovou difuzní metodu použilo ke stanovení citlivosti přírodních látek mnoho autorů. Sokovic *et al.* (2010) stanovili touto metodou účinky esenciálních olejů získaných z *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*, *Mentha piperita*, *Mentha spicata* a dalších. Z nichž nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazoval *Thymus vulgaris* (16-30 mm) a *Origanum vulgare* (20-35 mm).

Tuto metodu použili Vardar-Unlu *et al.* (2002) k testování silice získané z *Thymus pectinatus*. Walsh *et al.* (2003) stanovili diskovou difuzní metodou MIC thymolu. Bagamboula *et al.* (2004) potvrdili MIC thymolu a stanovili MIC karvakrolu.

Účinky esenciálních olejů získaných z *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Cinnamomum verum*, *Cimbopogon flexuosus* a *Satureja montana* testovali Galuppi *et al.* (2010) diskovou diluční metodou.

1.6.1.2 Agarová difuzní metoda

Agarová difuzní metoda je založena na stejném principu jako metoda disková. Liší se v tom, že antimikrobiální látka se u agarové difuzní metody pipetuje do předem připravených jamek v agaru.

Nevýhodou této metody je pracnost a možnost vylití antimikrobiální látky z vyražené jamky při manipulaci s Petriho miskou.

1.6.2 Kvantitativní metody

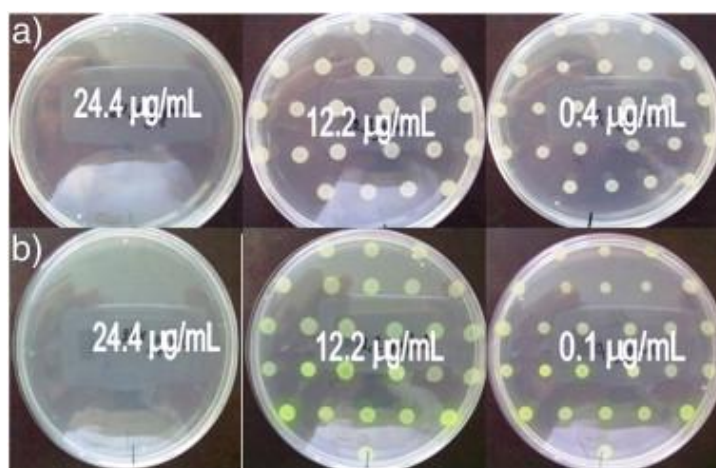
Těmito metodami je prokazována tzv. míra citlivosti. Principem dilučních metod je použití odstupňovaných koncentrací účinných látek, které jsou přidány buď do tuhých (agarová diluční metoda) nebo tekutých médií (bujónová diluční metoda). Po přidání inokula a následné inkubaci je hodnocena nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která zastavila růst testovaného kmene. Tato hodnota je označována jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) a udává se v mg.l⁻¹ nebo µg.ml⁻¹.

Bakteriostatický účinek je stav reverzibilní. Odstraněním inhibičního faktoru může mikrob po určité zotavovací fázi obnovit své životní pochody.

Dilučními testy lze stanovit také hodnotu minimální baktericidní koncentrace (MBC), tj. množství účinné látky, které usmrcuje 99,9% exponované bakteriální populace za stanovený časový úsek. Udává se ve stejných jednotkách jako MIC. Baktericidní účinky jsou ireverzibilní. MBC je někdy shodná s MIC, ale může být mnohonásobně vyšší (Islam *et al.*, 2008).

1.6.2.1 Agarová diluční metoda

Tato metoda je náročná, ale velmi přesná, má platnost referenční metody. Do Petriho misek jsou nalévány standardní objemy agarového media obsahující různé koncentrace účinné látky. Na povrch takto připravených půd jsou mikropipetou nebo kalibrovanou kličkou bodově očkována inokula jednotlivých bakteriálních kmenů. Po stanovené době inkubace je hodnocen růst kmenů ve formě uzavřených kolonií. Živné médium, kde již kmen nenaroste, obsahuje MIC antibiotika pro testovaný kmen, jak je znázorněno na obrázku 9.



Obr. 9: a) MIC *Escherichia coli*; b) *Pseudomonas aeruginosa*

Převzato: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493112002366>)

Agarovou diluční metodou zjišťovali Kalemba a Kunická (2003) antimikrobiální účinky *Thymus vulgare* a *Origanum vulgare*.

V roce 2004 Rota *et al.* stanovovali touto metodou antimikrobiální účinky esenciálních olejů získaných z *Thymus vulgaris*, *Salvia sclarea*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis* a *Satureja montana*. Tito autoři zjistili, že výrazné inhibiční účinky vykazovala *Satureja montana* a *Thymus vulgaris*. Naopak *Salvia sclarea* neprokazovala žádný inhibiční účinek.

1.6.2.2 Bujónová diluční metoda

Bujónová diluční metoda je založena na stejném principu jako agarová. Rozdíl je pouze v tom, že používáme Muller-Hintonův bujón. Do zkumavek je pipetován MHB obsahující různé koncentrace účinné látky. Do každé zkumavky s MHB je naočkován testovaný mikroorganismus. Po stanovené době inkubace je hodnocen růst mikroorganismu v bujónu s určitou koncentrací účinné látky. Pokud je bujón bez nárůstu mikroorganismů = MIC (mg.l^{-1}). Následuje porovnání s hraničními hodnotami pro citlivé kmeny (Kalemba a Kunická, 2003, Islam *et al.*, 2008).

Bujónovou diluční metodu použil v roce 2003 Hyeon-Hee *et al.* Ve své studii analyzoval metodou GC-MS chemické složení esenciálního oleje získaného z *Artemisia iwayomogi Kitamura*. Autoři zjistili, že hlavními složkami této silice byl kafr a 1,8-cineol. Bujónovou diluční metodou byly zjišťovány inhibiční účinky jednotlivých složek silice.

1.6.2.3 Diluční mikrometoda

Diluční mikrometoda je v praxi nejpoužívanější metodou. Je založena na stejném principu jako bujónová diluční metoda. Její výhodou je, že veškerá realizace probíhá v mikrotitrační destičce. Do jamek mikrotitrační destičky je pipetován MHB s určitou koncentrací antimikrobiální látky. Hustota inokula by měla odpovídat 0,5-3 stupně McFarlandovy zákalové stupnice. Po následné inkubaci je hodnocen vzniklý zákal popř. sediment v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky, určována hodnota MIC a porovnávána s hraničními hodnotami pro citlivé kmeny (Kalemba a Kunická, 2003, Islam *et al.*, 2008).

Kosar *et al.* (2008) stanovili touto metodou antimikrobiální aktivitu esenciálního oleje získaného extrakcí z *Chaerophyllum libanoticum*. Hlavní složkou byl karvakrol. Hodnota MIC pro MRSA a *C. albicans* byla v rozmezí 250-500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Diluční mikrometodu použil Didry *et al.* (1998) ke zjištění hodnoty MIC esenciálního oleje extrahovaného z nadzemní části *Drosera peltata*. Autoři zjistili hodnotu MIC 31,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro *Str. mutans* a 15,62 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro *Str. sobrinus*.

Tuto metodu použili Imelouane *et al.* (2009) ke zjištění antimikrobiálních účinků silice získané z *Thymus vulgaris*. Autoři uvedli hodnoty MIC pro *St. aureus*, *St. epidermidis* a *E. coli* (1330 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), *Str. sp.* (2670 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Pro stanovení antifungální aktivity osmi přírodních sloučenin použili Scorzoni *et al.* (2007) difúzní diskovou a diluční mikrometodu. Porovnáním výsledků těchto metod autoři zjistili, že disková difúzní metoda je méně citlivá než mikrometoda. Dále zjistili, že u diluční mikrometody mohli detekovat hodnotu MIC.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 MATERIÁL A METODY

2.1.1 Přírodní látky

Ověřovali jsme antibakteriální aktivitu 7 přírodních látek zakoupených ve firmách Sigma-Aldrich a Fluka. Kyselinu gallovou jsme získali od prof. RNDr. Lubomíra Opletala, CSc. z farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. V tabulce 2 jsou zaznamenány testované přírodní látky, jejich původ, číslo šarže a rozmezí testovaných koncentrací.

Tab. 2: Seznam přírodních látek a rozmezí hodnot testovaných koncentrací

Přírodní látka	Výrobce	Číslo šarže	Testovaná koncentrace v [µg.ml ⁻¹]
Cymen	SIGMA - ALDRICH	S33159-386	2400-76800
Eugenol	SIGMA - ALDRICH	03522CE-216	75-2400
Karvakrol	FLUKA	1359583	75-2400
Kyselina gallová	FFHK 320700/1 695	neuvedeno	75-2400
Thymol	SIGMA - ALDRICH	126K0140	75-2400
α-pinen	FLUKA	1330348	75-2400
β-pinen	FLUKA	1380035	75-2400

Vysvětlivky: FFHK – Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

2.1.2 Bakteriální kmeny

Při zjišťování antimikrobiálních účinků přírodních sloučenin jsme používali kmeny bakteriálních druhů a kvasinek, jejichž seznam je uveden v tabulce 3. Většina z nich byla vykultivována z ejakulátu kanců, některé pocházeli ze sbírky mikrobiologické laboratoře katedry biologických a biochemických věd (KBBV).

Tab. 3: Přehled kmenů používaných k testování antimikrobiální aktivity přírodních látek

Mikroorganismus	Původ
<i>Candida albicans</i>	sbírka KBBV
<i>Enterococcus sp. A</i>	sbírka KBBV
<i>Candida lipolytica</i>	z ejakulátu kanců
<i>Enterococcus durans</i>	z ejakulátu kanců
<i>Enterococcus sp. B</i>	z ejakulátu kanců
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> kmen I, II, III	z ejakulátu kanců
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	z ejakulátu kanců

Vysvětlivky: KBBV – katedra biologických a biochemických věd

2.1.3 Kultivační média

Bakteriální kmeny používané k testování antimikrobiální aktivity přírodních sloučenin jsme kultivovali i uchovávali na krevním agaru (KA). Pro kultivaci kvasinek jsme používali MALT médium. Zjišťování účinných koncentrací jsme prováděli v Mueller-Hintonově bujónu.

- Krevní agar (KA)

Krevní agar jsme připravovali z krevního agaru od firmy Hi Media, č.š. 135914 a z Blood Agar Base NO. 2 Oxoid, England č.š. 1037003 dle návodu a přidávali jsme 5% defibrinované beraní krve.

- Mueller-Hintonův bujón (MHB)

Mueller-Hintonův bujón jsme připravovali z Mueller-Hinton Broth od firmy Oxoid, England, č.š. 395796.

- MALT médium

MALT médium jsme připravovali z MALT média od firmy Hi Media, č.š. 53507.

2.1.4 Roztoky a činidla

- Přírodní sloučeniny jsme rozpouštěli ve 24% etanolu, připraveném zředěním 96% etanolu pufrovaným fyziologickým roztokem.
- Pufrovaný fyziologický roztok (PBS) o pH 7,4 jsme připravili rozpuštěním 2,2800 g NaCl, 0,7470 g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0,1230 g NaH₂PO₄ · H₂O a do 300 ml doplnili destilovanou vodou.
- K přípravě bakteriální suspenze jsme použili fyziologický roztok: 0,9 g NaCl do 100 ml destilované vody.
- McFarlandova zákalová stupnice č. 0,5 ($1,5 \cdot 10^8$ CFU.ml⁻¹).

2.1.5 Pomůcky a přístroje

- skleněné krevní zkumavky, plastové zkumavky, gumové zátky, Erlenmayerovy baňky, pipety, špičky, Petriho misky, odměrné válce, bakteriologické kličky
- plynový kahan, stojánky na zkumavky, předvážky, analytické váhy
- biologický termostat, chladnička, IKA Vortex-Genius 3, Densila Meter II. horkovzdušný sterilizátor, autokláv, stolní lampa

2.2 PRACOVNÍ POSTUP

2.2.1 Zjišťování účinné koncentrace přírodních látek

2.2.1.1 Příprava zásobních roztoků přírodních látek

Stanovené navážky přírodních sloučenin jsme rozpouštěli ve 24% etanolu. Pro urychlení rozpouštění jsme zkumavky s přírodními látkami homogenizovali ve vortexu. Poté jsme objem zkumavky doplnili do 20 ml MHB.

2.2.1.2 Příprava inokula

Bakteriální suspenzi jsme připravovali z 24 hodinové kultury narostlé na KA. Kvasinky jsme inkubovali 48 hodin na MALT médiu.

