Citlivost mikroorganizmů dutiny ústní k antimikrobiálním látkám

Bc. Jaroslava Prchalová

Diplomová práce
2015

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Jaroslava Prchalová**
Osobní číslo:	**T14507**
Studijní program:	**N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia:	**prezenční**
Téma práce:	**Citlivost mikroorganizmů dutiny ústní k antimikrobiálním látkám**

Zásady pro vypracování:

1. **V teoretické části vypracujte literární rešerši na zadané téma.**
2. **Věnujte se charakteristice mikroorganizmů osídlujících dutinu ústní. Zaměřte se především na mikroflóru dutiny ústní u ortodonticky léčených pacientů.**
3. **V další části se zaměřte na citlivost těchto mikroorganizmů k antimikrobiálním látkám.**
4. **V praktické části izolujte mikroorganizmy přítomné ve slinách ortodonticky léčených pacientů.**
5. **Izoláty charakterizujte a identifikujte. Sledujte citlivost těchto mikroorganizmů k antimikrobiálním látkám.**
6. **Získané výsledky zpracujte a vyhodnoťte. Srovnejte účinky jednotlivých antimikrobiálních látek.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. **PANDIS, N., PAPAIOANNOU, W., KONTOU, E., NAKOU, M., MAKOU, M., ELIADES, T. Salivary Streptococcus mutans levels in patients with conventional and self-ligating brackets. European Journal of Orthodontics, 2010, vol. 32, p. 94-99.**
2. **VOTAVA, M., BROUKAL, Z., VANĚK, J. Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře. Brno: Neptun, 2007. 567 s. ISBN 978-80-86850-03-0.**
3. **GOLDMAN, E., GREEN, L. H. Practical Handbook of Microbiology. Boca Raton: CRC Press, 2009. 852 p. ISBN 978-0-8493-9365-5.**
4. **BASER, K. H. C., BUCHBAUER, G. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. Boca Raton: CRC Press, 2010. 975 p. ISBN 978-1-4200-6315-8.**
5. **BASSOLÉ, I. H. N., JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules. 2012, 17, p. 3989-4006.**

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **20. ledna 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **18. května 2016**

Ve Zlíně dne 20. ledna 2016

doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická
L.S.

Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: PRCHALOVÁ JAROSLAVA Obor: CHTP-

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby [1)];
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 [2)];
- beru na vědomí, že podle § 60 [3)] odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 [3)] odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 18. 5. 2016

.....

[1] *zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:*

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

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

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

[2] *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:*

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

[3] *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:*

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

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá antibakteriálními látkami e jejich účinností na mikroorganizmy dutiny ústní. V teoretické části je popsána přítomnost mikroorganizmů ve formě mikrobiálního zubního plaku, dále jsou popsány esenciální oleje, jejich získávání a složení. Také jsou zde uvedeny metod, pomocí kterých lze stanovit konkrétní mikroorganizmy dutiny ústní a metody pro inhibici těchto mikroorganizmů.

Praktická část je tedy zaměřena ne konkrétní stanovení mikroorganizmů dutiny ústní, na schopnost tvorby biofilmu těmito mikroorganizmy. Dále byla zjišťována antibakteriální účinnost vybraných esenciálních olejů pomocí diskové difuzní metody a pomocí mikrodiluční metody.

Klíčová slova: zubní plak, mikroorganizmy dutiny ústní, esenciální olej, antibakteriální účinek

ABSTRACT

This diploma thesis deals with effect of antibacterial substances on microorganisms in mouth. Theoretical part describes presence of microorganisms in form of microbial dental plaque. Further, essential oils, their manufacture and basic components are described. This part describes methods enabling to specify particular microorganisms and methods for inhibiting activity of these microorganisms.

Practical part is focused on specifying particular mouth microorganisms and their ability to create biofilm. Next antibacterial effect of particular essential oils was tested by disk diffusion method and microdilution method.

Keywords: Plaque, microorganisms of the oral cavity, essential oil, antibacterial activity

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce, kterou byla RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D, za její pomoc, trpělivost, připomínky a cenné rady. Také za čas, který mi věnovala během konzultací a při práci v laboratořích. Poděkování patří také laborantkám za jejich pomoc a užitečné rady.

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

OBSAH

ÚVOD **10**
I TEORETICKÁ ČÁST **11**
1 MIKROFLÓRA DUTINY ÚSTNÍ **12**
1.1 MIKROBIÁLNÍ BIOFILM 12
1.2 ZUBNÍ PLAK 12
1.3 SLOŽENÍ ZUBNÍHO PLAKU 13
1.4 VÝVOJ A DĚLENÍ PLAKU 13
1.4.1 První stádium 13
1.4.2 Druhé stádium 13
1.4.3 Dělení plaku 14
1.5 MIKROOGANIZMY ZUBNÍHO PLAKU 14
1.5.1 Grampozitivní mikroorganizmy 15
Rod Streptococus 15
Rod Enterococcus 16
Rod Micrococcus 16
Rod Lactobacillus 16
Rod Bifidobacterium 17
Rod Eubacterium 17
1.5.2 Gramnegativní mikroorganizmy 17
Rod Neisseria 17
Rod Bacteroides 18
Actinobacillus actinomycetemcomitans 18
Porphyromonas gingivalis 18
Veillonela parvula 19
2 ESENCIÁLNÍ OLEJE **20**
2.1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ 20
2.2 ZÍSKÁVÁNÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ 22
2.2.1 Lisování za studena 22
2.2.2 Destilace 23
2.3 ANTIMIKROBNÍ ÚČINKY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ 24
2.4 VYBRANÉ ESENCIÁLNÍ OLEJE 25
2.4.1 Mátové oleje 25
Máta peprná (*Mentha piperita*) 25
Máta luční (*Mentha arvensis*) 26
Máta kadeřavá (*Mentha spicata*) 26
2.4.2 Eukalyptové oleje 27
Eukalyptus citronovonný (*Eucalyptus citriodora*) 27
Eucalyptus polybractea 27
Eucalyptus globulus 27
Eucalyptus camaldulensis 27
Eucalyptus radiata 28
2.5 ESENCIÁLNÍ OLEJE VE FORMĚ MIKROEMULZÍ 28
3 CHARAKTERIZACE MIKROORGANIZMŮ IZOLOVANÝCH Z DUTINY ÚSTNÍ **31**

3.1 IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ POMOCÍ MALDI-TOF MS 31
3.2 PRŮKAZ TVORBY BIOFILMU 32
II PRAKTICKÁ ČÁST 35
4 CÍL PRÁCE 36
5 MATERIÁL, CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE 37
5.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE 37
5.2 POUŽITÉ ESENCIÁLNÍ OLEJE 37
5.3 POUŽITÉ ŽIVNÉ PŮDY 37
5.3.1 Pomnožovací média 38
5.4 POMŮCKY A PŘÍSTROJE 38
6 METODY 39
6.1 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ 39
6.2 PŘÍPRAVA ŽIVNÝCH PŮD 39
6.2.1 Pomnožovací média 40
6.3 IZOLACE ČISTÝCH KULTUR MIKROORGANIZMŮ 40
6.3.1 Vzorky pro izolaci mikroorganizmů 40
6.3.2 Postup izolace čistých kultur 41
6.4 IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE MIKROORGANIZMŮ 41
6.4.1 Gramovo barvení a mikroskopie 41
6.4.2 Identifikace izolátů metodou MALDI TOF - MS 42
6.4.3 Průkaz tvorby biofilmu 42
6.5 STANOVENÍ CITLIVOSTI MIKROORGANIZMŮ K ANTIBAKTERIÁLNÍM LÁTKÁM 42
6.5.1 Mikrodiluční metoda 42
6.5.2 Disková difuzní metoda 43
7 VÝSLEDKY A DISKUZE 45
7.1 IZOLACE MIKROORGANIZMŮ A MIKROSKOPIE 45
7.2 IDENTIFIKACE METODOU MALDI-TOF MS 46
7.3 TVORBA BIOFILMU U IZOLOVANÝCH MIKROORGANIZMŮ 47
7.4 CITLIVOST IZOLÁTŮ K ESENCIÁLNÍM OLEJŮM 52
7.4.1 Stanovení citlivosti diskovou difuzní metodou 52
7.4.2 Stanovení citlivosti mikrodiluční metodou 54
7.5 ZÁVĚREČNÁ DISKUSE VŠECH VÝŠE UVEDENÝCH VÝSLEDKŮ 62
ZÁVĚR 64
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 65
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 71
SEZNAM OBRÁZKŮ 72
SEZNAM TABULEK 73

ÚVOD

Mikroorganizmy, kolonizující dutinu ústní, mají schopnost tvořit takzvaný mikrobiální plak. Zubní plak lze označit jako nejdéle známý mikrobiální biofilm, tedy strukturované společenstvo mikroorganizmů, pro jehož vznik je zásadní adherence mikroorganizmů k různým povrchům. Zastoupení mikrobiálních druhů ovlivňuje vlastnosti zubního plaku. Během vývoje plaku mají největší zastoupení grampozitivní koky a tyčinky. V menší míře se zde nachází i gramnegativní koky a tyčinky. Zubní plak se vyvíjí ve dvou stadiích. Zubní plak, který je již vyzrálý, je zpravidla tvořen několika druhy mikroorganizmů. Ze skupiny grampozitivních máji největší zastoupení streptokoky, enterokoky, mikrokoky a mnohé další. U gramnegativních jsou to převážně neisserie. Je známé, že růst těchto mikroorganizmů a tvorbu zubního plaku, nelze úplně eliminovat, ale je možné jeho tvorbu potlačit. Mezi látky, které inhibují růst mikroorganizmů, se řadí i esenciální oleje. Esenciální oleje a výtažky z některých rostlin jsou schopny inhibovat růst mikroorganizmů související s tvorbou zubního plaku. Tyto oleje lze získávat vodní (parní) destilací, suchou destilací, lisováním za studena, nebo extrakcí pomocí rozpouštědel. Esenciální oleje jsou směsí různých komponent, mezi které patří převážně uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony a estery. Je známá celá škála olejů, které mají antibakteriální vlastnosti. Tato aktivita je přiřazována mnohým složkám daného oleje.

V této diplomové práci byla věnována pozornost deseti esenciálním olejům, z nichž pět bylo mátových a pět eukalyptových. Cílem bylo zjistit, zda vybrané esenciální oleje mají inhibiční účinky na mikroorganizmy dutiny ústní. Inhibiční účinnost byla sledována pomocí diskové difuzní metody. Dále pomocí mikrodiluční metody, kde byly použity různé koncentrace daných esenciálních olejů. Při této metodě byl sledován pokles či nárůst mikroorganizmů v závislosti na koncentraci daného esenciálního oleje. V práci byly využity mikroorganizmy izolované z dutiny ústní. Součástí práce byla také izolace těchto mikroorganizmů, ejich charakterizace, identifikace a stanovována byla i jejich schopnost tvorby biofilmu. Izoláty, byly identifikovány pomocí metody MALDI-TOF MS.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MIKROFLÓRA DUTINY ÚSTNÍ

Dutina ústní je zcela jedinečné prostředí umožňující tvorbu tzv. mikrobiálního povlaku nebo plaku, který se hromadí na povrchu zubů. Plak je tvořen především mikroorganizmy a jejich metabolickými produkty [1, s. 18].

1.1 Mikrobiální biofilm

Biofilm, je strukturované společenstvo mikrobiálních buněk, jejichž základní vlastností je schopnost adherence k nejrůznějším povrchům. Biofilm není tvořen pouze mikrobiálními buňkami, ale i extracelulárně produkovanými polymerními látkami. Existence ve formě biofilmu je pro mikroorganizmy výhodnější a to především díky tomu, že jim poskytuje ochranu vůči nepříznivým vlivům vnějšího prostředí. Předpokládá se, že v přirozeném prostředí je život mikroorganizmů ve formě planktonických kultur spíše výjimečný [2].

Biofilm se nachází prakticky všude, kde jsou přítomné mikroorganizmy [3, s. 104]. Povrch, na kterém se mikroorganizmy tvoří, může být pevný, polotuhý materiál přírodního či syntetického původu [2]. Existuje celá řada definic biofilmu, ty aktuálnější však zahrnují i fyziologické a genetické vlastnosti mikroorganizmů v biofilmu. Bakteriální biofilm je společenství mikrobiálních buněk nevratně přichycených k podložce nebo k okolním buňkám, pevně usazených v polymerní mimobuněčné hmotě, kterou sami produkují, a mají odlišný fenotyp růstových vlastností a odlišnou transkripci genů [4, s. 62]. Tvorba biofilmů byla prokázána u většiny patogenních bakterií, např. u zástupců rodů *Pseudomonas, Vibrio, Escherichia, Salmonella, Listeria, Streptococcus, Staphylococcus* nebo *Mycobacterium* [3, s. 104]. Biofilm je znám už od 17. Století, kdy Van Leeuwenhoek poprvé pozoroval mikroorganizmy na povrchu zubů a tímto se podílel na objevu mikrobiálních biofilmů. Můžeme tedy říci, že nejdéle známou formou biofilmu je zubní plak [4].

1.2 Zubní plak

Plak je strukturovaný, tuhý, plstnatý zubní povlak (biofilm), který se skládá ze složek slin, bakteriálních metabolických produktů, zbytků potravy a bakterií [5, s. 25]. Zubní plak je složen z velkého množství bakterií usazených v makromolekulární matrix bakteriálního a slinného původu [1, s. 18]. V biofilmu jsou mikroorganizmy vázány v těsné blízkosti a v důsledku toho mezi nimi dochází k interakcím. Tato blízkost má své výhody i nevýhody. Výhodou je například společné působení více bakteriálních druhů při rozkladu polysacharidů či glykoproteinů. Pro kompletní katabolizmus těchto substrátů je zapotřebí komplex-

ního enzymatického aparátu celého mikrobiálního společenstva zubního plaku. Proto je pro různé druhy mikroorganizmů výhodné držet se v těsné blízkosti [6, s. 11-15]. Výhodou je také rozšíření mikrobiálního společenstva o anaerobní druhy, které mají přežívání usnadněno díky koadhezi s bakteriemi, které využívají kyslík [7, s. 204]. Plak velmi snadno přilne k povrchu zubu a odstranit ho můžeme pouze mechanicky. Zmineralizovaný zubní plak nazýváme zubní kámen. Plak lne také ke sliznicím a jeho složení se liší v závislosti na konkrétní lokalizaci [8, s. 35].

