

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Antibakteriální účinky přírodních látek

Bc. Kristýna Sobková

Diplomová práce

2009

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. 2009

Bc. Kristýna Sobková

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří se mnou v průběhu diplomové práce spolupracovali. Především bych chtěla poděkovat doc. MVDr. J. Mazurové, CSc. za odborné vedení, pomoc a ochotu, se kterou se mi věnovala.

Také děkuji své rodině, která mne po dobu mého studia podporovala.

SOUHRN

Cílem práce bylo ověření antibakteriálních účinků a stanovení minimální inhibiční (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) přírodních látek carvacrolu, cymenu, diberberin sulfátu, eugenolu, hydrochinon monomethyletheru, knicinu, limonenu, kyseliny gallové, kyseliny rozmarýnové, quercetinu, thymolu a tea tree oil zkumavkovou diluční metodou v Mueller-Hintonově bujónu.

Dále byly testovány následující dvojkombinace přírodních látek: cymen ve směsi s carvacrolem, cymen s eugenolem a také cymen s thymolem, knicin ve směsi s carvacrolem, kyselina gallová ve směsi s carvacrolem, s thymolem, s eugenolem a dále s quercetinem.

Přírodní látky byly rozpouštěny v 24% ethanolu, 0,5% Tweenu 20 a 80.

Účinnost byla testována na referenční kmeny *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Escherichia coli* CCM 3954, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a kmeny izolované z kančích ejakulátů - *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus hyicus*. Jeden kmen *Pseudomonas aeruginosa* byl vykultivován v naší laboratoři z výtěru ucha psa s klinickým nálezem *otitis externa*.

Mezi nejúčinnější přírodní látky patřily **knicin** rozpouštěný v 24% ethanolu MIC - 150 - 1200 µg/ml a MBC - 150 - 4800 µg/ml a dále **carvacrol**, **thymol** a **eugenol** MIC - 600 - 2400 µg/ml a MBC - 600 - 2400 µg/ml rozpouštěné v 24% ethanolu.

Při testování dvojkombinací látek jsme nejnižší hodnoty MIC a MBC zaznamenali u **knicinu ve směsi s carvacrolem**, **eugenolem** a také s **thymolem** rozpouštěných v 24% ethanolu (600:300 – 2400:1200 µg/ml a 600:600 – 4800:2400 µg/ml), stejné hodnoty MIC byly stanoveny u **směsi kyseliny gallové s carvacrolem** a MBC se pohybovaly v rozmezí 1200:600 – 4800:2400 µg/ml.

klíčová slova: antibakteriální aktivita, přírodní látky, zkumavková diluční metoda, minimální inhibiční koncentrace, minimální baktericidní koncentrace, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

SUMMARY

The aim was to verify the antibacterial effects and the determination of minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of natural substances carvacrol, cymen, diberberin sulfate, eugenol, hydroquinone monomethylether, cnicin, limonene, gall acid, rosemary acid, quercetin, thymol and tea tree oil using broth dilution bioassay in Mueller-Hint broth.

In addition, the following were tested in combination: cymen mixed with carvacrol and thymol, cnicin mixed with carvacrol, eugenol and thymol, gall acid mixed with carvacrol with thymol, with eugenol and with quercetin.

Natural compounds were dissolved in 24% ethanol, 0, 5% of Tween 20 and 0, 5% of Tween 80.

The effectiveness was tested on reference strains of *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Escherichia coli* CCM 3954, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 and *Staphylococcus aureus* CCM 3953 and strains isolated from boars ejaculate - *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus hyicus*. One of the strains in our laboratory, *Pseudomonas aeruginosa*, was derived from swabs from dog's ear.

Among the most effective natural substances were **cnicin** dissolved in 24% ethanol (MIC = 150 - 1200 mg / ml and MBC = 150 - 4800 mg / ml), **carvacrol, thymol, and eugenol** (MIC = 600 - 2400 mg / ml and MBC = 600 - 2400 mg / ml) dissolved in 24% ethanol.

The lowest MIC and MBC values of combined substances dissolved in 24% ethanol were recorded in case of **of cnicin with carvacrol, with eugenol and with thymol**. The same MIC values were determined in a mixture of **gall acid with carvacrol** and MBC ranged 1200:600 - 4800:2400 mg / ml.

keywords: antibacterial activity, essential oils, broth dilution bioassay, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

*	izolováno z kančího ejakulátu
**	izolováno z výtěru ucha psa s klinickým nálezem <i>otitis externa</i>
ATB	antibiotikum
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Ent.</i>	<i>Enterococcus</i>
G ⁺	grampozitivní
G ⁻	gramnegativní
GC–MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPLC–UV	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s ultrafialovou detekcí
KA	krevní agar
LC–MS–MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí v tandemovém uspořádání
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MHA	Mueller – Hintonův agar
MHB	Mueller – Hintonův bujón
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NMR	nukleární magnetická rezonance
PBS	fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku

<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i>
RNA	ribonukleová kyselina
<i>sp.</i>	<i>species</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>S.</i>
<i>Thymus</i>	<i>Th.</i>

OBSAH

ÚVOD	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
1. VÝZNAM STUDIA PŘÍRODNÍCH LÁTEK	12
2. HLAVNÍ ZDROJE PŘÍRODNÍCH LÁTEK A ZPŮSOBY JEJICH SEPARACE	13
3. MECHANISMUS ÚČINKU PŘÍRODNÍCH LÁTEK NA MIKROORGANISMY	15
4. CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH SKUPIN PŘÍRODNÍCH LÁTEK S ANTIMIKROBIÁLNÍMI ÚČINKY	18
4.1. Fenoly a polyfenoly.....	18
4.2. Alkaloidy.....	19
4.3. Glykosidy	20
4.4. Terpeny, terpenoidy	21
4.5. Silice.....	21
5. VLASTNOSTI VYBRANÝCH TESTOVANÝCH PŘÍRODNÍCH LÁTEK 24	
5.1. Thymol	24
5.2. Carvacrol	26
5.3. Hydrochinon.....	28
5.4. Hydrochinon monomethylether.....	29
5.5. Limonen	30
5.6. Berberin sulfát	32
5.7. Quercetin dihydrát.....	33
5.8. Kyselina gallová.....	34
5.9. Melaleuceae aetheroleum (tea tree oil)	35
5.10. Kyselina rozmarýnová.....	36
5.11. <i>p</i> – cymen	38

5.12.	Knicin	40
5.13.	Eugenol.....	41
6.	METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI BAKTERIÍ K ANTIMIKROBIÁLNÍM LÁTKÁM.....	43
6.1.	Kvalitativní metody.....	43
6.2.	Kvantitativní metody.....	45
6.3.	Faktory ovlivňující výsledky stanovení účinku antimikrobiálních látek	48
	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	50
7.	MATERIÁL A METODY.....	50
7.1.	Bakteriální kmeny	50
7.3.	Kultivační média	52
7.4.	Roztoky a činidla.....	53
7.5.	Pomůcky a přístroje.....	53
8.	PRACOVNÍ POSTUP	54
8.1.	Zjišťování minimálních inhibičních a minimálních baktericidních koncentrací přírodních látek	54
8.2.	Zjišťování účinných koncentrací kombinací přírodních látek	56
9.	VÝSLEDKY	57
9.1.	Minimální inhibiční a minimální baktericidní koncentrace přírodních látek....	57
9.2.	Minimální inhibiční a minimální baktericidní koncentrace přírodních látek testovaných v kombinacích	68
	DISKUSE A ZÁVĚR.....	81
	SEZNAM LITERATURY	87
	PŘÍLOHY	101

ÚVOD

Vlastnostmi a možnostmi využití přírodních látek se zabývají vědci na celém světě. Výsledky studií potvrzují, že jejich uplatnění je široké. Můžeme jmenovat potravinářský, farmaceutický, kosmetický průmysl a v neposlední řadě také v medicíně.

Bylo zjištěno, že některé látky přírodního původu mají vedle dalších také protizánětlivé a antioxidační účinky. U některých byly prokázány inhibiční účinky na růst mikroorganismů, a to jak bakterií, virů, hub, tak i různých parazitů.

Zájem o výzkum antibakteriálních vlastností přírodních látek v posledních letech stoupá také z důvodu narůstající rezistence mikroorganismů k používaným antibiotikům. Přírodní látky jsou preferovány pro jejich minimální toxicitu, minimální vedlejší účinky, dobrou dostupnost a lepší odbouratelnost ve srovnání s antibiotiky.

Využívají se jak extrakty z rostlin, tak i jednotlivé složky, které tyto extrakty obsahují. Účinné látky jsou získávány z rostlin moderními analytickými metodami a antibakteriální aktivita testována stejně jako u antibiotik.

Cílem mé diplomové práce bylo zjišťování antibakteriálních účinků vybraných přírodních látek a jejich kombinací zkoumavkovou diluční metodou. Součástí bylo také stanovení minimální inhibiční a minimální baktericidní koncentrace různých bakteriálních druhů.

TEORETICKÁ ČÁST

1. VÝZNAM STUDIA PŘÍRODNÍCH LÁTEK

Přírodní látky jsou pro své léčivé účinky využívány již po staletí. Jejich biologická aktivita zahrnuje mimo jiné také antibakteriální, antimykotické, antivirové i antiparazitární účinky. Mnohé působí protizánětlivě a u některých byly prokázány antioxidační a antikarcinogenní efekty (Kalemba, Kunicka, 2003). Tyto poznatky jsou důvodem stále se rozšiřujícího výzkumu a ověřování jejich uplatnění v medicíně k léčbě infekčních chorob.

Narůstající rezistence mikroorganismů zahrnuje již poměrně široké spektrum antibakteriálních látek a stává se tak celosvětovým problémem. Tato skutečnost pobízí k hledání nových bioaktivních sloučenin s antimikrobiálními účinky vhodných k léčbě samostatně nebo v kombinaci s antibiotiky (Vinšová, Imramovský, 2004).

O využití přírodních látek v kombinaci s antibiotiky informovali Opletal a Šimerda (2005). Cefalosporiny, peniciliny či makrolidová antibiotika ve směsi s terpeny (silice z *Melaleuca*, *Leptospermum*) byly použity ve veterinární medicíně a vykazovaly synergický efekt.

Přírodní látky pro své různorodé účinky mají velký potenciál využití v medicíně, potravinářském průmyslu, kosmetice a farmakologii (Kalemba, Kunicka, 2003).

2. HLAVNÍ ZDROJE PŘÍRODNÍCH LÁTEK A ZPŮSOBY JEJICH SEPARACE

Přírodní látky jsou získávány převážně z rostlin. Účinné složky mohou být obsaženy v celé rostlině, nebo jen v některé z jejích částí. Nacházejí se v nadzemní části, jako jsou nať, květy, listy, lodyha, pupen, semeno a podzemní části - kořen, oddenek, hlíza (Moravcová, 2003; Dorman a Deans, 2000).

Hledání léčivých prostředků z rostlin má velmi dlouhou tradici. Rostliny mají takřka neomezenou schopnost syntetizovat aromatické sloučeniny, které mohou různými mechanismy ovlivňovat živé organismy. Často jim slouží jako ochrana proti mikroorganismům, hmyzu i býložravcům. Většina z těchto sloučenin jsou fenoly nebo jejich kyslíkaté deriváty. Některé z těchto složek dávají rostlině typickou vůni či jsou zodpovědné za jejich zbarvení, například třísloviny a chinony. Z dalších můžeme jmenovat kapsaicin (terpenoid) z čili papriček, který způsobuje charakteristickou pálivou chuť. Řada rostlin vytváří také sloučeniny s léčivými účinky a případně s antimikrobiální aktivitou (Cowan a kol., 1999).

Aktivita esenciálních olejů přírodních látek závisí na složení, struktuře daných komponent, funkčních skupinách a možných synergických interakcích mezi komponentami (Dorman a Deans, 2000).

Způsobů izolace přírodních sloučenin je několik. Nejčastěji používanou metodou je destilace s vodní parou (Kalemba, Kunicka, 2003; M. Bendahou a kol., 2008). Z dalších se využívá hydrodestilace, metanolová a etanolová extrakce (Navarro a kol., 1996).

Zastoupení účinných složek esenciálních olejů lze stanovit plynovou chromatografií (GC) (Skočibušić a Bezić, 2004; Bendahou a kol., 2008; Economakis a kol., 1999), plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC-MS) (Koşar a kol., 2008; Dadalioğlu a Evrendilek, 2004; Oke a kol., 2009; Hernandez T. a kol., 2005) kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí (LC-MS), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV detekcí (Burt a kol., 2005; Proněk a kol., 2005), nukleární magnetickou rezonancí (NMR) (Stojanovic, 2005; Fatope, 2008; Paolini, 2008) kapilární zónovou elektroforézou (CZE) a rentgenovou krystalografií (Borris, 1996).

Přehled některých rostlin obsahujících látky s antimikrobiální aktivitou uvádí tabulka 1. (Cowan a kol., 1999)

Tabulka 1: Příklady rostlin obsahujících látky s inhibičními účinky na mikroorganismy

běžný název	přírodovědný název	účinná složka	skupina	inhibiční účinky
Bazalka vonná	<i>Ocimum basilicum L.</i>	kyselina rozmarýnová	fenolická kyselina	antivirové, antibakteriální
Benedikt lékařský	<i>Cnicus benedictus L.</i>	knicin	laktonové hořčiny	antibakteriální
Blahovičník	<i>Eucalyptus spp.</i>	p-cymen	monoterpen	antibakteriální, antivirové, fungicidní
Dřišťál obecný	<i>Berberis vulgarit</i>	berberin	alkaloid	antibakteriální
Henna	<i>Lawsonia dermis</i>	kyselina gallová	fenol	antibakteriální
Hrušeň	<i>Prus spp.</i>	hydrochinon	fenol	antioxidační, antibakteriální
Hřebíčkovce kořený	<i>Syzigium aromaticum</i>	eugenol	terpenoid	antivirové, fungicidní
Jedle bělokorá	<i>Pini sibirica</i>	limonen	terpen	antibakteriální, antivirové, fungicidní
Jinan dvoulaločný	<i>Ginkgo biloba L.</i>	quercetin	flavonoidní glykosid	antibakteriální

Tabulka 1 (pokračování): Příklady rostlin obsahujících látky s inhibičními účinky na mikroorganismy

Saturejka horská	<i>Satureja montana</i>	carvacrol	terpenoid	antibakteriální
Tymián obecný	<i>Thymus vulgaris</i>	thymol	fenolický alkohol	antibakteriální, antivirové, fungicidní

3. MECHANISMUS ÚČINKU PŘÍRODNÍCH LÁTEK NA MIKROORGANISMY

Mechanismus účinku přírodních látek na mikroorganismy je složitý proces, který nebyl dosud zcela objasněn. Bylo zjištěno, že antimikrobiální účinky esenciálních olejů souvisejí s hydrofilními a lipofilními vlastnostmi daných komponent. Terpeny, které slouží jako příklad látek rozpustných v tucích, působí inhibičně na enzymy katalyzující v membráně bakteriální buňky (Kalemba, Kunicka, 2003).

Některé složky esenciálních olejů mohou „působit jako vypínač“, interferují totiž s translokací protonů přes membránové váčky a tak blokují fosforylaci adenosin-difosfátu jakožto primárního energetického metabolismu. Specifické terpeny s funkční skupinou, jako je fenolický alkohol nebo aldehyd rozrušují membránu. Zasahují také do enzymatických pochodů buňky tím, že potlačují enzymatickou aktivitu nebo úplně zastaví produkci enzymů a tím může dojít k smrti bakteriální buňky (Kalemba, Kunicka, 2003).

Carvacrol a thymol způsobují rupturu vnější lipopolysacharidové vrstvy, což má za následek částečnou dezintegraci vnější membrány. Tea tree oil denaturuje membránové proteiny. Následně dochází k částečnému úniku draselných iontů, poruše buněčného dýchání a následně k lýze buňky (Kalemba, Kunicka, 2003).

Lambert a kol. (2001) studovali mechanismus účinku thymolu, eugenolu a carvacrolu. Jejich výsledky prokázaly, že mechanismus jejich baktericidních účinků na *Ps. aeruginosa* a *S. aureus* spočívá ve zvýšení permeability membrány. Uvedené sloučeniny vstupují do cytoplasmy G- bakterií přes porinové proteiny vnější membrány a dochází tak k poškození transportu iontů (Helander a kol., 1998).

Silice také inhibují syntézu DNA, RNA, proteinů a polysacharidů v buněčné stěně plísní a bakterií. U hub navozují změny shodné s efektem působení antimykotik (Kalemba, Kunicka, 2003; Trombetta a kol., 2005).

Některé sloučeniny přírodního původu mají více mechanismů účinku. Cowan (1999) zjistil, že mechanismem účinku berberinu je vmezeřování do DNA bakterií. A Sun a kol. (1988) dokázali, že berberin sulfát je bakteriostatický na kmen *Streptococcus* a že při dosažení MIC zablokuje přilnavost tohoto kmene k hostitelským buňkám a inaktivuje fibronektin. Berberin má tedy dva mechanismy účinku na streptokoky – uvolnění kyseliny lipoteichoové a přímé zředění komplexů kyseliny lipoteichoové s fibrinonektinem.

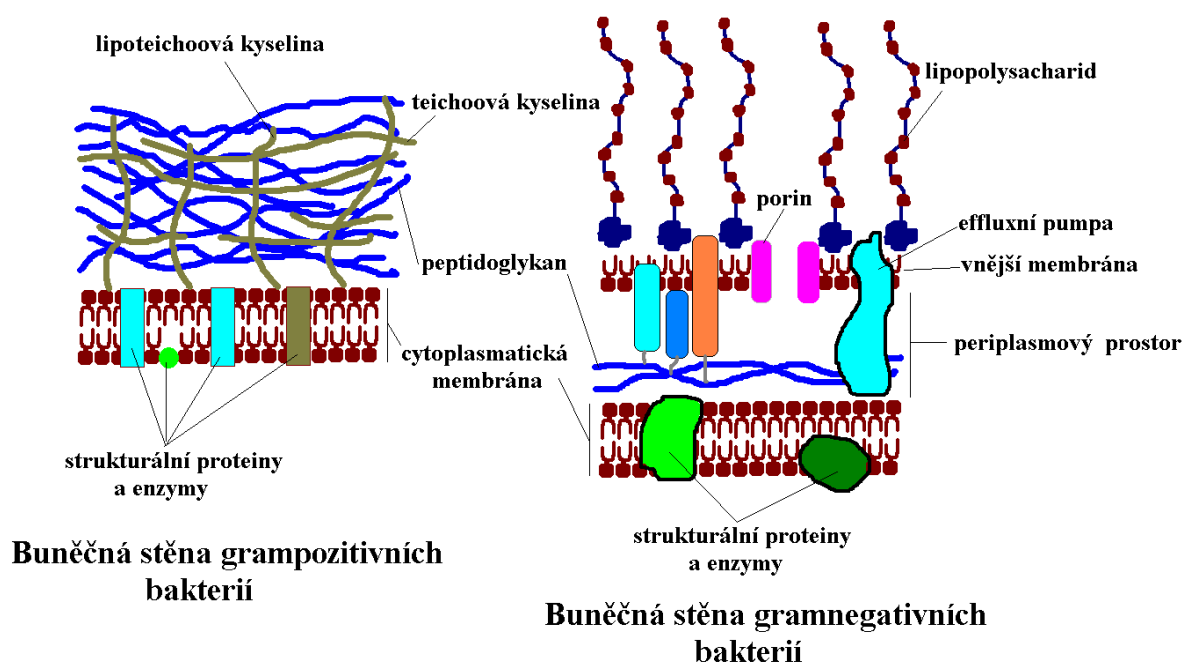
Studie Cristaniho a kol. (2007) potvrdily, že antibakteriální účinek cymenu je založen na perturbaci lipidové části buněčné membrány. Tento efekt se zdá být závislým na složení a rozložení náboje mikrobiální membrány.

Ultee a Smid (2001) při ověřování inhibičních účinků carvacrolu a cymenu na *Bacillus cereus* dokázali, že baktericidní aktivita carvacrolu byla potencována cymenem. Toto synergické působení je založeno na tom, že cymen narušuje cytoplasmatickou membránu G+ bakterií. Tím umožňuje proniknutí carvacrolu dovnitř buňky a zesílení jeho účinku spočívajícího v porušení transportu iontů a živin do buňky.

Podle studií Hynie (2003) a Kalemby a Kunické (2003) antimikrobiální účinky přírodních látek korelují se složením buněčné stěny a cytoplasmatické membrány. Grampozitivní bakterie (G+) mají ve své buněčné stěně silnější vrstvu peptidoglykanu protkanou řetězcí kyseliny teichoové. Buněčná stěna gramnegativních (G-) bakterií obsahuje málo peptidoglykanu bez kyseliny teichoové, ale silnou vrstvu lipoproteinů a lipopolysacharidů, která znesnadňuje průnik esenciálních olejů dovnitř buňky. Způsob účinku antimikrobiální aktivity také závisí na typu mikroorganismu.

Složení buněčné stěny člení bakterie na G⁺ a G⁻ na základě jejich barvitelnosti dle Gramma. Tyto skutečnosti lze tedy využít i při studiu antimikrobiálních látek. G⁻ bakterie jsou odolnější k působení přírodních sloučenin než G⁺ bakterie (Stojanovic, 2005; Navarro, 1996), což je v rozporu s hypotézou publikovanou Dormanem a Deansem (2000), podle kterých nesouvisí inhibiční účinky přírodních látek s členěním bakterií na G⁺ a G⁻.