Bakteriální kmeny i kvasinky jsme suspendovali ve fyziologickém roztoku. K přesnější homogenizaci suspenze ve zkumavce jsme používali vortex. Následně jsme zkumavku vložili do nefelometru a změřili hustotu suspenze, která odpovídala 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice ($1,5 \cdot 10^8$ CFU.ml⁻¹).

Poté jsme 30 µl suspenze přenesli do zkumavky s 3 ml fyziologického roztoku, a tak získali inokulum o hustotě 10^6 CFU.ml⁻¹. Stejným postupem jsme připravili inokulum o hustotě 10^4 CFU.ml⁻¹.

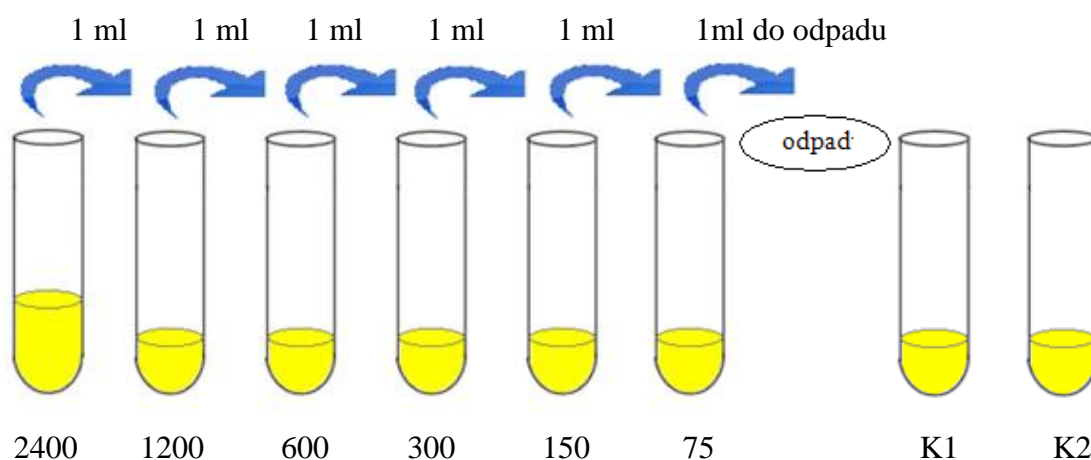
K testování antibakteriálních účinků přírodních sloučenin jsme používali inokula o hustotě 10^6 a 10^4 CFU.ml⁻¹.

2.2.1.3 Příprava ředící řady

Do dvou řad sterilních zkumavek umístěných ve stojánku jsme napipetovali po 1 ml MHB, s výjimkou první zkumavky, která obsahovala 2 ml zásobního roztoku testované sloučeniny. Poté jsme z první zkumavky přenesli 1 ml zásobního roztoku testované sloučeniny do druhé zkumavky a důkladně promíchali. Dále jsme přenesli 1 ml obsahu druhé zkumavky do následující a opět promíchali. Stejným způsobem jsme provedli ředění až do poslední zkumavky, z níž jsme 1 ml obsahu umístili

do dezinfekčního roztoku. Takto jsme připravili tzv. dvojkovou ředící řadu, kde následující zkumavka obsahuje poloviční množství testované látky ve srovnání s předchozí. Následující dvě zkumavky v řadě obsahující pouze MHB slouží jako kontrola růstu mikroorganismu (K1) a kontrola sterility MHB (K2). Příprava ředění testované látky je zobrazena na obrázku 10.

Na závěr jsme do všech zkumavek, s výjimkou K1, naočkovali 100 μ l připraveného inokula o hustotě 10^6 a 10^4 CFU.ml⁻¹. Poté jsme zkumavky inkubovali při 22°C a 37°C. Hodnocení růstu jsme prováděli po (6), 24, 48, 72 a 168 hodinách.



Obr. 10: Znázornění přípravy ředění přírodní látky v MHB v μ g.ml⁻¹

Růst mikroorganismů signalizoval zákal nebo sediment na dně zkumavky. Po vizuálním hodnocení jsme obsahy zkumavek bez viditelného růstu vyočkovali v uvedených časových intervalech na KA, kvasinky na MALT médium. Naočkované agarové půdy jsme inkubovali 24-48 hodin při 37°C a poté sledovali nárůst kmenů.

Za nejnižší účinnou koncentraci jsme považovali množství testované sloučeniny, které potlačilo růst bakteriálního kmene nebo kvasinek.

2.3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Zkumavkovou diluční metodou jsme zjišťovali antimikrobiální aktivitu sedmi přírodních látek. Při testování jsme používali mikroorganismy vykultivované z kančích ejakulátů a některé pocházeli ze sbírky KBBV. Přírodní látky jsme rozpouštěli ve 24% etanolu. Porovnávali jsme inhibiční účinky přírodních sloučenin na inokula o hustotě 10^6 a 10^4 CFU.ml⁻¹, při inkubační teplotě 22°C a 37 °C.

Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 10.

Tab. 4: Účinné koncentrace karvakrolu rozpuštěného ve 24% etanolu zjištěné zkumavkovou diluční metodou

(testované koncentrace 75-2400 $\mu\text{g.ml}^{-1}$)

Kmen	Účinná koncentrace přírodní látky v $\mu\text{g.ml}^{-1}$								Účinná koncentrace přírodní látky v $\mu\text{g.ml}^{-1}$							
	Doba inkubace při 37°C								Doba inkubace při 22°C							
	24 h		48 h		72 h		168 h		24 h		48 h		72 h		168 h	
	CFU.ml ⁻¹								CFU.ml ⁻¹							
	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶
<i>St. epidermidis</i> *	netestováno								150	1200	600	1200	600	1200	600	1200
<i>E. sp. A</i> ***	600	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	300	1200	600	1200	600	1200	600	1200
<i>E. durans</i> *	300	600	600	600	600	600	600	600	300	600	300	600	300	600	300	600
<i>E. sp. B</i> *	N	300	N	600	N	600	N	600	N	600	N	600	N	600	N	600
<i>Ps. aeruginosa</i> I.*	600	600	600	600	600	600	600	600	600	1200	1200	1200	1200	1200	1200	2400
<i>Ps. aeruginosa</i> II.*	300	600	300	600	300	600	300	600	300	300	300	300	300	300	300	300
<i>Ps. aeruginosa</i> III.*	600	600	600	600	600	600	600	600	300	300	300	600	300	600	300	600
<i>C. lipolytica</i> *	N	150	150	300	150	300	150	300	N	300	300	300	300	600	600	600

Vysvětlivky: * vykultivován z ejakulátu kanců ...** z katedrální sbírky ...*** vankomycin rezistentní z katedrální sbírky

St. - *Staphylococcus* *E.* - *Enterococcus* *Ps.* - *Pseudomonas* *C.* - *Candida* CFU - colony-forming unit N - nelze hodnotit

Tab. 5: Účinné koncentrace eugenolu rozpuštěného ve 24% etanolu zjištěné zkumavkovou diluční metodou

(testované koncentrace 75-2400 µg.ml⁻¹)

Kmen	Účinná koncentrace přírodní látky v µg.ml ⁻¹								Účinná koncentrace přírodní látky v µg.ml ⁻¹								
	Doba inkubace při 37°C								Doba inkubace při 22°C								
	24 h		48 h		72 h		168 h		24 h		48 h		72 h		168 h		
	CFU.ml ⁻¹								CFU.ml ⁻¹								
	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	
<i>E. sp. A</i> ***	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	2400	2400	2400	2400	1200	2400	1200	2400
<i>E.durans</i> *	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200
<i>E.sp. B</i> *	1200	1200	1200	600	1200	600	1200	600	N	2400	N	2400	N	1200	N	N	N
<i>Ps. aeruginosa</i> <i>I.</i> *	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200
<i>Ps. aeruginosa</i> <i>II.</i> *	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200
<i>Ps. aeruginosa</i> <i>III.</i> *	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200

Vysvětlivky: * vykultivován z ejakulátu kanců ...*** vankomycin rezistentní z katedrální sbírky

E. - *Enterococcus* *Ps.* - *Pseudomonas* CFU - colony-forming unit N - nelze hodnotit

Tab. 6: Účinné koncentrace kyseliny gallové rozpuštěné ve 24% etanolu zjištěné zkumavkovou diluční metodou

(testované koncentrace 75-2400 $\mu\text{g.ml}^{-1}$)

Kmen	Účinná koncentrace přírodní látky v $\mu\text{g.ml}^{-1}$								Účinná koncentrace přírodní látky v $\mu\text{g.ml}^{-1}$							
	Doba inkubace 37°C								Doba inkubace při 22°C							
	24 h		48 h		72 h		168 h		24 h		48 h		72 h		168 h	
	CFU.ml ⁻¹								CFU.ml ⁻¹							
	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶
<i>E. sp. A</i> ***	2400	2400	1200	2400	600	2400	600	300	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400
<i>E. durans</i> *	2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400
<i>E. sp. B</i> *	1200	2400	2400	2400	1200	1200	1200	1200	N	2400	N	2400	N	2400	N	2400
<i>Ps. aeruginosa</i> I. *	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	600	> 2400	600	2400	600	1200	600	1200
<i>Ps. aeruginosa</i> II. *	300	600	300	600	600	600	600	600	150	300	300	600	300	600	600	600
<i>Ps. aeruginosa</i> III. *	300	300	300	600	300	600	300	600	150	300	300	300	300	600	300	600
<i>C. albicans</i> **	1200	2400	1200	2400	1200	2400	1200	2400	N	> 2400	600	2400	2400	> 2400	2400	> 2400
<i>C. lipolytica</i> *	N	N	N	N	600	600	600	600	N	N	N	N	1200	2400	2400	2400

Vysvětlivky: * vykultivován z ejakulátu kanců ...** z katedrální sbírky ...*** vankomycin rezistentní z katedrální sbírky

E. - *Enterococcus* *Ps.* - *Pseudomonas* *C.* - *Candida* CFU - colony-forming unit N - nelze hodnotit

Tab. 7: Účinné koncentrace thymolu rozpuštěného ve 24% etanolu zjištěné zkumavkovou diluční metodou

(testované koncentrace 75-2400 $\mu\text{g.ml}^{-1}$)

Kmen	Účinná koncentrace přírodní látky v $\mu\text{g.ml}^{-1}$								Účinná koncentrace přírodní látky v $\mu\text{g.ml}^{-1}$							
	Doba inkubace při 37°C								Doba inkubace při 22°C							
	24 h		48 h		72 h		168 h		24 h		48 h		72 h		168 h	
	CFU.ml ⁻¹								CFU.ml ⁻¹							
	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶
<i>St. epidermidis</i> *	při této teplotě jsme netestovali								300	300	300	600	300	600	300	600
<i>E. sp. A</i> ***	600	600	600	600	1200	600	1200	600	300	600	300	600	300	600	300	600
<i>E. durans</i> *	600	600	600	1200	600	1200	600	1200	600	600	600	600	600	600	600	600
<i>E. sp. B</i> *	600	600	600	600	600	1 200	600	1 200	N	300	N	300	N	300	N	300
<i>Ps. aeruginosa I</i> *	600	600	600	600	600	600	600	600	300	300	300	600	300	600	300	600
<i>Ps. aeruginosa II</i> *	300	300	300	600	300	600	300	600	300	300	300	300	300	300	300	300
<i>Ps. aeruginosa III</i> *	300	300	300	600	300	600	300	600	300	300	300	300	300	300	300	300
<i>C. lipolytica</i> *	N	150	N	300	150	150	150	150	N	150	150	300	300	300	300	300

Vysvětlivky: * vykultivován z ejakulátu kanců ...** z katedrální sbírky ...*** vankomycin rezistentní z katedrální sbírky

St. - *Staphylococcus* *E.* - *Enterococcus* *Ps.* - *Pseudomonas* *C.* - *Candida* CFU - colony-forming unit N - nelze hodnotit

Tab. 8: Účinné koncentrace α -pinenu rozpuštěného ve 24% etanolu zjištěné zkumavkovou diluční metodou

(testované koncentrace 75-2400 $\mu\text{g.ml}^{-1}$)