1.3 Složení zubního plaku

V jednom miligramu plaku se může nacházet zhruba 10^8 bakterií [9, s. 247]. Dále plak obsahuje 80 % vody a sušinu, z toho je 1/3 tvořena buňkami a 2/3 tvoří nebuněčné (intermikrobiální) substance. Organický obsah je tvořen hlavně polysacharidy a proteiny. Anorganickou složku tvoří hlavně vápník a fosfáty. Fosfáty představují tzv. nárazníkový systém plaku a účastní se při tvoření zubního kamene [10, s. 16]. Během doby vývoje plaku mají největší zastoupení grampozitivní (G+) koky a tyčinky, dále pak gramnegativní (G-) koky a tyčinky, vláknité mikrooranizmy, fusiformní bakterie a v poslední řadě spirochety a spirily [11, s. 37].

1.4 Vývoj a dělení plaku

Tvorba plaku není náhodná, ale je způsobena různými vlivy. Mezi tyto vlivy můžeme řadit vlastnosti prostředí dutiny ústní, imunitní reakce lidského organizmu, ale také způsob výživy a ústní hygienu. Plak a jeho vývoj můžeme popsat ve dvou stadiích [1, s. 36]

1.4.1 První stádium

Na očištěném povrchu zubu vytvářejí silné glykoproteiny takzvanou získanou kutikulu - pelikulu [11, s. 35]. Tato pelikula, se díky svému náboji elektrostaticky váže na vápenaté a fosfátové ionty apatitu [5, s. 25]. Pelikula nepokrývá jen zuby, ale i výplně a zubní protézy. Jeji tvorba je poměrně rychlá, probíhá řádově v minutách [11, s. 35].

1.4.2 Druhé stádium

V tomto stádiu dochází k osídlování pelikuly mikroorganizmy. Většinou jde o koky a krátké grampozitivní tyčinky. Významně se uplatňují streptokoky, a to zejména druhy schopné tvořit polysacharidová pouzdra. Při vzniku plaku se nejvíce uplatňuje *Streptococcus sanguis*, dále pak *Streptococcus mutans*. Tyto dva mikroorganizmy mají schopnost tvořit vel-

ké množství extracelulárních polysacharidů, které jsou součástí intermikrobiální substance. Během 8 – 12 hodin je povlak zubu souvislý. Po této době, ale vývoj plaku nekončí. Postupně se zvětšuje množství mikroorganizmů. Začne pomalu stoupat počet gramnegativních mikroorganizmů a postupně můžeme nalézat i anaerobní mikroorganizmy [5, s. 35-36].

1.4.3 Dělení plaku

Složení zubního plaku je proměnlivé podle jeho lokalizace. Nejčastější rozlišení je na plak fisurální, koronální, gingivální, který se dále dělí na supragingivalní a subgingiválním. Svým složením se fisurální a koronární plak vzájemně odlišuje pouze částečně. Oba dva tyto typy plaků se však výrazně liší od plaku gingiválního, který má některé druhy mikroorganizmů které se u těchto dvou nevyskytují. [11, s. 35].

Vývoj supragingiválního plaku lze popsat následovně. V prvních 24 hodinách se na pelikulu adherují kolonie G+ bakterií, které jsou tvořené streptokoky a aktinomycetami. Během následujících dnů se začínají usídlovat G- koky, G+ a G- tyčinky a vláknité mikroorganizmy. Plak stále mění svůj objem a složení. Zhruba po cca třech týdnech převažují vláknité mikroorganizmy. Aerobní mikroorganizmy jsou postupně nahrazovány anaerobními a fakultativně anaerobními druhy [10, s. 16].

Subgingiválním plak a jeho vznik je zatím méně prozkoumán, především kvůli problematickému získávání vzorků. Byl zatím zjištěn výskyt G+ a G- koků, tyčinek a filament. Je možný i výskyt spirochet a dalších mikroorganizmů [10, s. 16].

1.5 Mikrooganizmy zubního plaku

Vyzrálý plak se skládá z přilnutých bakteriálních buněk, které tvoří 60 - 70 % objemu plaku [5, s. 26]. Kvalitativní a kvantitativní zastoupení jednotlivých mikrobiálních skupin či druhů je závislé na mnoha faktorech [12, s. 17]. V tabulce 1 jsou uvedeny mikroorganizmy, které se v zubním plaku vyskytují nejčastěji.

Tab. 1.Přehled nejčastějších mikroorganizmů zubního plaku [8, s. 39] [3, s. 20]

Grampozitivní mirkoorganizmy	**Gramnegativní mikroorganizmy**
Streptococcus (*S. mutans, S. mitis, S. sanguis, S. salivarius, S. sobrinus, S. milleri*)	*Actinobacillus actinomycetemcomitans*
Enterococcus	*Capnocytophaga ochracea, Capnocytophaga spitigena, Capnocytophaga gingivalis*
Micrococcus	*Neisserie* (*N. lactamicus, N. pharingis*)
Actinomycetes (*A. israeli, A. viscosus, A. naeslundi, A. odontolyticus*)	*Prevotella* (*P. melaninogenica, P. denticola, P. oralis*)
Lactobacillus (*L. casei, L. acidophilus*)	*Bacteroides* (*B. melanogenicus, B. oralis, B. corrodens, B. ochraceus*)
Bifidobacterium	*Porphyromonas gingivalis*
	Fusobacterium nucleatum
Eubacterium	*Leptotrichia buccalis*
	orální spirochety
Rothia dentocariosa	*Veillonella* (*V. alkalescens, V. parvula*)
	Treponema denticola

1.5.1 Grampozitivní mikroorganizmy

Rod *Streptococus*

Streptokoky lze v mikroskopických preparátech pozorovat jako sférické nebo ovoidní koky uspořádané v párech či řetězcích. Jsou nepohyblivé, fakultativně anaerobní a nesporulující [12, s. 17]. Některé druhy tvoří pouzdra. Streptokoky jsou chemoorganotrofní a k růstu vyžadují nutričně bohaté média a nekdy i 5% CO_2. Mají fermentatorní typ metabolizmu a produkují převážně kyselinu mléčnou, ale ne plyn. Optimální teplota pro růst je 37°C, ale dokáží růst i v rozmezí teplot 25 - 43°C [14, s. 251], streptokoky jsou nejčastěji rozlišovány na α, β a typ γ. Toto rozlišení probíhá nejčastěji na základě jejich hemolytické aktivity

na krevním agaru. Alfa-hemolytické streptokokové kolonie jsou obklopeny úzkou zónou hemolýzy, která se projevuje jako zelené zbarvení (tzv. vididace) [13, s. 295]. Beta-hemolytické streptokoky vykazují úplnou hemolýzu, která se projeví projasněním média v okoli beta-hemolytické kolonie [12, s. 18]. Gama-hemolytické streptokoky bývají označovány také jako nehemolytické, protože nemění vzhled krevního agaru [13, s. 295]. Na tvorbě zubního kazu a plaku se nejčastěji podílí *Streptococcus mutans*. Tato bakterie kolonizuje zubní povrch a způsobuje poškození pevné struktury zubu [14, s. 290].

Rod *Enterococcus*

Zástupci tohoto rodu jsou kataláza-negativní koky, které se objevují v krátkých řetízcích, ve dvojicích, nebo jednotlivě. Enterokoky byly původně řazeny do rodu *Streptococcus* [13, s. 303]. Netvoří endospory a některé druhy jsou pohyblivé nevýraznými bičíky. Na rozdíl od streptokoků pouzdra nevytváří. Jsou to mikroorganizmy fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní s fermentatorním metabolizmem. Pro růst vyžadují nutričně bohatá média. Jsou schopny využívat širokou škálu sacharidů, přičemž je hlavním produktem fermentace L(+)-kyselina mléčná. Rostou v rozmezí teplot 10 - 45°C, snášejí i vyšší koncentrace solí a žlučových kyselin. Enterokoky jsou široce rozšířené v prostředí, izolovány mohou být z půdy, vody, rostlinného materiálu, dále je nacházíme ve feces obratlovců, v potravinách a v klinickém materiálu. Občas způsobují pyogenní infekce [14, s. 248,249]. Izolovat je lze i z dutiny ústní a to konkrétně z plaku, ve kterém se nachází druhy *Enterococcus faecalis* a *E. faecium* [12, s. 20].

Rod *Micrococcus*

Mikrokoky mají sférické buňky, které se vyskytují po dvou, čtyřech či v nepravidelných shlucích. Tyto buňky mohou produkovat karotenoidní pigmenty. Jsou nepohyblivé, nesporulující a striktně aerobní. Jsou chemoorganotrofní s respiratorním typem metabolizmu. Mikrokoky jsou mírně halotolerantní, kataláza a oxidáza pozitivní a optimální růstová teplota je 25 až 37 °C. Primárně se vyskytují na kůži savců včetně člověka, ale jsou i široce rozšířeny v prostředí (půda, voda) a v potravinách (maso). Obecně jsou považovány za nepatogen [14, s. 192].

Rod *Lactobacillus*

Lactobacily mají tvar pravidelných tyček, které jsou obvykle delší. Občas se můžeme setkat i s kokovitým tvarem. Buňky, jsou uspořádány v palisádách nebo v krátkých řetízcích

[15, s. 244]. Zástupci rodu jsou řazeny mezi bakterie mléčného kvašení. Lactobacily jsou historicky definovány jako mikroaerofilní organizmy, které fermentují šesti uhlíkaté cukry až na kyselinu mléčnou. Nejčastěji se využívají v potravinářství při výrobě fermentovaných mléčných výrobku, masa, zeleniny, vína, kávy a kakaa. Dále je tento rod spojen se slizničními povrchy zvířat a lidí, jako jsou například sliznic tenkého a tlustého střeva, nebo vaginy. [16, s. 15611]

Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie jsou grampozitivní bakterie, které přirozeně kolonizují lidský gastrointestinální trakt, pochvu a dutinu ústní. [17, s. 14422]. Tento rod může mít velmi rozmanitý tvar buněk, převážně jsou to tyčinky, mírně zakřivené a kyjovité, často ztluštělé či s náznaky větvení. Uspořádány jsou jednotlivé, ve dvou do tvaru písmene V, Y, X, občas i v řetízcích, palisádách nebo růžicích. Bifidobakterie jsou kataláza negativní, nepohyblivé, nesporulující a anaerobní mikroorganizmy [18, s. 549]. Optimální teplota růstu pro tyto mikroorganizmy je 38 °C v gastrointestinálním traktu, mohou však růst i při teplotě nižší a to okolo 20°C. Optimální pH prostředí pro růst bifidobakterií je okolo 7,0 [19, s. 49].

Rod Eubacterium

Jsou to grampozitivní bakterie tvar tyček, nepravidelné velikosti, vzácně mohou tvořit i vlákna. Tento rod řadíme do čeledi *Eubacteriaceae*. Buňky jsou pleomorfní, se ztluštělými nebo zúženými konci, někdy až zakřivené. Uspořádání je jednotlivé, po dvou či v řetízcích. Eubacterie jsou anaerobní, chemoorganotrofní, metabolizmus je fermentatorní. Konečným produktem metabolizmu glukózy nebo peptonů je obvykle směs kyselin, zahrnující velké množství kyseliny mléčné, octové nebo mravenčí spolu s produkcí plynného vodíku. Některé druhy jsou oportunně patogenní pro obratlovce a mohou způsobovat infekce tkání. Nachází se v tělních dutinách člověka, v rostlinných produktech a v půdě [15, s. 226-27], [14, s. 227].

1.5.2 Gramnegativní mikroorganizmy

Rod *Neisseria*

Rod *Neisseria* řadíme mezi diplokoky, mají tvar "fazole'' a jsou zploštělé. Tento rod obsahuje dva patogenní a mnoho komensálních druhů. Většina z nich je neškodná a najdeme je v horních cestách dýchacích a v zažívacím traktu. Patogenním druhem je *Neisseria menin-*

gitidis (meningokok), která je původcem meningitidy a *Neisseria gonorrhoeae* (gonokoků), která je původcem kapavky. Gonokoky a meningokoky vyžadují aerobní atmosféru s přidaným oxidem uhličitým a obohacené médium pro optimální růst. Gonokoky rostou pomaleji a jsou náročnější než meningokoky, které mohou růst na běžných médiích, jako je krevní agar. Všichni zástupci rodu *Neisseria* jsou oxidáza pozitivní [20, s. 327].

Rod *Bacteroides*

Rod *Bacteroides* je řazen do čeledi *Bacteriodaceae* která zahrnuje bakterie, které žijí ve střevním traktu člověka. Nekteré druhy tohoto rodu mohou způsobovat zánět pobřišnice, dále je můžeme najít v dutině ústní [21, s. 158]. Rod obsahuje tyčinkovité, nesporulující, nepohyblivé a obligátně anaerobní bakterie. Tento rod má více než 50 druhů, které se však liší ve své buněčné morfologii, jsou biochemicky a fyziologicky velmi různorodé. Mnoho druhů je pleomorfních. Jsou, chemoorganotrofní a metabolizují sacharidy i peptony [15, s. 158], [22, s. 85]. Z ústní dutiny bývá nejčastěji izolován druh *Bacteriodes oralis*. V dutině ústní se ale může nacházet až 27 různých druhů rodu *Bacteriodes* [23, s. 1329].

Actinobacillus actinomycetemcomitans

Tento mikroorganizmus způsobuje některé typy onemocnění lidského parodontu, tvoří malé průsvitné kolonie, které jsou snadno přehlédnutelné [24, s. 606]. Hovoříme o sférických, oválných nebo tyčinkovitých buňkách, které jsou nepohyblivé. Převažuje však tvar tyčinek. Uspořádání buněk může být jednotlivé, po dvou a zřídka v řetízcích. Dále jsou chemoorganotrofní, fakultativně anaerobní a jejich optimální teplota růstu je 37 °C [15, s. 135].