Rozdíly ve struktuře buněčné stěny G⁺ a G⁻ bakterií znázorňuje obrázek 1.



Obrázek 1: Schéma uvádějící rozdílnost ve stavbě buněčné stěny u G⁺ a G⁻ bakterií

(<http://www.volny.cz/microbiology/cesky/texty/obecmikro.doc>, staženo 23. 3. 2009)

4. CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH SKUPIN PŘÍRODNÍCH LÁTEK S ANTIMIKROBIÁLNÍMI ÚČINKY

4.1. Fenoly a polyfenoly

4.1.1. *Jednoduché fenoly, polyfenoly a fenolové kyseliny*

Patří do skupiny jednodušších bioaktivních látek s jednou substitucí na aromatickém kruhu. Hlavními zástupci této rozsáhlé skupiny odvozené od fenyylpropanu jsou kyselina skořicová a kávová. Tyto kyseliny, obsažené v estragonu a mateřídoušce, vykazují antivirové, antibakteriální a antimykotické účinky (Cowan, 1999).

Do této skupiny patří také kyselina felurová, která je součástí buněčné stěny obilovin. Má široké spektrum biologických účinků a přírodní estery této kyseliny mají antimikrobiální účinky. Feruloyloligosacharidový ester izolovaný z ananasu vykazuje ještě silnější inhibiční účinky na G⁺ a G⁻ bakterií (Opletal a Šimerda, 2005).

Cowan (1999) uvádí, že poloha a počet hydroxylových skupin ve fenolické struktuře úzce souvisí s antimikrobiální aktivitou. Ve své studii dokazuje, že zvýšená hydroxylace vede ke zvýšené toxicitě. Význam hydroxylových skupin i jejich umístění v molekule potvrdili Dorman a Deans (2000).

4.1.2. *Chinony*

Chinony jsou nejrozšířenější skupinou přírodních barviv. Chemicky se jedná o deriváty benzochinonů, naftochinonů, antrachinonu a dalších (Moravcová, 2003).

Jsou to aromatické sloučeniny se dvěma substituovanými karbonylovými skupinami. Chinony jsou vysoce reaktivní sloučeniny. V mikrobiální buňce tvoří ireverzibilní komplexy s nukleofilními aminokyselinami, což má za následek inaktivaci proteinů a ztrátu jejich funkce. Pravděpodobně reagují také s povrchovými adheziny, polypeptidy buněčné stěny a enzymy vázané na membránách (Cowan, 1999).

4.1.3. *Flavonoidy*

Flavonoidy jsou jednou z nejméně studovaných skupin přírodních látek s antimikrobiální aktivitou. Z chemického hlediska jsou flavonoidy hydroxylované fenolické aromatické sloučeniny odvozené od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, který je tvořen dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem. Jsou také známé pro své antioxidační působení, které závisí na počtu a poloze hydroxylovaných skupin v molekule.

Jejich antimikrobiální aktivita je pravděpodobně založena na tvorbě komplexů s extracelulárními rozpustnými proteiny a sloučeninami v buněčné stěně mikroorganismu. Lipofilní flavonoidy mohou rozrušovat cytoplazmatickou membránu (Cowan, 1999).

Nejznámějším flavonoidem je rutin, který je netoxický. Má určitý antimikrobiální význam v zažívacím traktu. Významné jsou glykosidy morin, quercetin a kemferol. Zejména u quercetinu byly zjištěny inhibiční účinky proti *Salmonella enteritidis* a *Bacillus cereus* (Opletal a Šimerda, 2005).

Složky flavonoidů vykazují i silný antivirový efekt. Hodně studií dokládá, že flavonoidy glycyrrhizin, chrysin a swertiofranchetin jsou efektivní proti viru HIV. Do skupiny flavonoidů patří i katechiny nacházející se v zelených čajích. Katechiny inhibují růst mikroorganismů (Cowan, 1999).

4.2. Alkaloidy

Jedná se o heterocyklické organické dusíkaté sloučeniny s různými farmakologickými účinky hojně využívané v medicíně. Řadí se do aromatických planárních kvartérních alkaloidů. Jako příklad Cowan (1999) uvádí morfin, izolovaný již v 19. století z máku. Z dalších jmenuje diterpenoidní alkaloidy vykazující antibakteriální aktivitu, jež pochází z pryskyřníku a glykoalkaloid solamargin, který je používán u HIV infekce.

V rostlinách jsou vázány jako soli organických kyselin (kyselina šťavelová, octová, mléčná, jablečná, vinná apod.). Většina alkaloidů jsou bezbarvé pevné látky, bez zápachu,

špatně rozpustné ve vodě a dobře v alkoholu, chloroformu, éteru a ve směsi chloroformu s éterem (Cowan, 1999).

Důležitým představitelem skupiny je berberin. Mechanismus účinku je přisuzován jeho schopnosti vmezeřovat se do bakteriální DNA. Je potenciálně účinný vůči trypanozomám a plasmodiím (Cowan, 1999).

4.3. Glykosidy

Glykosidy jsou deriváty monosacharidů, v nichž je glykosidická hydroxylová skupina substituována, jsou to tedy úplné acetaly. Jsou to sloučeniny, které obsahují jednu nebo více monosacharidových jednotek a alespoň jednu nesacharidovou část, tzv. aglykon nebo také genin. Ačkoli struktura aglykonu může být rozmanitá, na výsledné vlastnosti glykosidu má velký vliv zejména navázaný sacharid. Podle typu aglykonu se dělí do skupin: fenolové glykosidy, flavonoidové glykosidy, kardioaktivní glykosidy, saponiny, kumariny a jejich deriváty a další. Glykosidy tvoří také mnohé důležité obsahové látky rostlin a často se využívají v lékařství (<http://www.biotox.cz/naturstoff/chemie/ch-gly.html>, staženo 23. 3. 2009).

Jsou nejčastěji bezbarvé, rozpustné v alkoholu a ve vodě. V éteru, petroléteru a chloroformu jsou prakticky nerozpustné a jen nepatrně se rozpouštějí v octanu ethylnatém (<http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/glykosidy.php> staženo 23. 3. 2009).

Glykosidy se vyskytují hojně v rostlinné říši, ale některé mohou být syntetizovány i živočichy a mikroorganismy. Hrají důležitou roli při detoxikaci ve vodě nerozpustných látek. Flavonoidní glykosidy jsou deriváty fenylochromanu a odvozují se od tří základních skeletů: flavan, isoflavan a neoflavan. Nacházejí se v květech a plodech. Patří mezi rostlinná barviva, která způsobují žluté, červené a modré zbarvení květů. Účastní se redoxních pochodů a mají řadu biologických účinků. Vykazují detoxikační účinky, a proto jsou využívány při léčení infekčních i jiných nemocí (Moravcová, 2003).

4.4. Terpeny, terpenoidy

Jsou významnou složkou rostlinných silic a pryskyřic. Základním skeletem terpenů je izoprenová struktura, C₁₀H₁₆. Také se vyskytují jako diterpeny, triterpeny, (...), stejně jako hemiterpeny a sesquiterpeny. Pokud obsahují ještě heterogenní molekulu kyslíku, nazývají se terpenoidy. Jsou syntetizovány z kyselin a obsahují podíl mastných kyselin. Nejznámějšími terpenoidy jsou kafr, methanol (monoterpeny), farnesol a artemisin (sesquiterpenoidy).

Terpeny a terpenoidy potlačují růst bakterií, virů a prvoků. Triterpenoid betulinik inhibuje i virus HIV. Mechanismus inhibičního působení terpenoidů není zcela objasněn, ale zřejmě narušuje cytoplazmatickou membránu bakterií a plísní (Cowan, 1999).

Také Dorman a Deans (2000) předpokládají, že mechanismus účinku terpenů spočívá v poškození cytoplazmatické membrány bakterií. Studium účinků terpenoidů na izolované bakteriální membrány prokázalo, že jejich toxicita na mikroorganismy je založena na lipofilních vlastnostech terpenů. Jedná se o vazbu na lipidy bakteriální membrány, narušení iontové rovnováhy, tím i související poruchu funkce membránových proteinů a inhibici dýchání (Trombetta a kol., 2005).

4.5. Silice

Silice jsou těkavé lipofilní směsi přírodních látek s intenzivní vůní. Dobře se rozpouštějí v organických rozpouštědlech a naopak ve vodě velmi špatně. Jsou obsaženy v mnohých rostlinách a patří k významným léčivům. Většina je bezbarvá, některé jsou však zbarvené přirozeně: žlutá je silice hřebíčková (*Oleum caryophylli*), zelenkavou až modravou barvu mívají silice, obsahující azuleny - např. heřmánková silice (*Oleum chamomillae*). Jsou většinou kapalné, některé částečně tuhnou - např. růžová (*Oleum rosae*) nebo anýzová silice (*Oleum anisi*).

Nejčastěji jsou silice tvořeny terpeny, zejména monoterpenickými uhlovodíky, aldehydy, alkoholy, ketony, kyselinami, estery nebo seskviterpeny. Dále mohou obsahovat fenylypropanoidy. Vůni zpravidla podmiňují terpenické složky. Silice jsou obsaženy ve

zvláštních rostlinných pletivech. Mohou prostupovat celou rostlinu, jako v případě jehličnatých stromů, nebo se koncentrují v určitých rostlinných orgánech (<http://www.biotox.cz/naturstoff/chemie/ch-silice.html>, staženo 23. 3. 2009).

Silice jsou obvykle získávány z rostlinných materiálů destilací s vodní parou. Mezi další metody patří extrakce těkavými rozpouštědly a lisování.

Antibakteriální, antifungální a antioxidační aktivita silic a jejich složek je stále studována. Antioxidační aktivita se zejména sleduje u kořenových částí rostliny. Nejlepších výsledků v inhibici bakteriálních kmenů dosahovaly silice obsahující především carvacrol, cineol, eugenol a thymol. Byl zjištěn synergický efekt při kombinaci silic (z *Leptosporum*, *Melaleuca*) s antibiotiky (makrolidová antibiotika, peniciliny, cefalosporiny). Některé z těchto kombinací by se mohly využít v léčbě infekcí a tak by se snížila spotřeba antibiotik. Některé složky silic vykazují navíc i antihelmintickou a antivirovou aktivitu. (Opletal, Šimerda, 2005).

V následující tabulce 2 jsou uvedeny informace o účinných látkách silic a jejich zdrojích.

Tabulka 2: Příklady silic, účinných látek a jejich zdrojů (Moravcová, 2003; Opletal a Šimerda, 2005)

silice	účinná látka	zdroj	
		český název	latinský název
<i>carvi etheroleum</i>	karvon, limonen	kmín kořený	<i>Carum carvi</i>
<i>caryophilli etheroleum</i>	eugenol	hřebíčkovce kořený	<i>Jambosa caryophyllus</i>
<i>eucalypti etheroleum</i>	α -felandren	blahovičník kulatoplodý	<i>Eucalyptus globulus</i>
<i>foeniculi etheroleum</i>	fenchon, anethol	fenykl hořký	<i>Foeniculum vulgare</i>
<i>lavandulae etheroleum</i>	linalol	levandule lékařská	<i>Lavandula angustifolia</i>
<i>melaleuca etheroleum</i>	terpen-4-ol, γ -terpinen	tea tree oil	<i>Melaleuca alternifolia</i>
<i>menta piperine etheroleum</i>	mentol	máta peprná	<i>Menta ktiivit L.</i>
<i>origani etheroleum</i>	carvacrol	dobromysl obecná	<i>Origanum vulgare</i>
<i>rosmarini etheroleum</i>	kafr	rozmarýn lékařský	<i>Rosmarinus officinalis L.</i>
<i>salvia etheroleum</i>	kafr, α a β -thujon	šalvěj lékařská	<i>Salvia officinalis L.</i>
<i>terebinthinae etheroleum</i>	α -pinen	borovice lesní	<i>Pinus silvestris L.</i>
<i>thymi etheroleum</i>	thymol	tymián obecný	<i>Thymus vulgaris L.</i>

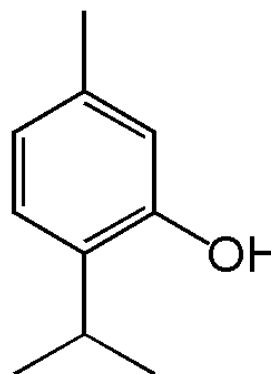
5. VLASTNOSTI VYBRANÝCH TESTOVANÝCH PŘÍRODNÍCH LÁTEK

5.1. Thymol

Sumární vzorec: $C_{10}H_{14}O$

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

Synonyma: 2isopropyl – 5 – methylfenol



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

Obrázek 2: strukturní vzorec – thymol

(<http://faf.vfu.cz/html/docs/compounds/monoterpeny/thymol/index.html>, staženo 19. 2. 2008)

Thymol patří do skupiny fenolických sloučenin, tvoří bezbarvé krystalky a voní jako kafr. Je velmi těžko rozpustný ve vodě, snadno v 96% ethanolu, éteru, silicích a zředěných roztocích alkalických hydroxidů (Český lékopis, díl IV., 2002).

Thymol je obsažen spolu s carvacrolem v listech a květech druhu *Thymus (Th.) vulgaris L.* (Tymián (T.) obecný), *Th. zygis L.* (T. bílý) nebo v *Origanum vulgare* (Dobromysl obecná). Dalším zdrojem jsou silice z rostlin *Citrus limon* (Citroník), *Tanacetum vulgare* (Vratič obecný), *Th. serpyllum* (Mateřídouška úzkolistá), *Satureja hortensis* (Saturejka zahradní), *Arnica montana* (Prha arnika), případně v řadě dalších.

M. Bendahou a kol. (2008) se zabývali chemickým složením a antibakteriálními účinky *Origanum glandulosum*. Metodou vodní destilace a mikrovlnné extrakce (SFME) získali požadované esenciální oleje, jejichž složení určili plynovou chromatografií. Hlavními komponentami obou esenciálních olejů byly thymol (41,6 – 81,1 %), γ – terpinen

(27,0 – 3.1 %), *p* – cymen (17,1 – 4,0 %) a carvacrol (2,2 – 4,4 %). Autoři uvádějí, že metoda SFME byla selektivnější pro extrakci thymolu a olej *O. glandulosum* prokazoval antifungální a antibakteriální aktivitu.

Inhibiční účinky ověřovali také Lambert a kol. (2001) inovovanou technologií v mikrotitračních destičkách s turbidimetrickým vyhodnocením. Autoři zjišťovali minimální inhibiční koncentraci (MIC) oreganového esenciálního oleje a dvou jeho hlavních složek thymolu a carvacrolu pro kmeny *Pseudomonas (Ps.) aeruginosa* a *Staphylococcus (S.) aureus*. Zároveň studovali mechanismus účinku. Ve výsledcích uvádějí, že *Ps. aeruginosa* byl méně citlivý k thymolu a carvacrolu než *S. aureus*. Dále prokázali, že dochází ke zvýšení membránové permeability, což bylo podstatou baktericidního účinku obou přírodních látek.

Rovněž Helander a kol. (1998) potvrdili, že thymol svou fenolickou strukturou poškozují cytoplazmatickou membránu. Esenciální oleje thymolu, carvacrolu a eugenolu vstupují do cytoplasmy G- bakterií přes porinové proteiny vnější membrány a způsobují porušení transportu iontů. I Kalemba a Kunická (2003) potvrdili poznatky uvedených autorů.

Thymol inhibuje růst jak G- tak i G+ bakterií, kvasinek a plísní. Didry a kol. (2003) prokázali inhibiční účinek thymolu na *S. aureus* a *E. Coli* v koncentracích 250 µg/ml a na *Ps. aeruginosa* v koncentracích vyšších než 500 µg/ml.

Jsou známé toxické účinky thymolu na sliznice dýchacího i trávicího traktu, ale neexistují záznamy o toxických účincích na reprodukci ani o karcinogenitě.

Kosar a kol. (2008) stanovili MIC thymolu, *p* - cymenu a carvacrolu u methicillin-resistentních *S. aureus* a kvasinek *Candida albicans* a *Candida tropicalis*. Hodnoty minimální inhibiční koncentrace se pohybovaly v rozmezí 62,5 a 250 µg/ml.

Walsh a kol. (2003) prokázali inhibiční a baktericidní účinky thymolu na *S. aureus*, *E. coli* a *Ps. aeruginosa*. Autoři uvádějí, že MIC byla 500 µg/ml u *S. aureus* a *E. coli*, avšak pro *Ps. aeruginosa* více než 1000 µg/ml.

5.2. Carvacrol

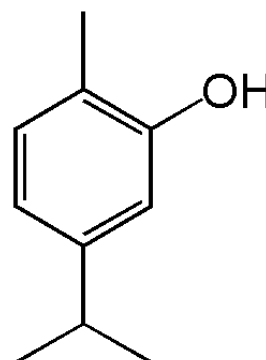
Sumární vzorec: C₁₀H₁₄O

Molekulová hmotnost: 150,22 g.mol⁻¹

Synonyma: 5 – isopropyl – 2 – methylfenol

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

2 – hydroxy - p - cymol



Obrázek 3: carvacrol – strukturní vzorec

(<http://faf.vfu.cz/html/docs/compounds/monoterpeny/carvacrol/index.html>, staženo 19. 2. 2008)

Carvacrol je fenolický monoterpen (Opletal a Šimerda, 2005). Jedná se o světle hnědou kapalinu, prakticky nerozpustnou ve vodě, ale snadno v 96% ethanolu a éteru (Český lékopis, díl I., 2002).

Zdrojem této éterické silice je zejména *Th. vulgaris* (T. obecný) nebo *Th. zygis* L. (T. bílý), kde se vyskytuje v listech a v květech spolu s thymolem. Také je obsažen v *Origanum vulgare* (Dobromysl obecná), *Mentha* (Máta peprná), *Th. serpyllum* (Mateřídouška úzkolistá), (<http://faf.vfu.cz/html/docs/compounds/monoterpeny/carvacrol/index.html>, staženo 19. 2. 2008), *Satureja montana* a *Satureja hortensis* (Saturejka horská a zahradní), (Kapesní atlas str. 272) a v dalších rostlinných silicích.

Chemickým složením silice z *Origanum dictamnus* se zabývali Economakis a kol. (1999). Autoři metodou plynové chromatografie a GC–MS zjistili, že převládající složkou byl carvacrol. Následně ověřovali antimikrobiální aktivitu této silice na *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *E. coli* a *Ps. aeruginosa*.

Carvacrol jako hlavní složku (45.7 %) silice ze *Satureja montana* prokázali chromatografickou analýzou (GC–MS) Skočibušić a Bezić (2004). María C. Rota a kol. (2008) stejnou metodou určili, že silice z *Th. zygis* obsahuje chemotypy carvacrolu.

Liolios a kol. (2009) prověřovali složení a antibakteriální aktivitu esenciálního oleje z *Origanum dictamnus*. Metodou GC–FID určili, že majoritní složku tvoří carvacrol. Dále silice obsahovala thymol, *p* – cymen a γ – terpinen. Antibakteriální aktivitu testovali difuzní metodou proti čtyřem druhům G+ a čtyřem G- bakterií.

Inhibiční účinky carvacrolu na *E. Coli* O157: H7 studovali Burt a kol. (2005). Mikrodiluční metodou určili MIC carvacrolu 180 $\mu\text{g/ml}$ na *E. Coli* O157:H7. Výsledky jejich studie také potvrdily, že carvacrol ve směsi s thymolem má aditivní antibakteriální efekt na uvedené mikroorganismy.

Antibakteriální aktivitu na mikroorganismy v potravinách studovali Feyza Oke a kol. (2009). Chromatografickou analýzou (GC–MS) detekovali v *Satureja cuneifolia* carvacrol (44,9 %) a *p* – cymen (21.61 %). Stanovili MIC, která se pohybovala v rozmezí 600 – 1400 $\mu\text{g/ml}$.

Didry a kol.(1993) zjišťovali MIC carvacrolu difuzní diskovou metodou. Hodnota MIC pro *S. aureus*, *E. coli* a *Streptococcus pneumoniae* byla 125 $\mu\text{g/ml}$, pro *Ps. aeruginosa* vyšší než 500 $\mu\text{g/ml}$. Zároveň se zabývali vzájemným působením carvacrolu s thymolem a carvacrolu s kyselinou skořicovou. Mikrodiluční metodou zaznamenali synergické působení směsi carvacrolu s thymolem.

Složením a antibakteriální aktivitou silice z *Lantana achyranthiofilia* se zabývali Hernandez T. a kol.(2005). Metodou GC-MS prokázali jako hlavní složku esenciálního oleje carvacrol (30,64 %). Dále diskovou difuzní metodou stanovili MIC. Pro *E. coli* a *Salmonella typhimorium* byla hodnota rovna 1000 $\mu\text{g/ml}$, u *S. aureus* 250 $\mu\text{g/ml}$, u *S.epidermidis* a *Bacillus subtilis* 500 $\mu\text{g/ml}$. Rovněž prokázali, že carvacrol a thymol porušují buněčnou membránu *E. coli* a *Salmonella thyphimurium*.