Kmen	Účinná koncentrace přírodní látky v $\mu\text{g.ml}^{-1}$								Účinná koncentrace přírodní látky v $\mu\text{g.ml}^{-1}$							
	Doba inkubace při 37°C								Doba inkubace při 22°C							
	24 h		48 h		72 h		168 h		24 h		48 h		72 h		168 h	
	CFU.ml ⁻¹								CFU.ml ⁻¹							
	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶
<i>E. sp. A</i> ***	> 2400	> 2400	2400	> 2400	2400	> 2400	2400	2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	2400	2400
<i>E. durans</i> *	2400	> 2400	2400	> 2400	2400	> 2400	2400	> 2400	2400	> 2400	2400	> 2400	2400	> 2400	2400	> 2400
<i>E. sp. B</i> *	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	> 2400	2400	2400	2400	> 2400	2400	> 2400	2400	> 2400
<i>Ps. aeruginosa</i> I.*	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	> 2400	> 2400	2400	> 2400	2400	> 2400	2400	> 2400
<i>Ps. aeruginosa</i> II.*	1200	2400	1200	2400	1200	2400	1200	1200	2400	> 2400	2400	> 2400	2400	> 2400	2400	> 2400
<i>Ps. aeruginosa</i> III.*	1200	2400	1200	2400	1200	2400	1200	1200	1200	> 2400	1200	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400

Vysvětlivky: * vykultivován z ejakulátu kanců ...*** vankomycin rezistentní z katedrální sbírky

E. - *Enterococcus* *Ps.* - *Pseudomonas* CFU - colony-forming unit

Tab. 9: Účinné koncentrace β -pinenu rozpuštěného ve 24% etanolu zjištěné zkumavkovou diluční metodou

(testované koncentrace 75-2400 $\mu\text{g.ml}^{-1}$)

Kmen	Účinná koncentrace přírodní látky v $\mu\text{g.ml}^{-1}$								Účinná koncentrace přírodní látky v $\mu\text{g.ml}^{-1}$							
	Doba inkubace při 37°C								Doba inkubace při 22°C							
	24 h		48 h		72 h		168 h		24 h		48 h		72 h		168 h	
	CFU.ml ⁻¹								CFU.ml ⁻¹							
	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶
<i>E. sp. A</i> ***	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	2400	> 2400	2400	2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400
<i>E. durans</i> *	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	2400	> 2400	2400	> 2400	2400	> 2400	2400	> 2400
<i>E. sp. B</i> *	2400	2400	2400	2400	2400	2400	1200	2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400	> 2400
<i>Ps. aeruginosa</i> I.*	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	> 2400	> 2400	2400	> 2400	> 2400	> 2400	2400	> 2400
<i>Ps. aeruginosa</i> II.*	1200	2400	1200	2400	1200	1200	1200	1200	1200	> 2400	1200	> 2400	1200	> 2400	2400	> 2400
<i>Ps. aeruginosa</i> III.*	1200	2400	1200	2400	1200	2400	2400	2400	1200	> 2400	1200	> 2400	1200	> 2400	2400	> 2400

Vysvětlivky: * vykultivován z ejakulátu kanců ...*** vankomycin rezistentní z katedrální sbírky

E. - *Enterococcus*

Ps. - *Pseudomonas*

CFU - colony-forming unit

Tab. 10: Účinné koncentrace *p*-cymenu rozpuštěného ve 24% etanolu zjištěné zkumavkovou diluční metodou

(testované koncentrace 2400-76800 $\mu\text{g.ml}^{-1}$)

Kmen	Účinné koncentrace přírodní látky v $\mu\text{g.ml}^{-1}$								Účinné koncentrace přírodní látky v $\mu\text{g.ml}^{-1}$							
	Doba inkubace při 37°C								Doba inkubace při 22°C							
	24 h		48 h		72 h		168 h		24 h		48 h		72 h		168 h	
	CFU.ml ⁻¹								CFU.ml ⁻¹							
	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶
<i>E. sp. A</i> ***	76800	76800	38400	76800	76800	76800	76800	76800	76800	> 76800	> 76800	> 76800	> 76800	> 76800	> 76800	> 76800
<i>E. durans</i> *	9600	19200	19200	38400	19200	38400	38400	76800	19200	> 76800	76800	> 76800	> 76800	> 76800	> 76800	> 76800
<i>E. sp. B</i> *	76800	76800	76800	76800	76800	76800	76800	76800	N	> 76800	2400	76800	2400	76800	19200	76800
<i>Ps. aeruginosa</i> I.*	38400	76800	38400	76800	38400	76800	76800	76800	76800	> 76800	76800	> 76800	76800	> 76800	76800	76800
<i>Ps. aeruginosa</i> II.*	38400	76800	38400	76800	38400	76800	38400	76800	9600	> 76 800	9600	> 76800	38400	> 76800	38400	> 76800
<i>Ps. aeruginosa</i> III.*	38400	76800	38400	76800	38400	76800	38400	76800	9600	76800	9600	> 76800	38400	76800	38400	76800
<i>C. albicans</i> **	2400	4800	2400	4800	2400	4800	2400	4800	2400	9600	4800	4800	4800	9600	19200	19200
<i>C. lipolytica</i> *	N	N	N	4800	N	9600	N	9600	N	N	4800	9600	9600	9600	9600	9600

Vysvětlivky: * vykultivován z ejakulátu kanců ...** z katedrální sbírky ...*** vankomycin rezistentní z katedrální sbírky

E. - *Enterococcus*

Ps. - *Pseudomonas*

C. - *Candida*

CFU - colony-forming unit

N - nelze hodnotit

Z údajů uvedených v tabulkách 6 a 7 je zřejmé, že nejnižší hodnoty účinných koncentrací přírodních sloučenin jsme prokázali u thymolu a karvakrolu. Uvedené přírodní látky jsou však obtížně rozpustné a vytvářejí emulze.

Nižší hodnotu thymolu $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, která inhibovala růst kmene *St. epidermidis* jsme zjistili při inkubační teplotě 22°C a koncentraci bakteriálních buněk $10^4 \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro inokulum obsahující $10^6 \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla hodnota $600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Guarda *et al.* (2011) uvádějí účinné množství thymolu pro kmen *St. aureus* $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Vankomycin rezistentní kmen *E. sp. A*, byl po 24 i 48 hodinách inkubace při 37°C inhibován koncentrací $600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ thymolu, v obou koncentracích $\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ (10^4 i 10^6). Po tří denní inkubaci došlo ke zvýšení účinné koncentrace na $1200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro inokulum $10^4 \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$. Při inkubační teplotě 22°C byla hodnota účinné koncentrace thymolu pro inokulum obsahující $10^4 \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. V suspenzi $10^6 \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl kmen usmrcen $600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Růst kmenů *E. durans* i *E. sp. B* inhiboval thymol v množství $600\text{-}1200\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v obou inokulech (10^4 i $10^6 \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$) při inkubační teplotě 37°C . K potlačení růstu obou kmenů inkubovaných při 22°C bylo dostatečné množství $300\text{-}600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ thymolu v 1 ml.

Rozdíly v hodnotách účinné koncentrace thymolu lze zdůvodnit potřebou vyšší teploty pro růst a množení bakteriálních buněk.

Mazurová *et al.* (2007) testovali účinné koncentrace thymolu, karvakrolu, eugenolu, kyseliny gallové a *p*-cymenu na kmeny *Ps. aeruginosa* a *E. faecalis*. Přírodní sloučeniny rozpouštěli v 5% DMSO a v 96% etanolu, zatímco mi jsme používali 24% etanol. Autoři zjistili, že hodnoty účinné koncentrace thymolu, rozpuštěného v 5% DMSO na kmen *E. faecalis* byly $600\text{-}2400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a v 96% etanolu $150\text{-}600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Na rozdílných účinných koncentracích thymolu se zřejmě podílela rozpouštědla, která autoři použili. V 96% etanolu byla sloučenina lépe rozpouštěna.

Pro kmen *Ps. aeruginosa* uvedli Mazurová *et al.* (2007) hodnoty účinných koncentrací thymolu rozpuštěného v 5% DMSO $600\text{-}2400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a v 96% etanolu $150\text{-}600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Námi zjištěné účinné koncentrace thymolu pro *Ps. aeruginosa I.* při inkubační teplotě 37°C a hustotě inokula 10^4 i $10^6 \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ byly $600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, což je srovnatelné s hodnotami autorů uvádějícími u thymolu rozpuštěného v 96% etanolu. Kmeny

Ps. aeruginosa II. a III. byly inhibovány thymolem při hustotě inokula 10^4 CFU.ml⁻¹ v množství 300 µg.ml⁻¹. Stejné výsledky jsme zaznamenali pro kmen *Ps. aeruginosa* I. při inkubační teplotě 22°C a hustotě inokula 10^4 CFU.ml⁻¹.

Účinné koncentrace thymolu pro kmeny *Ps. aeruginosa* zjišťovali Didry *et al.*, (1999). Množství účinné látky bylo vyšší než 500 µg.ml⁻¹.

Také Consetino *et al.* (1999) uvádějí hodnotu inhibující růst *Ps. aeruginosa* přesahující 900 µg.ml⁻¹.

Diluční metodu použili i Lambert *et al.* (2001), kteří zjistili, že hodnota 385 µg.ml⁻¹ inhibuje růst kmene *Ps. aeruginosa*.

Autoři Walsh *et al.* (2003) uvádějí účinné množství thymolu pro *Ps. aeruginosa* 1000 µg.ml⁻¹, přírodní látky rozpouštěli v 96% etanolu. Sokovic *et al.* (2010) tuto hodnotu potvrzují.

Inhibiční účinky thymolu testovali i Kosar *et al.* (2007), kteří rozpouštěli thymol ve 25% DMSO a jako účinnou hodnotu thymolu, která inhibuje růst *Ps. aeruginosa* uvedli 500 µg.ml⁻¹.

Při srovnání našich výsledků s hodnotami účinných koncentrací uvedených autorů se shodujeme s údaji Lamberta *et al.* (2001) i Kosara *et al.* (2007) i když jsme používali jiné rozpouštědlo.

Nejlepší inhibiční účinky v naší studii vykazoval thymol na kmen *C. lipolytica* při 37°C i 22°C. Pro hustotu inokula 10^4 CFU.ml⁻¹ jsme zjistili hodnoty 150 µg.ml⁻¹ a pro 10^6 CFU.ml⁻¹ 300 µg.ml⁻¹.

Naše výsledky se shodují s údaji Bragy *et al.* (2007), kteří uvádějí 125 µg.ml⁻¹ pro *C. albicans*.

Botelho *et al.* (2007) stanovili účinnou koncentraci thymolu pro *C. albicans* 625 µg.ml⁻¹.

Účinný byl i karvakrol (tabulka 4). Jeho nejnižší inhibiční koncentrace byla 150 µg.ml⁻¹ u kmene *St. epidermidis*, inkubovaném při 22°C 24 hodin a hustotě bakteriálních buněk 10^4 CFU. ml⁻¹. Po 48-168 hodinách došlo ke zvýšení na 600µg.ml⁻¹.

Diluční mikrometodou zjišťovali účinky karvakrolu na *St. epidermidis* Sokovic *et al.* (2010). Autoři zaznamenali, že kmen inhibovalo množství 250 µg.ml⁻¹ karvakrolu. Rozdílné hodnoty mohly být ovlivněny použitou metodou.

Účinné koncentrace karvakrolu pro kmeny *St. aureus* ověřovali Afra *et al.* (2006) a Guarda *et al.* (2011). Jimi publikované hodnoty byly 250 µg.ml⁻¹ a 225 µg.ml⁻¹.

Testováním antimikrobiálních účinků karvakrolu při inkubační teplotě 37°C a koncentraci 10^4 i 10^6 CFU.ml⁻¹ pro *Ps. aeruginosa* I. a III. jsme prokázali, že sloučenina inhibovala kmeny v množství 600 µg.ml⁻¹. K inhibici *Ps. aeruginosa* II. při stejné teplotě a koncentraci 10^4 CFU.ml⁻¹ dostačovalo 300 µg.ml⁻¹. Při inkubační teplotě 22°C a hustotě inokula 10^4 i 10^6 CFU.ml⁻¹ byly účinné hodnoty karvakrolu pro *Ps. aeruginosa* I. 1200 µg.ml⁻¹. Nižší hodnoty 300 µg.ml⁻¹ jsme zjistili u *Ps. aeruginosa* II. inkubované při teplotě 22°C u obou použitých suspenzí bakteriálních buněk.

Diluční mikrometodu použili ke stanovení účinné koncentrace karvakrolu Sokovic *et al.* (2010). Autoři zjistili, že uvedená sloučenina inhibovala růst *Ps. aeruginosa* v množství 500 µg.ml⁻¹.