Porphyromonas gingivalis

Rod zahrnuje gramnegativní, obligátně anaerobní krátké tyčky až kokotyčky. Kolinie na krevním agaru jsou většinou hnědé až černé. Jsou asacharolytické, růst je podpořen přítomností proteinových hydrolyzátů. Hlavními produkty vermentace jsou kyseliny máselná a octová, v malém množství také propionová, izomáselná a izovalerová. Tyto bakterie bývají izolovány z infekcí ústní dutiny a z infekcí zubních kořenových kanálků [14, s. 160]. Kolonizace subgingiválního oblasti je umožněna schopností *Porphyromonas gingivalis* adherovat na substráty, jako jsou složky slin, proteinové matrice, epiteliální buňky a bakterie na povrchu zubů. Vazba na tyto substráty je zprostředkována strukturálními podjednotkami fimbrií (molekuly fimbrilinu). *P. gingivalis*, nevyužívá cukry jako zdroj energie, ale vyža-

duje hem jako zdroj železa a peptidy pro energii a růst. Bakterie produkuje přinejmenším tři hem aglutiny a pět proteáz, které se podílí na poškození gingivy. Výsledkem je počáteční zánětlivá reakce známá jako periodontitida, která je způsobena reakcí imunitního systému na přítomnost bakterií zubního plaku a také rakcí na poškození tkáně. To vede k otoku tkáně a formování periodontálních kapes. Bakterie kolonizují tyto kapsy a způsobují zánět, což vede k vytvoření periodontálního abscesu, destrukci kosti nebo parodontóze či zánětu dásní. Pokud onemocnění není léčené, může dojít až k vypadnutí zubu [18, s. 936]

Veillonela parvula

Jedná se o malé nefermentující anaerobní koky, které jsou součástí běžné flóry v dutině ústní, gastrointestinálním traktu a vagině. Tyto bakterie nacházíme ve vedlejších nosních dutinách, plicích, játrech, centrálním nervovém systému, srdci a v kostech [25, s. 3235]. Vyskytují se v párech, izolovaně, ve shlucích nebo v krátkých řetízcích. Většinou tvoří přirozenou mikroflóru výše zmíněných lokalit, ale mohou být oportunně patohenní tzn., že se mohou šířit z místa přirozeného výskytu a to zejména při oslabení hostitele. *Veilonella* tvoří endotoxin lipopolysacharidové povahy, který zvyšuje její invazitu do tkání, což způsobuje vznik zánětu [26, s. 359].

2 ESENCIÁLNÍ OLEJE

Aromatické rostliny se díky svým antimikrobním účinkům tradičně používají v lidové medicíně, nebo v potravinářství k prodloužení trvanlivosti potravin. Antimikrobní působení těchto rostlin nebo jejich extraktů lze přičítat mnoha látkám, které jsou většinou produktem sekundárního metabolizmu. Tyto látky jsou součástí takzvaných silic neboli esenciálních olejů. Esenciální oleje některých rostlin jsou schopny ovlivnit růst a množení různých skupin mikroorganismů [27, s. 275].

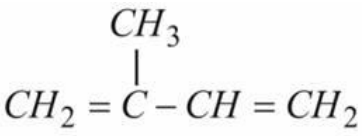
Již od středověku jsou esenciální oleje široce používány pro své baktericidní, virucidní, fungicidní, insekticidní, léčivé a kosmetické účinky. V současnosti jsou používány farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu, nebo v zemědělství [28, s. 446]. Esenciální oleje (EO), také známé pod názvem éterické oleje, či silice, jsou definovány jako směsi látek získané parní (vodní) destilací rostlinného materiálu. Mohou být získány z rostlinných orgánů, jako jsou květy, listy, kůra, dřevo, kořeny, oddenky, ovoce a semena [29, s. 15]. Dále můžeme silice definovat jako těkavé, intenzivně vonící směsi přírodních rostlinných látek, které mají olejovitou konzistenci, jsou tedy lipofilní ve vodě těžko rozpustné. V čerstvém stavu jsou bezbarvé a při delším uchování mohou oxidovat, pryskyřičnatět a tmavnout. Při běžných teplotách jsou tekuté [30, s. 2]. Význam silic a jejich funkce v přírodě je stále otázkou a předmětem výzkumu. Existují však důkazy, že rostliny produkují silice pro obranu, signalizaci, ochranu vůči okusu, atraktant hmyzu nebo jako součást sekundárního metabolizmu [31, s. 43].

2.1 Chemické složení esenciálních olejů

Esenciální oleje jsou velmi složité přírodní směsi, které můžou obsahovat 60 různých komponent ve zcela různých koncentracích [28, s. 447]. Obecně lze říci, že složkami esenciálních olejů jsou uhlovodíky, nebo jejich kyslíkaté deriváty. Některé EO také mohou obsahovat deriváty dusíku a síry. Jednotlivé komponenty olejů mohou existovat ve formě alkoholů, kyselin, esterů, aldehydů, ketonů, aminů nebo sulfidů [32, s. 6]. Uhlovodiky esenciálních olejů dělíme na dvě skupiny, a to na terpenoidní a neterpenoidní uhlovodíky [29, s. 15].

Ze složek EO mají největší význam terpenické uhlovodíky, jejichž základem jsou jednotky izoprenu (2-methyl-1,3 butandien). Molekula izoprenu je znázorněna na obrázku 1 [33, s. 138]. Terpenoidní uhlovodíky představují širokou skupinu chemických látek, kterou lze

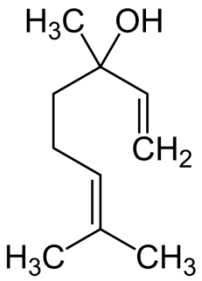
rozdělit do základních skupin odrážejících počet izoprenových jednotek, které konkrétní molekulu tvoří. Podle toho rozlišujeme monoterpeny, sekviterpeny, diterpeny a triterpeny [34, s. 10]. Monoterpeny jsou tvořeny dvěma izoprenovými jednotkami, molekula seskviterpenu obsahuje tři jednotky izoprenu a diterpeny tvoří čtyři izoprenové jednotky. Mezi typické terpenoidní uhlovodíky, vyskytující se v EO, patří například limonen, pinen, piperen, myrcen atd. Mnohé terpeny vykazují různé biologické účinky, jsou protizánětlivé, antiseptické, protivirové a baktericidní [33, s. 138, 139].



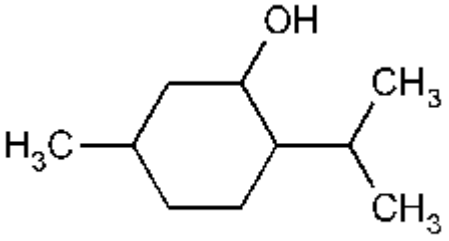
Obrázek 1:

Obrázek 1: Isopren [34, s. 10]

Podle funkčních skupin můžeme terpenoidní uhlovodíky dále dělit na terpenové alkoholy, aldehydy nebo ketony. Mezi významné vlastnosti terpenových alkoholů můžeme řadit jejich anti-septické, anti-virové, baktericidní a dezinfekční účinky. Mezi terpenické alkoholy řadíme linalool (obr.2), geraniol, citronellol, α-terpineol, mentol (obr.3), borneol a nerol [33, s. 139, 140].

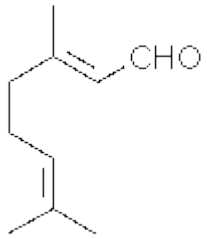


Obrázek 2: Linalool [33, s. 140]



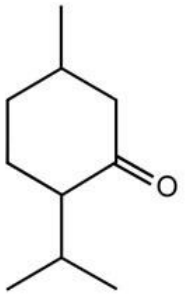
Obrázek 3: Menthol [33, s. 140]

Terpenové aldehydy mohou mít anti-fungální, protizánětlivé, anti-septické, anti-virové, baktericidní a dezinfekční účinky [34, s. 13]. Mezi nejdůležitější aldehydy z řady terpenických náleží citral (obr. 4), citronellal, cyklamal a safranal [33, s. 141, 142].



Obrázek 4: Citral

Ketony v silicích působí proti nachlazení, využívají se například jako látky usnadňující vykašlávání. Často se nacházejí v rostlinách, které se využívají pro léčbu horních cest dýchacích. Dále jsou prospěšné pro podporu hojení ran a jizev. Mezi nejznámější terpenické ketony řadíme menthon (máta peprná), jehož struktura je uvedena na obrázku 5, dále pak karvon (kmín), piperiton (eukalyptus), diosfenol nebo kafr [30, s. 3].



Obrázek 5: Strukturní vzorec menthonu [32, s. 184]

2.2 Získávání esenciálních olejů

Esenciální oleje můžeme získávat různými postupy. Mezi ty nejznámější a nejvyužívanější patří lisovaní za studena, vodní destilace, parní destilace a suchá destilace, která je nejméně využívána [35, s. 88, 89]. Nejstarším způsobem získávání silic je extrakce pomocí tuků. S touto metodou se můžeme v omezeném rozsahu setkat i dnes. Nejčastěji se využívá ke zpracování květů [30, s. 4].

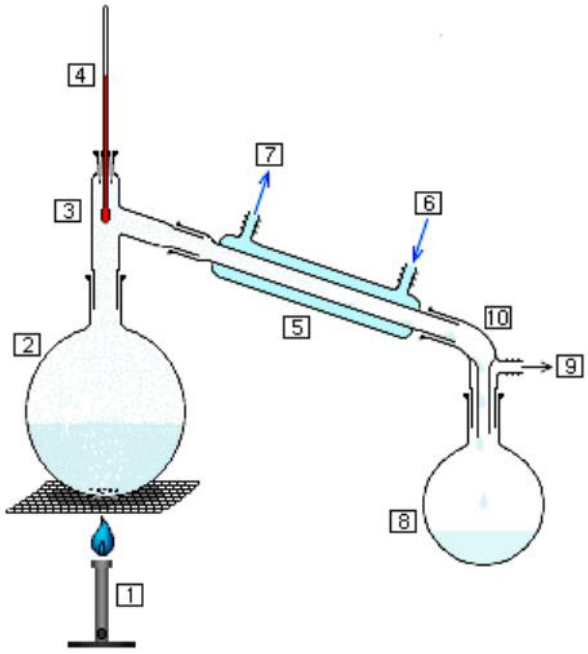
2.2.1 Lisování za studena

Lisování se používá pro získání esenciálních olejů z citrusových slupek, jako jsou pomerančové, citronové, grapefruitové a z bergamotu. Vylisovaná tekutina není čistou silicí, protože obsahuje vodu a jiné látky, jako jsou např. pektiny [34, s. 16]. Lisováním dochází k rozrušení olejových buněk a tím pádem k uvolnění vodnaté směsi. Dalším krokem je oddělení oleje od vodné části a to pomocí destilace [31, s. 416].

2.2.2 Destilace

Parní nebo vodní destilace je nejčastěji používaná metoda pro získání esenciálních olejů z rostlin. Silice vyráběné touto cestou jsou často vysoké kvality. Termín “destilace“ je odvozen z latinského “destillare“ což znamená stékat. Destilace je nejjednodušeji definována jako odpařování a následná kondenzace kapaliny. Existuje celá řada destilačních zařízení, všechny pracují na stejném principu, jen se liší ve své konstrukci. [35, s. 99]. Destilace vodou je vhodná pro suchý materiál, kde je přímý var ve vodě nežádoucí. Suchý materiál je přelit vodou a do směsi se vhání pára. Olejové buňky z daného materiálu přejdou do vyluhovací vody. Těkavé látky přecházejí s vodní parou do chladiče a kondenzát se odděluje od vodné fáze [30, s. 5].

Zařízení, používané k destilaci, je složeno z destilační baňky, destilačního nástavce, chladiče, alonže, předlohy (jímadla) a teploměru. Často se k destilaci používá destilačních mostů, což jsou zařízení, ve kterých jsou některé z dříve uvedených částí pevně spojeny. Běžně používané zařízení pro prostou destilaci je znázorněno na obrázku 6 [36].



Obrázek 6: Destilační aparatura 1. zdroj tepla 2. destilační baňka 3. destilační hlava 4. teploměr 5. chladič 6. přívod chladicí vody 7. odtok chladicí vody 8. předloha (jímadlo na destilát) 9. přívod vakua, vodní vývěva 10. nástavec (alonž) [36]

2.3 Antimikrobní účinky esenciálních olejů

U celé řady esenciálních olejů byly prokázány, antimikrobiální účinky vůči různým skupinám mikroorganizmů, grampozitivním i gramnegativním bakteriím, kvasinkám i vláknitým mikromycetám. Inhibiční působení jednotlivých olejů závisí na jejich složení. Účinnými složkami jsou především terpenoidní uhlovodíky typu monoterpenů nebo seskviterpenů, a také od nich odvozené alkoholy, fenoly nebo estery. Za animikrobní charakter těchto složek EO je zodpovědná lipofilní povaha jejich uhlovodíkového skeletu a hydrofilní charakter jejich funkčních skupin [31, s. 88]. Některé oleje působí pouze na úzkou skupinu mikroorganizmů, ale jsou známy i oleje, jež by bylo možné označit za širokospektré. Příkladem mohou být EO obsahující fenolické struktury, jako jsou karvakrol a thymol, tedy např. tymiánové oleje, které velmi dobře působí na grampozitivní i gramnegativní bakterie včetně čeledi *Enterobasteriaceae* [37].

Esenciální oleje mají většinou dvě až tři hlavní složky, které v oleji svým zastoupením dominují. Ty bývají doplněny poměrně velkým počtem minoritních komponent, jejichž koncentrace v oleji je nízká. Oleje, jejichž majoritními složkami jsou fenolické struktury, jsou zpravidla ty, které vykazují vysokou antimikrobiální aktivitu. Schopnost inhibovat růst mikroorganizmů klesá u jednotlivých složek EO v následujícím pořadí: fenoly > aledehydy > ketony > alkoholy > estery > uhlovodíky [32], [39].

Nízká aktivita byla pozorována u komponent, které obsahují jediný aromatický kruh s alkylovými substituenty [31, s. 88]. Esenciální oleje bohaté na 1,8-cineol mají prokázanou účinnost proti G+ a G- bakteriím, včetně *Listeria monocytogenes*, proti kvasinkám *Candida albicans* a proti fytopatogenním druhům hub [31, s. 88]. Kyslíkaté monoterpeny, jako je mentol a u alifatických alkoholů (např linaloolu) byla zjištěna silná až střední aktivita proti několika bakteriím [38, s. 71]. S ohledem na velké množství různých skupin chemických sloučenin přítomných v EO, je velmi pravděpodobné, že mechanizmus účinku jejich antimikrobiálního působení není jednotný. To může být velkou výhodou pro jejich využití coby antibakteriálních agnes. Při současném působení na různé struktury či procesy bakteriální buňky je totiž méně pravděpodobný vznik rezistence k použitému oleji [31, s. 90].

Již bylo zmíněno, že antimikrobiální aktivita se významně liší u EO získaných z různých rostlinných druhů. Je však také třeba dodat, že rozdíly v inhibičním účinku nacházíme i u olejů získaných ze stejného rodu, ale jiného druhu rostliny. Příkladem mohou být různé

mátové oleje. Zatímco EO získaný z druhu *Mentha arvensis* působí inhibičně na grampozitivní bakterie, olej z máty peprné (*Mentha piperita*) má antibakteriální účinnost výrazně slabší, a to především vůči gramnegativním druhům [41].