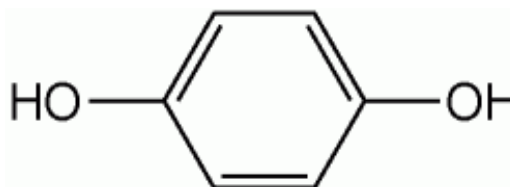
Nižší hodnotu MIC carvacrolu pro *E. coli* uvádějí Kim a kol.(1995) a to 500 $\mu\text{g/ml}$. Při testování inhibičních účinků carvacrolu na *Salmonella thyphimorium*, *Listeria monocytogenes* a *Vibrio vulnificus* stanovili MIC 500 $\mu\text{g/ml}$.

Ultee a Smid (2001) ověřovali účinky carvacrolu a cymenu na *Bacillus cereus*, který kontaminoval rýži. Dokázali, že baktericidní aktivita carvacrolu byla potencována účinkem cymenu. Obě látky potlačovaly růst *Bacillus cereus* a tím i produkci toxinu. Uvedené sloučeniny ve směsi mají synergické účinky, které spočívají v tom, že cymen narušuje cytoplasmatickou membránu G⁺ bakterií, čímž umožňuje proniknutí carvacrolu dovnitř buňky a zesílení jeho účinku.

5.3. Hydrochinon

Sumární vzorec: C₆H₆O₂

Molekulová hmotnost: 110,11 g.mol⁻¹



Obrázek 4: hydrochinon – strukturní vzorec

Synonyma: benzen – 1,4 – diol

1, 4 – dihydroxybenzen

p – dihydroxybenzen

4 – hydroxyfenol

(http://www.eurochem.cz/index/toxi/369_0213.htm, staženo 9. 11. 2008)

Hydrochinon je dvojsytný fenol s oxidačně redukčními účinky. Tvoří bezbarvé krystalky. Je rozpustný ve vodě, volně rozpustný v 96% ethanolu, éteru a málo rozpustný v benzenu. Roztoky hydrochinonu na vzduchu hnědnou následkem oxidace.

V listech medvědice léčivé (*Folia Uvae – ursi*) je obsažený hydrochinon glykosidicky vázán. V tucích působí jako antioxidant.

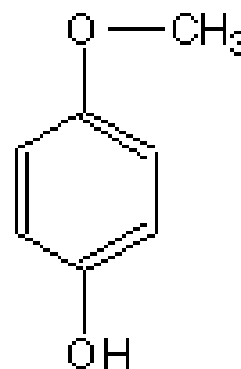
(<http://64.233.183.104/search?q=cache:ZxC62AISAcJ:www.piskac.cz/pavel/recenze/TIS/HYDROCHINON.RTF+hydrochinon,vlastnosti&hl=cs&ct=clnk&cd=6&gl=cz>, staženo 9. 11. 2008).

Hydrochinon je karcinogen a mutagen 3. třídy a může vyvolat alergickou reakci. Má toxické a karcinogenní účinky především na kůži, kde může vyvolat nádorové bujení.

5.4. Hydrochinon monomethylether

Sumární vzorec: $C_7H_8O_2$

Molekulová hmotnost: $124,13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Obrázek 5 : hydrochinon monomethylether – strukturní vzorec

Synonyma: 4 – Methoxyphenol

p – hydroxyanisol

4 – hydroxyanisol

(http://www.4-methoxyphenol.com/4_methoxyphenol_info.html, staženo 9. 11. 2008)

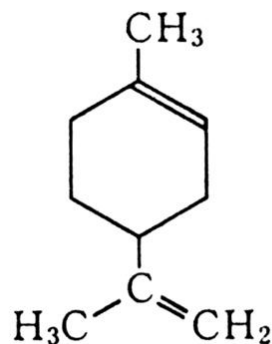
Hydrochinon monomethylether je bílá až žlutohnědá krystalická látka, která voní po karamelu a fenolu. Je rozpustný v organických rozpouštědlech jako alkohol, éter a benzen a velmi málo rozpustný ve vodě (<http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/4-ethoxyphenol/recognition.html>, staženo 9. 11. 2008).

Jedná se o vysoce hořlavou, zdraví škodlivou sloučeninu. Dráždí oči, dýchací orgány a kůži, kde může vyvolat senzibilizaci (<http://org.sci.muni.cz/files/bezp.pdf>, staženo 9. 11. 2008).

5.5.Limonen

Sumární vzorec: $C_{10}H_{16}$

Molekulová hmotnost: $136.23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Obrázek 6: limonen – strukturní vzorec

Synonyma: Methyl – 4 – isopropenyl – cyclohexen

p – mentha – 1,8 – dien

dipenten

Cajaputene, Carvene

(<http://faf.vfu.cz/html/docs/compounds/monoterpeny/limonen/index.html>, staženo 11. 3.2008)

Čistý limonen je čirá tekutina. Jedná se o monoterpen tvořený dvěma izoprenovými jednotkami. Limonen má dvě aktivní optické formy, L – limonen a R – limonen lišící se odlišným zápachem. L-limonen voní po borovicích a připomíná terpentýn, kdežto R-limonen má příjemnou pomerančovou vůni. Jednotlivé formy se liší i svými účinky (Filipsson a kol., 1998).

Bylo prokázáno, že limonen má protirakovinné účinky, zvyšuje úroveň jaterních enzymů zapojených v detoxikačních procesech karcinogenů a to zejména u glutathion-S transferázy. Je také používán jako rozpouštědlo a detergent (Filipsson a kol., 1998).

Tato přírodní látka se nachází v esenciálním oleji citrusových plodů jako je *Citrus limon* (Citrovník), *Citrus aurantium subsp.amara*, *Citrus aurantium subsp.aurantium*. Rovněž se vyskytuje v rostlinách *Carum carvi* (Kmín kořený), *Coriandrum sativum* (Koriandr setý), *Salvia officinalis* (Šalvěj lékařská), *Rosmarinus officinalis* (Rozmarýna lékařská) a v mnoha dalších rostlinných silicích (<http://faf.vfu.cz/html/docs/compounds/monoterpeny/limonen/index.html>, staženo 11. 3. 2008).

Limonen vykazuje antibakteriální, antivirové a fungistatické účinky. Antibakteriální aktivitou aromatických esenciálních olejů z *Eucalyptus*, *Aframomum*, *Cymbopogon*, *Monodora* a *Ocinum* se zabývali K. Cimanga a kol. (2002) diskovou difuzní metodou. Jejich separaci provedli plynovou chromatografií a zastoupení jednotlivých složek zjistili metodou GC–MS. Autoři prokázali, že limonen je jednou z hlavních komponent v testovaných rostlinách vykazující antimikrobiální účinek.

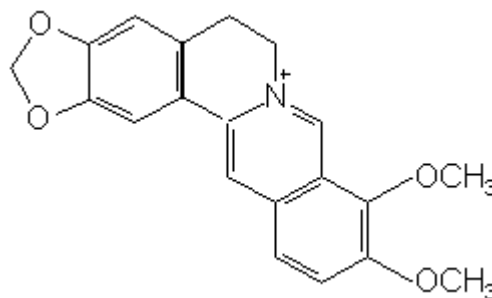
Mikrodiluční metodou určili MIC limonenu Sonboli a kol. (2006) při prověřování antibakteriální aktivity esenciálního oleje ze tří druhů *Salvia* (*Sal.*) (*Sal. santolinifolia*, *Sal. mirzayanii* a *Sal. hydrangea*). Hodnoty MIC se pohybovaly v rozmezí 4400 – 36800 µg/ml u *Bacillus subtilis*, *Ent. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Ps. aeruginosa*.

Van Vuuren a kol. (2007) studovali baktericidní účinky enantiomerů limonenu. MIC stanovili mikrotitrační metodou u čtyř druhů G+ bakterií (*S. aureus*, *Ent. faecalis*, *Bacillus cereus*) a čtyř G – bakterií (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* a *Ps. Aeruginosa*). Rozmezí pro R – limonen bylo od 3000 do 27000 µg/ml a u L – limonenu byly hodnoty MIC od 2000 do 27000 µg/ml v závislosti na druhu mikroorganismu. Nižší hodnoty MIC u *S. aureus* (8000 µg/ml) a *Ps. aeruginosa* (8000 µg/ml) zaznamenali u kombinace limonenu a 1,8 – cineolu (1:1).

5.6. Berberin sulfát

Sumární vzorec: $C_{40}H_{36}N_2O_{12}S_1$

Molekulová hmotnost: $768.803 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Obrázek 7: berberin - strukturní vzorec

Synonyma: Berbinium

7,8,13,13a – tetrahydro – 9,10 – dimethoxy – 2,3 – (methylenedioxy) – sulfát
(2:1)

http://www.eurochem.cz/index.php?EURID=201823790&CompNo=1&PropNo=0&LtoB=1&QSAS=4&QSPG=1&MN=BERBERIN-SULF%E1T&ID=0&MLEV=0&DT=134217728&SPC=0&ACT=30&M_ID=0&M_MLEV=0&M_SPC=0&LA=CS

Berberin je isochinolinový alkaloid jasně žluté barvy. Je rozpustný v 96% ethanolu, éteru a benzenu, ale nerozpustný ve vodě. Je to alkaloid odvozený od fenylyalaninu a tyrozinu (Dharmananda, 2005).

Berberin je obsažen asi v 1 % v kořenové kůře dřeviny obecného zvaného též dráč (*Berberis vulgaris L.*). Používá se při onemocnění žlučníku a jater, je oblíbený v lidovém léčitelství a homeopatii na revmatismus a hemeroidy. Je obsažen také ve vlašovičnicku větším (*Chelidenum majus L.*) (Moravcová J., 2006).

Mechanismus účinku studoval Cowan (1999) a zjistil, že jeho podstatou je vmezeřování do DNA bakterií. Sun a kol. (1988) ověřovali jeho antivirový i antibakteriální efekt. V této studii dokázali, že berberin sulfát působí bakteriostaticky na streptokoky. Při dosažení MIC zablokuje v místě infekce přilnavost mikroba k hostitelským buňkám inaktivací fibronektinu. Berberin má tedy dvojitý účinek při streptokokové infekci – uvolnění kyseliny lipoteichoové a přímé zředění komplexů kyseliny lipoteichoové s fibronektinem.

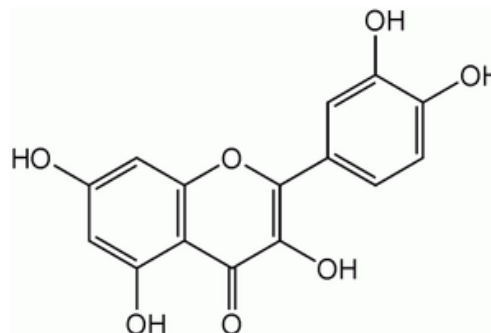
Studie Stermitzeho a kol.(2000) dokládá účinnost berberinu na *S. aureus* zodpovědného za řadu nosokomiálních nákaz. Hodnota MIC kombinace berberinu s 5'-methoxyhydnocarpinem (5' - MHC) činila 256 µg/ml. Sloučenina 5' - MHC sama o sobě antibakteriální aktivitu nevykazuje.

5.7.Quercetin dihydrát

Sumární vzorec: $C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$

Molekulová hmotnost: $338,27 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

(Večeřa a kol., 1975)



Obrázek 8: quercetin- strukturní vzorec

Synonyma: 3, 3', 4', 5,7 – pentahydroxyflavon dihydrát

2 – (3,4 – dihydroxyfenyl) – 3,5,7 – trihydroxy – 4H – chromen – 4 – on dihydrát

2 – (3, 4- dihydroxyfenyl) – 3,5,7 – trihydroxychromen – 4 – on dihydrát

Quercetin je glykosidický flavonoid, který tvoří základ mnoha dalších flavonoidů jako je rutin, hesperidin, naringin a tangeritin. Mnoho léčivých rostlin vděčí velké části svých aktivit právě vysokému obsahu quercetinu. Quercetin vykazuje významnou protizánětlivou aktivitu. Omezuje produkci a uvolňování histaminu a jiných alergických a zánětlivých mediátorů. Navíc má silnou antioxidační schopnost (<http://flavonoid.navajo.cz/>, staženo 3. 12. 2008.).

Uvedená sloučenina tvoří žluté krystalky dobře rozpustné v 96% ethanolu, methanolu nebo v éteru, avšak špatně rozpustné ve vodě (Český lékopis, 2002, 1. Díl).

Je opticky aktivní, vykazuje antioxidační a antilipoperoxidační účinky. In vitro byly prokázány antiprotozoální účinky na *Entamoeba histolytica* a *Giardia lambda*.

Vyskytuje se v česneku, cibuli, chmelu a plodech kaštanů. Dalším zdrojem tohoto flavonoidu jsou rostliny jako například *Oenothera biennis* (Pupalka dvouletá), *Helianthus annuus* (Slunečnice roční), *Avena sativa* (Oves setý), *Acacia senegal* (Akácie senegalská), *Achillea millefolium* (Řebříček obecný), *Ginkgo biloba* (Jinan dvoulaločný) a v dalších (<http://faf.vfu.cz/html/docs/compounds/Flavony/kvercetin/index.html>, staženo 5. 4. 2008).

Opletal a Šimerda (2005) informují o antimikrobiální aktivitě quercetinu na *Bacillus cereus* a *Salmonella enteritidis*. Uvádějí, že quercetin inhibuje růst obou bakteriálních druhů.

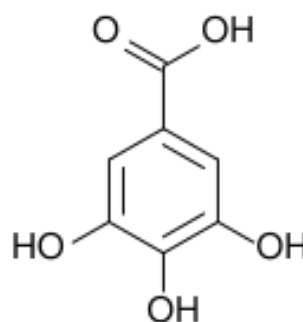
Terapeuticky významný je také flavonový glykosid rutin (quercetin – 3 – rhamnoglukosid) vyskytující se v *Ruta graveolens* (ruta vonná), kde byl primárně izolován. Je obsažen také v pohance a spolu s quercetinem se nachází v cibuli, v níž se vyskytuje i další účinný flavonoid spiraeosid, což zjistili Proněk a kol.(2005) metodou HPLC.

5.8.Kyselina gallová

Sumární vzorec: $C_7H_6O_5 \cdot H_2O$

Molekulová hmotnost: $188,14 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

(Večeřa a kol., 1975)



obrázek 9: kyselina gallová-strukturní vzorec

Synonymum: monohydrát kyseliny 3, 4, 5 – trihydroxybenzeové

Kyselina gallová je organická kyselina, která se nachází v duběnkách, ořeších, dubové kůře, čajových lístcích a dalších rostlinách. Vyskytuje se ve volné formě nebo vázaná do taninů, ze kterých se získává kyselou hydrolyzou. Tato přírodní fenolická sloučenina je bezbarvá nebo slabě nažloutlá. Tvoří dlouhé jehlice nebo krystalický prášek. Je dobře rozpustná ve vodě, v 96% ethanolu a v glycerolu, špatně v éteru (Český lékopis, díl 1., 2002).

Kyselina gallová vykazuje antibakteriální a imunomodulační účinky společně s methyl-galátem (<http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xbcr/zc/Prakticke-lekarenstvi-2-2005-SOLEN-0009.pdf>). Antibakteriální účinek kyseliny gallové, kterou získali z extraktu z listů několika druhů *Cirsium*, analyzovali metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie Nazaruk a kol. (2008).

Plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí rozdělili a identifikovali frakce kyselin z *Paeonia peregrina* a *Paeonia teneuifolia* Ivanova a kol. (2002). Tyto frakce obsahovaly mimo jiné sloučeniny kyselinu gallovou a ethylgalláty. Při ověřování antimikrobiálních účinků kyseliny gallové diskovou difuzní metodou zaznamenali inhibici u kmenů *S. aureus*, *E. coli* a *Candida albicans*.

Nohýnek a kol. (2006) studovali mechanismus a antibakteriální účinek fenolických plodů. Mezi nejcitlivější bakterie patřili *Helicobacter pylori* a *Bacillus cereus*. Kyselina gallová účinně inhibovala i testovaný kmen *Salmonella sp.*

5.9.Melaleuceae aetheroleum (tea tree oil)

Tea tree oil lze získat z extraktu z listů čajového stromu *Melaleuca alternifolia* (kajeput střídavolistý), který patří do rodiny *Myrtaceae*. Tento extrakt je získaný destilací vodní parou obsahuje více než sto komponent, většinou seskviterpeny a terpenoly. Hlavní složky působící bakteriostaticky a antimykoticky jsou 1,8 – cineol a terpinen – 4 – ol.

Tea tree oil je bezbarvá až světle žlutá olejová kapalina s typickým kořeněným aroma. Je nerozpustný ve vodě, rozpouští se v 96% ethanolu. Je používán v medicíně, hojně v kosmetickém průmyslu pro své antiseptické, antibakteriální a antimykotické účinky (<http://www.chemicaland21.com/lifescience/foco/TEA%20TREE%20OIL.htm>, staženo 3. 12. 2008).

Antibakteriálními účinky *Melaleuceae aetheroleum* na *S. aureus* studovali Chung a kol. (2007). Nejen, že prokázali baktericidní efekt, ale také zjistili že tea tree oil má vysokou afinitu k bakteriálním buňkám, což umožňuje jejich lýzi.

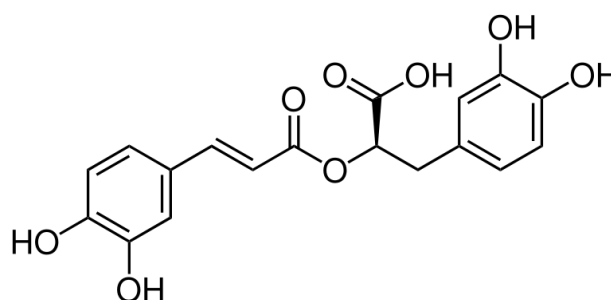
Papadopoulos a kol. (2006) stanovili hodnoty MIC tea tree oil u kmenů *Pseudomonas sp.* Výsledná hodnota MIC byla 17560 µg/ml. Autoři potvrdili, že účinnými složkami oleje jsou terpinen – 4 – ol, α – terpineol, cineol, γ – terpinen a ρ – cymen.

Oproti tomu v publikované studii Coxe a kol. (2001) je uvedeno, že *Ps. aeruginosa* byl k tea tree oil i jeho jednotlivým složkám rezistentní. Kmeny *S. aureus* a *E.coli* inhiboval tea tree oil v koncentraci 2195 µg/ml a *Candida albicans* 1097,5 µg/ml.

5.10. Kyselina rozmarýnová

Sumární vzorec: C₁₈H₁₆O₈

Molekulová hmotnost: 360,31 g.mol⁻¹



obrázek 10: Kyselina rozmarýnová – strukturní vzorec

Synonyma: Ros A,

[[3 – (3,4 – dihydroxyfenyl) – 1 – oxo – 2E – propenyl]oxy] – 3,4 – dihydroxy – benzenpropanová kyselina

Kyselina rozmarýnová se vyskytuje ve formě hnědého až načervenalého prášku a patří mezi fenolické kyseliny. Jedná se o derivát kyseliny kávové. Je rozpustná ve vodě, 96% ethanolu a ve vodně-alkoholickém roztoku, ale nerozpustná v absolutním alkoholu a oleji. Pro své antioxidační, antikoagulační, antivirové a antibakteriální účinky je používána v potravinářském, kosmetickém a v chemickém průmyslu a hojně také v medicíně (<http://www.chemnet.com/sell/chemdetail/1988500.html>, staženo 2. 3. 2009).

Nachází se v rostlinách *Rosmarinus officinalis* L. (Rozmarýn lékařský), v *Ocinum basilicum* (Bazalka vonná), *Melissa officinalis* (Meduňka lékařská), *Th. vulgaris* (T. obecný), *Salvia officinalis* (Šalvěj lékařská) a v dalších (<http://www.liberherbarum.com/minor/cz/In1478.HTM>, staženo 2. 3. 2009).

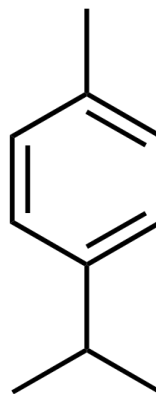
Petersen a Simmonds (2002) studovali chemickou strukturu a biologické účinky kyseliny rozmarýnové. Autoři uvádějí, že se jedná o ester kyseliny kávové a 3,4 – dihydroxyfenylmléčné. Mezi významné účinky kyseliny patří antioxidační, antimutagenní, anstringentní, antiflogistický, antivirový a antibakteriální působení. Její přítomnost v rostlinách má zřejmě obranný efekt, slouží tedy jako ochranná složka rostliny před působením mikroorganismů a škůdců.

Chemickému složení a antibakteriálním účinkům esenciálního oleje z *Rosmarinus officinalis* L. se ve své studii věnovali Santovo a kol. (2005). Jednotlivé složky získané extrakcí superkritickým CO₂ identifikovali plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Inhibiční účinky na *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E.coli* a *Ps. aeruginosa* ověřovali diskovou difuzní metodou a zkumavkovou diluční metodou. Nejcitlivější k extraktům z rozmarýnu byl *S. aureus* (rozmezí zóny inhibice – 17- 33mm a rozmezí MBC: 2250 – 250 µg/ml).