Hodnota účinné koncentrace karvakrolu prokázaná Afrou *et al.* (2006) pro *Ps. fluorescens* byla 1000 µg.ml⁻¹.

Mazurová *et al.* (2007) publikovali účinné hodnoty karvakrolu rozpuštěného v 5% DMSO pro kmen *Ps. aeruginosa* 2400 µg.ml⁻¹. Sloučenina rozpuštěná v 96% etanolu inhibovala v množství 300-600 µg.ml⁻¹.

Růst vankomycin rezistentního kmene *E. sp.* byl spolehlivě inhibován karvakrolem v množství 1200 µg.ml⁻¹. Pro další dva kmeny enterokoků byla tato hodnota 600 µg.ml⁻¹.

Mazurová *et al.* (2007) uvádějí pro kmeny *E. faecalis* účinnou hodnotu karvakrolu rozpouštěného v 5% DMSO 1200 µg.ml⁻¹ a v 96% etanolu 300-600 µg.ml⁻¹.

Účinná koncentrace karvakrolu na kmen *C. lipolytica* byla při inkubační teplotě 37°C a koncentraci inokula 10^4 CFU.ml⁻¹ 150 µg.ml⁻¹, ale při 22°C byla inhibice až ve zkumavce obsahující 300 µg.ml⁻¹.

Účinnou koncentraci karvakrolu pro kmeny *C. albicans* ověřovali Botelho *et al.* (2007). Uvedenými autory byly testované kmeny inhibovány 1250 µg.ml⁻¹.

Námi zjištěné hodnoty účinných koncentrací eugenolu byly 1200 µg.ml⁻¹ u všech kmenů při hustotě inokula 10^4 a 10^6 CFU.ml⁻¹ i obou inkubačních teplotách. Pouze u VAN kmene *E. sp.* inkubovaného při 22°C došlo ke zvýšení účinné koncentrace na 2400 µg.ml⁻¹.

Účinné koncentrace eugenolu rozpuštěného v 96% etanolu, které publikovali Mazurová *et al.* (2007) dosahovali hodnot 1200-2400 µg.ml⁻¹.

Hammer *et al.* (2012) uvádějí účinné koncentrace pro kmen *E. faecalis* 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Koncentrace eugenolu spolehlivě inhibující *Ps. aeruginosa* byly při teplotě 37°C i 22°C i obou testovaných suspenzích (10^4 i 10^6 CFU. ml^{-1}) shodné 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Mazurová *et al.* (2007) uvedli účinné hodnoty eugenolu rozpouštěného v 5% DMSO 9600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a při rozpouštění v 96% etanolu hodnoty 600-4800 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Autoři Lee *et al.* (2009) publikovali jako účinné hodnoty pro *Ps. aeruginosa* až 32500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Naše výsledky nemůžeme s údaji uvedených autorů srovnávat z důvodu odlišných postupů, kterými byly zjištěny.

Z údajů v tabulce 6 je zřejmé, že kyselina gallová byla méně účinná na enterokoky ve srovnání s kmeny *Ps. aeruginosa*. Inhibiční koncentrace se pohybovaly od 1200-2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, přičemž při inkubační teplotě 22 °C nejvyšší testované množství sloučeniny tj. 2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ převyšovaly. Vzhledem k dalšímu využití našich výsledků nejsou tato zjištění příznivá.

Vysoké hodnoty účinných koncentrací zaznamenali Mazurová *et al.* (2007). Kyselina gallová rozpuštěná v 96% etanolu inhibovala *E. faecalis* v množství 9600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Povzbudivé výsledky jsme získali při testování účinků na *Ps. aeruginosa*. Dva ze tří kmenů byly inhibovány kyselinou gallovou v množství 300-600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ při obou inkubačních teplotách (37°C i 22°C) i inokulech (10^4 CFU. ml^{-1} i 10^6 CFU. ml^{-1}), u třetí byla hodnota zvýšená na 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Hodnoty přesahující 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kyseliny gallové pro *Ps. aeruginosa* publikovali Pretto *et al.* (2004) i Mazurová *et al.* (2007).

U *C. albicans* jsme při teplotě 37°C a koncentraci inokula 10^4 CFU. ml^{-1} zjistili účinné množství 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, a při koncentraci inokula 10^6 CFU. ml^{-1} se hodnota zvýšila na 2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. K dalšímu zvýšení účinné koncentrace kyseliny gallové došlo při koncentraci inokula 10^6 CFU. ml^{-1} a inkubační teplotě 22°C, kdy *C. albicans* vyrůstala i v nejvyšším množství 2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ testované sloučeniny.

Prettem *et al.* (2004) stanovené účinné hodnoty kyseliny gallové, které inhibovaly růst *C. albicans* a *C. tropicalis* byly vyšší než 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

U *C. lipolytica* inkubované při 37°C jsme zaznamenali inhibici v koncentraci 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. V prostředí 22°C byla účinná koncentrace 1200-2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Z tabulky 8 a 9 vyplývá, že přírodní látky α -pinen, stejně i β -pinen inhibovaly kmeny převážně v množství $2400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a vyšším, zejména při teplotě 22°C .

Ps. aeruginosa byla ve srovnání s enterokoky citlivější k účinkům obou sloučenin především inkubovanými v termostatu při 37°C . Z výsledků lze usuzovat, že α - i β -pinen jsou účinnější na množící se bakterie.

Nejvyšší inhibiční koncentrace uvedené v tabulce 10 jsme prokázali u cymenu. Kmeny enterokoků i *Ps. aeruginosa* inkubované při 37°C vyrůstaly v médiu obsahujícím 19200 - $38400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ účinné látky. Při teplotě 22°C hodnoty převyšovaly $76800 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Výrazně účinnější byl cymen na *C. albicans*, jejíž růst potlačoval při 37°C v množství $2400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v inokulu obsahujícím $10^4 \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $4800 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v médiích s inokulem o hustotě $10^6 \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$.

C. lipolytica narostla při koncentraci 4800 - $9600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U této kvasinky jsme nezaznamenali nutnost zvýšení účinné koncentrace cymenu při nižší inkubační teplotě.

B. BIOFILM

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 BIOFILM

Bakteriálním biofilmem je označováno strukturované společenství mikrobů, které vytváří tenkou vrstvu na pevném povrchu. První zmínka pochází již ze 17. století, kdy vynálezce mikroskopu Anton van Leeuwenhoek, pozoroval mikroorganismy v zubním plaku. V té době však nebyly o biofilmu žádné informace. (Donlan *et al.*, 2002, Chandki *et al.*, 2011).

Život ve formě biofilmu umožňuje mikroorganismům setrvávat v prostředí, odolávat škodlivým vlivům, vysychání, UV záření, antimikrobiálním či sanitačním látkám. Tato forma života jim zároveň usnadňuje vzájemnou kooperaci životních pochodů i výměnu genetických informací. Mikroorganismy jsou schopny tvořit biofilmy na různých površích, přirozených i umělých.

Bakteriální biofilmy jsou nedílnou součástí přírodního prostředí a mohou být také prospěšné, například k úpravě pitné vody, odpadních vod, detoxikaci nebezpečných odpadů (Costerton *et al.*, 1999, Davey *et al.*, 2000, Mash *et al.*, 2001, Stoodley *et al.*, 2004, Chandki *et al.*, 2011).

Běžně se biofilmy nacházejí také v organismech živočichů, kde mikroby tvoří tzv. přirozenou mikroflóru sliznic. Již dlouho je známo, že se mikroby tvořící biofilm mohou podílet na vzniku infekčních onemocnění. Význam tzv. biofilmových infekcí roste se zvýšeným používáním různých umělohmotných katetrů, implantátů i přístrojů, v nichž se biofilmy tvoří.

Schopnost tvorby biofilmu je u mikroorganismů považován za významný faktor virulence (Costerton *et al.*, 1999, Stewart *et al.*, 2001, Chandki *et al.*, 2011).

3.2 TVORBA BIOFILMU

Podmínkou vzniku biofilmu je schopnost adheze bakteriálních buněk na pevný povrch. Mezi mikroorganismy, které nejčastěji tvoří bakteriální biofilm patří *Pseudomonas (Ps.) aeruginosa*, *Staphylococcus (St.) aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* a další. (Davey *et al.*, 2000, Donlan *et al.*, 2002, Aslam 2008).

Tvorba biofilmu je cyklický proces sestávající se z několika na sebe navazujících pochodů. Začíná přitahováním planktonických forem bakterií k přirozeným či umělým povrchům prostřednictvím faktorů adhezivitu např. fimbrií, lipopolysacharidů buněčné stěny případně exopolysacharidů a dalších receptorů nacházejících se na povrchu mikrobiálních buněk.

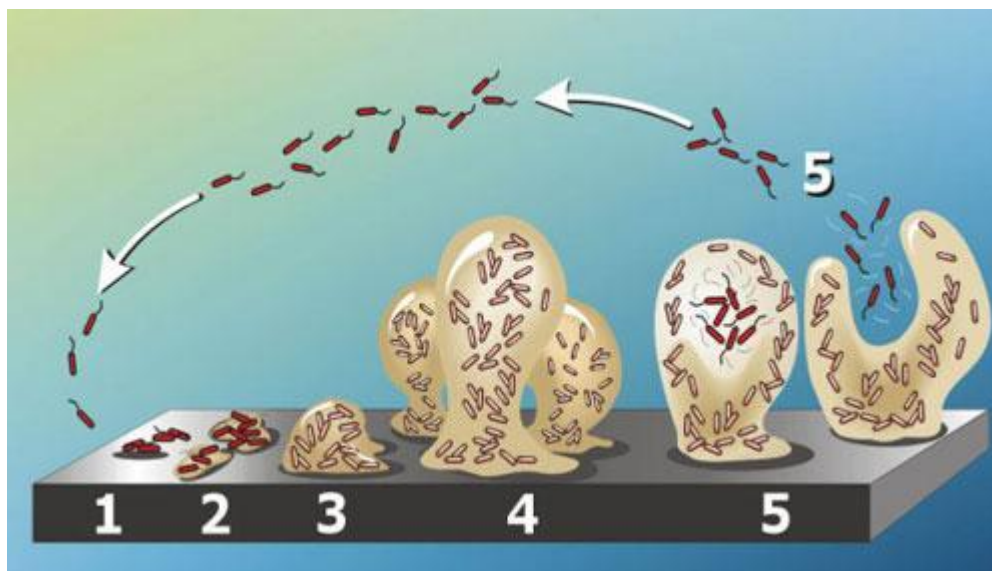
Následuje akumulace a maturace biofilmu. V této fázi bakterie svým množením a vzájemnou agregací vytvářejí tzv. mikrokolonie. Dochází k produkci zejména polysacharidových substancí, které jsou součástí tzv. extracelulární matrix (Katsikogianni and Missirlis, 2004).

Na regulaci celého procesu se podílejí specifické molekuly, které umožňují mezibuněčnou komunikaci jako např. Quorum sensing.

Quorum sensing (QS) systém řídí expresi mnoha genů. Umožňuje jednotlivým bakteriím komunikovat a koordinovat své chování v populaci. Principem tohoto systému je tvorba a uvolňování signálních molekul bakteriálními buňkami v populaci. Signální molekuly zodpovědné za komunikaci mezi buňkami se nazývají autoinduktory. U gramnegativních bakterií slouží jako autoinduktor N-acyl homoserin lakton, zatímco u grampozitivních bakterií to jsou oligopeptidy. Prostřednictvím autoinduktorů bakterie regulují svoje chování v závislosti na hustotě bakteriální populace (Kievit *et al.*, 2000, Drenkard, 2003, Otto 2004, Xu *et al.*, 2006).

V poslední době byla značná část autoinduktorů identifikována u *Ps. aeruginosa*. QS se podílí na regulaci genové exprese řady faktorů virulence, které hrají důležitou roli ve virulenci kmenů uvedeného druhu. U *St. aureus* má hlavní funkci accessory gene regulátor (AGR-systém), který jako signály vylučuje modifikované peptidy. (Kievit *et al.*, 2000, Yarwood *et al.*, 2003, Xu *et al.*, 2006, Duan *et al.*, 2007, Antunes *et al.*, 2010)

Po vytvoření biofilmu dochází k disperzi bakteriálních buněk z biofilmu a jejich dalšímu šíření. Bakteriální buňky tak mohou kolonizovat další povrchy. Celý proces tvorby bakteriálního biofilmu je znázorněn na obrázku 11.