Inhibiční účinek esenciálních olejů se může dokonce lišit i v závislosti na části rostliny, ze které je získáván. Příčinou je odlišné složení EO, jejichž zdrojem jsou odlišné části téže rostliny. Obsah účinných látek v olejích dále závisí na postupu jejich získání, na lokalitě, kde jsou rostliny pěstovány a na konkrétních klimatických podmínkách [42].

V dalších částech textu jsou blíže popsány EO, které byly zvoleny pro praktickou část práce. Jedná se oleje získané z rostlin různých druhů rodu *Mentha* a *Eucalyptus*. Pro praktickou část byly tyto oleje zvoleny z důvodu jejich antimikrobiální aktivity, která je hojně popisována v odborné literatuře.

2.4 Vybrané esenciální oleje

2.4.1 Mátové oleje

Mátové oleje získáváme extrakcí z rostlin máty a jejich složení bylo rozsáhle studováno. Hlavní složky mátového esenciálního oleje jsou mentol (33,28%), mentyl acetát (6,40%) a menton (22,03%). Využití těchto olejů je široké, nejčastěji se s nimi můžeme setkat v potravinářském, kosmetickém či farmaceutickém průmyslu [39, s. 667].

Máta peprná (*Mentha piperita*)

Máta peprná nebo-li *Mentha piperita* je vytrvalá bylina z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). Kvete od června do září a je to přirozený hybrid máty vodní a máty klasnaté. Pochází ze západní Evropy, ale dnes už se pěstuje v mírných pásech celého světa [40].

Oddenek máty má podzemní výběžky, lodyha je přímá, čtyřhranná, slabě ochlupená a nahoře se větví. Listy máty peprné jsou řapíkaté s kopinatou až vejčitou čepelí. Květy jsou uspořádány v hustých lichopřeslenech a mají růžovou až nafialovělou barvu. Máta peprná ve volné přírodě roste jen zřídka, její rozmnožování je nejčastější pomocí řízků, nebo dělení trsů.

Obsah silice je 1 až 2 % s hlavními složkami mentol asi 35 % a menton asi 25 %. Dále silice obsahuje mentofuramen, piperot, třísloviny, hořčiny, flavonoidy, kyselinu octovou a dalších asi 40 látek. Všechny tyto látky jsou získávány z listů této rostliny [41]. Bylo provedeno mnoho studií na antibakteriální účinky máty peprné. Obecně vzatu se všechny stu-

die shodují na prokázané antibakteriální aktivitě, ale bohužel nelze tyto studie mezi sebou porovnávat vzhledem k různým metodám testování. Bylo však zjištěno, že antibakteriální účinky máty peprné působí jak na gramnegativní tak i na grampozitivní bakterie. Za antibakteriální působení oleje máty peprné je zodpovědná především jedna složka a tou je mentol, tedy látka, jež se v silici vyskytuje v nejvyšší koncentraci [42, s. 29] .

Máta luční (*Mentha arvensis*)

Máta luční je vytrvalá bylina, 10 až 80 cm vysoká, s lodyhou bohatě větvenou, čtyřhrannou a opatřenou velkým množstvím trichomů. Listy jsou křižmostojné, řapíkaté, vejčité nebo kopinaté a roztroušeně pokryté trichimy. Lichopřesleny jsou oddálené v úžlabí lodyžních listů, koruna je světle fialová až světle růžová. Můžeme ji nejčastěji najít volně rostoucí na polích, zahradách, náplavách, vlhčích lučních i lesních cestách, vlhkých pastvinách, močálech a bažinách. Tato bylina preferuje půdy hlubší, vlhké, hlinité a slabě kyselé až zásadité. Obsah mentolu máty luční je o polovinu nižší ve srovnání s mátou peprnou [43].

Máta kadeřavá (*Mentha spicata*)

Jedná se o aromatickou vytrvalou bylinu s plazivým oddenkem a přímou, větvitou, až 70 cm vysokou, drsně oděnou lodyhou. Listy jsou vstřícné, asi 3-5 cm dlouhé, krátce řapíkaté, nebo podlouhlé vejčité, částečně zašpičatělé. Listy jsou na líci zelené a na rubu šedozelené. Květy jsou pyskaté, červenofialové, sestavené v lichopřesleny a nahloučené ve štíhlé válcovité klasy. Je rozšířena hlavně ve Středozemí. U nás se pěstuje v zahradách či na polích. Při pěstování se množí dělením trsů a je odolnější proti mrazům než máta peprná. Silice je obsažena hlavně v listech (25 %). Hlavní obsahovou složkou je karvon, cineol, limonen a z flavonových látek je to diosmetin, dále třísloviny (asi 6 %) [44, s. 264].

Máta citronová (*Mentha citriodora*)

Latinský název je *Mentha aquatica var. Citrata* nebo *Mentha citriodora*. Je to mrazuvzdorná bylinná trvalka, která dorůstá do výšky 20-80 cm. Rostliny tvoří menší keříky, mají tmavě zelenou barvu. Listy na okrajích mají zvláštní fialový, někdy až načervenalý odstín. Rostlina je hladká bez chloupků, listy má lesklé. Máta, jako všechny hluchavkovité rostliny, je medonosná. Řadíme ji mezi nejznámější léčivky už od starověku. Malé listy vyrůstají v létě do koncových oválných květenství ve formě klasu. Rostlina obsahuje mentol, cineol, třísloviny, flavonoidy a také hořčiny. Najdeme ji v zahradách, ale i volně v přírodě [45].

2.4.2 Eukalyptové oleje

Eukalyptové oleje se skládají z více než 100 různých složek, jsou získávány parní destilací. Jako hlavní chemické složky jsou α-pinen, β-pinen, α-fellandren, 1,8-cineol, limonen, terpinen-4-ol, aromadendrene, epi globulol, piperiton a globulol. Surový eukalyptový olej někdy obsahuje více sloučenin v různých množstvích [46].

Eukalyptus citronovonný (*Eucalyptus citriodora*)

Jedná se o velký, stále zelený strom, který dosahuje výšky od 24-50 m, v průměru má 60-130 cm. Tento strom má velice cenné dřevo, kmen vylučuje pryskyřici, má hladkou kůru se skvrnami různých odstínů šedé, žluté a růžové. Mladé listy jsou oválné a časem se stávají úzkými a špičatými. Esenciální olej je známý jako odpuzovač hmyzu, který má antiseptické, protivirové, baktericidní, fungicidní, insekticidní a deodorační vlastnosti. Esenciální olej je průhledná žlutá nebo bezbarvá tekutina s citrónovo-balzamickou vůní. Získává se destilací párou listů a větviček [47, s. 1,2,3].

Eucalyptus polybractea

Rostli latinského jména *Eucalyptus polybractae* je u nás je známa také pod názvem modrý blahovičník. Strom je menšího vzrůstu 3-9 m s hladkou kůrou a podlouhlými oválnými listy, které mají vysoký obsah oleje v rozmezí 1-6 %. Hlavně jsou zde zastoupeny monoterpeny spolu s několika seskviterpeny. Je zde také velmi vysoký obsah 1,8-cineolu. Tento olej je hodně vyhledávaný hlavně v oblasti farmaceutických výrobků. Vůně je kořenitá, intenzivní, kafrová. Je často využíván při infekcích dýchacích a močových cest [48, s. 452].

Eucalyptus globulus

Tento strom je také znám pod názvem Blahovičník kulatoplodý (*Eucalyptus globulus*), dosahuje výšky max. 60 m. Kůra stromu se samovolně olupuje v dlouhých pruzích. Listy tohoto stromu se mění v průběhu stárnutí. Nejdříve jsou oválné podlouhlé a u starších stromů tvoří jehličky. Listy jsou cenné pro získávání eukalyptového oleje. Olej má silné protizánětlivé a antiseptické účinky [47, s. 1,3].

Eucalyptus camaldulensis

Tento strom roste běžně do výšky okolo 20 m, ale jen zřídka do 50 m. Má tlustý kmen a velkou širokou korunu, která se větví. Kůra je hladká, krémová až bílá, nebo světle šedá.

Listy jsou stále zelené a získáváme z nich esenciální olej pomocí parní destilace. Vůně oleje je kořenitá, kafrová s balzámovými tóny. Tento olej je účinný při infekci dýchacích a močových cest [49, s. 1].

Eucalyptus radiata

Eucalyptus radiata je velký strom, který může dorůstat až do výšky50 m. Květy se objevují v létě, kůra je vláknitá, šedo zelené barvy. Hlavní biochemické komponenty esenciálního oleje z *Eucalyptus radiata* zahrnují: 1-8 cineol, alfaterpineol. Díky biochemické kombinaci cineol a alfa-terpineol, má *Eucalyptus radiata* silnější antibakteriální a protivirový účinek než *Eucalyptus globulus*. Doporučuje se pro všechny ORL problémy, zimnice, zánět průdušek, zánět vedlejších nosních dutin, při chřipce, nachlazení a virové epidemii. Nevýhodou jsou relativně časté alergické reakce, jejichž příčinou je vyšší obsah alergenních komponent jako jsou citral, limonen, linalool, geraniol, nebo citronellol [50].

2.5 Esenciální oleje ve formě mikroemulzí

Z chemického charakteru esenciálních olejů vyplývá jejich špatná rozpustnost ve vodě či vodných mediích. To představuje značnou komplikaci při provádění mikrobiologických testů jejich antimikrobiální účinnosti. Citlivost mikroorganizmů k různým látkám lze stanovit pomocí dvou základních typů metod, difuzních a dilučních.

Při agarové difuzní metodě jsou testované mikroorganizmy inokulovány na povrch pevné agarové půdy. Pro tyto účely se nejčastěji využívá Miller Hintonův agar, jehož složení zajišťuje vhodné podmínky pro difuzi antimikrobiální látky agarem. Na zaočkovaný povrch půdy jsou následně kladeny disky napuštěné testovanou antimikrobní látkou. V případě citlivosti mikroorganizmu na testovanou látku dochází v okolí disku k vytvoření inhibiční zóny, ve které nedochází k růstu bakterií. Velikost této inhibiční zóny je úměrná antimikrobiálnímu účinku látky. Disková difuzní metoda je spíše metodou kvalitativní. Kvantitativní metody umožňují přesné stanovení takzvané minimální inhibiční koncentrace (MIC) testované látky [55, s. 149-52].

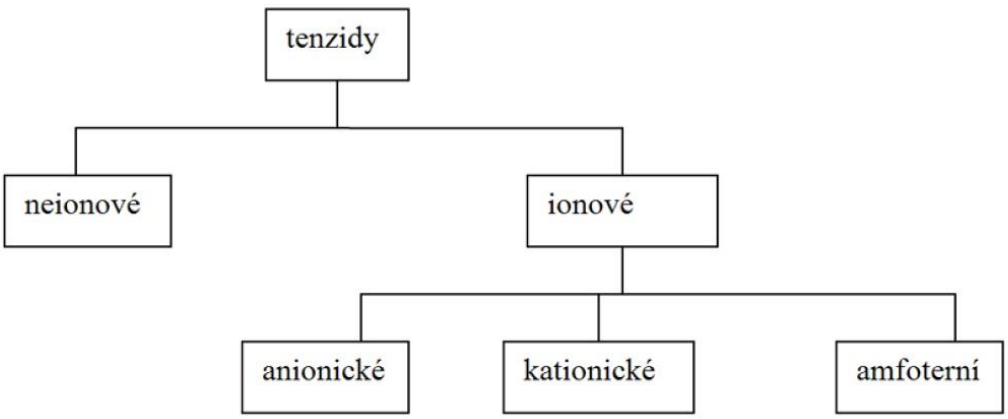
Diluční metody umožňují stanovit MIC. Existují různá provedení dilučních metod, ale všechny zahrnují přípravu série roztoků (kultivačních médií) o různých koncentracích testované látky. Tyto roztoky jsou zaočkovány standardizovaným inokulem testovaného mikroorganizmu a jsou po stanovenou dobu inkubovány. Růst bakterií v tekutém médiu se projeví vznikem zákalu, jehož intenzita je úměrná množství buněk. Pokud jsou mikroorga-

nizmy antimikrobní látkou inhibovány, projeví se tato inhibice menším zakalením media, které lze vyjádřit například hodnotou optické denzity (OD). Diluční metody lze provádět ve sterilních plastových zkumavkách či skleněných zkumavkách, ale také v mikromodifikaci na mikrotitračních destičkách s 96 jamkami [55, s. 149-52], [56].

V praktické části diplomové práce byly antibakteriální účinky esenciálních olejů sledovány jak pomocí diskové difuzní metody, tak i pomocí diluční metody na mikrotitračních destičkách. Kvůli nízké rozpustnosti olejů v tekutém médiu však bylo nutné připravit z esenciálních olejů mikroemulze, které už následně mohou být použity při diluční metodě.

Jako mikroemulze můžeme označit systémy, které se skládají z olejové a vodné fáze. Tyto fáze jsou navzájem spojeny a velikost částic je v řádech nanometrů. Podle novější a obecně přijímané definice je mikroemulze spontánně vytvořená, čirá, termodynamicky stabilní, homogenní disperze dvou nemísitelných kapalin, obsahující vhodné množství surfaktantu a kosurfaktantu [49, s. 152].

Mikroemulze je složena z polárního organického rozpouštěla, které je s vodou omezeně mísitelné a mnohdy zcela nemísitelné. Je třeba tedy hledat způsob, jak je do vodného prostředí rozptýlit tak, aby systém zůstal dlouhodobě stabilní. Stabilitě napomáhají látky, které jsou označovány jako povrchově aktivní (PAL, tenzidy, smáčedla, surfaktanty) [57, s. 24]. Podle struktury molekul můžeme Pal dělit na ionogení (kationaktivní nebo anionaktivní) nebo neionogenní obr.7. Mezi kationaktivní PAL, patří především kvarterní amoniové soli, mezi anionaktivní hlavně soli organických kyselin s dlouhými uhlíkatými řetězci. Schopnost surfaktantu tvořit micely lze soudit i podle tzv. hydrofilně lipofilní rovnováhy (HLB). Tato hodnota charakterizuje poměr vlivu hydrofilní a lipofilní části jejich molekul. Vysoká hodnota HLB nám ukazuje, dobrou schopnost dané PAL tvořit micely [59, s. 1113]



Obrázek 7: Schéma rozdělené tenzidů [33, s. 6]

Podle povahy fázové rovnováhy můžeme mikroemulze dělit do pěti základních typů.