5.11. *p* – cymen

Sumární vzorec: C₁₀H₁₄

Molekulová hmotnost: 134,22 g.mol⁻¹



Obrázek 11: *p* - cymen – strukturní vzorec

Synonyma: 1 – isopropyl – 4 – methylbenzen

1 – isopropyl – 4 – methyl – benzol

1 – methyl – 4 – (1 – methylethyl) – benzen

p - cymol

Jedná se o substituovaný aromatický alkyl nacházející se v éterických olejích nejméně sta rostlin (http://umbbd.msi.umn.edu/pcy/pcy_map.html, staženo 3. 3. 2009). *P* - cymen je bezbarvá až světle žlutě zbarvená tekutina, která je rozpustná v 96% ethanolu a nerozpustná ve vodě (<http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1032711.html>, staženo 3. 3. 2009).

Je opticky aktivní. *In vitro* působí fungistaticky na *Penicillium digitatum*. Má také antibakteriální a antivirové účinky. Působí také jako analgetikum, antirevmatikum a sedativum. Zdrojem *p* – cymenu jsou rostliny *Th. vulgaris* (T. obecný), *Th. serpyllum* (Mateřídouška úzkolistá), *Origanum vulgare* (Dobromysl obecná), *Eucalyptus globulus* (Blahovičnick kulatoplodý), *Pinus sylvestris* (Borovice lesní), *Cnicus benedictus* (Benedikt lékařský), *Valeriana officinalis* (Kozlík lékařský) a další (<http://faf.vfu.cz/html/docs/compounds/monoterpeny/cymen.index.html>, staženo 13. 3. 2008).

Studie Cristaniho a kol. (2007) potvrzuje, že *p* - cymen vykazuje antimikrobiální aktivitu na *S. aureus* a *E. coli*. Autoři rovněž poukazují na to, že výsledky byly ovlivněny lipofilními vlastnostmi a rozpustností *p* – cymenu, který je ve vodě prakticky nerozpustný. Na základě výsledných studií mechanismus účinku cymenu spočívá v porušení cytoplazmatické membrány bakterie (hrubá perturbace lipidové frakce membrány).

Esenciální olej z *Origanum syriacum* L., obsahující *p* – cymen, γ – terpinen a carvacrol (analýza GC/MS), má antioxidační a bakteriostatické účinky (Alma a kol., 2003). Tyto účinky byly ověřovány agarovou diskovou difuzní metodou s koncentrací 2 a 4 μ l silice v disku. Významným zjištěním byla inhibice *E. coli* a *S. aureus* izolovaných z potravin. Zóny inhibice u obou koncentrací byly u *E. coli* 16mm,30mm a *S. Aureus* 20mm,38mm a byly větší než u ampicilinu (10 μ g/disk) a streptomycinu (10 μ g/disk).

Kisko a Roller (2005) zjistili, že *p* – cymen a carvacrol mohou zabránit množení kmene *E. coli* O157:H7 v jablečném džusu. Inhibice bakteriálních buněk byla zaznamenána u koncentrace 1,25 mM *p* – cymenu i carvacrolu. Při použití obou přírodních látek v kombinaci byla účinná koncentrace *p* – cymenu 0,25mM a 0,5mM carvacrolu. Výsledky svědčí o synergickém působení obou látek.

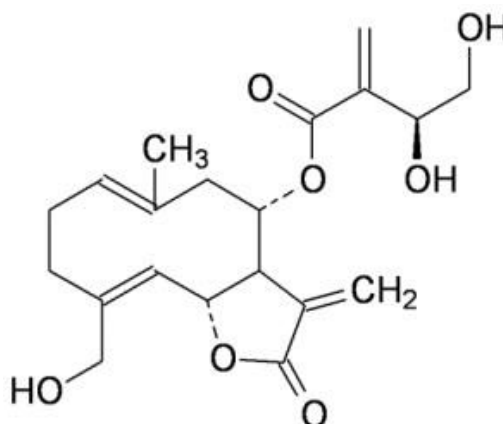
Čeľad *Hedychium* byla zkoumána Joshi a kol.(2008) pro své antibakteriální vlastnosti. *H. aurantiacum* obsahovala jako hlavní komponentu *p* – cymen. Minimální inhibiční koncentrace byly zjištěny diskovou metodou na *S. aureus*, *Shigella flexneri*, *Pasteurella multocida*, *E. coli* a *Salmonella enterica enterica*.

Bylo stanoveno složení esenciálních olejů rostlin rodu *Origanum* (Dobromysl, oregáno). Rovněž byla zkoumána antioxidační a antibakteriální aktivita těchto izolovaných rostlinných olejů. Silice z oregana byly silně zastoupeny monoterpenem *p*-cymenu (16.8-24.9 %). Oregano vykazovalo antioxidační účinky, které však závisely na specifickém chemickém složení a použité metodě detekce. Při zjišťování antibakteriálních účinků oregánové silice zjistili Hazzit a kol. (2006), že *Listeria monocytogenes* je rezistentní.

5.12. Knicin

Sumární vzorec: C₂₀H₂₆O₇

Molekulová hmotnost: 378.42 g.mol⁻¹



Obrázek 12: knicin – strukturní vzorec

Synonyma: Centaurin

Cynisin

(Opletal a kol., 2007)

Knicin je seskviterpenický lakton, germakranolid. Patří mezi sloučeniny obsažené v rostlinách s hořkou chutí a farmakologickými účinky (Opletal a kol., 2007). Je rozpustný v acetonu (Šnejdar, 2005).

Knicin se nachází v bylinách *Cnicus benedictus* (Benedikt lékařský), *Centaurea cyanus* (Chrpa modrá) a *Silybum marianum* (Ostropestřec mariánský). (<http://www.liberherbarum.com/Minor/HU/IN0426.htm>, staženo 4. 3. 2009)

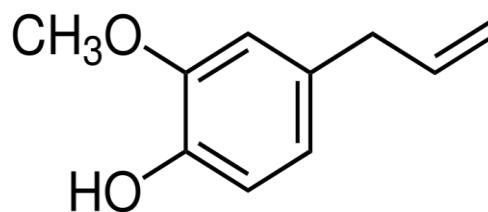
Saroglou a kol. (2005) prokázali antibakteriální aktivitu knicinu na tři G⁺ a tři G⁻ bakterie. Bruno a kol. (2003) stanovili MIC pro *E.coli* 12,5 µg/ml, *S. aureus* 25 µg/ml, *Proteus mirabilis* 25 µg/ml a *Ps. aeruginosa* 50 µg/ml. Z hodnot MIC je patrné, že knicin vykazuje vyšší antibakteriální aktivitu na G⁺ bakterie než na G⁻. Tento poznatek autoři přisuzují rozdílům ve stavbě buněčné stěny.

Stanovením MIC knicinu se zabývali i Vanhaelen-Fastré a Vanhaelen (1976). Hodnoty u *S. aureus* byla 75-100 µg/ml, *E.coli* 100 µg/ml, 50 µg/ml pro *Ps. aeruginosa* a více než 200 µg/ml pro *Proteus mirabilis*.

5.13. Eugenol

Sumární vzorec: $C_{10}H_{12}O_2$

Molekulová hmotnost: 164, 20 $g \cdot mol^{-1}$



Obrázek 13: eugenol – strukturní vzorec

Synonyma: 4 – Allyl – 2 – methoxyfenol

1 – Allyl – 3 – methoxy – 4 – hydroxybenzen

Eugenol je derivát guajakolu s alylovým řetězcem. Je částečně rozpustný ve vodě a dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech. Eugenol patří mezi fenyylpropanoidy. Je to čirá až bledě žlutá olejovitá kapalina. Vyskytuje se v hřebíčku, muškátovém oříšku, skořici a bobkovém listu. Pro svou příjemnou kořeněnou vůni je používán v kosmetickém průmyslu. Eugenol vykazuje antibakteriální, antivirové, antimykotické a antiseptické účinky.

Walsh a kol. (2003) ověřovali inhibiční účinky eugenolu na *E. coli* a *S. aureus*. U *E.coli* byl růst potlačen množstvím 533,5 $\mu g/ml$ a *S. aureus* 1067 $\mu g/ml$.

Antibakteriálním efektem éterických olejů obsahujících eugenol se zabývali Burt a kol. (2005). Výsledky jejich in vitro studie potvrzují účinnost na *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimorium*, *E. coli* O157:H7, *S. hyicus*, *S. aureus* a *Bacillus cereus*. Rozmezí hodnot MIC se pohybovalo od 0,2 do 10 $\mu l/ml$. Autoři potvrdili také synergické působení eugenolu s aldehydem kyseliny skořicové.

Dorman a Deans (2000) zjistili, že sloučeniny s fenolickou strukturou, jako jsou carvacrol, thymol a eugenol vykazují baktericidní a bakteriostatické účinky. Agarovým difúzní testem stanovili aktivitu eugenolu u devíti G+bakterií a u šestnácti G-bakterií.

Inhibiční aktivitu eugenolu na *Listeria monocytogenes* a *Lactobacillus sakei* zkoumali včetně mechanismu působení Gill a Holley (2004). Diluční zkumavkovou metodou při inkubační teplotě 20°C zjistili při koncentraci 5mM baktericidní účinky na

Listeria monocytogenes a v koncentraci 6mM na *Lactobacillus sakei*. Podstatou baktericidního účinku bylo porušení cytoplazmatické membrány buňky.

Eugenol byl účinný i vůči na *Helicobacter pylori*. Bylo testováno 30 kmenů *Helicobacter pylori* agarovou diluční metodou. Eugenol a aldehyd kyseliny skořicové inhiboval růst všech v koncentraci 2μg/ml.

6. METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI BAKTERIÍ K ANTIMIKROBIÁLNÍM LÁTKÁM

6.1. KVALITATIVNÍ METODY

K průkazu účinnosti antimikrobiální látky jsou velmi často užívány difuzní metody, které slouží k semikvantitativnímu stanovení citlivosti bakterií na antimikrobiální látky. Jejich spolehlivost potvrzuje studie Urbáškové (1998), uvádějící 95 % shodu s výsledky dlučnicích metod.

Principem těchto metod je difúze antimikrobiální látky ze zdroje do okolí. Tímto vzniká klesající koncentrační gradient, který zabrání růstu mikroorganismu do vzdálenosti účinné inhibiční koncentrace (tzv. inhibiční zóna) (http://www.uzs.tul.cz/lekarska_mikrobiologie/ucebnicemikrobiologiepdf/antibiotika.pdf, staženo 6. 4. 2009).

6.1.1. *Difúzní disková metoda*

Je nejčastěji používanou orientační metodou stanovení citlivosti mikroorganismů k antibakteriálním léčivům. Tato jednoduchá metoda je založena na difúzi antimikrobiální látky z papírového disku do agarové půdy. Agar je naočkován stanovenou koncentrací testovaného mikroorganismu. Absorpcí vody z půdy dochází k rozpouštění látky a její následné difúzi do média. Kolem disku vzniká koncentrační gradient účinné látky inhibující růst mikroorganismu. Vzniká tzv. zóna inhibice, jejíž průměr a naměřená hodnota se srovnává s hodnotou inhibiční zóny pro citlivé kmeny (Urbášková a kol, 1985).

Vhodným kultivačním médiem pro většinu testovaných kmenů je Mueller-Hintonův agar (MHA). Pro náročnější bakterie se půda obohacuje o 5 % defibrinované ovčí nebo koňské krve. Mezinárodní kooperativní studie NCCLS potvrdila hodnotu agaru Mueller Hinton pro tento účel z důvodu relativně dobré reprodukovatelnosti média, jednoduchosti jeho vzorce a hodnotě experimentálních údajů, které byly pomocí tohoto média nashromážděny (http://www.ita-intertact.com/blob.php?produkty_soubory=56, staženo 6. 4. 2009).

Výsledek testu výrazně ovlivňuje koncentrace bakteriálních buněk v inokulu, a proto je nutné dbát na jeho správnou přípravu. Hustota inokula by měla být upravena na zákal odpovídající standardu 0,5 McFarlandovy stupnice. Dalším faktorem je růstová fáze mikroorganismu. Inokulum z kultury ve stacionární fázi (buňky se nemnoží) je více odolné k působení antimikrobiální látky než buňky v logaritmické fázi (Urbášková a kol, 1985).

Diskovou difuzní metodou lze zjistit i účinné koncentrace antimikrobiální látky. V tomto případě jsou disky napuštěny různými koncentracemi testované látky. Takto zjišťovali hodnoty minimální inhibiční koncentrace carvacrolu Didry a kol.(1993), Liolios. a kol. (2009), Vardar-Unlü a kol.(2003) a Kim a kol. (1995).

Stejnou metodou Hernandez T. a kol.(2005) stanovili hodnoty MIC esenciálního oleje získaného z *Lantana achyranthifolia* s obsahem carvacrolu a 1,8-cineolu jako hlavních složek. Zjištěná MIC na kmen *S. aureus* byla 250 µg/ml a *E. coli* 1000 µg/ml.

Pomocí diskové difuzní metody prověřovaly antibakteriální aktivitu patnácti rostlin obsahujících limonen, *p* – cymen, mircen, terpinen a terpineol K. Cimanga a kol. (2002). Složky vykazovaly zejména velmi silnou inhibici růstu na *Ps. aeruginosa*, jež činila 15 - 16 mm.

Santovo a kol. (2005) touto metodou určili MIC esenciálního oleje z *Rosmarinus officinalis* L na *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* a *Ps. aeruginosa*. Hodnoty MBC se pohybovaly v rozmezí 0,25 – 2,25 mg/ml. Stejnou metodu stanovení MIC použili Joshi a kol.(2008) na *S. aureus*, *Shigella flexneri*, *Pasteurella multocida*, *E. coli* a *Salmonella enterica enterica*.

Antibakteriální aktivitu levandulové silice zjišťovali diskovou difuzní metodou Roller a kol.(2009). Zóny inhibice u *S. aureus* byly 8 - 30 mm. Stejně tak byl testován esenciální olej z pomerančů proti 11 sérotypům bakterií rodu *Salmonella* (O'Bryan a kol. (2008).

Účinky esenciálních olejů ze saturejky, tymiánu a oregana takto ověřovali Sarac a Ugur (2008). Složením a antibakteriální aktivitou jednotlivých složek silice oregana se zabývali Alma a kol. (2003) na tyto bakteriální druhy: *Ps. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *Ent.faecalis*.

Kelen a Tepe (2007) a Yousefzadi a kol. (2007) použili diskovou difuzní metodu při studiu antibakteriální aktivity u esenciálního oleje ze šalvěže na grampozitivní bakterie – *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumulis*, *Ent. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* a gramnegativní - *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *Klebsiella pneumonie*. Esenciální oleje vykazovaly antibakteriální aktivitu na všechny kmeny kromě *Ps. aeruginosa*.

6.1.2. Agarová difúzní metoda

Princip metody je obdobný jako u diskové difuzní metody. Rozdíl spočívá v aplikaci antimikrobiální látky. Látka se přímo pipetuje do hloubených jamek v agarovém médiu.

Touto metodou zjišťovali inhibiční efekty esenciálních olejů z tymiánu a bazalky i jejich hlavních složek carvacrolu a thymolu na *Shigella sonnei* a *Shigella flexneri* Bagamboula a kol. (2003). Hodnoty MIC se pohybovaly mezi 100 a 1000 µg/ml. Stejnou metodou ověřovali baktericidní a bakteriostatické účinky carvacrolu, thymolu a eugenolu u devíti G+bakterií a u šestnácti G-bakterií Dorman a Deans (2000).

Wang a kol. (2006) ověřili baktericidní a fungicidní účinky esenciálního oleje z ambrozie trojklané agarovou difuzní metodou. Touto metodou rovněž prověřili antibakteriální schopnosti komponent z koriandru setého a fenyklu obecného Lo Cantore a kol. (2004) na *E. coli* a *Bacillus megateriuma*. Autoři Faleiro a kol. (2003) prověřili takto složky silice z tymiánu proti *Candida albicans*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp.* a *S. aureus*.

6.2.KVANTITATIVNÍ METODY

Mezi kvantitavní metody stanovení citlivosti patří diluční metoda v agarovém médiu a diluční metody v tekutém bujónovém médiu. Těmito metodami se stanovují účinná množství antimikrobiálních látek inhibujících růst mikroba tzv. minimální inhibiční koncentrace nebo účinného množství, jež je zcela usmrcuje – minimální baktericidní koncentrace. Diluční metody poskytují přesnější informace o množství a účinku látky vykazující antibakteriální efekt. V praxi je nejčastěji používaná diluční mikrometoda.

Výsledek kvantitativních testů se vyjadřují jako minimální inhibiční koncentrace – MIC, což je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky schopná inhibovat růst testovaného mikroorganismu nebo jako minimální baktericidní koncentrace MBC - nejnižší koncentrace antimikrobiální látky schopná testovaný mikroorganismus usmrtit (Urbášková a kol, 1985).

6.2.1. Agarová diluční metoda

MIC se zjišťuje v agarovém médiu obsahujícím zvolené koncentrace antimikrobní látky. Obvykle se připravuje 12 - 15 koncentrací jednoho ATB, ředěných geometrickou řadou. Standardní inokulum vyšetřovaných bakterií je nanášeno na povrch agarových medií. Na jedné plotně testujeme až 20 kmenů. Po inkubaci hledáme nejnižší koncentraci antimikrobní látky, která inhibuje růst vyšetřovaného kmene.

Agarová diluční metoda je metodou referenční sloužící k hodnocení nových antimikrobních látek, je však pracná a ekonomicky náročná.

Pro stanovení MIC carvacrolu a thymolu použili tuto metodu autoři Nostro a kol. (2004). Stejně tak použili tuto metodu Ali a kol. (2005) při zjišťování antibakteriální aktivity eugenolu a aldehydu kyseliny skořicové proti patogenu *Helicobacter pylori*. MIC byla stanovena na hodnotu 2 μ g/ml.

Rafii a Shahverdi (2007) ověřili agarovou diluční metodou antimikrobiální účinky esenciálních olejů ze třech bylin obsahujících jako hlavní komponenty karvon, limonen, kafr a menthon. Navarro a kol. (1996) pro stanovení hodnoty inhibiční koncentrace eukalyptové silice, která se pohybovala od 0, 62 do 40 mg/ml.

6.2.2. Bujónová diluční metoda

Do řady zkumavek s kultivačním médiem obsahujícím sestupnou koncentraci antimikrobní látky (dvojková ředící řada) se očkuje inokulum testovaného kmene. Jako kultivační médium se používá Muellerův-Hintonův bujón (MHB), který se pro testování náročnějších mikrobů obohacuje a Todd-Hewittův bujón (THB) pro testování koků. Pro bujónový diluční test se připravuje inokulum o hustotě 10⁸CFU/ml, což odpovídá

standardu 0,5 dle McFarlanda, které se dále ředí 1:20. Po dané době inkubace se jako MIC hodnotí nejnižší koncentrace antimikrobní látky, kde není patrný růst mikroorganismu, tj. nevznikl zákal nebo sediment vyjadřující růst mikroba.

Luqman a kol. (2007) studovali antimikrobiální aktivitu rozmarýnového oleje na *Mycobacterium smegmatis*, *E. coli* a *Candida albicans*. Hodnoty MIC stanovili pomocí bujonové diluční metody. Takto ověřili i inhibiční účinky carvacrolu na *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* a *Vibrio vulnificus* Kim a kol. (1995). Autoři zjistili inhibici růstu kmenů *E. coli* a *Listeria monocytogenes* v koncentraci 500 µg, *Vibrio vulnificus* a *Salmonella typhimurium* 250 µg carvacrolu v 1 ml kultivačního média.

Také Becerril a kol. (2007) zjišťovali touto metodou účinné množství extraktů ze skořice a oregána na bakterie *E. coli* a *S. aureus*. MIC a MBC šesti esenciálních olejů proti *Salmonella Enteritidis*, *E. coli* a *Listeria innocua* byla stanovena bujonovou diluční metodou autory Raybaudi-Massilia a kol. (2006).

6.2.3. Diluční mikrometoda

Do mikrotitrační destičky se aplikuje v bujónu rozpuštěná antimikrobní látka, ředěná geometrickou řadou. V každé destičce se většinou testuje 12 druhů antibiotik po 8 koncentracích. Inokulum se připravuje z testovaného kmene o standardním zákalu. Používá se Mueller - Hintonův bujón a zákal 1,5 - 3 stupně McFarlandovy stupnice. Růst bakterií se projevuje zákalem obsahu jamky nebo sedimentem. Minimální inhibiční koncentrace je taková nejnižší koncentrace antibiotika, která zamezí danému mikroorganismu růst, to znamená, že v jamce nevznikne ani zákal ani sediment. Takto stanovenou MIC opět porovnáváme s MIC referenčních kmenů.

Touto metodou stanovili MIC limonenu a 1,8 – cineolu Van Vuuren a Viljoen (2007), rozmezí účinných hodnot bylo 3 - 27 mg/ml pro limonen a 23 mg/ml pro 1,8 – cineol. Inhibiční účinek berberinu na *S. aureus* prověřili mikrometodou Stermitz a kol. (1999).

Antibakteriální aktivitu thymolu a carvacrolu prokázali diluční mikrometodou Skocibusic a Bezic (2004) na *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Ps.*

aeruginosa, *Bacillus subtilis* a *S. aureus*. Byly prokázány inhibiční účinky na růst všech testovaných mikroorganismů kromě *Ps. aeruginosa*. Kosar a kol. (2008) stanovili touto metodou hodnoty MIC esenciálního oleje ze *Satureja* obsahující hlavní složky thymol, carvacrol a *p* – cymen. Rozmezí MIC bylo 62,5 – 250 mg/ml u *S. aureus*, *Candida albicans* a *Candida tropicalis*.