Obr. 11: Tvorba bakteriálního biofilmu

Převzato: (Van Houdt and Michiels, 2005)

Bakterie v biofilmu mohou mít odlišné fenotypové vlastnosti ve srovnání s bakteriemi žijícími v planktonické formě a uvádí se i jejich zvýšená citlivost (až o 3 řády) k antimikrobiálním látkám (Mash *et al.*, 2001). Stewadt *et al.* 2001 uvádějí, že i bakterie citlivé k antibiotikům, u nichž není znám mechanismus rezistence, mohou být rezistentní, pokud tvoří biofilm.

Na rychlost a rozsah uchycení mikrobiálních buněk má vliv především velikost buněčného povrchu, hydrofobicita, přítomnost fimbrií a bičíků a tvorba EPS matrix (Davey *et al.*, 2000). Rychlost tvorby biofilmu je významně ovlivněna přítomností živin, hodnotou pH, přítomností antibiotik, ale i dalšími chemickými a fyzikálními vlivy (Mash *et al.*, 2001).

3.3 MOŽNOSTI PRŮKAZU TVORBY BIOFILMU

Laboratorní průkaz schopnosti tvořit biofilm lze provádět mnoha metodami, ale ne všechny lze používat v rutinní praxi mikrobiologické laboratoře. Obecně lze tyto metody rozdělit na genotypové a fenotypové. Genotypovými metodami prokazujeme geny kódující faktory adherence (*atlE*, *fnb*) nebo geny odpovědné za syntézu extracelulární matrix (*ica*). Nejčastěji používanou metodou průkazu je PCR (Stepanovic *et al.*, 2000).

Mezi běžně používané fenotypové metody patří postupy prokazující tvorbu biofilmu na stěně kultivační nádoby, zejména Christensenova zkumavková metoda, případně její modifikace. Také je možno prokázat schopnost tvorby extracelulární polysacharidové substance (EPS), např. u stafylokoků metodou kultivace na agaru s kongo červení. Dále lze použít např. mikroskopické metody a další laboratorní postupy jako jsou elektromigrační metody (Růžička *et al.*, 2006).

Christensenova zkumavková metoda je poměrně rozšířená, používaná pro kvalitativní průkaz tvorby biofilmu u celé řady lékařsky významných mikroorganismů tvořících biofilm. Při této metodě je vyšetřovaný kmen kultivován ve zkumavce s vhodným médiem a poté je vrstva biofilmu vytvořená na vnitřní stěně zkumavky prokázána obarvením. Vyzrálá, dostatečná vrstva biofilmu se vytvoří asi za 18-48 hodin. Promytím zkumavky po skončení inkubace jsou odstraněny neadherované bakterie. Vrstva biofilmu pevně lpící na vnitřní stěně zkumavky se fixuje, nejlépe sušením nebo Bouinovým roztokem a poté se barví vhodným barvivem – krystalovou violetí, safraninem aj. Zkumavkový test je jednoduchý, snadno proveditelný, ale vyhodnocení výsledků bývá zatíženo subjektivní chybou, zvláště u kmenů slabě tvořících biofilm (Růžička *et al.*, 2006).

Kvantitativní průkaz biofilmu kultivací v mikrotitrační destičce je modifikací Christensenovy zkumavkové metody. Jako kultivační nádoby se používají jednotlivé jamky mikrotitrační destičky, což umožní snazší manipulaci a možnost kvantifikace výsledků. Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky je aplikována suspenze vyšetřovaného kmene ve vhodném médiu, poté je destička kultivována, vypláchnuta a obarvena podobně jako v případě zkumavkové metody. Vyhodnocení je prováděno spektrofotometricky, měřením intenzity zbarvení jamky (Stepanovic *et al.*, 2000, Růžička *et al.*, 2006).

Kultivace na agaru s kongo červení je poměrně často používaná metoda v praxi. Nejčastěji se používá pro průkaz EPS u stafylokoků. Kongo červeně je barvivo specificky adherující na polysacharidy. Tvorba EPS je hodnocena podle zbarvení a konzistence vyrostlých kolonií na agaru s tímto barvivem. Silní producenti EPS rostou v černě pigmentovaných koloniích se suchou strukturou, zatímco kmeny, které sliz netvoří, rostou v červených lesklých koloniích. Výsledky získané touto metodou však mají pouze orientační hodnotu, protože odečet výsledků je značně zatížen subjektivní chybou (Růžička *et al.*, 2006).

S výhodou bývá používána fluorescenční mikroskopie, např. pro sledování životaschopnosti buněk. Metoda nám umožňuje zobrazit průřez biofilmem. Ke sledování biofilmu a jeho struktury slouží také elektronová mikroskopie (Růžička *et al.*, 2006, Schaudinn *et al.*, 2009, Neu *et al.*, 2010).

Z kapilárních elektromigračních technik je často používaná kapilární zónová elektroforéza nebo kapilární izoelektrická fokusace. Při separaci mikroorganismů se využívá odlišnosti jejich povrchových vlastností v různých separačních elektrolytech, rozdílů ve velikosti mikrobů a rozdílnosti jejich povrchového náboje (Růžička *et al.*, 2006).

3.4 REZISTENCE BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK ŽIJÍCÍCH V BIOFILMU NA ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

Život v biofilmu poskytuje mikroorganismům mnoho výhod. Bakterie rostoucí v biofilmu, jsou ve srovnání s bakteriemi v planktonické formě více chráněny před účinky antimikrobiálních látek. Jestliže bakterie nemá odolnost k antibiotikům geneticky podloženou, může svou vnímavost snížit tím, že vytvoří biofilm (Stewart *et al.*, 2001). Bakterie v biofilmu nezískají odolnost mutací nebo mobilními elementy, protože když se buňka odtrhne z biofilmu, odolnost rychle ztrácí.

Levin a Rozen (2006) se domnívají, že bakterie se brání antibiotikům tím, že změní svůj fenotyp. Mechanismů, kterými se bakterie vzdoruje působení antibiotik, je několik. Jedním z nich je omezené pronikání antimikrobiálních látek do biofilmu díky EPS. Extrapolymerární matrix je negativně nabitá, váže často pozitivně nabitá antibiotika

a zpomaluje tak difúzi těchto látek. Díky ní je biofilm rezistentní k velkým molekulám, jako je lysozym nebo molekuly komplementu.

Dalším mechanismem odolnosti je pomalý růst bakterií. Bakterie na povrchu biofilmu mají lepší přístup k živinám a kyslíku oproti bakteriím ve středu biofilmu, které tak rostou pomaleji. Jelikož jsou antibiotika všeobecně účinnější při působení na rychle rostoucí buňky, např. penicilin, ampicilin, jsou tak bakterie ve středu biofilmu ve výhodě a stávají se k nim rezistentními (Harrison *et al.*, 2005).

Vyšší rezistence bakterií v biofilmu je vysvětlována také snížením pH následkem kumulace kyselých metabolitů, což může vést k omezení účinku některých antimikrobiálních látek (Stewart *et al.*, 2001, Drenkard, 2003).

Jelikož se v biofilmu vytváří gradient živin, odpadních látek a signálních faktorů, každá buňka biofilmu roste jinou rychlostí. V závislosti na těchto gradientech bakterie mění svou fyziologickou aktivitu a reaguje tím na působení antibiotika či jiného stresového faktoru.

U bakteriálních biofilmů je možno pozorovat jev nazývaný bakteriální perzistence. Perzistentní buňky jsou k antibiotiku tolerantní. Princip tolerance spočívá v inhibici cílového místa antibiotika navázáním jiné molekuly, antibiotikum tak nepůsobí na metabolismus buňky a ta je pak tolerantní. Antibiotikum se do cílového místa může navázat, ale funkci buňky neovlivní. Perzistentní buňky mají zpomalený metabolismus a nedělí se (Lewis 2007).

Po snížení koncentrace antibiotika v prostředí nebo po jeho odstranění se z perzistentních buněk vytvoří nová populace biofilmu. Tento mechanismus se jeví jako jedna z hlavních příčin vzniku chronických infekcí a jejich návratu po antibiotické léčbě.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 MATERIÁL A METODY

4.1.1 Bakteriální kmeny

Schopnost tvorby biofilmu jsme ověřovali u 15 mikroorganismů. Testovali jsme kmeny bakteriálních druhů a kvasinek, vykultivovaných z ejakulátu kanců – *Aeromonas sp.*, *Candida lipolytica*, *Enterococcus durans*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Morganella morganii*, *Proteus sp.*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus porcinus*. Vankomycin rezistentní *Enterococcus sp.* pocházel ze sbírky mikrobiologické laboratoře katedry biologických a biochemických věd (KBBV).

4.1.2 Kultivační média

Bakteriální kmeny používané k testování tvorby biofilmu jsme uchovávali na krevním agaru (KA), zatímco kvasiky na MALT médiu. Pro kultivaci všech kmenů jsme používali Brain Heart Infusion bujón (BHI).

- Krevní agar (KA)

Krevní agar jsme připravovali z krevního agaru od firmy Hi Media, č.š. 135914 a z Blood Agar Base NO. 2 Oxoid, England č.š. 1037003 dle návodu a přidávali jsme 5% defibrinované beraní krve.

- MALT médium

MALT médium jsme připravovali z MALT média od firmy Hi Media, č.š. 53507.

- BHI bujón

BHI bujón jsme připravovali z Brain Heart Infusion Broth od firmy Hi Media, č. š. 126144.

4.1.3 Roztoky a činidla

- K přípravě bakteriální suspenze jsme použili sterilní fyziologický roztok: 0,9 g NaCl do 100 ml destilované vody
- McFarlandova zákalová stupnice č. 1 ($3 \cdot 10^8$ CFU.ml⁻¹)
- K uvolnění biofilmu ze stěn jamek mikrotitrační destičky jsme použili 95% etanol
- Biofilm jsme barvili 2% roztokem krystalové violeti, příprava:

A. krystalová violet' 5g
 etanol 96%.....200 ml

B. 1% oxalát amonný

Smíchat 20 ml roztoku A a 80 ml roztoku B a zfiltrvat.

4.1.4 Pomůcky a přístroje

- mikrotitrační destičky, pipety, špičky na pipety, krevní zkumavky, gumové zátky, kapátko, bakteriologické kličky, kádinky
- plynový kahan, stojánky na zkumavky, termostat, chladnička, IKA Vortex Genius 3, Densila Meter II., denzitometr
- horkovzdušný sterilizátor, autokláv

4.2 PRACOVNÍ POSTUP - MODIFIKOVANÁ CHRISTENSENOVA METODA

Bakteriální suspenzi jsme připravovali z inkubované 24 hodinové kultury narostlé na KA při 37°C.

Do označené zkumavky obsahující 3 ml fyziologického roztoku jsme bakteriologickou kličkou přenesli kolonie z KA. Po homogenizaci na vortexu jsme změřili zákal nefelometrem. Výsledný zákal odpovídal 1 stupni McFarlandovy zákalové stupnice (cca $3 \cdot 10^8$ CFU.ml⁻¹).

Do každé jamky mikrotitrační destičky jsme napipetovali 180 µl BHI. Následně jsme přidali 20 µl bakteriální suspenze. Po mírném protřepání jsme mikrotitrační destičku zakryli víčkem, vložili do sáčku a nechali inkubovat 24 hodin při 37°C aerobně.

Po ukončení inkubace jsme obsah všech jamek mikrotitrační destičky opatrně vyličili do dezinfekčního roztoku. Následovalo 3-4 násobné promytí jamek fyziologickým roztokem o laboratorní teplotě.

Fixaci destičky jsme prováděli tak, že jsme nechali mírně pootevřené víčko a destičku jsme vložili na 24 hodin do termostatu při 37°C.

Po fixaci jsme biofilm vytvořený na stěnách jamek mikrotitrační destičky obarvili 2% roztokem krystalové violeti. Barvení probíhalo 20 minut při laboratorní teplotě. Poté jsme barvivo z jamek odstranili a promývali vodou, dokud neodtékala čirá tekutina.

Po promytí a vysušení mikrotitrační destičky následovalo rozpouštění barviva fixovaného v buňkách 95% etanolem. Do každé jamky mikrotitrační destičky jsme napipetovali 160 µl etanolu a nechali působit 1 hodinu. Poté jsme zbarvení obsahu každé jamky změřili na spektrofotometru při vlnové délce $\lambda = 620$ nm. Výsledkem byla hodnota optické denzity (OD), která odpovídala množství vytvořeného biofilmu.