- Typ I – v těchto mikroemulzích se používá surfaktant, který je rozpustný ve vodné fázi. Díky tomu vzniká mikroemulze typu olej ve vodě (o /v).
- Typ II – použitý surfaktant je rozpustný v olejové fázi, díky čemuž vzniká mikroemulze typu voda v oleji (v / o). Vodná fáze surfaktant neobsahuje.
- Typ III – zde hovoříme o třífázovém systému, který je tvořen dispergovanými částicemi vody ve větších částicích oleje a ty jsou dispergovány v kontinuální vodné fázi.
- Typ IV – zde hovoříme o jednofázovém systému, kde je olej i voda solubilizován v přítomnosti surfaktantu a ko-surfaktantu.
- Typ V – je současná přítomnost dvou fází mikroemulze, jedna fáze má kontakt s vodou a druhá je v kontaktu s olejem [57, s. 688].

Pro vznik mikroemulzí typu voda v oleji je vhodným surfaktantem povrchově aktivní látka s nízkou hodnotou hydrofilně-lipofilní rovnováhy (HLB). Pro vznik opačné mikroemulze, tedy mikroemulze typu olej ve vodě (o/v), je nutné použít jako surfaktant povrchově aktivní látku, která vykazuje vyšší hodnotu HLB [60].

Pro přípravu mikroemulzí existuje celá řada postupů, u kterých se liší zastoupení jednotlivých složek. Pro tuto diplomovou práci byl použit surfaktant Tween 20 (HLB 16,7). Díky vysoké hodnotě HLB je tento surfaktant schopen tvořit emulze typu o/v. Olejovou fázi tvoří esenciální olej s etanolem v poměru 1:1. Rámcové složení pro přípravu jedné zkumavky je 0,1 g esenciálního oleje, 0,1g Ethanolu, 0,8g Tween 20 a 9g destilované vody. Aby došlo k homogenizaci jednotlivých složek, je za potřebí, použít vysoké rychlosti míchání pomocí třepačky Vortex. Nejdříve homogenizujeme Tween, olej a ethanol a na konec je přidána destilovaná voda. Po přídavku destilované vody se také provede dostatečná homogenizace do vzniku čiré emulze.

3 CHARAKTERIZACE MIKROORGANIZMŮ IZOLOVANÝCH Z DUTINY ÚSTNÍ

V praktické části diplomové práce bylo pracováno s mikroorganizmy, které byly získány na Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky Fakulty technologické UTB v rámci bakalářské práce zaměřené na mikroflóru ústní dutiny u ortodonticky léčených pacientů. Vzorky obsahující bakterie adherované na povrch ortodontických zámků byly během bakalářské práce uchovány pro případné další analýzy. V této diplomové práci bylo třeba ze zamražených vzorků izolovat čisté kultury jednotlivých mikroorganizmů, provést jejich základní charakteristiku a identifikaci, a následně provést stanovení schopnosti tvořit biofilm.

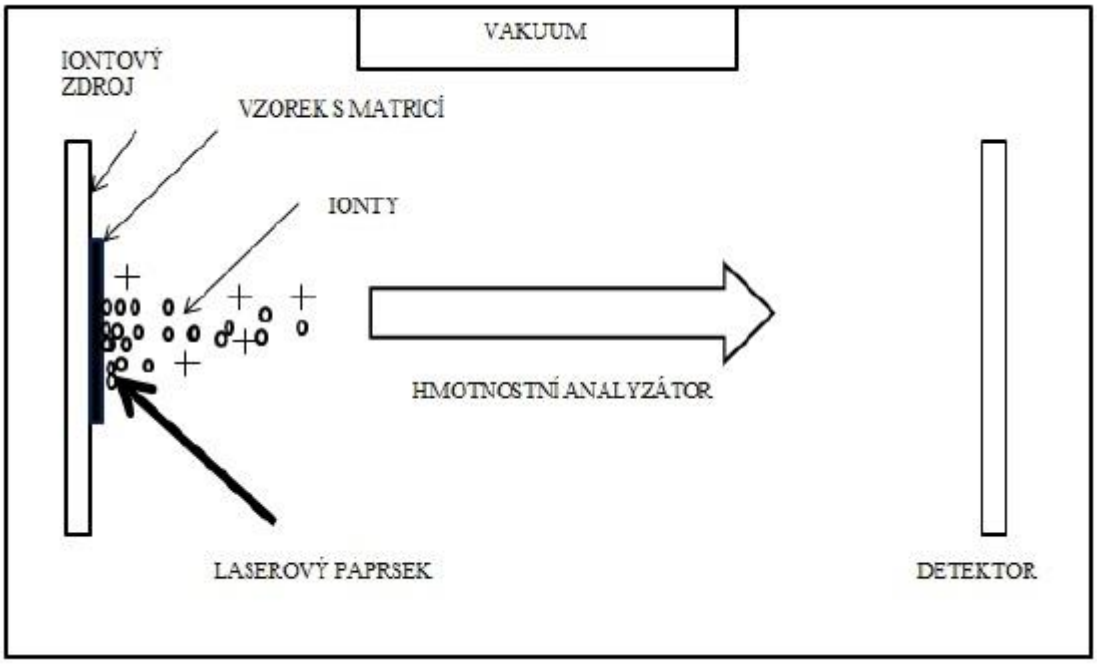
3.1 Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS

Metoda MALDI-TOF MS je hmotnosti spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátorem: Matrix-Assisted Laser Desorption/Inization Time of Flight mass spectrometr. Tato metoda je rychlá, vysoce přesná a lze ji aplikovat na široké spektrum mikroorganismů. Schopnost rozlišovat bakterie či jiné mikroorganismy na rodové, druhové a často i kmenové úrovni [51, s. 64,65].

Principem hmotnostní spektrometrie je separace iontů a iontových fragmentů vniklých ionizací, v magnetickém nebo vysokofrekvenčním elektrickém poli. Zaznamenané hmotnostní spektrum je grafickým znázorněním četnosti iontů lišících se měrným nábojem m/z. Výsledné hmotnostní spektrum je ovlivňováno způsobem ionizace i dalšími faktory včetně konstrukčních charakteristik spektrometru. Teoreticky by tedy reprodukovatelnost neměla být dokonalá ani u spekter zaznamenaných za stejných podmínek na různých přístrojích. Prakticky jsou ale taková spektra odlišná minimálně, takže je metoda hojně využívána k identifikaci a určení struktury látek porovnáváním spekter se standardy [62, s. 35-37].

Hmotnostní spektrometrie MALDI byla původně vyvinuta pro kvalitativní analýzu peptidů a bílkovin, v současnosti se ale využívá i pro analýzy nukleových kyselin nebo nízkomolekulárních organických i anorganických látek. Výhodou je především její vysoká citlivost a rychlost měření. Mezi výhody metody patří především to, že se vzorek při analýze nerozpadá, což umožňuje měření složitějších směsí. Další výhodou je, že při analýze nepřekáží běžné pozadí biologických a biochemických vzorků jako jsou například pufrační roztoky [63].

Metodu MALDI-TOF MS kterou můžeme vidět na obrázku 8 lze jednoduše popsat, tak že na krystaly matrice se vzorkem je působeno laserovým zářením, které působí desorpci molekul matrice spolu s molekulami vzorku a zároveň dojde k ionizaci molekul vzorku předáním H^+ od molekul matrice. Dále je aplikováno extrakční napětí mezi MALDI destičku a vstupní štěrbinu průletového analyzátoru, čímž dojde k extrakci nabitých molekul, podle zvolené polarit napětí a k jejich analýze v průletovém hmotnostním analyzátoru. Vypočítá se poměr *m/z* v závislosti na době letu molekul analyzátorem k detektoru. Detektor zachycuje dopadající ionty, ze kterých vypočítává hmotnost každého iontu, který na něj dopadne. Máme několik druhů detektorů a to elektronové, fotonásobič a Faradayovu klec [52, s. 71].



Obrázek 8: Schéma hmotnostního spektrometru MALDI-TOF MS [51, s. 65]

3.2 Průkaz tvorby biofilmu

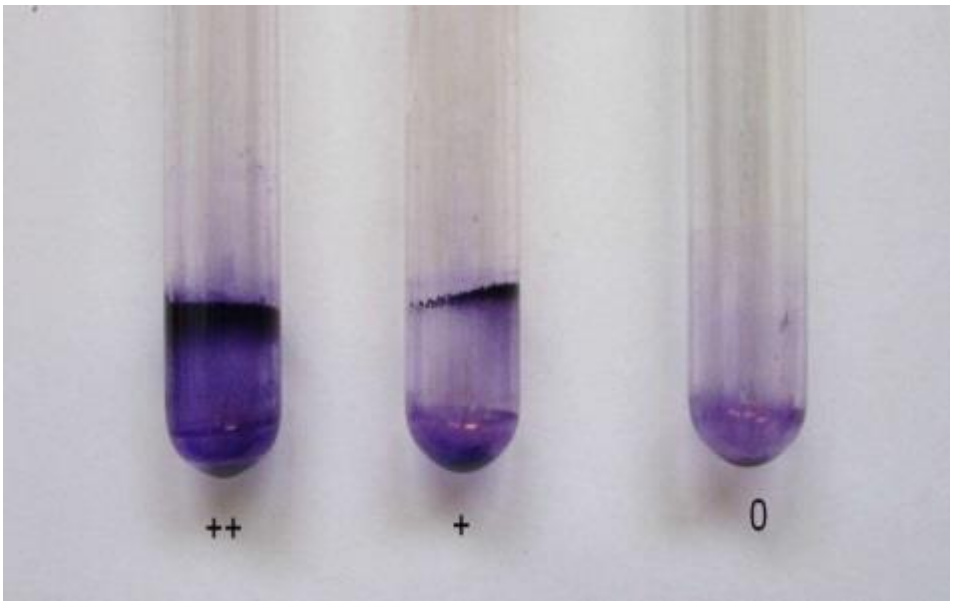
Schopnost tvořit biofilm je vlastní pouze některým mikroorganizmům. K průkazu této schopnosti u konkrétních mikroorganizmů jsou využívány metody mikroskopické, kultivační a metody genotypové. Genotypové metody prokazují přítomnost specifických genů, které jsou pro přežívání ve formě biofilmu nepostradatelné. Biofilm a jeho existenci lze prokázat pomocí několika mikroskopických metod. Kromě mikroskopických metod se používají dále i kultivační metody, jako je Christensenova metoda, která se využívá jak v klasické zkumavkové verzi, tak i v mikromodifikaci na mikrotitračních destičkách. Další

možností průkazu tvorby biofilmu je kultivace na agaru s Kongo červení. Tato metoda však není příliš spolehlivá a měla by sloužit spíše pro prvotní screening než pro průkaz schopnosti tvořit biofilm [53, s. 18], [63].

V praktické části předkládané diplomové práce byla pro stanovení schopnosti tvořit biofilm zvolena Christensenova metoda, která je blíže popsána v následujícím textu.

Christensenova zkumavková metoda

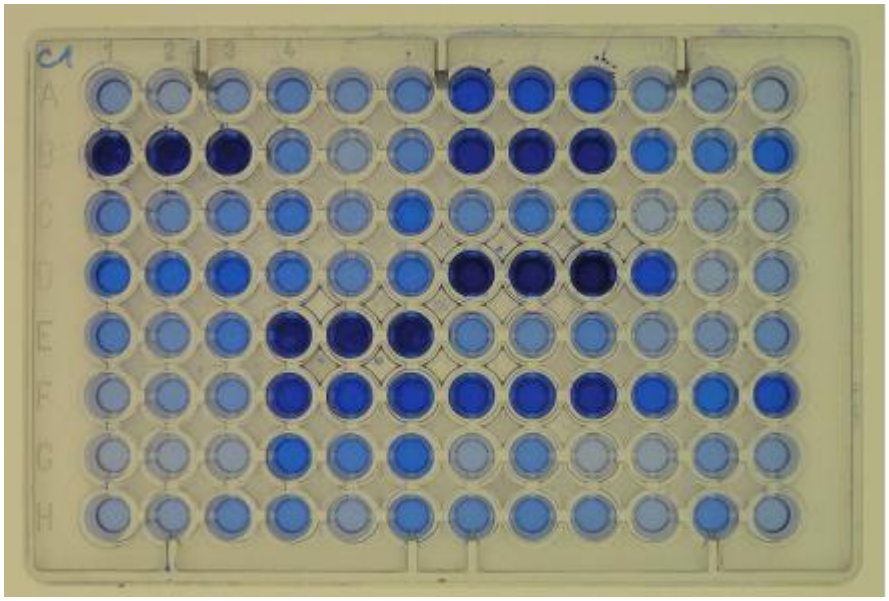
Tato metoda se provádí ve skleněných či plastových zkumavkách. Do zkumavek s připraveným bujonem je sterilní kličkou přenesena čistá kultura. Takto připravené zkumavky jsou kultivovány 24 hodin při 37 °C za normální atmosféry. Poté je obsah zkumavek slit a lehce promyt sterilní vodou nebo fyziologickým roztokem. Promytí slouží k odstranění bakteriálních buněk, které jsou přítomny v tekutém médiu, ale neadherují na povrch zkumavky. V dalším kroku následuje fixace etanolem, po skončení fixace je do zkumavky přidána krystalová violeť. Barvivo zbarvuje buňky adherované na povrch zkumavky a hodnocení přítomnosti či nepřítomnosti biofilmu se provádí pomocí intenzity zabarvení vnitřní stěny zkumavky. Následně je barvivo slito a zkumavka promyta destilovanou vodou. Zkumavky se nechají uschnout v obrácené poloze. Tvorba biofilmu je považována za pozitivní, pokud viditelný film lemuje spodní část zkumavky. Jsou rozlišovány tři stupně hodnocení, což můžeme vidět na obrázku 9 a to silně pozitivní biofilm (++), slabě pozitivní biofilm (+) a biofilmnegativní (0) [54, s. 306].



Obrázek 9: Christensenova zkumavková metoda [55, s. 13]

Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách

Christensenovu metodu lze provádět i v mikromodifikaci, při které je zkumavka nahrazena jamkou mikrotitrační destičky. Metoda se provádí na mikrotitračních destičkách s 96 jamkami, kde do každé jamky je pipetováno kultivační médium, které je následně zaočkováno čistou kulturou testovaného mikroorganizmu. Následuje inkubace po dobu 24 hodin při 37 °C. Po inkubaci se obsah každé jamky odstraní jemným poklepem a promyje fyziologickým roztokem. Poté následuje barvení krystalovou violetí, která se nechá působit po stanovenou dobu. Destička je následně promyta destilovanou vodou a ponechána volně uschnout. V případě, že testovaný kmen je schopen tvořit za daných podmínek biofilm, dojde k zabarvení stěny jamky, na kterou adherovaly mikroorganizmy. Intenzitu zabarvení je možné měřit spektrofotometricky. K rozpuštění barviva je možné použít 33% kyselinu octovou. Destička připravená pro spektrofotometrické měření je znázorněna na obrázku 10 [54, s. 306].