Také Didry a kol. (1993) ověřovali inhibiční účinky thymolu, carvacrolu, eugenolu a aldehydu kyseliny skořicové na růst streptokoků mikrometodou. Cristani a kol. (2007) stanovili stejnou metodou hodnoty MIC thymolu (0,31 mg/ml u *S. aureus*, 5 mg/ml u *E. coli*), carvacrolu a *p* - cymenu (1,25 mg/ml u *S. aureus*, 2,5 mg/ml u *E. coli*).

Autoři Burt a kol. (2005) stanovili diluční mikrometodou hodnoty MIC carvacrolu a thymolu na 180 µg/ml u *E.coli* O157:H7 a potvrdili jejich aditivní antibakteriální efekt.

6.3.FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VÝSLEDKY STANOVENÍ ÚČINKU ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK

Výsledky kvalitativních i kvantitativních metod může ovlivnit řada faktorů. Mezi ně patří složení a kvalita živného média včetně pH, obsahu solí a minerálů, růstová fáze testovaného kmene, podmínky inkubace i způsoby hodnocení výsledků. Urbášková a kol. (1985) mimo jiné uvádí i rychlost difuze antimikrobiálních látek do agaru. Rychlost difuze závisí na velikosti molekuly a chemické povaze antimikrobní látky i agarového média. Významnými faktory ovlivňujícími výsledky stanovení je obsah účinné látky v disku a koncentrace bakteriálních buněk v ml - hustota inokula.

Stanovení antimikrobiálních účinků některých přírodních látek velmi komplikuje jejich špatná rozpustnost a nestabilita. Kalemba a Kunicka (2003) uvádějí ve své studii, že dlouhá inkubace může mít za následek odpaření nebo rozložení jednotlivých složek přírodních látek. Většina z přírodních látek je hydrofobní povahy, a proto jsou obtížně či zcela nerozpustné ve vodném prostředí. Nedochozí tak k úplné distribuci a difuzi účinných látek do kultivačního média, což vede k nepřesným výsledkům vyhodnocení.

Přírodní látky jsou většinou rozpouštěny v ethanolu, Tweenu 20 a 80 a v dimethylsulfoxidu (DMSO). Hodnoty MIC esenciálních olejů klesají s rostoucí koncentrací rozpouštědel, což je pravděpodobně způsobeno vyšší rozpustností siličných složek ve vodě a poklesem jejich vazby na cytoplazmatickou membránu. U použití ethanolu jako rozpouštědla tento jev nebyl pozorován (Kalemba a Kunicka, 2003).

Vlivem složení kultivačního média a inkubační teploty na výsledky inhibice se zabývali Vieira a Nahas (2005). Prokázali, že inkubační teplota ovlivňuje růst mikrobů, a to tak že exponenciálně.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7. MATERIÁL A METODY

7.1. Bakteriální kmeny

Jak je zřejmé z tabulky 3 referenční kmeny bakterií jsme obdrželi z České sbírky mikroorganismů v Brně. Jeden kmen *Ps. aeruginosa* pocházel z výtěru zevního zvukovodu psa s projevy zánětu.

Ostatní kmeny použité k testování antimikrobiální aktivity přírodních látek byly vykultivovány z kančího ejakulátu v mikrobiologické laboratoři katedry biologických a biochemických věd Univerzity Pardubice.

Tabulka 3: Přehled bakteriální kmenů použitých k testování antibakteriální aktivity přírodních látek

mikroorganismus	původ
<i>Enterococcus faecalis</i>	referenční kmen CCM 4224
<i>Escherichia coli</i>	referenční kmen CCM 3954
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	referenční kmen CCM 3955
<i>Staphylococcus aureus</i>	referenční kmen CCM 3953
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	výtěr z ucha psa
<i>Enterococcus faecalis</i>	kančí sperma
<i>Escherichia coli</i>	kančí sperma
<i>Proteus mirabilis</i>	kančí sperma
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	kančí sperma
<i>Staphylococcus hyicus</i>	kančí sperma

7.2. Přírodní látky

Antibakteriální aktivitu jsme ověřovali u dvanácti přírodních látek, které jsme získali převážně od doc. RNDr. Lubomíra Opletala, CSc. z Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. V následujících tabulkách 4 a 5 je uveden seznam sloučenin testovaných jednotlivě a v dvojkombinacích včetně rozmezí testovaných koncentrací.

Tabulka 4: Přehled přírodních látek a rozmezí koncentrací připravených pro stanovení antibakteriální aktivity

přírodní látka	číslo šarže	rozmezí koncentrací (µg/ml)
carvacrol	456690/121005279	2400 – 37,5
<i>p</i> – cymen	S33159 – 386	19200 – 300
berberin sulfát trihydrát	11828	19200 – 150
eugenol	03522CE – 216	2400 – 37,5
hydrochinon monomethylether	221135 581	9600 – 150
knicin	13/06.02.27/392/E	4800 – 75
limonen	2278135	38400 – 150
kyselina gallová monohydrát	320700/1695	4800 – 75
kyselina rozmarýnová	00905 CC/MVV 05201	9600 – 150
quercetin dihydrát	UN 2811/Lot 42310	9600 – 150
tea tree oil	neuveveno	9600 – 150
thymol	SUKL 2001 75	2400 – 37,5

Tabulka 5: Kombinace přírodních látek a rozmezí koncentrací připravených pro stanovení antibakteriální aktivity zkumavkovou diluční metodou

kombinace látek	rozmezí koncentrací (µg/ml)
<i>p</i> -cymen + carvacrol	19200:300 + 1200:18,5
<i>p</i> -cymen + thymol	19200:300 + 1200:18,5
knicin + carvacrol	4800:150 + 4800:150
knicin + eugenol	4800:150 + 4800:150
knicin + thymol	4800:150 + 4800:150
kyselina gallová monohydrát + carvacrol	4800:150 + 2400:75
kyselina gallová monohydrát + eugenol	4800:150 + 2400:75
kyselina gallová monohydrát + thymol	4800:150 + 2400:75
kyselina rozmarýnová + quercetin dihydrát	2400:37,5 + 2400:37,5

7.3. Kultivační média

K uchování a pomnožování testovaných bakteriálních kmenů jsme používali krevní agar. Pro zjištění účinných koncentrací přírodních látek jsme používali Mueller-Hintonův bujón.

- **Krevní agar (KA)**

Krevní agar jsme připravili z Blood agar Base NO. 2 od firmy Himedia, India, č.š. 0000017141 s přidavkem 5% beraní krve.

- **Mueller-Hintonův bujón (MHB)**

MHB jsme připravili z Mueller-Hinton Broth od firmy Oxoid, England, č. š 395796.

7.4. Roztoky a činidla

- Roztok k přípravě suspenze bakteriálních kmenů a ředění 96% ethanolu: sterilní pufrovaný fyziologický roztok (PBS)
 - příprava PBS: do 1000 ml destilované vody jsme navážili: 8,0067 g NaCl, 0,2013 g KCl, 1,1527 g Na₂HPO₄ · 7H₂O, 0,2439 g KH₂PO₄;
 - pH ~ 7,32
- Rozpouštědla přírodních látek:
 - 24% roztok ethanolu, který jsme připravili naředěním 96% ethanolu v PBS v poměru 1:3
 - 0,5% roztok Tween 20 a 0,5% roztok Tween 80 (ředěno PBS)
- McFarlandova zákalová stupnice č. 0,5

7.5. Pomůcky a přístroje

- zkumavky, gumové zátky, stojánky na zkumavky, mikropipety, špičky, Erlenmayerovy baňky, lékovky, injekční stříkačky, bakteriologické očkovací kličky, kádinky, odměrné válce, Petriho misky, alobal – vše sterilní
- plynový kahan, analytické váhy, předvážky
- autokláv, horkovzdušný sterilizátor, biologický termostat, chladnička, třepací vodní lázeň, laboratorní třepačka

8. PRACOVNÍ POSTUP

8.1. Zjišťování minimálních inhibičních a minimálních baktericidních koncentrací přírodních látek

8.1.1. *Ověření rozpustnosti přírodních látek*

Vzhledem ke špatné rozpustnosti přírodních sloučenin ve vodě i fyziologickém roztoku jsme testovali jejich rozpustnost v 12%, 24% a 96% ethanolu, 0,5% DMSO, 0,5% Tweenu 20 a 0,5% Tweenu 80. Rozpustnost v jednotlivých rozpouštědlech uvádí tabulka 6.

8.1.2. *Příprava základních roztoků přírodních látek*

Základní koncentraci roztoků testovaných přírodních látek pro zkumavkovou diluční metodu jsme připravili rozpuštěním jejich navážky v 10 ml 24% ethanolu (ředěném v PBS v poměru 1:3) v Erlenmayerově baňce. Pro zlepšení rozpustnosti jsme některé přírodní látky zahřívali ve vodní lázni a homogenizovali na laboratorní třepače.

Ředěním základního roztoku dvojkovou řadou jsme připravili sestupnou řadu koncentrací přírodních látek.

8.1.3. *Příprava inokula*

Inokula jsme připravovali z osmnáctihodinových kultur jednotlivých kmenů narostlých na krevním agaru. Bakteriologickou kličkou jsme odebrali potřebný počet kolonií a suspendovali je v PBS do zákalu odpovídající 0,5 Mc Farlandově zákalové stupnici. Tuto suspenzi jsme následně ředili PBS v poměru 1:20, aby výsledná koncentrace bakteriálních buněk v inokulu činila $7,5 \times 10^6$ na 1ml.

8.1.4. Stanovení MIC a MBC jednotlivých látek zkumavkovou diluční metodou

Do připravených sterilních zkumavek jsme napipetovali po 1ml MHB. Do první zkumavky s MHB jsme přidali 1ml základního roztoku přírodní látky rozpuštěné v 24% ethanolu nebo 0,5% Tweenu 20 a 0,5% Tweenu 80. Po důkladném promísání jsme 1ml z první zkumavky přenesli do další zkumavky, kde byl obsah opět promíchán a přenesen do následující. Tento postup ředění jsme opakovali a z předposlední zkumavky byl 1ml přenesen do dezinfekčního roztoku. Poslední zkumavku, která neobsahovala přírodní látku, jsme pouze zaočkovali testovaným mikroorganismem a sloužila tedy jako kontrola růstu. (příloha 1).

Do všech zkumavek jsme následně očkovali 100 µl inokula testovaného kmene.

Inkubace zkumavek probíhala v termostatu při 37° C 24 hodin. Po inkubaci jsme zjišťovali nejnižší koncentraci přírodní látky, která inhibovala viditelný růst mikroorganismu – MIC. Růst bakterií se projevoval zákalem obsahu zkumavky nebo vytvořením sedimentu na dně (příloha 2 a 3).

Obsah zkumavek bez viditelného růstu jsme po protřepání bakteriologickou kličkou vyočkovali na KA a dále inkubovali v termostatu při 37° C 24 hodin. Poté jsme posuzovali nárůst mikroorganismů na KA (příloha 4). Stejný postup hodnocení včetně vyočkování jsme provedli po 48 a 72 hodinách.

Jako minimální inhibiční koncentraci jsme hodnotili množství přírodní látky, které potlačilo viditelný růst mikroorganismu v bujónu. Jako nejnižší baktericidní koncentraci množství přírodní látky ve zkumavce, ve které mikroorganismus na KA nevyrostl.

8.2.Zjišťování účinných koncentrací kombinací přírodních látek

8.2.1. Příprava pracovních roztoků přírodních látek

Základní roztoky pro testování dvoukombinací přírodních látek jsme připravovali stejným způsobem jako u přípravy roztoků látek jednotlivých. Navážky jsme rozpustili v 10 ml 24% ethanolu či v 10 ml 0,5% Tweenu 20 a 0,5% Tweenu 80 v Erlenmayerově baňce.

8.2.2. Stanovení MIC a MBC kombinací látek

1ml MHB jsme napipetovali do sterilních zkumavek. Do první zkumavky s MHB jsme přidali 0,5 ml základního roztoku první přírodní látky a 0,5ml základního roztoku druhé přírodní látky a vše bylo důkladně promícháno. Poté jsme provedli ředění obdobně jako u jednotlivých látek. Poslední zkumavka obsahovala jen MHB bujon a sloužila jako kontrola růstu bakteriálních buněk.

Poté jsme přidali do každé zkumavky 100 μ l inokula vyšetřovaného kmene.

Inkubace zkumavek obsahujících sestupnou koncentraci přírodních látek probíhala v termostatu při 37° C 24 hodin. Následně jsme hodnotili inhibici růstu mikroorganismu. Obsah zkumavek bez viditelného růstu jsme vyočkovali na KA a inkubovali 24 hodin při 37° C. Poté jsme hodnotili nárůst bakterií na KA. Stejný postup hodnocení včetně vyočkování jsme prováděli po 48 a 72 hodinách.

9. VÝSLEDKY

Zkumavkovou diluční metodou jsme zjišťovali MIC a MBC dvanácti přírodních látek a některých jejich dvojkombinací. V testech jsme používali referenční kmeny bakterií a kmeny izolované z kančího ejakulátu.

Přírodní látky jsme rozpouštěli v 24% ethanolu a v případě quercetinu v éteru. U dvojkombinací jsme použili i rozpouštědla 0,5% Tween 20 a 0,5% Tween 80. Rozpustnost jednotlivých sloučenin uvádíme v tabulce 6.

9.1. MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ A MINIMÁLNÍ BAKTERICIDNÍ KONCENTRACE PŘÍRODNÍCH LÁTEK

Hodnoty MIC a MBC přírodních látek rozpuštěných v 24% ethanolu jsme zaznamenali v tabulkách 7 – 18. Z uvedených údajů vyplývá, že neúčinnější antibakteriální účinky na všechny bakteriální kmeny vykazuje knicin v koncentraci 150 - 1200 µg/ml (tabulka 17). U eugenolu (tabulka 12), carvacrolu (tabulka 13) a thymolu (tabulka 14) jsme zjistili shodné MIC 600 - 2400 µg/ml. MIC hydrochinonu (tabulka 8) byla 1200 - 4800 µg/ml (tabulka 7). V množstvích 2400 až 4800 µg/ml zabránily růstu bakteriálních kmenů hydrochinon monomethylether (tabulka 8), kyselina rozmarýnová (tabulka 15) a kyselina gallová monohydrát (tabulka 16). U dalších testovaných látek byly MIC vyšší.

Mezi velmi odolné k účinkům námi testovaných přírodních látek patřily kmeny *Ps. aeruginosa*. Neúčinněji inhiboval uvedený druh knicin, jehož MIC byla 600 a MBC 1200 µg/ml, dále eugenol s MIC a MBC 1200 µg/ml. V množství 2400 µg/ml inhibovaly růst *Ps. aeruginosa* carvacrol, hydrochinon monomethylether, kyselina gallová, kyselina rozmarýnová a thymol.

Také kmeny *Ent. faecalis* byly ve srovnání s ostatními druhy odolnější k působení testovaných přírodních látek. Růst kmenů tohoto druhu nejlépe inhiboval knicin, thymol a carvacrol, jejichž MIC byla 600 µg/ml. Účinný byl i eugenol, kyseliny rozmarýnová a gallová a to v minimální koncentraci 2400 µg/ml.

Kmeny *E. coli* nejlépe inhiboval knicin. Hodnoty MIC i MBC byly 600 µg/ml. V koncentraci 4800 µg/ml potlačovaly růst kmenů uvedeného druhu kyseliny rozmarýnová a gallová.

Antibakteriální aktivitu na kmeny obou druhů stafylokoků vykazoval knicin v koncentraci 600 - 1200 µg/ml. Kyseliny gallová a rozmarýnová inhibovaly růst *S. aureus* a *S. hyicus* v množství 2400 – 4800 µg/ml.

Minimální inhibiční koncentrace knicinu, která potlačila růst *Proteus mirabilis*, byla 150 µg/ml.

Tabulka 6: Rozpustnost a zbarvení testovaných přírodních látek

Přírodní látka	Rozpustnost					
	5% DMSO	Ethanol 12%	Ethanol 24%	Ethanol 96%	0,5% Tween 20	0,5% Tween 80
carvacrol	rozpustný roztok	špatně rozpustná emulze	špatně rozpustná emulze	rozpustný roztok	N	N
<i>p</i>-cymen	špatně rozpustný emulze	špatně rozpustný emulze	špatně rozpustný emulze	rozpustný emulze	špatně rozpustný emulze	špatně rozpustný emulze
berberin sulfát	rozpustný roztok	N	špatně rozpustný suspenze	rozpustný roztok	N	N
eugenol	špatně rozpustný emulze	špatně rozpustný emulze	špatně rozpustný emulze	rozpustný emulze	N	N
hydrochinon	N	N	rozpustný roztok	rozpustný roztok	N	N
hydrochinon monomethyl-ether	N	N	rozpustný roztok	rozpustný roztok	N	N
knicin	nerozpustný suspenze	nerozpustný suspenze	nerozpustný suspenze	nerozpustný suspenze	N	N
kyselina gallová monohydrát	rozpustná roztok	N	rozpustný roztok	rozpustný roztok	N	N
kyselina rozmarýnová	N	N	rozpustný roztok	rozpustný roztok	N	N
limonen	N	N	špatně rozpustný emulze	špatně rozpustný emulze	N	N
quercetin dihydrát	nerozpustný suspenze	nerozpustný suspenze	nerozpustný suspenze	nerozpustný suspenze	N	N
tea tree oil	špatně rozpustný emulze	špatně rozpustný emulze	špatně rozpustný emulze	rozpustný emulze	N	N
thymol	N	špatně rozpustný emulze	špatně rozpustný emulze	rozpustný roztok	špatně rozpustný emulze	špatně rozpustný emulze

Vysvětlivky: N – neprováděno

Tabulka 7: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) **hydrochinonu** rozpouštěného v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 9600 µg/ml – 150 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	4800	4800	4800	4800	4800	4800
<i>Enterococcus faecalis</i> *	1200	1200	1200	1200	1200	1200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM3955	600	1200	1200	1200	1200	1200

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 8: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) **hydrochinon monomethyetheru** rozpouštěného v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 9600 µg/ml – 150 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	4800	9600	4800	4800	4800	9600
<i>Enterococcus faecalis</i> *	4800	9600	4800	9600	4800	9600
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM3955	1200	4800	2400	4800	2400	4800

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 9: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) **berberin sulfátu** rozpouštěného v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 19 200 µg/ml – 150 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	>19200	>19200	>19200	>19200	>19200	>19200
<i>Enterococcus faecalis</i> *	2400	>19200	>19200	>19200	>19200	>19200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM3955	9600	19200	9600	19200	9600	19200

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 10: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) **quercetinu** rozpouštěného v etheru stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 9600 µg/ml – 150 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	Δ	>9600	Δ	>9600	Δ	>9600
<i>Enterococcus faecalis</i> *	Δ	4800	Δ	9600	Δ	9600
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM3955	2400	2400	2400	4800	2400	4800

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Δ Nelze odečíst zákal↔žluté zbarvení roztoku a látka tvoří nerozpustný sediment

Tabulka 11: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) **tea tree oil** rozpouštěného v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 9600 µg/ml – 150 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	4800	>9600	9600	>9600	9600	>9600
<i>Enterococcus faecalis</i> *	4800	9600	4800	9600	9600	9600
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM3955	4800	9600	9600	9600	9600	9600

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 12: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) **eugenolu** rozpouštěného v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 2400 µg/ml – 37,5 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	1200	2400	1200	2400	1200	2400
<i>Enterococcus faecalis</i> *	1200	2400	1200	2400	2400	2400
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM3955	600	600	600	600	600	600

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 13: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) **carvacrolu** rozpouštěného v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 2400 µg/ml – 37,5 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	600	600	600	600	600	600
<i>Enterococcus faecalis</i> *	600	600	600	600	600	600
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM3955	1200	2400	2400	2400	2400	2400

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 14: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) **thymolu** rozpouštěného v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 2400 µg/ml – 37,5 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	300	300	300	600	600	600
<i>Enterococcus faecalis</i> *	300	600	300	600	600	600
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM3955	1200	1200	1200	1200	2400	2400

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 15: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) kyseliny rozmarýnové rozpouštěné v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 9600 – 150 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24 hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	2400	4800	2400	4800	2400	4800
<i>Enterococcus faecalis</i> *	2400	4800	2400	4800	2400	4800
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM3953	1200	4800	2400	4800	4800	4800
<i>Staphylococcus hyicus</i> *	2400	9600	2400	9600	2400	9600
<i>Escherichia coli</i> CCM3954	2400	4800	4800	4800	4800	4800
<i>Escherichia coli</i> *	4800	4800	4800	4800	4800	4800
<i>Proteus mirabilis</i> *	2400	4800	4800	4800	4800	4800
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM3955	2400	4800	2400	4800	2400	4800

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 16: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) kyseliny gallové monohydrátu rozpouštěné v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 9600 – 150 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24 hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	2400	9600	2400	9600	2400	9600
<i>Enterococcus faecalis</i> *	2400	9600	2400	9600	2400	9600
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM3953	2400	4800	2400	4800	2400	4800
<i>Staphylococcus hyicus</i> *	1200	9600	4800	9600	4800	9600
<i>Escherichia coli</i> CCM3954	2400	4800	4800	4800	4800	4800
<i>Escherichia coli</i> *	4800	4800	4800	4800	4800	4800
<i>Proteus mirabilis</i> *	2400	4800	4800	4800	4800	4800
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM3955	2400	4800	2400	4800	2400	4800

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 17: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) **knicinu** rozpouštěného v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 9600 – 150 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24 hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	600	1200	600	1200	600	1200
<i>Enterococcus faecalis</i> *	600	4800	1200	4800	1200	4800
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM3953	150	1200	300	1200	600	1200
<i>Staphylococcus hyicus</i> *	600	2400	1200	2400	1200	2400
<i>Escherichia coli</i> CCM3954	300	600	600	600	600	600
<i>Escherichia coli</i> *	150	600	300	600	600	600
<i>Proteus mirabilis</i> *	150	150	150	150	150	150
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM3955	300	600	600	600	600	1200

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 18: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) **limonenu** rozpouštěného v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 38400 – 150 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24 hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	19200	38400	38400	38400	38400	38400
<i>Enterococcus faecalis</i> *	19200	19200	38400	38400	38400	38400
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM3953	19200	19200	19200	19200	19200	19200
<i>Staphylococcus hyicus</i> *	38400	38400	38400	38400	38400	38400
<i>Escherichia coli</i> CCM3954	19200	19200	19200	19200	19200	19200
<i>Escherichia coli</i> *	19200	19200	19200	19200	19200	19200
<i>Proteus mirabilis</i> *	19200	19200	19200	19200	19200	19200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM3955	9600	19200	19200	19200	19200	19200

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

9.2. MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ A MINIMÁLNÍ BAKTERICIDNÍ KONCENTRACE PŘÍRODNÍCH LÁTEK TESTOVANÝCH V KOMBINÁCÍCH

MIC a MBC zjištěné při testování dvojkombinací přírodních látek jsme zaznamenali do následujících tabulek 19 – 30. Přírodní látky byly rozpouštěny v 24% ethanolu, který byl připraven naředěním 96% ethanolu v PBS v poměru 1:3. Kombinace cymenu s thymolem a cymenu s carvacrolem jsme rozpouštěli ve 24% ethanolu a v 0,5% Tweenu 20 a 80.