Všechny kmeny i negativní kontrola, kterou byl BHI jsme testovali v tripletech. U každého kmene i negativní kontroly jsme získali tři hodnoty absorbancí, z nichž jsme vypočítali průměrnou hodnotu. Průměrnou absorbanci každého kmene jsme porovnávali s průměrnou absorbancí negativní kontroly tzv. *cutt-off value*, která odpovídala hodnotě 0,1879.

Hodnotu *cutt off-value* jsme zjistili tak, že jsme vypočítali průměrnou hodnotu absorbance negativní kontroly, následně jsme vypočítali směrodatnou odchylku podle vzorce 1, kterou jsme pak vynásobili třemi a přičetli k průměrné hodnotě absorbance negativní kontroly. Vyhodnocení jsme prováděli podle autorů Stepanovic *et al.* (2000). Výše uvedené nalezneme v tabulce 11.

Vz. 1: Výpočet směrodatné odchylky

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = 0,001891$$

4.3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Modifikovanou Christensenovou metodou jsme zjišťovali schopnost tvorby biofilmu u bakteriálních druhů a kvasinek, z nichž většina byla vykultivována z ejakulátu kanců. Některé z nich pocházely z KBBV. V tabulce 11 je uveden seznam mikroorganismů a jejich hodnoty optických denzit, podle kterých jsme posuzovali schopnost tvorby biofilmu. Hodnocení biofilmu jsme prováděli spektrofotometricky při vlnové délce $\lambda=620$ nm a vyhodnocení podle autorů Stepanovic *et al.* (2000).

Tab. 11: Výsledky tvorby biofilmu prokázané modifikovanou Christensenovou metodou

Mikroorganismus	OD. (1)	OD. (2)	OD. (3)	Ø OD.	Biofilm
<i>Candida lipolytica</i>	0,2779	0,2971	0,2667	0,2806	+
<i>Proteus sp.</i>	0,3296	0,3489	0,3554	0,3446	+
<i>Providencia stuartii</i>	0,6834	0,6549	0,6948	0,6777	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,7226	0,7981	0,8783	0,7997	+
<i>Aeromonas sp.</i>	0,1504	0,1537	0,1607	0,1549	-
<i>Enterococcus durans</i>	0,1502	0,1691	0,1558	0,1584	-
<i>Enterococcus sp.</i>	0,1842	18,92	17,65	18,33	-
<i>Escherichia coli</i>	0,1711	0,1701	0,1706	0,1706	-
<i>Lactobacillus sp.</i>	0,1523	0,1799	0,1662	0,1661	-
<i>Micrococcus sp.</i>	0,1539	0,1511	0,1674	0,1575	-
<i>Morganella morganii</i>	0,1718	0,1638	0,1744	0,1700	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,1075	0,1179	0,1115	0,1123	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0,1513	0,1542	0,1592	0,1549	-
<i>Staphylococcus simulans</i>	0,1599	0,1659	0,1567	0,1608	-
<i>Streptococcus porcinus</i>	0,1453	0,1447	0,1510	0,1470	-
Negativní kontrola (BHI)	0,1848	0,1803	0,1816	0,1822	/

Vysvětlivky: OD.: optická denzita Ø: průměr + pozitivní - negativní

Modifikovanou Christensenovu metodou jsme prokázali tvorbu biofilmu u kmenů *Candida lipolytica*, *Proteus sp.*, *Providencia stuartii*, a *Pseudomonas aeruginosa*. Ostatní kmeny *Aeromonas sp.*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Morganella morganii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus simulans* a *Streptococcus porcinus* biofilm netvořily.

Tvorbu biofilmu u *St. aureus* a *St. epidermidis* zjišťovali Lasa and Penades (2006). Autoři zjistili, že na tvorbě biofilmu se podílejí biofilm associated protein (Bap).

Ps. aeruginosa i některé ostatní druhy pseudomonad patří mezi oportunní patogeny a časté původce nozokomiálních infekcí. Zejména *Ps. aeruginosa* se vyznačuje rezistencí na řadu antibiotikům, např. penicilin, cefalosporin, fluorochinolony, aminoglykosidy aj. (Podstatová a Maďar 2005).

V naší studii jsme prokázali u tohoto kmene silnou tvorbu biofilmu. Stejná zjištění publikovali Mah *et al.* (2003).

Kurup *et al.* (2010) zaznamenali výraznou tvorbu biofilmu u *Lactobacillus sp.* Kromě uvedeného kmene zjistili, že biofilm produkovaly i *Micrococcus sp.*, *Providencia sp.*, *Ps. sp.*, *St. sp.*, nehemolytické streptokoky a další.

Za hlavního producenta biofilmu v močových katetrech označují Hung *et al.* (2007) *Proteus sp.*

Uvedené skutečnosti dokumentují, že mikroorganismy vyskytující se ve spermatu kanců mohou vytvářet biofilm v pomůckách a přístrojích používaných při přípravě inseminačních dávek a také v prostředí chovných stanic. Eliminace takových kmenů je problematická vzhledem k jejich zvýšené odolnosti k dezinfekčním roztokům.

ZÁVĚR

Ze sedmi testovaných přírodních látek vykazovaly nejvyšší antimikrobiální aktivitu jednoduché fenolické sloučeniny karvakrol a thymol, které inhibovaly růst kmenů *Ps. aeruginosa*, enterokoky i *C. lipolytica* v množství 300-1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Hodnoty účinných koncentrací byly ovlivněny množstvím bakteriálních buněk v inokulu, inkubační teplotou i rozpustností sloučenin ve 24% etanolu.

Modifikovanou Christensenovou metodou byla tvorba biofilmu prokázána u kmenů *Ps. aeruginosa*, *Proteus sp.*, *Providencia stuartii* a *C. lipolytica*.

Výsledky experimentů uvedené v diplomové práci dokumentují možnost dekontaminace ejakulátů kanců sloučeninami přírodního původu, pokud nebudou toxické pro spermie, což je předmětem dalšího studia.

Další poznatky potvrzují, že některé mikroorganismy vyskytující se v kančím spermatu tvoří biofilm, což může komplikovat sanitaci pomůcek, přístrojů i prostředí inseminačních stanic.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AFRA, A. B., COMBES, S., PREZIOSI-BELLOU, L., GONTARD, N., CHALIER, P. Antimicrobial activity of karvakrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Mikrobiology*. 2006, roč. 43, s. 149-154.

AL-BAYATI, F. A. Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2009, roč. 8, s. 1-6.

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. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2003, roč. 26, s. 1725-1729.

ANTUNES, L. C. M., FERREIRA, R. B. R., BUCKNER, M. M. C., FINLAY, B. B. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*. 2010, roč. 156, s. 2271-2282.

ARCHANA, P. R., RAO, N. B., RAO, B. S. S. In vivo radioprotective potential of thymol, a monoterpene phenol derivative of cymene. *Elsevier*. 2011, roč. 726, s. 136-145.

ASHIHARA, H., ZHENG, X. Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in *Coffea arabica* seedlings. *Plant Science*. 2004, roč. 166, s. 807-813.

ASLAM, S. Effect of antibacterials on biofilms. *American Journal of Infection Control*. 2008, roč. 36, s. 175.

ATTI-SANTOS, A. C., ROSSATO, M., PAULETTI, G. F., ROTA, L. D., RECH, J. C., PANSERA, M. R., AGOSTINI F., SERAFINI L. A., MOYNA, P. Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2005, roč. 48, s. 1035-1039.

BAGAMBOULA, C. F., UYTTENDAELE, M., DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, karvakrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*. 2004, roč. 21, s. 33-42.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, roč. 46, s. 446-475.

BALANDRIN, F. M., KLOCKE, A. J., WURTELE, E. S., BOLLINGER, W. H. Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials. *Science*. 1985, roč. 228 s. 1154-1160.

BASER, K., KIRIMER, N. Composition of the Oil of *Origanum majorana* L. from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*. 1993, roč. 5, s. 577-579.

BASSOLÉ, I. H. N., LAMIEN-MEDA, A., BAYALA, B., TIROGO, S., FRANZ, CH., NOVAK, J., NEBIÉ, R. CH., DICKO, M. H. Composition and Antimicrobial Activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils and Their Major Monoterpene Alcohols Alone and in Combination. *Molecules*. 2010, roč. 15, s. 7825-7839.

BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. Lékařská mikrobiologie. 1999, ISBN 80-902896-6-5.

BENDAHOU, M., MUSELLI, A., GRIGNON-DUBOIS, M., BENYOUCEF, M., DESJOBERT, J. M., BERNARDINI, A. F., COSTA, J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*. 2008, roč. 106, s. 132-139.

BOBEREK, J. M., STACH, J., GOOD, L. Genetic Evidence for Inhibition of Bacterial Division Protein FtsZ by Berberine. *PLOS ONE*. 2010, roč. 5, s. 13745.

- BOTELHO, M. A., NOGUEIRA, N. A. P., BASTOS, G. M., FONSECA, S. G. C., LEMOS, T. L. G., MATOS, F. J. A., MONTENEGRO, D., HEUKELBACH, J., RAO, V. S., BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, karvakrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007, roč. 40, s. 349-356.
- BRAGA, P. C., DAL SASSO, M., CULICI, M., ALFIERI, M. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. *Fitoterapia*. 2007, roč. 78, s. 396-400.
- BURT, S. A., VLIELANDER, R., HAAGSMAN, H., VELDHUIZEN, J. A. E. Increase in Activity of Essential Oil Components Karvakrol and Thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by Addition of Food Stabilizers. *Journal of Food Protection*. 2005, roč. 68, s. 919-926.
- BUTAYE, P., DAVRIESE, L. A., HAESEBROUCK, F. Differences in Antibiotics Resistance Patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Farm and Pet animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001, roč. 45, s. 1374-1378.
- CITRON, D. M., OSTOVARI, M. I., KARLSSON, A., GOLDSTEIN, E. J. Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991, roč. 29, s. 2197-2203.
- CLARK, A. M. Natural products as a Resources for New Drugs. *Pharmaceutical Research*. 1996, roč. 13, s. 1133-1141.
- COSENTINO, S., TUBEROSO, C. I. G., PISANO, B., SATTA, M., MASCIA, V., ARZEDI, E., PALMAS, F. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. 1999, roč. 29, s. 130-135.
- COSTERTON, J. W., STEWARD, P. S., GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science Magazine*. 1999, roč. 284, s. 1318 -1322.

COWAN, M. M. Plant products as Antimicrobial Agents. *Clinical microbiology reviews*. 1999, roč. 12, s. 564-584.

CRISTANI, M., D'ARRIGO, M., MANDALARI, G., CASTELLI, F., SARPIETRO, M. G., MICIELI, D., VENUTI, V., BISIGNANO, G., SAIJA, A., TROMBETTA, D. Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, roč. 55, s. 6300-6308.

CUSHNIE, T. P. T., LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial agents*. 2005, roč. 26, s. 343-356.

DAFERERA, D. J., ZIOGAS, B. N., POLISSIOU, M. G. GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, roč. 48, s. 2576-2581.

DANESHFAR, A., GHAZIASKAR, H. S., HOMAYOUN, N. Solubility of Gallic Acid in Methanol, Ethanol, Water, and Ethyl Acetate. *J. Chem. Eng. Data*. 2008, roč. 53, s. 776-778.

DAVEY, M. E., O'TOOLE, G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000, roč. 64, s. 847-867.

DEMIRCI, B., TABANCA, N., BASER, H. C. Enantiomeric distribution of some monoterpenes in the essential oils of some *Salvia species*. *Flavour and Fragrance Journal*. 2002, roč. 17, s. 54-58.

DE VINCENZI, M., STAMMATI, A., DE VINCENZI, A., SILANO, M. Constituents of aromatic plants: karvakrol. *Fitoterapia*. 2004, roč. 75, s. 801-804.

DIDRY, N., DUBREUIL, L., PINKAS, M. Antibacterial activity of thymol, karvakrol and cinnamaldehyde alone or in combination. *Die Pharmazie*. 1993, roč. 48, s. 301-304.