Obrázek 10: Christensenova metoda mikrotitrační destičky [55, s. 14]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo zjistit, zda jsou mikroorganizmy dutiny ústní citlivé na působení vybraných esenciálních olejů.

V teoretické části byl kladen důraz na mikroorganizmy vyskytující se v dutině ústní a zubním plaku. Další část byla věnována esenciálním olejům se zaměřením na jejich antimikrobiální aktivitu, která je úzce spojena s jejich složením.

V praktické části bylo cílem izolovat mikroorganizmy kolonizující dutiny ústní a zuby. Provést jejich základní charakteristiku a identifikaci pomocí metody MALDI TOF - MS. Stanovována byla i jejich schopnost tvorby biofilmu.

V poslední části byla stanovena citlivost izolátů k vybraným esenciálním olejům získaným z různých druhů rostlin rodu *Mentha* a *Eucalyptus.* Analýza byla prováděna diskovou difuzní metodou a diluční metodou. Pro diluční metodu byla nutná příprava mikroemulzí

Veškerá data získaná pomocí výše popsaných metod byla vyhodnocena a znázorněna pomocí tabulek a grafů. Dosažené výsledky byly okomentovány, diskutovány a shrnuty v závěru práce.

5 MATERIÁL, CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE

5.1 Použité chemikálie

Etanol, Lach-Ner s.r.o., Neratovice

Glycerol, Sigma-Aldrich Corporate Offices

Chlorid sodný, Lach-Ner s.r.o., Neratovice

Tween 20, Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Praha

Lugolův roztok, Lach-Ner s.r.o., Neratovice

Krystalová violeť, Lach-Ner s.r.o., Neratovice

Imerzní olej, Intraco Micro s.r.o.

Destilovaná voda

5.2 Použité esenciální oleje

Esenciální oleje (EO), Nobilis Tilia s.r.o., Česká Lípa

- Máta peprná (*Mentha piperita*)
- Máta luční (*Mentha arvensis*)
- Bio máta peprná (BIO *Mentha piperita*)
- Máta kadeřavá (*Mentha spicata*)
- Máta citronovonná (*Mentha citriodora*)
- Eukalyptus citronovonný (*Eucalyptus citriodora*)
- *Eucalyptus polybraceta* Austrálie
- Bio *Eucalyptus radiata* Austrálie
- Eukalyptus kulatoplodý (*Eucalyptus globulus*)
- *Eucalyptus camaldulensis*

5.3 Použité živné půdy

Muller Hilton Agar, HiMedia

Lactobacillus MRS Broth (MRS), Acumedia a.s.

Nutrient Agar (NA), Acumedia a.s.

Soyabean Casein Digest Agar

5.3.1 Pomnožovací média

Lactobacillus MRS Broth (MRS), Acumedia a.s.

Masopeptonový bujon (MPB)

Trypton-sojový bujon s glukosou (TSB)

5.4 Pomůcky a přístroje

Automatické mikropipety Biohit a Nichipet

Autokláv Verioklav H+P, Německo

Bio Vortex V1, Biosan

Biologický termostat BT 120, Česká republika

Clean Air Technike B.V

Digitální Denzilametr

Infinite 200 PRO NANOQUANT Microplate readers from TECAN

Laboratorní váha KERN 440-47N, Kern & Sohn

Laboratorní pomůcky (hokejky, sterilní špičky na mikropipety, automatické mikropipety, lžička plastová, ependorfky, pinzeta, sterilní bakteriologická klička, mikrotitrační destička)

Laboratorní sklo (kádinky, sterilní misky, sterilní zkumavky, skleněná lahev, odměrný válec, podložní sklo)

Mikroskop

Ultrazvuková vana K-10IE nerezová, Kraintek Czech s.r.o

Stericell sterilizitáror, BMT Medical Technology, Brno, Česká republika

Ostatní běžné laboratorní pomůcky a vybavení.

6 METODY

6.1 Příprava roztoků

Fyziologický roztok

Byla připravena navážka 8,5 g NaCl na 1000 ml destilované vody. Připravený roztok byl sterilizován v autoklávu při 132 °C po dobu 20 minut.

6.2 Příprava živných půd

Muller Hilton Agar (MH)

Muller Hilton Agar byl použit ke stanovení antimikrobiální citlivosti metodou difúze v agaru. Bylo naváženo 15,2 g MH do skleněné lahve a rozpuštěno ve 400 ml destilované vody. Připravené médium bylo sterilizováno v autoklávu při teplotě 132 °C po dobu 20 minut. Připravené médium bylo následně naléváno do sterilních Petriho misek.

Lactobacillus MRS Agar, Acumedia a.s

Pro izolaci a kultivaci laktobacilů byl použit Lactobacillus MRS Agar. Do sterilní skleněné láhve bylo naváženo 22,1g Lactobacillus MRS Broth a 6 g agaru, vše bylo zalito 400 ml destilované vody. Připravené médium bylo následně sterilizováno v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 132 °C. Hotové médium bylo následně naléváno na sterilní Petriho misky.

Nutrient Agar, Acumedia a.s.

Do skleněné láhve bylo naváženo 11,2 g Nutrient agaru, vše bylo zalito 400 ml destilované vody. Takto připravené médium bylo sterilizováno při 132 °C po dobu 20 minut v autoklávu. Ještě teplé médium bylo naléváno do sterilních Petriho misek.

Soyabean Casein Digest Agar (SCDA)

Bylo naváženo 16 g Soyabean Casein Digest agaru do skleněné infuzní lahve společně s 2 g glukózy. Vše bylo zalito 400 ml destilované vody. Médium bylo sterilizováno v autoklávu při 132 °C po dobu 20 minut.

6.2.1 Pomnožovací média

Masopeptonový bujon (MPB)

Bylo připraveno 400 ml MPB, přičemž bylo naváženo 1,2 g NaCl, 1,2 g masového extraktu a 2 g peptonu. Vše bylo zalito 400 ml destilované vody. Takto připravený roztok byl rozpipetován do sterilních zkumavek a následně bylo vše dáno do autoklávu na 20 minut při teplotě 132 °C.

Trypton-sojový bujon s glukózou (TSB)

Bylo připraveno 200 ml TSB, na toto množství bylo naváženo 3,4 g tryptonu, 0,6 g sójového peptonu, 1 g NaCl, 0,5 g K_2HPO_4, 1 g glukózy a doplněno 200 ml destilované vody. Vše bylo dávkováno do sterilních zkumavek a sterilizováno při 132 °C 20 minut v autoklávu.

Lactobacillus MRS Broth (MRS), Acumedia a.s.

Bylo naváženo 20,1 g Lactobacillus MRS Broth do skleněné infuzní lahve a zalito 400 ml destilované vody. Připravené médium bylo pipetováno do zkumavek a následně bylo autoklávováno při 132 °C po dobu 20 minut.

6.3 Izolace čistých kultur mikroorganizmů

6.3.1 Vzorky pro izolaci mikroorganizmů

Pro diplomovou práci byly použity vzorky získané v rámci bakalářské práce zaměřené na mikroflóru dutiny ústní u ortodonticky léčených pacientů. Vzorky ortodontických zámků s adherovanými mikroorganizmy byly poskytnuty Ústavem technologie tuků, tenzidů a kosmetiky Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně.

Ortodontické zámky s adherovanými mikroorganizmy byly zamraženy v ependorfkách ve kterých byl roztok BHI a 30% glycerol v poměru 1:1. Po rozmražení byly vzorky přeneseny z roztoku glycerolu a BHI do ependorfky, ve které bylo napipetováno 1000 µl fyziologického roztoku. Takto připravená ependorfka se vzorkem byla následně dána na 2 minuty do ultrazvukového čističe, aby došlo k uvolnění mikroorganizmů přichycených na zámcích. Následně bylo provedeno ředění 1:9. Do zkumavky bylo pipetováno 100 µl vzorku a 900 µl fyziologického roztoku. Ředěnými i neředěnými vzorky byly následně zaočkovány pevné půdy Lactobacillus MRS Agar, Nutrient Agar a Soyabean Casein Digest Agar. Pro nanesení na půdu bylo použito vždy 100µl vzorku, který byl rozetřen sterilní hokejkou.

Připravené naočkované misky byly kultivovány 24 hodin při teplotě 37 °C. Kultivace byla prováděna aerobně i anaerobně.

6.3.2 Postup izolace čistých kultur

Mikroorganizmy rostoucí na pevných půdách po aerobní či anaerobní kultivaci byly izolovány pomocí křížového roztěru. Jednotlivé ohraničené kolonie mikroorganizmů byly pomocí kličky odebrány a byl proveden křížový roztěr na příslušných půdách (Lactobacillus MRS Agar, Soyabean Casein Digest Agar, a Nutrient Agar. Misky byly opět kultivovány aerobně či anaerobně při 37 °C po dobu 24 hodin. Křížový roztěr byl opakován do doby, než byly získány čisté kultury izolovaných mikroorganizmů. Takto připravené vzorky byly následně použity pro další práci, tedy pro mikroskopii a Gramovo barvení, identifikaci metodou MALDI TOF - MS a stanovení schopnosti tvorby biofilmu. Identifikované izoláty byly dále studovány s cílem stanovit jejich citlivost na antibakteriální látky difuzní diskovou metodou a mikrodiluční metodou.

6.4 Identifikace a charakterizace mikroorganizmů

6.4.1 Gramovo barvení a mikroskopie

Při tomto barvení byly potřeba následující pomůcky: bakteriální kultury, roztok krystalové violeti, Lugolův roztok, destilovaná voda, etanol, podložní skla, bakteriologická klička, imerzní olej a mikroskop.

Na ožehnuté a vychladlé podložní sklíčko byla nanesena kapka sterilní destilované vody. Vyžíhanou kličkou do ní bylo přeneseno malé množství kultury. Pomocí sterilní kličky byl na sklíčku vytvořen tenký nátěr, který byl nechán volně zaschnut. Po zaschnutí byla provedena fixace tak, že bylo třikrát sklíčko protaženo oxidační částí plamenu tak, aby byl nátěr nehoře. Po vychladnutí sklíčka byl nátěr převrstven roztokem krystalové violeti po dobu 20 vteřin, poté bylo barvivo slito. Dále bylo fixováno obarvení Lugolovým jodovým roztokem cca 1 minutu. Následně byl vzorek promyt 96% etanolem do odbarvení a opláchnut destilovanou vodou. Poté byl dobarven safraninem po dobu 1 minuty a opět bylo barvivo smyto vodou. Takto připravený vzorek byl po zaschnutí sledován pod mikroskopem za použití imerzního oleje při zvětšení 10x100.

6.4.2 Identifikace izolátů metodou MALDI TOF - MS

Mikroorganizmy izolované dle postupu v kapitole 6.3.2, byly přeneseny do sterilní ependorfkové zkumavky se 150 µl sterilní destilované vody a následně byly zality 450 µl etanolu. Takto připravené vzorky byly dále identifikovány pomoci metody MALDI-TOF MS, Vzorky byly identifikovány na Fakultě biotechnológie a potravinárstva Slovenské poľnohospodárské univerzity v Nitre. Byl zvolen postup standardně používaný v mikrobiologických laboratořích Fakulty biotechnológie a potravinárstva popsaný v dizertační práci Attily Kántora [67].

6.4.3 Průkaz tvorby biofilmu

U izolovaných kmenů byl proveden průkaz tvorby biofilmu pomocí Christensenovy metody. Nejprve byly připraveny suspenze izolovaných kultur ve sterilním fyziologickém roztoku, jejichž zákal odpovídal 2. stupni McFarlandovy stupnice. Tekuté živné médium TSB bylo napipetováno v množství 180 µl do každé z jamek mikrotitrační destičky. K živnému médiu bylo přidáno 20 µl suspenze kultury. První dva sloupce destičky zůstaly nezaočkované a sloužily jako negativní kontrola, ostatní byly zaočkovány příslušnou čistou kulturou mikroorganizmů. Takto připravená mikrotitrační destička byla kultivována aerobně i anaerobně po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Po kultivaci byl obsah jamek vylit a byly 3x promyty sterilním fyziologickým roztokem (250 µl/jamka). Následovalo barvení roztokem krystalové violeti (200 µl/jamka) po dobu jedné minuty. Barvivo bylo následně slito, destička byla 3x promyta destilovanou vodou a poté byla volně ponechána k uschnutí. Po usušení následovalo rozpuštění barviva, kdy do každé jamky bylo dáno 200 µl 33% kyseliny octové, která se nechala působit po dobu 10 minut. Poté následovalo měření optické denzity na fotometru TECAN při 600 nm.

6.5 Stanovení citlivosti mikroorganizmů k antibakteriálním látkám

6.5.1 Mikrodiluční metoda

Pro mikrodiluční metodu byly připraveny mikroemulze s různými esenciálními oleji. Pro přípravu jedné zkumavky mikroemulze bylo zapotřebí 0,1 g příslušného esenciálního oleje, 0,1 g etanolu, 0,8 g Tweenu 20 a 9 g destilované vody. Vše bylo postupně smícháno a řádně promícháno na vortexu. Mikroemulze byly připraveny z deseti esenciálních olejů, jednalo se o mátové esenciální oleje z máty peprné, máty luční, máty peprné (BIO kvalita), máty kadeřavé a máty citronovonné. Další skupinu olejů představovaly EO eukalyptové,

konkrétně pak olej získaný z ekalyptu citronovonného, *Eucalyptus polbractea*, *Eucalyptus radiata* (v BIO kvalitě), *Eucalyptus globulus* a *Eucalyptus camandulensis*.

Z izolátů byly připraveny suspenze bakterií do sterilních plastových zkumavek s fyziologickým roztokem. Zákal suspenze byl 1. stupeň McFarlandovy zákalové stupnice.

Následovala příprava sterilních zásobních roztoků mikroemulzí v masopeptonovém bujónu. Do sterilních skleněných zkumavek byly připraveny roztoky o různé koncentraci esenciálního oleje v celkovém objemu 3 ml. Koncentrace oleje v základní mikroemulzi byla 10 000 µg/ml. V tabulce 2 jsou uvedeny pipetované objemy mikroemulze a bujónu, a také výsledná koncentrace EO v roztoku, který byl zaočkován.