Směs knicinu s carvacrolem inhibovala růst testovaných mikroorganismů v rozmezí koncentrací 600:300 – 2400:1200 µg/ml. MIC knicinu ve směsi s eugenolem nebo thymolem se pohybovala od 600:300 do 2400:1200 µg/ml. Při testování antibakteriální aktivity kyseliny gallové monohydrátu s carvacrolem byly účinné koncentrace: 600:300 – 2400:1200 µg/ml. MIC kombinace kyseliny gallové monohydrátu s eugenolem činila 2400 - 4800:1200 µg/ml a kyseliny gallové s thymolem 1200:600 – 2400:1200 µg/ml. Kyselina rozmarýnová s quercetinem působila baktericidně na kmeny *E. coli*, *Proteus mirabilis* a na *Ps. aeruginosa* v rozmezí koncentrací 2400:2400 µg/ml.

U kombinací cymenu s thymolem nebo cymenu s carvacrolem rozpouštěných v 0,5% Tweenu 20 a 80 přesahovaly hodnoty námi testovaných koncentrací. MIC kombinace cymenu s thymolem rozpouštěná v 24% ethanolu byla 9600:600 – 19200:1200 µg/ml.

Tabulka 19: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) kombinace knicinu s carvacrolem rozpouštěných v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 4800 - 150 µg/ml + 4800 - 150 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24 hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	1200:600	1200:600	2400:1200	4800:2400	2400:1200	4800:2400
<i>Enterococcus faecalis</i> *	1200:600	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM3953	600:300	1200:600	600:300	1200:600	600:300	1200:600
<i>Staphylococcus hyicus</i> *	1200:600	1200:600	1200:600	1200:600	1200:600	1200:600
<i>Escherichia coli</i> CCM3954	600:300	600:300	600:300	1200:600	1200:600	1200:600
<i>Escherichia coli</i> *	300:150	300:150	600:300	600:300	600:300	600:300
<i>Proteus mirabilis</i> *	600:300	1200:600	600:300	1200:600	1200:600	1200:600
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM3955	1200:600	1200:600	1200:600	2400:1200	1200:600	2400:1200

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 20: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) kombinace knicinu s eugenolem rozpouštěných v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 4800 - 150 µg/ml + 4800 - 150 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24 hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	1200:600	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200
<i>Enterococcus faecalis</i> *	1200:600	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200	4800:2400
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM3953	300:150	1200:600	600:300	1200:600	600:300	1200:600
<i>Staphylococcus hyicus</i> *	1200:600	2400:1200	2400/1200	2400/1200	2400/1200	2400/1200
<i>Escherichia coli</i> CCM3954	300/150	600/300	1200/600	1200/600	1200/600	1200/600
<i>Escherichia coli</i> *	300:150	300:150	300:150	600:300	1200:600	1200/600
<i>Proteus mirabilis</i> *	600:300	1200:600	600:300	1200:600	1200:600	1200:600
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM3955	300:150	1200:600	1200:600	2400:1200	1200:600	2400:1200

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 21: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) kombinace knicinu s thymolem rozpouštěných v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 4800 - 150 µg/ml + 4800 - 150 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24 hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	1200:600	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200
<i>Enterococcus faecalis</i> *	1200:600	1200:600	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM3953	300:150	1200:600	600:300	1200:600	600:300	1200:600
<i>Staphylococcus hyicus</i> *	1200:600	2400:1200	1200:600	2400:1200	1200:600	2400:1200
<i>Escherichia coli</i> CCM3954	300:150	600:300	600:300	600:300	600:300	600:300
<i>Escherichia coli</i> *	300:150	300:150	300:150	600:300	600:300	600:300
<i>Proteus mirabilis</i> *	300:150	600:300	600:300	600:300	1200:600	1200:600
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM3955	600:300	1200:600	1200:600	1200:600	2400:1200	2400:1200

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 22: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) kombinace kyseliny gallové monohydrátu s carvacrolem rozpouštěných v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 4800 – 150 µg/ml + 2400 - 75 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24 hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200
<i>Enterococcus faecalis</i> *	1200:600	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM3953	600:300	1200:600	600:300	1200:600	600:300	1200:600
<i>Staphylococcus hyicus</i> *	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200
<i>Escherichia coli</i> CCM3954	1200:600	2400:1200	1200:600	2400:1200	1200:600	2400:1200
<i>Escherichia coli</i> *	1200:600	1200:600	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200
<i>Proteus mirabilis</i> *	1200:600	1200:600	1200:600	1200:600	1200:600	1200:600
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM3955	2400:1200	2400:1200	2400:1200	4800:2400	2400:1200	4800:2400

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 23: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) kombinace kyseliny gallové monohydrátu s eugenolem rozpouštěných v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 4800 – 150 µg/ml + 2400 - 75 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24 hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	2400:1200	4800:2400	2400:1200	4800:2400	2400:1200	4800:2400
<i>Enterococcus faecalis</i> *	4800:2400	4800:2400	4800:2400	4800:2400	4800:2400	4800:2400
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM3953	2400:1200	4800:2400	2400:1200	4800:2400	2400:1200	4800:2400
<i>Staphylococcus hyicus</i> *	2400:1200	2400:1200	2400:1200	4800:2400	2400:1200	4800:2400
<i>Escherichia coli</i> CCM3954	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200	4800:2400
<i>Escherichia coli</i> *	2400:1200	4800:2400	2400:1200	4800:2400	2400:1200	4800:2400
<i>Proteus mirabilis</i> *	2400:1200	4800:2400	2400:1200	4800:2400	2400:1200	4800:2400
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM3955	2400:1200	4800:2400	2400:1200	4800:2400	2400:1200	4800:2400

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 24: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) kombinace kyseliny gallové monohydrátu s thymolem rozpouštěných v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 4800 – 150 µg/ml + 2400 - 75 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24 hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	1200:600	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200
<i>Enterococcus faecalis</i> *	1200:600	2400:1200	1200:600	2400:1200	1200:600	2400:1200
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM3953	600:300	1200:600	1200:600	1200:600	1200:600	2400:1200
<i>Staphylococcus hyicus</i> *	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200
<i>Escherichia coli</i> CCM3954	1200:600	1200:600	1200:600	1200:600	1200:600	1200:600
<i>Escherichia coli</i> *	1200:600	2400:1200	1200:600	2400:1200	2400:1200	2400:1200
<i>Proteus mirabilis</i> *	1200:600	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200	2400:1200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM3955	2400:1200	2400:1200	2400:1200	4800:2400	2400:1200	4800:2400

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 25: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) kombinace kyseliny rozmarýnové s quercetinem rozpouštěných v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 2400 - 75 µg/ml + 2400 - 75 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24 hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	Δ	>2400: 2400	Δ	>2400: 2400	Δ	>2400: 2400
<i>Enterococcus faecalis</i> *	Δ	>2400: 2400	Δ	>2400: 2400	Δ	>2400: 2400
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM3953	Δ	>2400: 2400	Δ	>2400: 2400	Δ	>2400: 2400
<i>Staphylococcus hyicus</i> *	Δ	>2400: 2400	Δ	>2400: 2400	Δ	>2400: 2400
<i>Escherichia coli</i> CCM3954	Δ	2400: 2400	Δ	2400: 2400	Δ	2400: 2400
<i>Escherichia coli</i> *	Δ	2400: 2400	Δ	2400: 2400	Δ	2400: 2400
<i>Proteus mirabilis</i> *	Δ	2400: 2400	Δ	2400: 2400	Δ	2400: 2400
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM3955	Δ	2400: 2400	Δ	2400: 2400	Δ	2400: 2400

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 26: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) kombinace cymenu a thymolu rozpouštěných v 0,5% Tweenu 20 stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 19200 - 300 µg/ml + 1200 - 18,5 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24 hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	2400: 150	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200
<i>Enterococcus faecalis</i> *	4800: 300	19200: 1200	19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM3955	>1920: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM322	9600: 600	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 27: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) kombinace cymenu a thymolu rozpouštěných v 0,5% Tweenu 80 stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 19200 - 300 µg/ml + 1200 - 18,5 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24 hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200
<i>Enterococcus faecalis</i> *	9600: 600	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM3955	>19200 : 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM322	9600: 600	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 28: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) kombinace cymenu a thymolu rozpouštěných v 24% ethanolu stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 19200 - 300 µg/ml + 1200 - 18,5 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24 hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	9600: 600	19200: 1200	19200: 1200	19200: 1200	19200: 1200	19200: 1200
<i>Enterococcus faecalis</i> *	9600: 600	19200: 1200	19200: 1200	19200: 1200	19200: 1200	19200: 1200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM3955	9600: 600	9600: 600	9600: 600	19200: 1200	19200: 1200	19200: 1200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM322	4800 : 300	9600: 600	9600: 600	9600: 600	9600: 600	9600: 600

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 29: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) kombinace cymenu a carvacrolu rozpouštěných v 0,5% Tweenu 20 stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 19200 - 300 µg/ml + 1200 - 18,5 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24 hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	9600:600	>19200:1200	>19200:1200	>19200:1200	>19200:1200	>19200:1200
<i>Enterococcus faecalis</i> *	9600:600	9600:600	9600:600	19200:1200	>19200:1200	>19200:1200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM3955	>19200:1200	>19200:1200	>19200:1200	>19200:1200	>19200:1200	>19200:1200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM322	>19200:1200	>19200:1200	>19200:1200	>19200:1200	>19200:1200	>19200:1200

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

Tabulka 30: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) kombinace cymenu a carvacrolu rozpouštěných v 0,5 % Tweenu 80 stanovené zkumavkovou diluční metodou (rozmezí testované koncentrace: 19200 - 300 µg/ml + 1200 - 18,5 µg/ml)

mikroorganismus	účinná koncentrace (µg/ml)					
	24 hod		48 hod		72 hod	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200 : 1200	>19200: 1200
<i>Enterococcus faecalis</i> *	19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM3955	>19200 :1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CM322	>19200 :1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200	>19200: 1200

Vysvětlivky: * Izolováno z ejakulátu kanců

DISKUSE A ZÁVĚR

Tématem diplomové práce bylo ověření antibakteriální aktivity dvanácti přírodních látek a jejich vybraných dvojkombinací. Stanovili jsme hodnoty minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní koncentrace pro vybrané bakteriální kmeny zkumavkovou diluční metodou.

K zjišťování inhibičních účinků přírodních látek na bakterie, jsme používali kmeny druhů *Ent. faecalis*, *E.coli*, *Proteus mirabilis*, *Ps. aeruginosa* a *S. hyicus* vykultivované z ejakulátu kanců. Z referenčních kmenů jsme zařadili *Ent. faecalis* CCM 4224, *E. coli* CCM 3954, *Ps. aeruginosa* CCM 3955, *S. aureus* CCM 3953. Jeden kmen *Ps. aeruginosa* byl izolován z výtěru zevního zvukovodu psa s diagnózou *otitis externa*.

Přírodní látky jsme rozpouštěli v 24% ethanolu připraveném naředěním 96% ethanolu v PBS. Většina použitých přírodních látek byla v tomto rozpouštědle špatně rozpustná. Quercetin dihydrát nebyl vůbec rozpustný v 24% ethanolu a proto jsme tuto sloučeninu rozpouštěli v éteru. Z dalších rozpouštědel jsme vyzkoušeli 0,5% Tween 20 a 0,5% Tween 80 u kombinace *p* – cymenu s thymolem a *p* – cymenu s carvacrolem. Testované přírodní látky se však v těchto rozpouštědlech špatně rozpouštěly a vytvářely emulzi.

V publikovaných studiích uvádějí autoři použitá rozpouštědla velmi sporadicky a bohužel ani rozpustnost přírodních látek.

Cristiani a kol. (2007) testovali antibakteriální aktivitu thymolu, carvacrolu a *p* – cymenu na *S. aureus* a *E. coli*. Tyto přírodní látky autoři rozpouštěli v 5% Tweenu 20. Stejně rozpouštědlo použili i Trombetta a kol. (2005) při studiu inhibičních účinků thymolu, mentholu a linalylacetátu na *S. aureus* a *E. coli*. Rozpouštědla Tween 80 (1%) a vinný líh (95%) použili k rozpouštění složek z esenciálního oleje z bazalky Opalchenova a Obreshkova (2002).

Thymol, carvacrol, aldehyd kyseliny skořicové a eugenol rozpouštěli Didry a kol. (1993) v 10% DMSO a chloroformu. Prabuseenivasan a kol. (2006) rozpouštěli přírodní látky z esenciálních olejů ze skořice, hřebíčku, pelargónie, citrónů, limetek a rozmarýnu

v 10% DMSO s 0,5% Tweenem 80. Vybrané esenciální oleje byly testovány na *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Ps. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* a *S. aureus*.

Vardar-Unlu a kol. (2003) rozpouštěli přírodní látky thymol, terpinen, cymen, carvacrol a borneol v methanolu.

Antibakteriální aktivitu **thymolu**, **carvacrolu**, **eugenolu**, **tea tree oil**, **hydrochinonu**, **hydrochinon monomethyetheru**, **berberin sulfátu** a **quercetinu** jsme prověřovali pouze na kmenech *Ent. faecalis* a *Ps. Aeruginosa*, neboť jsou považovány za nejodolnější k účinkům přírodních látek.

Thymol byl špatně rozpustný v 24 % ethanolu, kde vytvářel bezbarvou emulzi. Didry a kol. (1993) uvádějí hodnoty MIC u *S. aureus* a *E. coli* 250 µg/ml a proti *Ps. aeruginosa* MIC vyšší než 500 µg/ml. Walsh a kol. (2003) taktéž stanovovali minimální inhibiční koncentrace thymolu u *S. aureus* a *E. coli* (500 µg/ml) a u *Ps. aeruginosa* uvádějí MIC vyšší než 1000 µg/ml. Lambert a kol. (2001) a Hanbali a kol. (2005) ve svých studiích uvádí, že *Ps. aeruginosa* je málo citlivá k inhibičním účinkům thymolu.

Námi stanovená hodnota inhibiční a baktericidní koncentrace thymolu u *Ps. aeruginosa* činila 2400 µg/ml. U kmenů *Ent. faecalis* MIC i MBC dosahovala hodnoty 600 µg/ml. Naše výsledky týkající se kmenů *Ps. aeruginosa* potvrzují poznatky uvedených autorů.

Také **carvacrol** tvořil emulzi v 24% ethanolu. Při ověřování jeho antibakteriálních účinků jsme stanovili MIC a MBC u *Ent. faecalis* 600 µg/ml a u kmenů *Ps. aeruginosa* 2400 µg/ml.

Didry a kol. (1993) zjistili, že *S. aureus*, *E. coli* a *Streptococcus pneumoniae* jsou účinně inhibovány carvacrolem po dosažení koncentrace 125 µg/ml a *Ps. aeruginosa* při hodnotách vyšších než 500 µg/ml. Lambert a kol. (2001) uvádějí, že *Ps. Aeruginosa* je méně citlivý na carvacrol i thymol. Naše výsledky odpovídají jejich zjištění.

Eugenol je světle žlutá látka v 24% ethanolu tvořící emulzi. MIC a MBC jsme stanovili pro *Ps. aeruginosa* na 600 µg/ml. U *Ent. faecalis* byla účinná inhibiční koncentrace 1200 µg/ml a baktericidní koncentrace 2400 µg/ml. Dorman a Deans (2000) uvádějí ve své studii, že eugenol působí inhibičně na růst *Ent. faecalis* i *Ps. aeruginosa*. Jelikož účinky zjišťovali agarovou difuzní metodou a neuvádějí MIC ani MBC nemůžeme výsledky autorů srovnávat.

Další testovanou přírodní látkou byl **tea tree oil**. Při rozpouštění v 24% ethanolu tvořil emulzi. Papadopoulos a kol. (2006) prověřovali antibakteriální aktivitu tea tree oil na *Ps. aeruginosa*. Jími stanovená MIC byla 17560 µg/ml. Na rozdíl studie Coxe a kol. (2001) uvádějí, že *Ps. aeruginosa* je k tea tree oil rezistentní. U *S. aureus* a *E. coli* stanovili hodnotu inhibiční koncentrace 2195 µg/ml.

Námi stanovené hodnoty MIC a MBC na *Ent. faecalis* a *Ps. aeruginosa* byly 9600 µg/ml. Tedy nižší než v uvedené studii Papadopoulos a kol. (2006).

U následujících přírodních látek - berberin sulfát, quercetin dihydrát, hydrochinon a hydrochinon monomethylether - nemůžeme srovnávat námi stanovené hodnoty MIC a MBC s jinými výsledky, protože jsme je v dostupné literatuře nezaznamenali.

Berberin sulfát je žlutě zbarvená sloučenina špatně rozpustná v 24% ethanolu. Při prověřování jeho inhibičního a baktericidního působení jsme stanovili u *Ps. aeruginosa* MIC 9600 µg/ml a MBC 19200 µg/ml. U enterokoků hodnoty přesahovaly námi testované koncentrace 19200 µg/ml.

Stermitz a kol. (2000) testovali berberin sulfát a zjistili, že v kombinaci s 5'-methoxyhydnocarbinem (5' - MHC) dochází ke snížení jeho hodnoty MIC na 256 µg/ml. Autoři uvádějí, že 5' - MHC samo o sobě nevykazuje antibakteriální aktivitu, ale potencuje účinek berberinu.

Quercetin dihydrát v éteru vytvářel žlutou suspenzi. Po přidání do MHB bujony se látka vysrážela a vytvořila žlutě zbarvený sediment na dně zkumavky, který znesnadňoval odečtení výsledků MIC. Přes to jsme stanovili hodnotu MBC 4800 µg/ml u *Ps. aeruginosa* a 9600 µg/ml u *Ent. faecalis*.

Hydrochinon a **hydrochinon monomethylether** se ve 24% ethanolu rozpouštěly. Hydrochinon byl účinnější – MIC i MBC = 1200 – 4800 µg/ml ve srovnání s hydrochinon monomethyletherem jehož hodnoty byly 2400 – 4800 µg/ml. Obě přírodní látky působily lépe na *Ps. aeruginosa* (1200 a 2400 µg/ml) než na enterokoky (1200 a 4800 µg/ml).

Následující přírodní látky byly testovány 4 referenčními bakteriálními kmeny - *Ent. faecalis*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* a 4 kmeny izolovanými z kančího spermatu - *Ent. faecalis*, *E. coli*, *S. hyicus* a *Proteus mirabilis*.

Kyselina rozmarýnová se v 24% ethanolu rozpouštěla dobře a tvořila nahnědlý průhledný roztok. Studium jejich inhibičních účinků na kmeny *S. aureus* se zabývali Santovo a kol. (2005). Účinná látka tento druh inhibovala v rozmezí 17 – 33 mm a usmrcovala v koncentraci 250 -2250 µg/ml. Námi stanovené hodnoty MIC a MBC u referenčního kmene *S. aureus* byly vyšší, dosahovaly hodnoty 4800 µg/ml. Stejná MIC a MBC byla u obou kmenů *E. coli* i kmene *Proteus mirabilis*. Takřka shodnou MIC - 2400 µg/ml jsme stanovili u *Ent. faecalis*, *S. hyicus* a *Ps. aeruginosa*.