- DIDRY, N., DUBREUIL, L., TROTIN, F., PINKAS, M. Antimicrobial activity of aerial parts of *Drosera peltata* Smith on oral bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998, roč. 60, s. 91-96.
- DIXON, A. R. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 2001, roč. 411, s. 843-847.
- DONLAN, R. N. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 2002, roč. 8, s. 881-890.
- DONLAN, R. M., COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002, roč. 15, s. 167-193.
- DORMAN, H. J. D., DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *Journal of Applied Microbiology*. 2000, roč. 88, s. 308-316.
- DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection*. 2003, roč. 5, s. 1213-1219.
- DUAN, K., SURETTE, G. M. Environmental Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl Quorum-Sensing Systems. *Journal of Bacteriology*. 2007, roč. 189, s. 4827-4836.
- EBRAHIMI, N. S., HADIAN, J., MIRJALILI, M. H., SONBOLI, A., YOUSEFZADI, M. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chemistry*. 2008, roč. 110, s. 927-931.
- EFTEKHAR, F., NARIMAN, F., YOUSEFZADI, M., HADIAND, J., EBRAHIMI, S. N. Anti-*Helicobacter pylori* activity and essential oil composition of *Thymus caramanicus* from Iran. *Natural product communications*. 2009, roč. 4, s. 1139-1142.
- ELISSONDO, M. C., ALBANI, C. M., GENDE, L., EQUARAS, M., DENEGRI, G. Efficacy of thymol against *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasitology International*. 2008, roč. 57, s. 185-190.

FANG, F., LI, J. M., PAN, Q. H., HUANG, W. D. Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chemistry*. 2007, roč. 101, s. 428-433.

FAKRUDDIN, MD. Biosurfactant: Production and application. *Journal Petroleum Environmental Biotechnology*. 2012, roč. 3, s. 1-5.

FULLBECK, M., MICHALSKY, E., DUNKEL, M., PREISSNER, R. Natural products: sources and databases. *Natural Products Reports*. 2006, roč. 23, s. 347-356.

GALUPPI, R., AURELI, S., BONOLI, C., OSTANELLO, F., GUBELLINI, E., TAMPIERI, M. P. Effectiveness of essential oils against *Malassezia spp.*: comparison of two in vitro tests. *Medical Mycology*. 2010, roč. 17, s. 79-84.

GAO, B., CHEN, Y., ZHANG, M., XU, Y., PAN, S. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Pericarpium Citri Reticulatae* Essential Oil. *Molecules*. 2011, roč. 16, s. 4082-4096.

GILL, A. O., HOLLEY, R. A. Mechanisms of Bactericidal Action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, roč. 70, s. 5750-5755.

GORMEZ, O., DILER, O. *In vitro* Antifungal activity of essential oils from *Tymbra*, *Origanum*, *Satureja* species and some pure compounds on the fish pathogenic fungus, *Saprolegnia parasitica*. *Aquaculture Research*. 2012, roč. 44, s. 1-6.

GUARDA, A., RUBILAR, J. F., MILTZ, J., GALOTTO, M. J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and karvakrol. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, roč. 146, s. 144-150.

HAMMER, K. A., HEEL, K. A. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2012, roč. 40, s. 239-245.

HANBALI, F. E., AKSSIRA, M., EZOUBEIRI, A., GADHI, C. E., MELLOUKI, F., BENHERRAF, A., BLAZQUEZ, A. M., BOIRA, H. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005, roč. 99, s. 399-441.

HARRISON, J. J., TURNER, R. J., CERI, H. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cation in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. 2005, roč. 7, s. 981-994.

HELANDER, I. M., ALAKOMI, H. L., KYOSTI, L. K., MATTILA-SANDHOLM, T., POOL, I., SMID, E. J., GORRIS, L. G. M., WRIGHT, V. A. Characterization of the Action of Selected Essential Oil components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998, roč. 46, s. 3590-3595.

HERRERO, M., IBÁÑEZ, E., CIFUENTES, A. Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. *Journal of Separation Science*. 2005, roč. 28, s. 883-897.

HUNG, E. W., DAROUICHE, R. O., TRAUTNER, B. W. Proteus bacteriuria is associated with significant in spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2007, roč. 45, s. 616-620.

HYEON-HEE, Y., YOUNG-HOI, K., BONG-SEOP, K., KANG-JU, K., SEUNG-IL, J., YONG-OUK, Y. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil of *Artemisia iwayomogi*. *Planta Medica*. 2003, roč. 69, s. 1159-1162.

HYNIE, S. Protiinfekční léčiva. *Speciální farmakologie*. roč. Díl VII/B, Karolinum, s. 16-18.

CHAMII, N., BENNIS, S., CHAMII, F., ABOUSSEKHRA, A., REMMAL, A. Study of anticandidal activity of karvakrol and eugenol in vitro and in vivo. *Oral Microbiology and Immunology*. 2005, roč. 20, s. 106-111.

CHANDKI, R., BANTHIA, P., BANTHIA, R. Biofilms. A microbial home. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2011, roč. 15, s. 111-114.

CHEN, H., ZUO, Y., DENG, Y. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2001, roč. 913, s. 387-395.

CHURSI, S., VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Damage of staphylococcal cytoplasmic membrane by *Quercus infectoria* G. Olivier and its components. *Letters in Applied Microbiology*. 2001, roč. 52, s. 565-572.

INOUE, M. SUZUKI, R., SAKAGUCHI, N., TAKEDA, T., OGIHARA, Y., JIANG, BY., CHEN. Y. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 1995, roč. 18, s. 1526-1530.

IMELOUANE, B., AMHAMDI, H., WATHELET, J. P., ANKIT, M., KHEDID, K., BACHIRI, A. E. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *International Journal of Agriculture Biology*. 2009, roč. 11, s. 205-208.

IPEK, E., ZEYTIÑOGLU, H., OKAY, S., TUYLU, B. A., KURKCUOGLU, M., BASER, K. H. C. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and karvakrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*. 2005, roč. 93, s. 551-556.

ISLAM, M. A., ALAM, M. M., CHOUDHURY, M. E., KOBAYASHI, N., AHMED, M. U. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of cloxacillin for selected isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with their antibiogram. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*. 2008, roč. 6, s. 121-126.

JANSSEN, A. M., CHIN, N. J. L., SCHEFFER, J. J. C., SVENDSEN, A. B. Screening for antimicrobial activity of some essential oils by the agar overlay technique. *Pharmaceuticsh Weekblad Scientific Edition*. 1986, roč. 8, s. 289-292.

JI, H. F., LI, X. J., ZHANG, H. Y. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? *EMBRO REPORTS*. 2009, roč. 10, s. 194-200.

KALEMBA, D., KUNICKÁ, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 2003, roč. 10, s. 813-829.

KANG, M. S., OH, J. S., KANG, I. C., HONG, S. J., CHOI, C. H. Inhibitory effect of Methyl Gallate and Gallic acid on Oral Bacteria. *The Journal of Microbiology*. 2008, roč. 46, s. 744-750.

KAR, B., BANERJEE, R., BHATTACHARYYA, B. C. Microbial production of gallic acid by modified solid state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 1999, roč. 23, s. 173-177.

KATSIKOIANNI, M., MISSIRLIS, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European Cells and Materials*. 2004, roč. 8, s. 37-57.

KAWADA, M., OHNO, Y., RI, Y., IKOMA, T., YUUGETU, H., ASAI, T., WATANABE, M., YASUDA, N., AKAO, S., TAKEMURA, G., MINATOGUCHI, S., GOTOH, K., FUJIWARA, H., FUKUDA, K. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anti-Cancer Drugs*. 2001, roč. 12, s. 847-852.

KELEN, M., TEPE, B. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology*. 2008, roč. 99, s. 4096-4104.

KIDDLE, G., BENNET, R. N., BOTTING, N. P., DAVIDSON, N. E., ROBERTSON, A. A. B., WALLSGROVE, R. M. High-performance liquid chromatographic separation of natural and synthetic desulphoglucosinolates and their chemical validation by UV, NMR and chemical ionisation-MS methods. *Phytochemical Analysis*. 2001, roč. 12, s. 226-242.

KIEVIT, T. R., IGLEWSKI, B. H. Bacterial Quorum sensing in Pathogenic Relationship. *Infection and Immunity*. 2000, roč. 68, s. 4839-4849.

KORDALI, S., ÇAKIR, A., ÖZER, H., ÇAKMAKCI, R., KESDEK, M., METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, karvakrol, thymol and *p*-cymene. *Bioresource Technology*. 2008, roč. 99, s. 8788-8795.

KOSAR, M., DEMIRCI, B., DEMIRCI, F., DINC, M., BASER, K. H. C. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. et Kotschy. *Food Chemistry*. 2008, roč. 105, s. 1512-1517.

KUPCHAN, M. S. Drugs from natural products-Plant sources. *Advances in Chemistry*. 1971, roč. 108, s. 1-13.

KURUP, J., PERSAUD, J., CAESAR, J., RAJA, V. Microbiological and physicochemical analysis of drinking water in Georgetown, Guyana. *Nature and Science*. 2010, roč. 8, s. 261-265.

LAMBERT, R. J. W, SKANDAMIS, P. N., COOTE, P. J., NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and karvakrol. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, roč. 91, s. 453-462.

LASA, I. AND PENADES, R. J. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology*. 2006, roč. 157, s. 99-107.

LAVOIE, E. D., ADAMS, J. D., REINHARDT, J., RIVENSON, A., HOFFMANN, D. Toxicity studies on clove cigarette smoke and constituents of clove: determination of the LD₅₀ of eugenol by intratracheal instillation in rats and hamsters. *Archives of Toxicology*. 1986, roč. 59, s. 79-81.

LEE, S. P., BUBER, M. T., YANG, Q., CERNE, R., CORTÉS, R. Y., SPROUS, D. G., BRYANT, R. W. Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel. *British Journal of Pharmacology*. 2008, roč. 153, s. 1739-1749.

LEE, S., NAJIAH, M., WENDY, W., NADIRAH, M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* flower bud (Clove) against fish systemic bacteria isolated from aquaculture sites. *Frontiers of Agriculture in China*. 2009, roč. 3, s. 332-336.

LEI, J., LESER, M., ENAN, E. Nematicidal activity of two monoterpenoids and SER-2 tyramine receptor of *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Pharmacology*. 2010, roč. 79, s. 1062-1071.

LEVIN, B. R., ROZEN, D. E. Non-inherited antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2006, roč. 4, s. 556-562.

LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*. 2007, roč. 5, s. 48-56.

LIOLIOS, C. C., GORTZI, O., LALAS, S., TSAKNIS, J., CHINO, I. Liposomal incorporation of karvakrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. *Food Chemistry*. 2009, roč. 112, s. 77-83.

MAH, C. T-F., O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*. 2001, roč. 9, s. 34-39.

MAH, F. T., PITTS, B., PELLOCK, B., WALKER, G. C., STEWART, P. S., O'TOOLE, G. A. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*. 2003, roč. 426, s. 306-310.

MARINO, M., BERSANI, C., COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, roč. 67, s. 187-195.

MAZUROVÁ, J., LYSKOVÁ, P., VYDRŽALOVÁ, M., ČAPKOVÁ, M., KROUPA, T. Bactericidal activity of natural substances on microorganisms contaminating boar semen. *Research in Pig Breeding* 2007, roč. 1, s. 51-53.

MILLER, D. J., HAWTHORNE, S. B. Solubility of Liquid Organic Flavor and Fragrance Compounds in Subcritical (Hot/Liquid) Water from 298 K to 473 K. *Journal of Chemical Engineering Data*. 2000, roč. 45, s. 315-318.

MOHSENZADEH, M. Evaluation of Antibacterial Activity of Selected Iranian Essential Oils Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in Nutrient Broth Medium. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2007, roč. 10, s. 3693-3697.

MOUJIR, L., GUTTIÉRREZ-NAVARRO A. M., GONZÁLES, A. G., RAVELO, A. G., LUIS, J. G. The relationship between structure and antimicrobial activity in quinones from the Celastraceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1990, roč. 18, s. 25-28.

NAVARRO, V., VILLARREAL, M. L., ROJAS, G., LOZOYA, X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 1996, roč. 53, s. 143-147.

NEU, T. R., MANZ, B., VOLKE, F., DYNES, J. J., HITCHCOCK, A. P., LAWRENCE, J. R. Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *Fems Microbiology Ecology*. 2010, roč. 72, s. 1-21.

NIHO, N., SHIBUTANI, M., TAMURA, T., TOYODA, K., UNEYAMA, C., TAKAHASHI, N., HIROSE, M. Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2001, roč. 39, s. 1063-1070.

NIKAIDO, H. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*. 1996, roč. 178, s. 5853-5859.

OKE, F., ASLIM, B., OZTURK, S., ALTUNDAG, S. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*. 2009, roč. 112, s. 874-879.

OLASUPO, N. A., FITZGERALD, D. J., GASSON, M. J., NARBAD, A. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology*. 2003, roč. 37, s. 448-451.