Tab. 2. Pipetované objemy a koncentrace EO v roztoku

Roztok	Pipetovaný objem mikroemulze (µl)	Pipetovaný objem MPB (µl)	Koncentrace EO v roztoku (µg/ml)
1	2550	450	8500
2	1950	1050	6500
3	1500	1500	5000
4	1050	1950	3500
5	450	2550	1500
6	150	2850	500

Mikrotitrační destička byla připravena v boxu tak, že do všech jamek řady A bylo napipetováno 200 µl MPB, do všech jamek řady B 200 µl čisté mikroemulze, do řady C bylo dávkováno 200 µl roztoku 1, do řady D 200 µl roztoku 2, do řady E 200 µl roztoku 3, do řady F 200 µl roztoku 4, do řady G 200 µl roztoku 5 a do řady H 200 µl roztoku 6. Následovalo zaočkování dvanácti sloupců destičky suspenzemi mikroorganizmů. Sloupec 1 a 2 zůstal nezaočkován, sloupec 3 a 4 byl zaočkován 5 µl suspenze mikroorganizmů 1, sloupec 5 a 6 suspenze mikroorganizmů 2, sloupec 7 a 8 suspenze mikroorganizmů 3, sloupec 9 a 10 suspenze mikroorganizmů 4 a sloupec 11 a 12 suspenze mikroorganizmů 5. Připravená destička byla měřena na spektrofotometru TECAN po dobu 24 h, kdy každých 30 minut byla odečtena hodnota optické denzity při vlnové délce 600 nm a teplotě 37 °C.

6.5.2 Disková difuzní metoda

Pro stanovení citlivosti izolovaných mikroorganizmů k esenciálním olejům byla využita i disková difúzní metoda. Pro její provedení byl zvolen Mueller Hinton Agar jako pevná půda, na kterou byly nanášeny disky. Povrch agaru byl inokulován suspenzemi testovaných mikroorganizmů a po vsáknutí suspenze do agaru byly na připravenou půdu kladeny

disky z filtračního papíru. Tyto sterilní disky měly průměr 5 mm a na jejich povrch byly naneseny 2 μl testovaného esenciálního oleje. Po 24 hodinové kultivaci misek při 37 °C byla změřena inhibiční zóna kolem disku. Inhibiční zóna byla měřena jako průměr kruhové zóny včetně disků. Diskový test závisí na difúzi antibiotika agarem. Po uplynutí inkubační doby se měří průměry inhibičních zón, které jsou následně interpretovány podle tabulek hraničních hodnot rezistence. Jinými slovy, za citlivý kmen můžeme označit až kmen s určitým průměrem zóny [60, s. 28].

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Izolace mikroorganizmů a mikroskopie

Ze vzorků ortodontických zámků bylo izolováno 25 vzorků čistých kultur mikroorganizmů. Devět izolátů bylo získáno z půd kultivovaných anaerobně, 16 izolátů pocházelo z aerobní kultivace. Jako živné půdy byly použity Nutrient Agar, Lactobacillus MRS Agar a Soyabean Casein Digest Agar (SCDA). Doba kultivace byla 24h při teplotě 37 °C. Některé vzorky byly kultivovány aerobně (A) a některé anaerobně (AN). Přehled izolovaných kmenů je uveden v tabulce 6.

Izoláty byly dále charakterizovány pomocí Gramova barvení a mikroskopie. Pomocí mikroskopie bylo zjištěno, zda se jedná o grampozitivní (G+) nebo gramnegativní (G-) mikroorganizmy. Dále pak, zda se jedná o tyčinky (T) či koky (K). Z tabulky můžeme vidět, že převažuje zastoupení G+ koků.

Izolované kmeny grampozitivních i gramnegativních bakterií byly také použity i pro stanovení pomocí metody MALDI-TOF MS. Díky této metodě byly vzorky identifikovány na úrovni druhu, případně i kmene.

Tab. 3. Výsledky pro jednotlivé vzorky z imerzní mikroskopie

Číslo vzorku	Použitá půda	Druh kultivace	Grampozitivní / Gramnegativní	Tyčinka / Kok
1.	NA	A	G+	K
2.	NA	A	G+	K
3.	NA	A	G+	K
4.	NA	A	G-	T
5.	NA	A	G+	T
6.	NA	A	G-	T
7.	NA	A	G+	K
8.	NA	A	G-	K
9.	NA	A	G+	K
10.	SCDA	A	G+	K
11.	SCDA	A	G+	K
12.	SCDA	A	G+	K
13.	SCDA	A	G+	K
14.	SCDA	A	G+	K
15.	SCDA	A	G+	K
16.	SCDA	A	G+	K
17.	NA	AN	G+	K
18.	NA	AN	G+	K

19.	NA	AN	G+	T
20.	NA	AN	G+	T
21.	SCDA	AN	G+	K
22.	SCDA	AN	G+	K
23.	SCDA	AN	G+	K
24.	SCDA	AN	G+	K
25.	SCDA	AN	G+	K

7.2 Identifikace metodou MALDI-TOF MS

Z 25 izolovaných kmenů bylo pomocí metody MALDI TOF spolehlivě identifikováno 20 izolátů. Výsledky identifikace těchto 20 kmenů jsou uvedeny v tabulce 4. Výsledky jsou vyjádřeny pomocí skóre, které se pohybuje v rozmezí 0 (žádná shoda) až 3 (maximální shoda). Skóre lze rozlišit pomocí barev, kde zelená barva nám vyznačuje hodnoty mezi 3 až 2 kde proběhla identifikace na úrovni druhu, žlutá vyznačuje hodnoty v rozmezí 1,999 až 1,700 pro identifikaci na úrovni rodu a červená nám značí hodnoty 1,699 až 0 tyto vzorky už nelze spolehlivě identifikovat.

Touto metodou se nepodařilo identifikovat všechny vzorky, 5 vzorků se pohybovalo pod hodnotou 1,700. Příčinou mohla být kontaminace vzorků jinými mikroorganizmy, nebo nesprávná kultivace.

Výsledky, které jsou uvedeny v tabulce 4, nám potvrzují předchozí základní charakterizaci mikroorganizmů pomocí Gramova barvení v kapitole 7.1., tedy že se převážně jedná o grampozitivní koky (viz. Tab.3). Z různých studií bylo zjištěno, že v zubním plaku se nejčastěji vyskytuje rod *Enterococcus*, zejména však druh *Enterococcus faecalis*. Z dvaceti izolátů bylo 14 identifikováno jako různé kmeny *E. faecalis*. Studie dále uvádí přítomnost *Staphylococcus* spp. v ústní dutině a zubním plaku. Z izolovaných kmenů byly 2 identifikovány jako *Staphylococcus hominis* a jeden izolát byl přiřazen ke druhu *S. warneri*. Kromě enterokoků a stafylokoků byly ze vzorků ortodontických zámků izolovány i druhy *Pantoea septica, Lysinibacillus sphaericus* a *Bacillus amyloliquefaciens*.

Tab. 4. Výsledky pro metodu MALDI-TOF MS

Číslo vzorku	Organizmus (nejlepší shoda)	Skóre	Číslo vzorku	Organizmus (nejlepší shoda)	Skóre
2.	*Enterococcus faecalis*	2,215	16.	*Enterococcus faecalis*	2,254
3.	*Enterococcus faecalis*	2,335	17.	*Enterococcus faecalis*	2,198
7.	*Enterococcus faecalis*	2,088	18.	*Staphylococcus hominis*	2,239
8.	*Enterococcus faecalis*	2,288	20.	*Lysinibacillus sphaericus*	1,752
9.	*Enterococcus faecalis*	2,218	21.	*Enterococcus faecalis*	1,719
10.	*Enterococcus faecalis*	2,335	22.	*Staphylococcus warneri*	2,042
11.	*Enterococcus faecalis*	2,071	23.	*Enterococcus faecalis*	2,403
12.	*Enterococcus faecalis*	2,306	24.	*Enterococcus faecalis*	2,365
13.	*Pantoea septica*	1,811	25.	*Staphylococcus hominis*	2,419
15.	*Enterococcus faecalis*	2,097	19.	*Bacillus amyloliquefaciens*	1,700

7.3 Tvorba biofilmu u izolovaných mikroorganizmů

Na mikrotitračních destičkách byla testována schopnost tvorby biofilmu u jednotlivých izolátů. Destičky byly kultivovány aerobně i anaerobně po dobu 24 a 48 hodin při 37 °C.

Po kultivaci byl obsah jamek odstraněn, destička byla promyta fyziologický roztokem a obarvena krystalovou violetí. Barvivo, které se přichytilo na stěnu mikrotitrační destičky, bylo následně rozpuštěno 33% kyselinou octovou. Intenzita zbarvení byla následně měřena spektrofotometricky při vlnové délce 600 nm. Kmeny, které označujeme jako biofilm pozitivní, vytváří na stěně mikrotitrační destičky barevnou vrstvu. Výsledky byly vyjádřeny pomocí optické denzity (OD), která nám vyjadřuje míru akumulace barviva na stěnách jamek a vyjadřuje tak míru adheze buněk. Z jamek negativních kontrol byla zjištěna průměrná OD a vypočítána směrodatná odchylka. Hraniční hodnota pro pozitivitu (ODc) je trojnásobek směrodatné odchylky nad průměrnou hodnotou OD negativních kontrol (Odc = průměrná OD negativních kontrol + 3 směrodatná odchylka negativních kontrol).

Výsledky byly rozděleny do tří kategorií na základě porovnání vypočtené OD s hraniční hodnotou ODc:

kmen netvořící biofilm (OD ≤ ODc) = n

kmen se slabou tvorbou biofilmu (ODc < OD ≤ 2ODc) = s

kmen se silnou tvorbou biofilmu (OD < 2ODc) = p

Tab. 5. Tvorba biofilmu pro jednotlivé vzory aerobní a anaerobní kultivací

Číslo izolátu (doba kultivace)	**Tvorba biofilmu (aerobní kultivace)**							
1	n	s	s	s	s	s	n	n
1	s	s	s	s	s	s	s	n
1	p	p	p	p	p	p	n	n
1 (po 48h)	p	p	p	p	p	p	p	p
2	p	p	p	p	p	p	n	n
3	p	p	p	p	p	p	n	n
4	p	p	p	p	p	p	n	n
5	p	p	p	p	p	p	n	n
5 (po 48h)	p	p	p	p	p	p	p	p
5 (po 48h)	n	n	n	n	n	n	n	n
10	n	n	n	n	n	n	n	n
10	n	n	n	n	n	n	n	n
12	n	n	n	n	n	n	n	n
12	p	p	p	p	p	p	n	n
12 (po 48h)	p	p	p	p	p	p	p	p
13	s	s	n	n	n	n	n	n
13	p	p	p	p	p	p	n	n
13 (po 48h)	p	p	p	p	p	p	p	p
14	s	n	n	n	n	n	n	n
14	p	p	p	p	p	p	n	n
14 (po 48h)	p	p	p	p	p	p	p	p
15	n	n	n	n	n	n	n	n
15	p	p	p	p	p	p	n	n
15 (po 48h)	p	p	p	p	p	p	p	p
16	s	n	n	n	n	n	n	n
16	p	p	p	p	p	p	n	n
16 (po 48h)	p	p	p	p	p	p	p	p
17	p	p	n	n	n	n	n	n
17	**Tvorba biofilmu (anaerobní kultivace)**							
18	p	n	p	p	p	p	p	p
18	p	p	p	s	p	p	p	p
19	p	p	p	p	p	p	n	n
19 (po 48h)	p	p	p	p	p	p	p	n
19 (po 48h)	p	p	p	n	n	n	n	n
19 (po 48h)	p	p	n	n	n	n	n	n

20	p	p	p	p	p	p	p	n
20 (po 48h)	p	p	p	p	p	p	p	n
20 (po 48h)	p	p	p	n	n	n	n	n
20 (po 48h)	p	p	n	n	n	n	n	n
21	p	p	p	p	p	p	p	p
21	p	p	p	p	p	p	p	s
21	p	p	p	p	p	p	n	n
21	p	p	p	p	p	n	n	n
21	p	p	p	n	n	n	n	n
22	n	n	s	n	s	n	s	s
22	s	s	s	s	s	s	s	s
22	p	p	p	p	p	p	n	n
22	p	p	p	p	p	n	n	n
22 (po 48h)	p	p	p	p	p	p	p	n
22 (po 48h)	p	p	p	p	p	p	n	n
23	s	s	s	s	p	s	s	s
23	p	p	p	p	s	s	s	s
23	p	p	p	p	p	p	n	n
23	p	p	p	p	p	n	n	n
23 (po 48h)	p	p	p	p	p	p	p	n
23 (po 48h)	p	p	p	p	p	p	n	n
24	p	p	p	p	p	p	n	n
24	p	p	p	p	p	n	n	n
24 (po 48h)	p	p	p	p	p	p	p	n
24 (po 48h)	p	p	p	p	p	p	n	n

Byla zjišťována schopnost tvorby biofilmu jednotlivých mikroorganizmů, které byly identifikovány pomoci metody MALDI-TOF MS. Pro stanovení tvorby biofilmu bylo použito 19 vzorků, které můžeme vidět v tabulce 7. Vzorky byly kultivovány aerobně (A) i anaerobně (AN) po dobu 24 hodin nebo 48 hodin. V tabulce jsou uvedena všechna opakování.

Nejdříve jsou popsány vzorky, které byly kultivovány aerobně.

Vzorek 1 byl stanoven mikroskopicky jako G+ kok. Metodou MALDI-TOF MS nebyl tento izolát spolehlivě identifikován. Dále byl vzorek podroben testování na tvorbu biofilmu s aerobní kultivací. Konkrétně tento vzorek byl testován 3x po 24hodinové kultivaci a 1x po 48 hodinách. Z tabulky 7 můžeme vidět, že po 24 hodinách je schopnost tvorby biofilmu slabá, kdežto po 48 hodinách je schopnost tvorby biofilmu tohoto izolovaného mikroorganizmu silná.

Vzorky 2 a 3 byly stanoveny jako G+ koky, které byly určeny jako *Enterococcus faecalis*. Při tvorbě biofilmu byly oba vzorky testovány 1x za aerobních podmínek a délce kultivace 24 hodin. Oba vzorky mají silnou schopnost tvorby biofilmu.

Mikroskopií u vzorku 4 byla zjištěna přítomnost G- tyčinek, což nelze potvrdit výsledkem identifikace, protože metodou MALDI-TOF MS nebyl určen konkrétní mikroorganizmus. Podle tabulky 7 je tento vzorek schopen silně tvořit biofilm.