Knicin se velmi špatně rozpouštěl v 24% ethanolu a vytvářel suspenzi. Bruno a kol. (2003) při testování inhibičních účinků knicinu prokázali hodnoty MIC 12,5 µg/ml u *E. coli*, 25 µg/ml, *S. aureus*, 50 µg/ml u *Ps. aeruginosa* a 25 µg/ml u *Proteus mirabilis*. Stejně výsledky u *Ps. aeruginosa* publikovali i Vanhaelen-Fastré a Vanhaelen již v roce 1976, kteří však uvádějí vyšší hodnoty u *E. coli* 100 µg/ml), *S. aureus* 75 - 100 µg/ml a u *Proteus mirabilis* 200 µg/ml.

Námi zjištěné hodnoty se liší od obou sdělení, s výjimkou MIC 150 µg/ml u *Proteus mirabilis*. Koncentrace knicinu byly vyšší u referenčních kmenů *Ent. faecalis*, *S. aureus*, *Ps. aeruginosa* a u kmenů *E.coli* 600 µg/ml. U *Ent. faecalis* a *S. hyicus* izolovaných z kančího spermatu byla MIC 1200 µg/ml.

Hnědočervený roztok vytvářela v 24% ethanolu **kyselina gallová monohydrát**. Pro zvýšení rozpustnosti jsme látku inkubovali při teplotě 40 °C ve

vodní lázni po dobu 30 min. Kyselina gallová potlačovala růst *Ps. aeruginosa* a kmenů *Ent.faecalis* po dosažení MIC - 2400 µg/ml, ostatní testované bakteriální kmeny účinně inhibovala v množství 4800 µg/ml. Stanovené MBC byly 4800 – 9600 µg/ml. V dostupné literatuře jsme hodnoty MIC nenašli, proto nemůžeme výsledky porovnávat.

Limonen je bezbarvá látka špatně rozpustná v 24% ethanolu. Van Vuuren a kol. (2007) uvádějí u limonenu rozmezí účinných hodnot od 3000 do 27 000 µg/ml. Sonboli a kol.(2006), kteří taktéž testovali antibakteriální účinky limonenu, stanovili hodnoty MIC 18400 µg/ml u *S. aureus* a 36800 µg/ml u *E. coli* a *Ent. faecalis*.

Antibakteriální účinky limonenu jsme prokázali u kmenů *S. aureus*, *E. coli*, *Proteus mirabilis* a *Ps. aeruginosa* v koncentraci 19200 µg/ml. U *Ent. faecalis* a *S. hyicus* potlačoval růst v množství 38400 µg/ml. Námí stanovené MIC pro *Ent. Faecalis* a *S. aureus* se přibližují hodnotám publikovaným autory Sonbolim a kol.(2006). U *E.coli* jsme však zjistili nižší účinnou koncentraci uvedené sloučeniny.

Inhibiční účinky jsme ověřovali také u přírodních látek v kombinacích. Hodnoty MIC a MBC jsme zjišťovali zkumavkovou diluční metodou a přírodní látky rozpouštěli v 24% ethanolu. Cymen ve směsi s thymolem a cymen s carvacrolem jsme rozpouštěli také v 0,5% Tweenu 20 a 0,5% Tweenu 80. Testované přírodní látky se však v těchto rozpouštědlech rozpouštěly špatně nebo vůbec.

Při kombinaci **knycinu s carvacrolem** jsme zjistili MIC 600:300 – 2400:1200 µg/ml. Díky synergickému působení sloučenin ve směsi došlo ke snížení hodnoty MIC carvacrolu. U kombinace knycinu s eugenolem a knycinu s thymolem (600:300 - 2400:1200 µg/ml) jsme zaznamenali stejný efekt.

p – cymen ve směsi **s thymolem** vykazoval účinné inhibiční rozmezí 9600:600 – 19200:1200 µg/ml. Kisko a Roller (2005) rovněž zaznamenali synergické působení těchto dvou přírodních látek ve směsi. Obdobně i Ultee a Smid (2001), na rozdíl od Burta a kol. (2005), kteří synergii cymenu s carvacrolem nepotvrdili.

Synergické účinky jsme zjistili i u směsi **kyseliny gallové monohydrátu s carvacrolem**. Stanovené hodnoty MIC 600:300 – 2400:1200 $\mu\text{g/ml}$ byly nižší než u jednotlivých sloučenin. Ke snížení MIC došlo i u kombinace **kyseliny gallové monohydrátu s thymolem**. Námi stanovené rozmezí bylo 1200:600 – 2400:1200 $\mu\text{g/ml}$ a u samostatně testované kyseliny gallové 2400 - 4800 $\mu\text{g/ml}$ a thymolu 600 – 2400 $\mu\text{g/ml}$. Nižší inhibiční účinky jsme pozorovali u dvojkombinace **kyseliny gallové monohydrátu s eugenolem**, kde hodnoty MIC a MBC byly 2400:1200 – 4800:2400 $\mu\text{g/ml}$.

Při testování dvojkombinace **kyseliny rozmarýnové s quercetinem** jsme měli problém s rozpustností quercetinu, což znesnadňovalo odečtení MIC z důvodu žlutého zabarvení roztoku a přítomností sedimentu na dně zkumavky. Hodnoty MBC byly 2400:2400 $\mu\text{g/ml}$ nebo přesahovaly rozmezí testovaných koncentrací.

Při realizaci diplomové práce jsme zaznamenali dobrou antibakteriální aktivitu u sloučenin knicinu, carvacrolu, eugenolu a thymolu. Z dvojkombinací byly nejúčinnější směsi knicinu s carvacrolem, knicinu s eugenolem, knicinu s thymolem a kyselina gallová ve směsi s carvacrolem.

Závěrem je nutné zdůraznit, že u přírodních látek, které nebyly zcela rozpuštěny v použitém rozpouštědle, mohlo dojít ke snížení účinného množství látky v 1 ml a tím i k určitému ovlivnění výsledků testů. Ve 24% ethanolu byly špatně rozpustné carvacrol, *p*-cymen, berberin sulfát, eugenol, knicin, limonen, thymol, tea tree oil a quercetin dihydrát. I přesto knicin, carvacrol, eugenol a thymol vykazovaly dobré inhibiční účinky na testované bakteriální kmeny. V dostupné literatuře jsme nenašli MIC přírodních látek rozpouštěných ve 24% ethanolu, proto nemůžeme naše výsledky srovnávat. Přírodní látky jsme rozpouštěli v 24% ethanolu (původně i v 5% DMSO) z důvodu spermotoxicity rozpouštědla na kančí sperma. Tato diplomová práce byla součástí studie finančně podporované Ministerstvem zemědělství.

SEZNAM LITERATURY

Antibiotika - stanovení citlivosti [online]. [cit. 2009-04-06]. Dostupný z WWW:

<http://www.uzs.tul.cz/lekarska_mikrobiologie/ucebnicemikrobiologiepdf/antibiotika.pdf>

Berberin sulfát [online]. [cit. 2008-12-02]. Dostupný z WWW:

<http://www.eurochem.cz/index.php?eurid=201823790&compno=1&propno=0<ob=1&qsas=4&qspg=1&mn=berberinsulf%e1t&id=0&mlev=0&dt=134217728&spc=0&act=30&m_id=0&m_mlev=0&m_spc=0&la=cs>

Berberin sulfát [online]. [cit. 2008-12-02]. Dostupný z WWW:

<<http://www.itmonline.org/arts/berberine.htm>>

Carvacrol [online]. [cit. 2008-02-19]. Dostupný z WWW:

<<http://faf.vfu.cz/html/docs/compounds/monoterpeny/carvacrol/index.html>>

Cymen [online]. [cit. 2009-03-03]. Dostupný z WWW:

<<http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1032711.html>>

Cymen [online]. [cit. 2009-03-03]. Dostupný z WWW:

<http://umbbd.msi.umn.edu/pcy/pcy_map.html>

Cymen [online]. [cit. 2009-03-13]. Dostupný z WWW:

<<http://faf.vfu.cz/html/docs/compounds/monoterpeny/cymen.index.html>>

Cymen [online]. [cit. 2008-11-30]. Dostupný z WWW:

<http://www.eurochem.cz/index.php?eurid=1211602528&compno=5&propno=0<ob=19&qsas=4&qspg=1&mn=&id=0&mlev=0&dt=134217728&spc=0&act=30&m_id=0&m_mlev=0&m_spc=0&la=cs>

Eugenol [online]. [cit. 2008-11-30]. Dostupný z WWW:
<<http://www.chemblink.com/products/97-53-0.htm>>

Eugenol [online]. [cit. 2008-11-30]. Dostupný z WWW:
<[http://www.polysciences.com/catalog/department/product/98/categoryid_272/
productid_1240/](http://www.polysciences.com/catalog/department/product/98/categoryid_272/productid_1240/)>

Eugenol staženo [online]. [cit. 2009-03-5]. Dostupný z WWW:
<<http://www.3dchem.com/molecules.asp?id=333>>

Eugenol staženo [online]. [cit. 2009-03-5]. Dostupný z WWW:
<<http://www.indepthinfo.com/nutrition/eugenol.htm>>

Eugenol staženo [online]. [cit. 2009-03-5]. Dostupný z WWW:
<<http://chemicalland21.com/specialtychem/perchem/eugenol.htm>>

Glykosidy, [online]. [cit. 2009-03-23]. Dostupný z WWW:
<<http://www.biotox.cz/naturstoff/chemie/ch-gly.html>>

Hydrochinon, [online]. [cit. 2008-11-9]. Dostupný z WWW:
<http://www.eurochem.cz/index/toxi/369_0213.htm,staženo>

Hydrochinon, [online]. [cit. 2008-11-9]. Dostupný z WWW:
<[http://64.233.183.104/search?q=cache:zxc62aisaocj:www.piskac.cz/pavel/
recenze/tis/hydrochinon.rtf+hydrochinon,vlastnosti&hl=cs&ct=clnk&cd=6&gl=cz](http://64.233.183.104/search?q=cache:zxc62aisaocj:www.piskac.cz/pavel/recenze/tis/hydrochinon.rtf+hydrochinon,vlastnosti&hl=cs&ct=clnk&cd=6&gl=cz)>

Hydrochinon monomethylether [online]. [cit. 2008-11-9]. Dostupný z WWW:
<<http://org.sci.muni.cz/files/bezp.pdf>>

Hydrochinon monomethylether [online]. [cit. 2008-11-9]. Dostupný z WWW:
<<http://www.osha.gov/sltc/healthguidelines/4-methoxyphenol/recognition.html>>

Knicin [online]. [cit. 2009-03-4]. Dostupný z WWW:
<<http://www.liberherbarum.com/minor/hu/in0426.htm>>

Knicin [online]. [cit. 2008-11-30]. Dostupný z WWW:
<http://www.rdchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol_id=7640>

Kyselina gallová [online]. [cit. 2008-12-03]. Dostupný z WWW:
<<http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xbcr/zc/prakticke-lekarenstvi-2-2005-solen-0009.pdf>>

Kyselina rozmarýnová [online]. [cit. 2009-02-28]. Dostupný z WWW:
<<http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/rosmarinic-acid.php>>

Kyselina rozmarýnová [online]. [cit. 2009-02-28]. Dostupný z WWW:
<https://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/77_1841.html>

Kyselina rozmarýnová [online]. [cit. 2009-03-02]. Dostupný z WWW:
<<http://www.chemnet.com/sell/chemdetail/1988500.html>>

Kyselina rozmarýnová [online]. [cit. 2009-03-02]. Dostupný z WWW:
<<http://www.phytotek.com/rosemary.htm>>

Kyselina rozmarýnová [online]. [cit. 2009-03-02]. Dostupný z WWW:
<<http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/rosmarinic-acid.php>>

Kyselina rozmarýnová [online]. [cit. 2009-03-02]. Dostupný z WWW:
<<http://www.liberherbarum.com/minor/cz/in1478.htm>>

Limonen [online]. [cit. 2008-11-30]. Dostupný z WWW:
<<http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/limonene.php>>

Limonen [online]. [cit. 2008-11-30]. Dostupný z WWW:
<<http://msds.chem.ox.ac.uk/li/limonene.html>>

Limonen [online]. [cit. 2008-03-11]. Dostupný z WWW:
<<http://faf.vfu.cz/html/docs/compounds/monoterpeny/limonen/index.html>>

Quercetin [online]. [cit. 2008-11-30]. Dostupný z WWW:
<<http://www.chemblink.com/products/117-39-5.htm>>

Quercetin [online]. [cit. 2008-12-03]. Dostupný z WWW: <<http://flavonoid.navajo.cz>>

Quercetin [online]. [cit. 2008-04-5]. Dostupný z WWW:
<<http://faf.vfu.cz/html/docs/compounds/flavony/kvercetin/index.html>>

Silice [online]. [cit. 2009-03-23]. Dostupný z WWW:
<<http://www.biotox.cz/naturstoff/chemie/ch-silice.html>>

Tea tree oil [online]. [cit. 2008-12-01]. Dostupný z WWW:
<<http://www.chemicaland21.com/lifescience/foco/tea%20tree%20oil.htm>>

Thymol [online]. [cit. 2008-02-19]. Dostupný z WWW:
<<http://faf.vfu.cz/html/docs/compounds/monoterpeny/thymol/index.html>>

ALI, S. M., KHAN, A. A., AHMED, I., MUSADDIQ, M., AHMED, K. S., POLASA, H., RAO, L. V., HABIBULLAH, C. M., SECHI, L. A., AHMED, N.: Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*., *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2005 vol. 21, no. 4, s. 20.

ALMA, M. H., MAVI, A., YILDIRIM, A., DIGRAK, M., HIRATA, T.: Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey., *Biol. Pharm. Bull.* 2003, vol. 26, no. 12, s. 1725-1729.

BAGAMBOULA, C. F., UYTENDAELE, M., DEBEVERE, J.: Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*, *Food Microbiology*, 2004, vol. 21, no. 1, s. 33-42 .

BECERRIL R, GÓMEZ-LUS R, GOÑI P, LÓPEZ P, NERÍN C.: Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007 vol. 388, no. 5–6, s. 1003-1011.

BENDAHOU, M., MUSELLI, A., GRIGNON-DUBOIS, M., BENYOUCEF, M., DESJOBERT, J., BERNARDINI, A., COSTA: Antimicrobial activity and chemical composition of *origanum glandulosum* Dest. essential oil and extract obtained by microwave extraction: comparison with hydrodistillation, *J. Food Chemistry* 2008, vol. 106, no. 1, s. 132-139.

BORRIS, R. P.: Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company., *J. Ethnopharmacol.* 1996; vol. 5, no. 1-3, s. 29-38.

BRUNO, M., ROSSELLI, S., MAGGIO, A., RACCUGLIA, R. A., NAPOLITANO, F., SENATORE, F.: Antibacterial evaluation of cnicin and some natural and semisynthetic analogues, *Planta Med.*, 2003 vol. 69, no. 3, s. 277-281.

BURT, S.: Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods, *Int. J. Food. Microbiol.*, 2004, vol. 94, no. 3, s. 223-253.

BURT, S. A., VLIELANDER, R., HAAGSMAN, H. P., VELDHUIZEN E, J.: Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers, *J. Food. Prot.*, 2005, vol. 68, no. 5, s. 919-926.

CIMANGA, K., KAMBU, K., TONA, L., APERS, S., DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J., PIETERS, L., VLIETINCK A, J.: Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo., *Journal of ethnopharmacology*, 2002, vol. 79, no. 2, s. 213-220.

COWAN, M. M.: Plant products as microbial agents, *Clin. Microbiol. Reviews*, 1999, vol. 12, no. 4, s. 564 – 582

COX, S. D., MANN, C.M., MARKHAM, J.L: Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*., *J. Appl. Microbiol.*, 2001, vol. 91, no. 3, s. 492-497.

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., *J. Agric. Food. Chem.*, 2007, vol. 55, no. 15, s. 6300-6308.

ČAPKOVÁ, M.: Antibakteriální účinky přírodních látek, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2007, s. 1-134.

DHARMANANDA, S.: New uses of berberine – A Valuable alkaloid from herbs for „Damp-Heat“ syndromes, *Institute for Traditional Medicine*, 2005

DIDRY, N., DUBREUIL, L., TROTIN, F., PINKAS, M.: Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination, *Pharmazie*, 1993, vol. 48, no. 4, s. 301-304.

DORMAN, H. J., DEANS, S. G.: Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils., *J. Appl. Microbiol.*, 2000 vol. 88, no. 2, s. 308-316.

ECONOMAKIS, C., DEMETZOS, C., ANASTASSAKI, T., PAPAZOGLU, V., GAZOULI, M., LOUKIS, A., THANOS, C. A., HARVALA, C.: Volatile Constituents of Bracts and Leaves of Wild and Cultivated *Origanum dictamnus*, *Planta Med.*, 1999 vol. 65, no. 2, s. 189-191.

FALEIRO, M. L., MIGUEL, M. G., LADEIRO, F., VENÂNCIO, F., TAVARES, R., BRITO, J. C., FIGUEIREDO, A. C., BARROSO, J. G., PEDRO, L. G.: Antimicrobial activity of essential oils isolated from portuguese endemic species of *Thymus*, *Appl. Microbiol.*, 2003, vol. 36, no. 1, s. 35-40.

FATOPE, M. O., MARWAH, R. G., AL HADHRAMI, N. M., ONIFADE, A. K., WILLIAMS, J. R.: Identification of the chemotypes of *Ocimum forskolei* and *Ocimum basilicum* by NMR spectroscopy., *Chem Biodivers.*, 2008, vol. 5, no. 11, s. 2457-2463.

FILIPSSON, A. F., BARD, J., KARLSSON, S.: Limonene, National Institute for Working Life, Solna, Sweden, Åseda, Sweden, National Chemicals Inspectorate, Solna, Sweden, World Health Organization Geneva, 1998.

GILL, A. O., HOLLEY, R. A.: Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, vol. 70, no. 10, s. 5750-5755.

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., *J. Ethnopharmacol.*, 2005, vol. 99, no. 3, s. 399-401.

HAZZIT, M., BAALIOUAMER, A., FALEIRO, M. L., MIGUEL, M. G.: Composition of the Essential Oils of *Thymus* and *Origanum* Species from Algeria and their Antioxidant and Antimicrobial Activities , *J. Agric. Food. Chem.*, 2006, vol. 54, no. 17, s. 6314-6321.

HERNÁNDEZ, T., CANALES, M., AVILA, J. G., GARCÍA, A. M., MARTÍNEZ, A., CABALLERO, J., DE VIVAR, A. R., LIRA, R.: Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae), *J. Ethnopharmacol.*, 2005, vol. 96, no. 3, s. 551-554.

HYNIE, S.: Speciální farmakologie. Díl VII/B. Protiinfekční léčiva, Karolinum, 2003, s. 16-18.

CHUNG, K. H., YANG, K. S., KIM, J., KIM, J. C., LEE, K.Y: Antibacterial activity of essential oils on the growth of *Staphylococcus aureus* and measurement of binding interaction using optical biosensor, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007 vol. 17, no. 11, s. 1848-1855.

IVANOVA, A., DELCHEVA, I., TSVETKOVA, I., KUJUMGIEV, A., KOSTOVA, I.: GC-MS analysis and antimicrobial activity of acidic fractions obtained from *Paeonia peregrina* and *Paeonia tenuifolia* rous, *Z. Naturforsch.*, 2002, vol. 57, no. 7-8, s. 624-628.

JOSHI, S., CHANOTIYA, C. S., AGARWAL, G., PRAKASH,O., PANT A. K., MATHELA, C. S.: Terpenoid compositions, and antioxidant and antimicrobial properties of the rhizome essential oils of different *Hedychium* species., *Chem. Biodivers*, 2008 vol. 5, no. 2, s. 299-309.

KALEMBA, D., KUNICKA, A.: Antibacterial and antifungal properties of essential oils, *Current Medicinal Chemistry*, 2003, vol. 10, no. 10, s. 813—829.

KELEN, M., TEPE, B.: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora, *Bioresour. Technol.*, 2008, vol. 99, no. 10, s. 4096-4104.

KIM, J., MARSHALL, M. R., CHENG-I WEI: Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens, *J. Agric. Food. Chem.*, 1995, vol. 43, s. 2839-2845.

KOŞAR, M., DEMIRCI, B., DEMIRCI, F., BAŞER, K. H.: Effect of maturation on the composition and biological activity of the essential oil of a commercially important *Satureja* species from Turkey: *Satureja cuneifolia* Ten. (*Lamiaceae*), *J. Agric. Food Chem.*, 2008, vol. 56, no. 6, s. 2260-2265.

LAMBERT, R. J., SKANDAMIS, P. N., COOTE, P. J., NYCHAS, G. J.: A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol, *J. Appl. Microbiol.*, 2001, vol. 91, no. 3, s. 453-462.

LEITE A. M., EDELTRUDES DE OLIVEIRA LIMA, EVANDRO LEITE DE SOUZA, MARGARETH DE FÁTIMA FORMIGA MELO DINIZ, VINÍCIUS NOGUEIRA TRAJANO, ISAC ALMEIDA DE MEDEIROS: Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, vol. 43, no. 1, s. 121-126.

LIOLIOS, C. C., GORTZI, O., LALAS, S., TSAKNIS, J., CHINOU, I.: Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity, *Food Chemistry*, 2009, vol. 112, no. 1, s. 77-83.