OLBERT-MAJKUT, A., WIERZEJEWSKA, M. Conformational Study of Eugenol by Density Functional Theory Method and Matrix-Isolation Infrared Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry*. 2008, roč. 112, s. 5691-5699.

OPLETAL, L., ŠIMERDA, B. Antiinvazivní látky přírodního původu jako aditiva do krmiv, Ministerstvo zemědělství ČR – Vědecký obor pro výživu zvířat, Výzkumný ústav pro výživu zvířat. 2005, s. 23-37.

<http://www.vuzv.cz/sites/File/vybor/Opletal%20Antiinvazni%20latky.pdf>

(staženo: 24.10.2012)

OTTO, M. Quorum-sensing control in Staphylococci – a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiology Letters*. 2004, roč. 241, s. 135-141.

OYEDEMI, S. O., OKOH, A. I., MABINYA, L. V., PIROCHENVA, G., AFOLAYAN, A. J. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*. 2009, roč. 8, s. 1280-1286.

PALANIAPPAN, K., HOLLEY, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, roč. 140, s. 164-168.

PASQUA, R. D., BETTS, G., HOSKINS, N., EDWARDS, M., ERCOLINI, D., MAURIELLO, G. Membrane Toxicity of Antimicrobial Compounds from Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, roč. 55, s. 4863-4870.

PAVIA, D. L. Introduction to organic laboratory techniques: a small-scale approach. English Book. 2005. ISBN 0-534-40833-8.

PELTZER, M., WAGNER, J., JIMÉNEZ, A. Migration study of karvakrol as a natural antioxidant in high-density polyethylene for active packaging. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2009, roč. 66, s. 938-946.

PHAIR, J. P., WATANAKUNAKORN, CH., BANNISTER, T. In vitro Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Carbenicillin and the combination of Carbenicillin and Gentamicin. *Applied and Environmental Microbiology*. 1969, roč. 18, s. 303-306.

PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*. 2000, roč. 63, s. 1035-1042.

PODSTATOVÁ, R., MAĎAR, R. Protiepidemická opatření při výskytu *Pseudomonas aeruginosa* a jiných gramnegativních tyčků. *Nozokomiální nákazy*. 2005, roč. 4, s. 26-38.

PRETTO, J. B., CECHINEL-VILHO, V., NOLDIN, V. F., SARTORI, M. R. K., ISAIAS, D. E. B., CRUZ, A. B. Antimicrobial Activity of Fractions and Compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). *Z. Naturfo Researche*. 2004, roč. 59c, s. 657-662.

PREUSS, H. G., ECHARD, B., DADGAR, A., TALPUR, N., MANOHAR, V., ENIG, M., BAGCHI, D., INGRAM, C. Effects of Essential Oils and Monolaurin on *Staphylococcus aureus*: *In Vitro* and *In Vivo* Studies. *Researche article*. 2005, roč. 15, s. 279-285.

RELLER, B. L., WEINSTEIN, M., JORGENSEN, H. J., FERRARO, J. M. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Oxford Journals*. 2009, roč. 49, s. 1749-1755.

ROTA, C., CARRAMINANA, J. J., BURILLO, J., HERRERA, A. In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oils from Aromatic Plants against Selected Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection*. 2004, roč. 67, s. 1252-1256.

RŮŽIČKA, F., HOLÁ, V., VOTAVA, M. Možnosti průkazu tvorby biofilmu v rutinní mikrobiologické praxi. *Epidemiologie, Microbiologie, Imunologie*. 2006, roč. 55, s. 23-29.

SAGDIC, O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *LWT - Food Science and Technology*. 2003, roč. 36, s. 467-473.

SCORZONI, L., BENADUCCI, T., AMLEIDA, A. M. F., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. DA S., GIANINNI, M. J. S. M. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. *Brasilian Journal of Microbiology*. 2007, roč. 38, s. 391-397.

SERGEDIEN, E., JONSSON, K., SZYMUSIAK, H., TYRAKOWSKA, B., RIETJENS, I. M. C. M. Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *FEBS Letters*. 1999, roč. 462, s. 392-396.

SCHAUDINN, C., CARR, G., GORUR, A., JARAMILLO, D., COSTERTON, J. W., WEBSTER, P. Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM – SEM). *Journal of Microscopy*. 2009, roč. 235, s. 124-127.

SILVA, N. C. C., FERNANDES, J. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2010, roč. 16, s. 402-413.

SLEHA, R., MOSIO, P., VYDRŽALOVÁ, M., JANTOVSKÁ, A., BOSTIKOVÁ, V., MAZUROVÁ, J. *In vitro* antimicrobial activities of cinnamon bark oil, anethole, karvakrol, eugenol and guaiazulene against *Mycoplasma hominis* clinical isolates. *Biomedical*. 2012, roč. 156, s. 1-4.

SOKOVIC, M., GLAMOČLIJA, J., MARIN, P. D., BRKIČ, D., GRIENSVEN, L. J. L. D. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an *In Vitro* Model. *Molecules*. 2010. roč. 15, s. 7532-7546.

STAMMATI, A., BONSI, P., ZUCCO, F., MOEZELAAR, R., ALAKOMI, H. L., WRIGHT, A. V. Toxicity of Selected Plant Volatiles in Microbial and Mammalian Short-term Assays. *Food and Chemical Toxicology*. 1999, roč. 37, s. 813-823.

STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B., VLAHOVIC, M. Š. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 2000, roč. 40, s. 175-179.

STEWART, P. S., COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*. 2001, roč. 358, s. 135-138.

STOJANOVIC, G., RADULOVIC, N., HASHIMOTO, T., PALIC, R. *In vitro* antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: The composition of *Achillea clavennae* L. (Asteraceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005, roč. 101, s. 185-190.

STOODLEY H. L., COSTERTON, J. W., STOODLEY, P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2004, roč. 2, s. 95-108.

STRLIČ, M., RADOVIČ, T., KOLAR, J., PIHLAR, B. Anti- and Prooxidative properties of Gallic acid in Fenton – Type systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, roč. 50, s. 6313-6317.

STUPANS, I., OW, Y. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. *Current Drug Metabolism*. 2003, roč. 4, s. 241-248.

TROMBETTA, D., CASTELLI, F., SARPIETRO, M. G., VENUTI, V., CRISTANI, M., DANIELE, C., SAIJA, A., MAZZANTI, G., BISIGNANO, G. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005, roč. 49, s. 2474-2478.

ULTEE, A., KETS, E. P. W., SMID, E. J. Mechanisms of Action of Karvakrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, roč. 65, s. 4606-4610.

ULTEE, A., SMID, E. J. Influence of karvakrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, roč. 64, s. 373-378.

VADDI, H. K., HO, P. C., CHAN, Y. W., CHAN, S. Y. Terpenes in ethanol: haloperidol permeation and partition through human skin and stratum corneum changes. *Journal of Controlled Release*. 2002, roč. 81, s. 121-133.

VAHER, M., KOEL, M. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2003, roč. 990, s. 225-230.

VARDAR-UNLU, G., CANDAN, F., SOKMEN, A., DAFERERA, D., POLISSIOU, M., SOKMEN, M., DONMEZ, E., TEPE, B. Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanol Extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, roč. 51, s. 63-67.

VAN HOUDT, R., MICHIELS, W. CH. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*. 2005, roč. 156, s. 626-633.

VELDHUIZEN, E. J. A., TJEERDSMA-VAN BOKHOVEN, J. L. M., ZWEIJTZER, C., BURT, S. A., HAAGSMAN, H. P. Structural requirements for the antimicrobial activity of karvakrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, roč. 54, s. 1874-1879.

VODRÁŽKA Z. Biochemie. (2002), s. 100-116. ISBN 80-200-0600-4

WALSH, S. E., MAILARD, J. Y., RUSSELL, A. D., CATRENICH, C. E., CHARBONNEAU, D. L., BARTOLO, R. G. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2003, roč. 94, s. 240-247.

WATNICK, P., KOLTER, R. Biofilm. City of Microbes. *Journal of Bacteriology*. 2000, roč. 182, s. 2675-2679.

XU, L., LI, H., VUONG, C., YAO, Y., OTTO, M., GAO, Q. Role *luxS* Quorum-snímací systém v biofilmu a virulenci *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*. 2006, roč. 74, s. 488-496.

YARWOOD, J. M., SCHLIEVERT, P. M. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *Journal of Clinical Investigation*. 2003, roč. 112, s. 1620-1625.

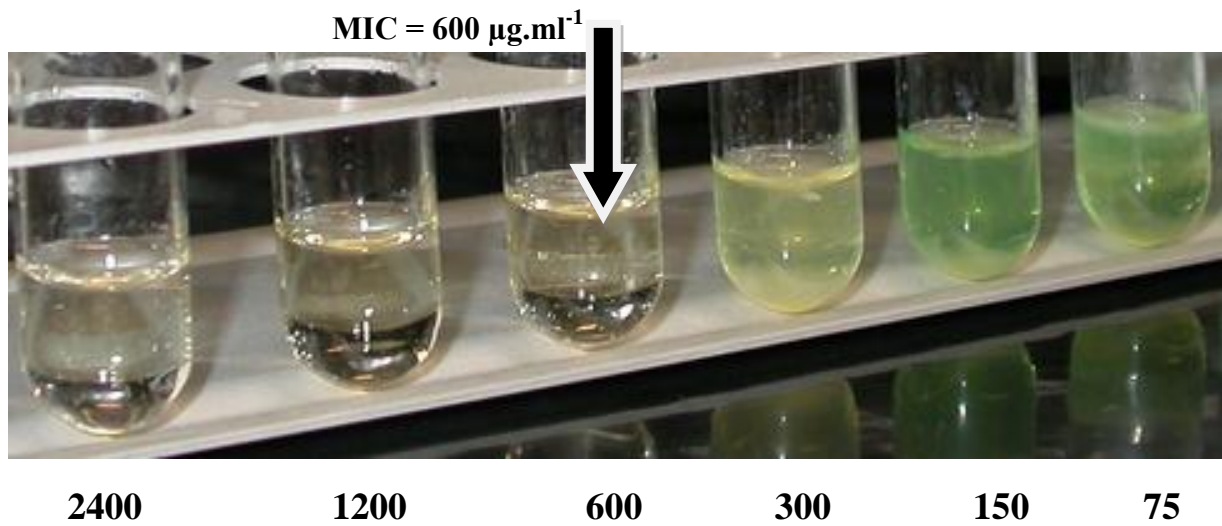
ZNINI, M., MAJIDI, L., BOUYANZER, A., PAOLINI, J., DESJOBERT, J. M., COSTA, J., HAMMOUTI, B. Essential oil of *Salvia aucheri mesatlantica* as a green inhibitor for the corrosion of steel in 0,5 M H₂SO₄. *Arabian Journal of Chemistry*. 2012, roč. 5, s. 467-474.

INTERNETOVÉ ZDROJE

- <http://www.biotox.cz/naturstoff/chemie/ch-silice.html> (staženo: 20.3.2013)
- <http://www.biotox.cz/naturstoff/chemie/ch-gly.html> (staženo: 23.3.2013)
- <http://www.chemnet.com/dict/dict--80-56-8--cz.html> (staženo: 23.3.2013)
- <http://www.caslab.com/4-Isopropyltoluene-p-Cymene.php5> (staženo: 24.10.2012)
- http://www.lekopis.cz/Kap_4_1_1.htm (staženo: 24.10.2012)
- <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6402.html> (staženo: 20.3.2013)
- <http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/quercetin.php> (staženo: 20.3.2013)
- <http://bioweb.webshake.cz/2-chinonova-barviva/> (staženo 23.3.2013)
- <http://www.biofilm.montana.edu/node/2390> (staženo 7.1.2013)
- http://biomach.wz.cz/mikrobiologie_bakterie.htm (staženo: 13.4.2013)
- <http://www.chemnet.com/dict/dict--97-53-0--cz.html> (staženo: 24.10.2012)
- http://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/k/bezplist_569.pdf (staženo 13.4.2013)
- <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---T/Thymol.htm>
(staženo: 24.10.2012)
- <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---C/carvacrol.htm>
(staženo: 24.10.2012)
- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493112002366>
(staženo 4.1.2013)

PŘÍLOHY

Příloha A



Obrázek A.1: Hodnocení inhibice růstu kmene *Ps. aeruginosa* v MHB obsahujícím různé koncentrace thymolu (2400-1200-600-300-150 a 75 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)