LO CANTORE, P., IACOBELLIS, N. S., DE MARCO, A., CAPASSO, F., SENATORE, F.: Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare miller var. Vulgare (miller)* essential oils, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, vol. 52, no. 26, s. 7862-7866.

LUQMAN, S., DWIVEDI, G. R., DAROKAR, M. P., KALRA, A., KHANUJA, S. P.: Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections, *Altern. Ther. Health Med.*, 2007, vol. 13, no. 5, s. 54-59.

MARTIN, J., DUŠEK, J.: Variabilita a využití silic z *Eucalyptus spp.*, *Praktické lékařství*, 2007, vol. 3, no.5, s. 238-239.

MORAVCOVA, J.: Biologicky aktivní přírodní látky, VŠCHT Praha 2003, s. 11-91.

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, *J. Ethnopharmacol.*, 1996, vol. 53, no. 3, s. 143-147.

NAZARUK, J., CZECHOWSKA, S. K., MARKIEWICZ, R., BORAWSKA, M. H.: Polyphenolic compounds and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activity of aqueous extracts from leaves of some *Cirsium* species, *Nat. Prod. Res.*, 2008, vol. 22, no. 18, s. 1583-1588.

NOHYNEK, L. J., ALAKOMI, H. L., KÄHKÖNEN, M. P., HEINONEN, M., HELANDER, I. M., OKSMAN-CALDENTEY, K. M., PUUPPONEN-PIMIÄ, R. H.:

Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens, *Nutr. Cancer.*, 2006, vol. 54, no. 1, s. 18-32.

NOSTRO, A., BLANCO, A. R., CANNATELLI, M. A., ENEA, V., FLAMINI, G., MORELLI, I., SUDANO ROCCARO, A., ALONZO, V.: Susceptibility of methicilin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, vol. 230, no. 2, s. 191-195.

O'BRYAN, C. A., CRANDALL, P. G., CHALOVA, V. I., RICKE, S. C.: Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp., *J. Food. Sci.*, 2008, vol. 73, no. 6, s. 264-267.

OKE, F., ASLIM, B., OZTURK, S., ALTUNDAG, S.: Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* ten., *Food Chemistry*, 2009, vol. 112, no. 4, s. 874-879.

OPLETAL, L., ČOPÍKOVÁ, J., UJER, M., LAPČÍK, O., MORAVCOVÁ, J., DRAŠAR, P.: Přírodní látky hořké chuti, *Chemické listy* 101, 2007, s. 895-906.

OPLETAL, L., ŠIMERDA, B. : Antiinvazivní látky přírodního původu jako aditiva do krmiv, Ministerstvo zemědělství ČR – Vědecký výbor pro výživu zvířat, Výzkumný ústav pro výživu zvířat, 2005, s. 27 – 37.

PAPADOPOULOS, C. J., CARSON, C. F., HAMMER, K. A., RILEY, T. V: Susceptibility of pseudomonads to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and components, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006, vol. 58, no. 2, s. 449-451.

PAOLINI, J., TOMI, P., BERNARDINI, A. F., BRADESI, P., CASANOVA, J., KALOUSTIAN, J.: Detailed analysis of the essential oil from *Cistus albidus* L. by combination of GC/RI, GC/MS and ¹³C-NMR spectroscopy., *Nat. Prod. Res.* 2008, vol. 22, no. 14, s. 1276-1284.

PETERSEN, M., SIMMONDS, M. S. J.: Rosmarinic acid, *Phytochemistry*, 2003, vol. 62, s. 121-125.

PRABUSEENIVASAN, S., JAYAKUMAR, M., IGNACIMUTHU, S.: *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils, *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2006, vol. 30, no. 6, s. 39.

PRONĚK, D., LACHMAN, J., HEJTMÁNKOVÁ, J., PIVEC, V., DUDJAK, J., FAITOVÁ, K.: Polyfenolické antioxidanty v různých odrůdách cibule (*Allium cepa* L.), Česká Zemědělská Univerzita, Praha, 2005.

RABBANI, G. H., BUTLER, T., KNIGHT, J., SANYAL, S. C., ALAM, K.: Randomized controlled trial of berberine sulfate therapy for diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*, *J. Infect. Dis.*, 1987, vol. 155, no. 5, s. 979-984.

RAFII, F., SHAHVERDI, A. R.: Comparison of essential oils from three plants for enhancement of antimicrobial activity of nitrofurantoin against *Enterobacteria*, *Chemotherapy*. 2007, vol. 53. no. 1, s. 21-25.

RAYBAUDI-MASSILIA, R. M., MOSQUEDA-MELGAR, J., MARTÍN-BELLOSO, O.: Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in fruit juices, *J. Food. Prot.*, 2006, vol. 69, no. 7, s. 1579-1586.

ROLLER, S., ERNEST, N., BUCKLE, J.: The antimicrobial activity of high-necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA)., *J. Altern. Complement. Med.*, 2009, vol. 15, no. 3, s. 275-279.

ROTA, M. C., HERRERA, A., MARTÍNEZ, R. M., SOTOMAYOR, CH. A., JORDÁN, M. J.: Antimicrobial activity and chemical composition of *thymus vulgaris*, *thymus zygis* and *thymus hyemalis* essential oils, *Food control*, 2008, vol. 19, no. 7, s. 681-687

SANTOYO, S., CAVERO, S., JAIME, L., IBAÑEZ, E., SEÑORÁNS, F. J., REGLERO, G.: Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction, *J. Food., Prot.*, 2005 vol. 68, no. 4, s. 790-795.

SARAC, N., UGUR, A.: Antimicrobial activities of the essential oils of *Origanum onites* L., *Origanum vulgare* L. subspecies *hirtum* (Link) Ietswaart, *Satureja thymbra* L., and

Thymus cilicicus Boiss. & Bal. growing wild in Turkey, *J. Med. Food.*, 2008, vol. 11. no. 3, s. 568-573.

SAROGLOU, V., KARIOTI, A., DEMETZOS, C., DIMAS, K., SKALTSA, H.: Sesquiterpene lactones from *Centaurea spinosa* and their antibacterial and cytotoxic activities, *J. Nat. Prod.*, 2005, vol. 68, no. 9, s. 1404-1407.

SKOCIBUSIĆ, M., BEZIĆ, N.: Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils, *Phytother Res.*, 2004, vol. 18, no. 12, s. 967-970.

SONBOLI, A., BABAKHANI, B., MEHRABIAN, A. R.: Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*, *Z. Naturforsch.*, 2006, vol. 61, no. 3-4, s. 160-164.

STERMITZ, F. R., LORENZ, P., TAWARA, J. N., ZENEWICZ, L. A., LEWIS, K.: Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor., *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2000, vol. 97, no. 4, s. 1433-1437.

STOJANOVIĆ, G., RADULOVIĆ, N., HASHIMOTO, T., PALIĆ, R.: *In vitro* antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: the composition of *Achillea clavennae* L. (*Asteraceae*) extract., *J. Ethnopharmacol.*, 2005, vol. 101, no. 1-3, s. 185-190.

SUN, H., COURTNEY H. S., BEACHEY, E. H.: Berberine sulfate blocks adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial cells, fibronectin, and hexadecane, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1988, vol. 32, no. 9, s. 1370-1374.

ŠNEJDAR V.: Slovník rostlin B [online], Benedikt lékařský, *Cnicus Benedictus* L. [citováno 2009-03-04]

ŠOUKALOVÁ, N.: Antibakteriální účinky přírodních látek, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2008, s. 1-100.

TROMBETTA, D., CASTELLI F., SARPIETRO, M. G., VENUTI, V., CRISTIANI M., DANIELE C., SAIJA, A., MAZZANTI G., BISIQNANO, G.: Mechanisms of antibacterial

action of three monoterpenes, *Antimicrob. Agents chemotherapy*, 2005, vol.49, no.6, s. 2474-2478.

ULTEE, A., SMID, E. J.: Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*, *Int. J. Food. Microbiol.*, 2001, vol. 64, no. 3, s. 373-378.

URBÁŠKOVÁ, P.: Rezistence bakterií k antibiotikům, Vybrané metody, Praha, Trios, s.r.o., 1998.

URBÁŠKOVÁ, P., SCHINDLER, J., TICHÁČEK, B., POTUŽNÍK, V.: Vyšetření pro antimikrobiální terapii, *Avicenum*, 1985, s. 19–31.

VAN VUUREN, S. F., VILJOEN, A. M.: Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8 - cineole alone and in combination, *Flavour and Fragrance Journal*, 2007, vol. 22, no. 6, s. 540–544.

VANHAELEN-FASTRÉ, R., VANHAELEN, M.: Activité antibiotique et cytotoxine de la ricine et de ses produits d'hydrolyse, *Planta Med.*, 1976, vol. 26, no. 2, s. 179-189.

VARDAR-UNLÜ, G., CANDAN, F., SÖKMEN, A., DAFERERA, D., POLISSIOU, M., SÖKMEN, M., DÖNMEZ, E., TEPE, B.: Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. *Var. pectinatus* (*Lamiaceae*)., *J. Agric. Food. Chem.*, 2003, vol. 51, no. 1, s. 63-67.

VIEIRA, F. C., NAHAS, E.: Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures, *Microbiol. Res.*, 2005, vol.160, no. 2, s. 197-202.

VINŠOVÁ, J., IMRANOVSKÝ, A.: Salicylanilidy - stále aktuální skupina s potenciální antibakteriální aktivitou, *Česká a slovenská farmacie*, 2004, vol. 53, no. 6, s. 294 – 299.

VYTRÁSOVÁ, J., BÍLKOVÁ, Z.: Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie, Univerzita Pardubice, 1998, s. 103 – 106.

WALSH, S. E., MAILLARD, 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, *J. Appl. Microbiol.* 2003, vol. 94, no. 2, s. 240-247.

WANG, P., KONG, C. H., ZHANG, C. X.: Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ambrosia trifida* L., *Molecules.*, 2006, vol. 11, no. 7, s. 549-555.

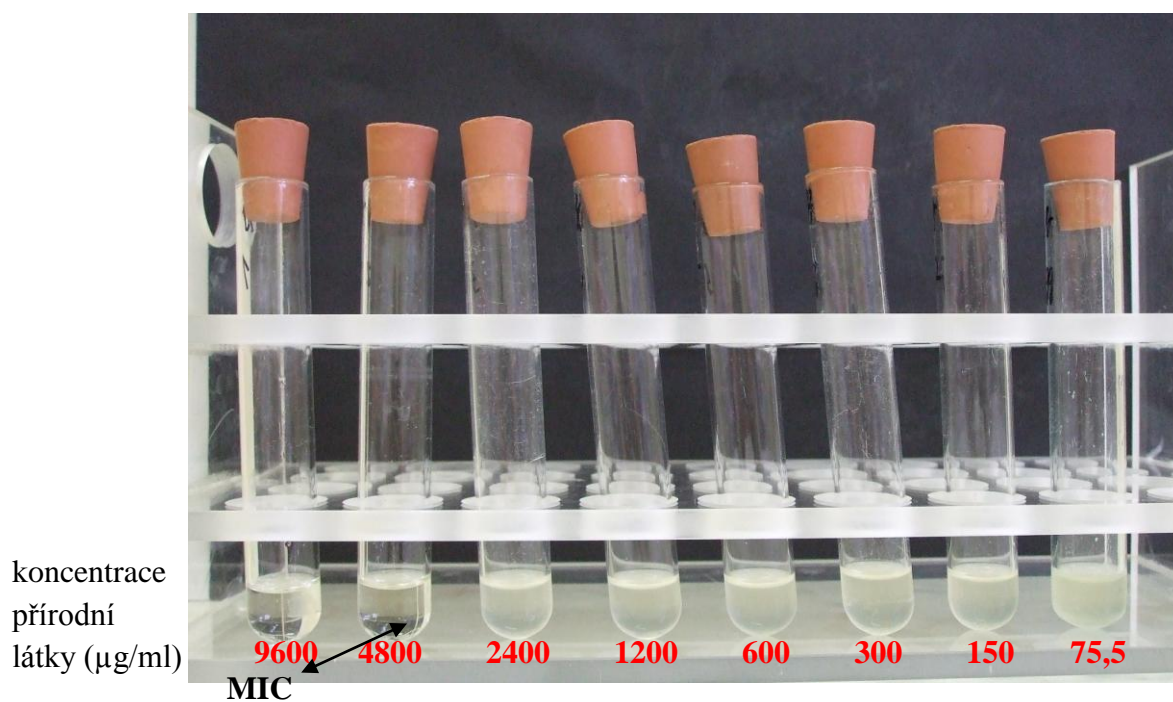
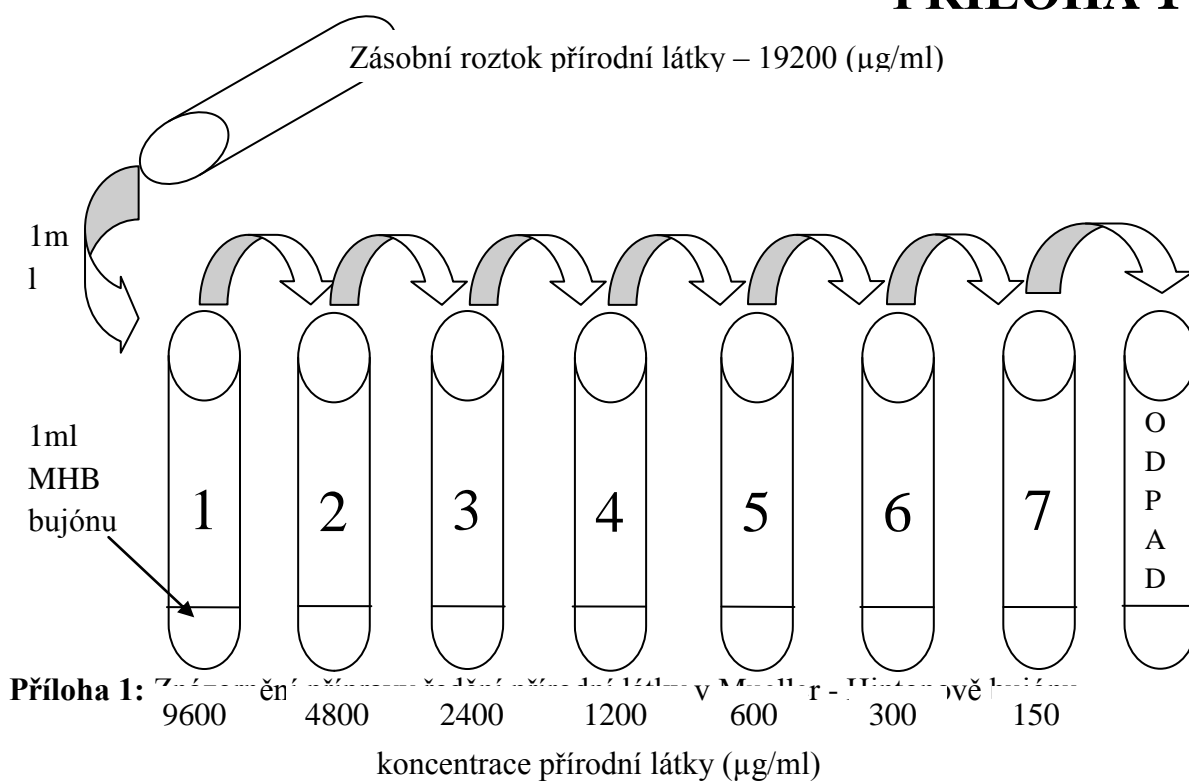
YOUSEFZADI, M., SONBOLI, A., KARIMIC, F., EBRAHIMI, S. N., ASGHARI, B., ZEINALIA, A.: Antimicrobial activity of some *Salvia species* essential oils from Iran, *Z. Naturforsch.*, 2007, vol. 62, no. 7-8, s. 514-518.

Český lékopis, Grada Publishing, 2002, 1. díl: 578 - 707.

Český lékopis, Grada Publishing, 2002, 2. díl: 706 - 707.

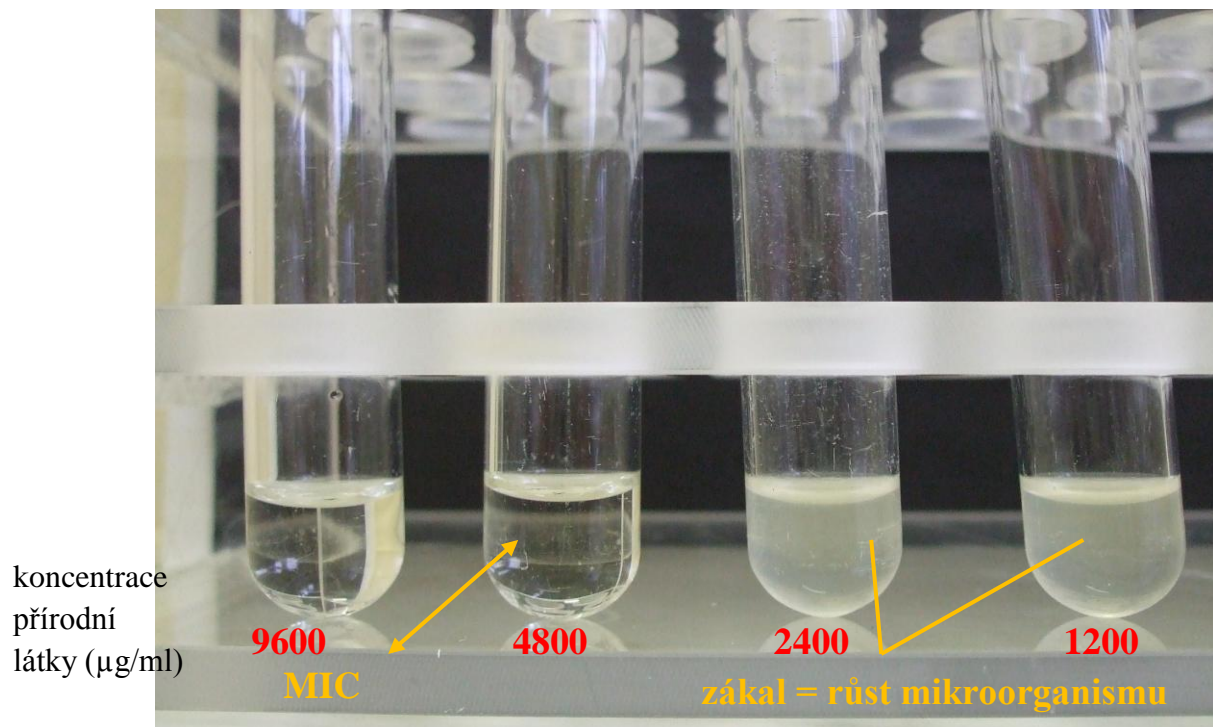
Český lékopis, Grada Publishing, 2002, 4. díl: 3981 – 4374.

PŘÍLOHA 1

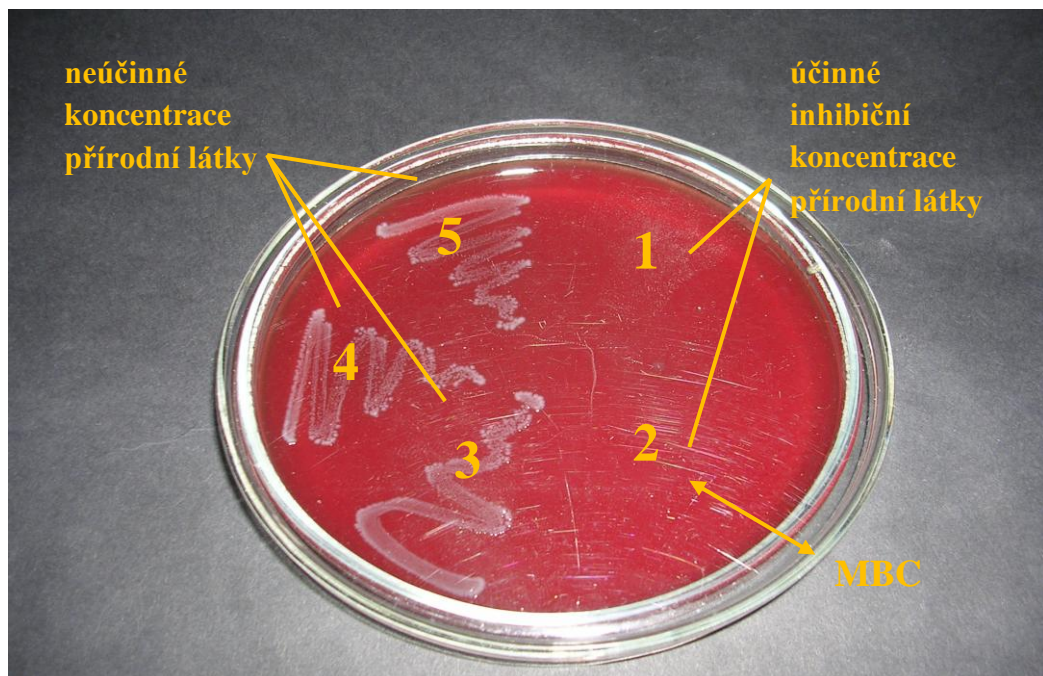


Příloha 2: Inhibice růstu mikroorganismů v bujónu s klesající koncentrací přírodní látky

PŘÍLOHA 2



Příloha 3: Inhibice růstu mikroorganismů v bujónu s klesající koncentrací přírodní látky



Příloha 4: Vyočkování kmenů z bujónu obsahujících klesající koncentrace inhibiční látky