Další stanovení proběhlo u vzorku 5, kde bylo zjištěno, že se jedná o G+ tyčinky. MALDI-TOF MS nevedla ke spolehlivé identifikaci tohoto izolátu, ale jako nejpravděpodobnější byl vyhodnocen rod *Arthrobacter*. Jedná se o grampozitivní aerobní mikroorganizmy tvaru tyčinek nebo koků, tvar závisí na růstové fázi. Stejně jako u předchozích vzorků je tento izolát schopen tvořit silně biofilm. Stanovení bylo provedeno po 24 hodinách i po 48 hodinách.

Grampozitivní koky, byly nalezeny i u vzorku 10 a 12. U obou vzorků byla provedena identifikace do druhu *Enterococcus faecalis*. Vzorek 10 není schopen tvořit biofilm, kdežto u vzorku 12, který byl kultivován i 48 hodin, byla potvrzena schopnost tvorby biofilmu.

Vzorek 13 byl stanoven jako grampozitivní kok, dalším stanovením hmotnostní spektrometrií byl určen konkrétně jako *Enterococcus faecalis*. U tohoto vzorku byla zaznamenána silná schopnost tvorby biofilmu. Vzorek byl testován 3x, z toho jednou byl kultivován 48 hodin.

Mikroskopicky bylo zjištěno u vzorku 14, že se jedná od G+ koky, ale následným stanovením metodou MALDI-TOF MS nebylo možné identifikovat izolát s dostatečnou spolehlivostí. Nejpravděpodobnějším druhem byl ale *Enterococcus faecalis* (skóre 1,63). Tvorba biofilmu je zde převážně silná hlavně po 48 hodinách.

U vzorku 15 se jedná o G+ koky, což bylo potvrzeno dalším stanovením. Konkrétně se jedná o *Enterococcus faecalis*. Během prvního stanovení na tvorbu biofilmu bylo zjištěno, že není schopen tvořit biofilm. Test byl proto opakován s kultivací 24 i 48 hodin. Při těchto stanoveních byla prokázána schopnost tvorby biofilmu u tohoto izolátu.

Grampozitivní koky, byly zjištěny u vzorku 16. Metoda MALDI-TOF MS nám toto stanovení potvrzuje a říká, že se jedná o *Enterococcus faecalis*. Tvorba biofilmu při prvním stanovení byla zaznamenána jako negativní. Následovaly tedy další dvě opakování testu, jed-

no po 24 hodinách a druhé po 48 hodinách, obě s pozitivním výsledkem potvrzujícím schopnost tvorby biofilmu.

Mikroskopicky u vzorku 17 byl viděn výskyt G+ koků, což můžeme podle dalšího stanovení označit za správné. Konkrétně se zde vyskytují bakterie druhu *Enterococcus faecalis*. U tohoto izolátu nebyla prokázána schopnost tvorby biofilmu.

Následují vzorky 18-24 byly kultivovány anaerobně, délka kultivace byla opět 24 a 48 hodin.

Vzorek 18 byl stanoven jako G+ kok, konkrétně *Staphylococcus hominis*. Stanovení bylo provedeno 2x. Tvorba biofilmu byla u tohoto vzorku prováděna za anaerobních podmínek. Z výsledků v tabulce 7 můžeme říct, že je zde silná schopnost tvorby biofilmu.

Další vzorek s číslem 19 byl taktéž podroben mikroskopii s výsledkem, že se zde vyskytují G+ tyčinky. Metodou MALDI- TOF MS byl izolát identifikován jako mikroorganizmus náležící do druhu *Bacillus amyloliquefaciens.* Tvorba biofilmu u tohoto izolátu nebyla spolehlivě prokázána.

Výskyt G+ tyčinek byl zjištěn u vzorku 20. Následným stanovením bylo zjištěno, že se jedná o *Lysinibacillus sphaericus* což potvrzuje předchozí stanovení. Při testování na tvorbu biofilmu je zde výskyt negativních i pozitivních výsledků. Schopnost tvorby biofilmu tedy nelze jednoznačně potvrdit.

U vzorku 21 byl mikroskopicky zjištěn výskyt G+ koků. Identifikace metodou MALDI však nebyla průkazná, přestože byl jako nejpravděpodobnější označen druh *Enterococcus faecalis* (skóre 1,719). Rodové zařazení k enterokokům je průkazné. Schopnost tvorby biofilmu můžeme hodnotit jako silnou.

Grampozitivní koky, byly pozorovány u vzorku 22. Izolát byl identifikován jako *Staphylococcus warneri*. Je zde vysoká schopnost tvorby biofilmu.

Vzorky s číslem 23 a 24 byly oba stanoveny jako G+ koky a metodou MALDI-TOF MS byly zařazeny do druhu *Enterococcus faecalis*. Tvorba biofilmu je u obou vzorků silná jak po 24 hodinách, tak i po 48 hodinách.

7.4 Citlivost izolátů k esenciálním olejům

Ke stanovení citlivosti mikroorganizmů izolovaných z dutiny ústní byly použity dvě metody, disková difúzní metoda a mikrodiluční metoda.

7.4.1 Stanovení citlivosti diskovou difuzní metodou

Pro stanovení citlivosti mikroorganizmů k antibakteriální aktivitě esenciálních olejů bylo použito 24 izolovaných kmenů. Sledovány byly účinky 5 mátových olejů a 5 eukalyptových olejů.

Misky, na které byly naočkovány jednotlivé vzorky, byly pokladeny sterilními disky o průměru 5 mm, na které byly naneseny 2 µl esenciálního oleje. Po 24 hodinové kultivaci misek při 37 °C byla změřena inhibiční zóna kolem disku. Inhibiční zóna byla měřena jako průměr kruhové zóny včetně disků. Velikost inhibičních zón pro jednotlivé oleje a izoláty je uvedena v tabulkách 4 a 5.

Z tabulky 4 je patrné, že z eukalyptových olejů měl největší inhibiční účinek olej *Eucalyptus camaldulensis*, následně *Eucalyptus radiata*, dále *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus polybraceta* a nejnižší inhibiční působení bylo zaznamenáno *Eucalyptus globulus*.

U mátových olejů, které můžeme vidět v tabulce 5, bylo zjištěno, že největší účinnost má *Mentha piperita*, což nám také potvrzuje výše popsanou teorii, že má dobré antibakteriální účinky. Srovnatelné inhibiční účinky má *Mentha citriodora*, dále pak *Mentha arvensis*. Následuje již s nižšími inhibičními účinky BIO *Mentha piperita* a s nejnižšími účinky *Mentha spicata*.

Porovnáním inhibiční účinnosti mezi olejem mátovým a ekalyptovým lze říci, že eukalyptové oleje mají vyšší inhibiční účinnost než oleje mátové.

Tab. 6. Výsledky měření diskové difuzní metody pro eukalyptové oleje, velikost zón v [mm]

Číslo vzorku	*Eucalyptus citriodora*	*Eucalyptus camaldulensis*	*Eucalyptus polybraceta*	*Eucalyptus radiata*	*Eucalyptus globulus*
1	20	20	12	11	15
2	10	26	11	12	8
3	13	20	14	14	16
4	11	15	10	10	0
5	8	22	13	10	10
6	10	16	11	13	11
7	16	13	11	20	12
8	10	10	7	18	10
9	0	9	10	0	10
10	15	12	10	11	11
11	7	17	12	16	12
12	12	12	10	15	12
13	0	31	5	10	9
14	12	11	8	20	10
15	18	14	12	15	15
16	12	13	13	17	10
17	1	12	15	19	10
18	15	10	7	6	10
19	12	10	10	16	17
20	16	11	15	18	10
21	12	15	15	15	11
22	15	19	10	21	12
23	20	20	12	15	10
24	6	20	12	13	6

Tab. 7. Výsledky měření diskové difuzní metody pro mátové oleje, velikost zón v [mm]

Číslo vzorku	*Mentha arvensis*	*Mentha piperita*	BIO *Mentha piperita*	*Mentha spicata*	*Mentha citriodora*
1	11	10	10	8	18
2	10	12	9	8	20
3	12	16	18	12	10
4	14	10	10	7	6
5	11	13	10	8	16
6	13	10	11	9	10
7	11	10	10	7	20
8	22	15	10	15	10
9	7	32	10	8	9
10	10	10	8	9	17
11	9	9	13	11	19
12	9	12	9	7	10

13	14	12	9	8	13
14	13	11	12	12	13
15	10	13	10	9	10
16	14	13	14	10	20
17	11	16	19	9	10
18	0	0	0	0	0
19	8	16	12	10	11
20	21	12	9	6	20
21	9	10	11	10	9
22	20	14	16	12	12
23	11	17	10	10	10
24	20	18	10	9	11

7.4.2 Stanovení citlivosti mikrodiluční metodou

Pro provedení této metody bylo připraveno 10 mikroemulzí, z čehož pět jich obsahovalo různé mátové oleje a pět různé eukalyptové oleje. U všech olejů a jejich různých koncentrací byla zjišťována schopnost inhibice růstu bakterií po dobu 24 hodin. Z naměřených dat byl vypočítán průměr a byly sestrojeny růstové křivky. Z těchto dat byl stanoven index růstu (IR) po 24 hodinách, který lze vypočítat ze vztahu:

$$IR = 100 - \left(\frac{OD_x}{OD_{PK} - OD_{NK}} \cdot 100\right) \quad (1)$$

Kde:

IR – index růstu [%]

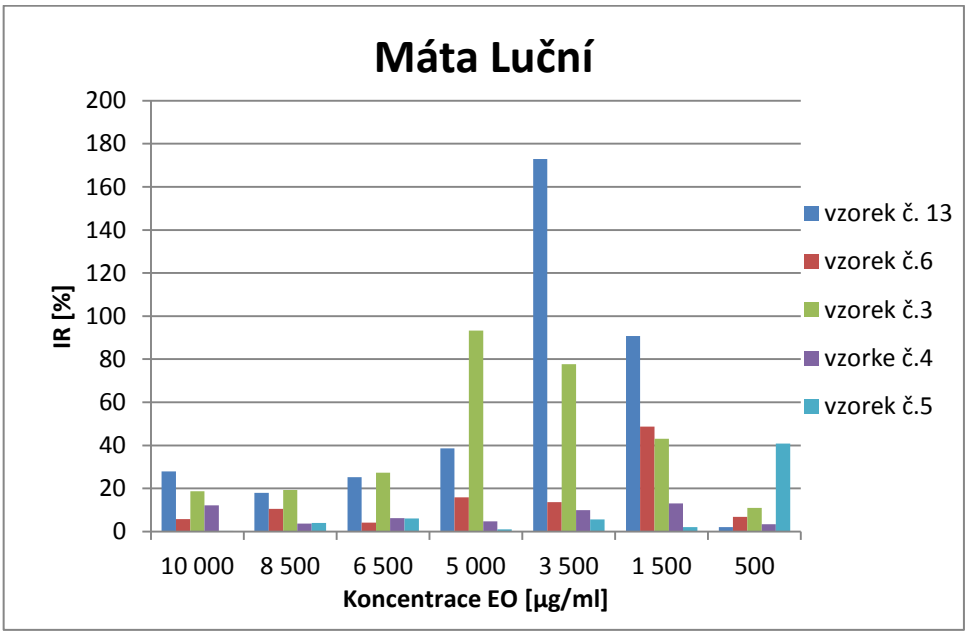
OD_x – optická denzita vzorku v médiu s příměsí mikroemulze

OD_{PK} – optická denzita pozitivní kontroly (růst mikroorganizmu bez přítomnosti inhibiční látky)

OD_{NK} – optická denzita negativní kontroly (médium s příslušnou koncentrací mikroemulze bez zaočkování)

V následujících kapitolách jsou uvedeny výsledky stanovení citlivosti izolátů k EO získané mikrodiluční metodou. Výsledky antimikrobního působení jednotlivých esenciálních olejů jsou znázorněny na samostatných grafech.

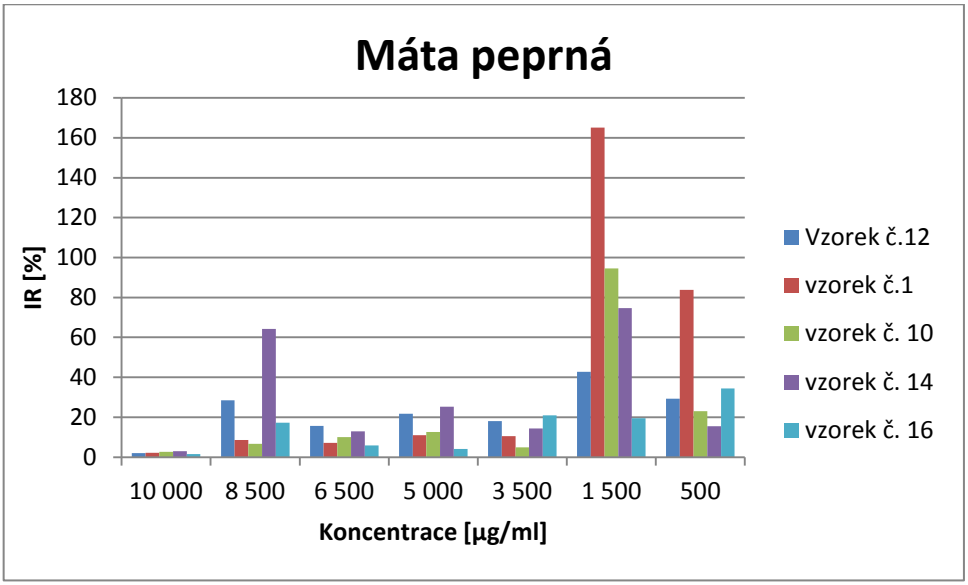
Antimikrobní aktivita EO máty luční vůči vybraným izolátům je znázorněna na obrázku 11. Graf vyjadřuje závislost IR na použité koncentraci oleje máty luční. Z grafu je patrné, že u většiny vzorků docházelo se snižující se koncentrací antimikrobiální látky k většímu pomnožení mikroorganizmů. Největší nárůst mikroorganismů při koncentraci 3 500 µg/ml, byl zaznamenán u vzorku č. 13, který byl identifikován jako *Enterococcus faecalis*. Obdobný trend, jen s nejvyšším nárůstem při koncentraci 5000 µg/ml, byl zaznamenán u vzorku č. 3. EO máty luční měl dobré antibakteriální účinky na vzorek č. 4 a č. 5. U vzorku č. 5 došlo k pomnožení mikroorganizmů až při koncentraci 500 µg/ml. Izoláty č. 4 a 5 nebyly pomocí MALDI TOF spolehlivě identifikovány.



Obrázek 11: Vliv mikroemulze EO máty luční na jednotlivé izoláty

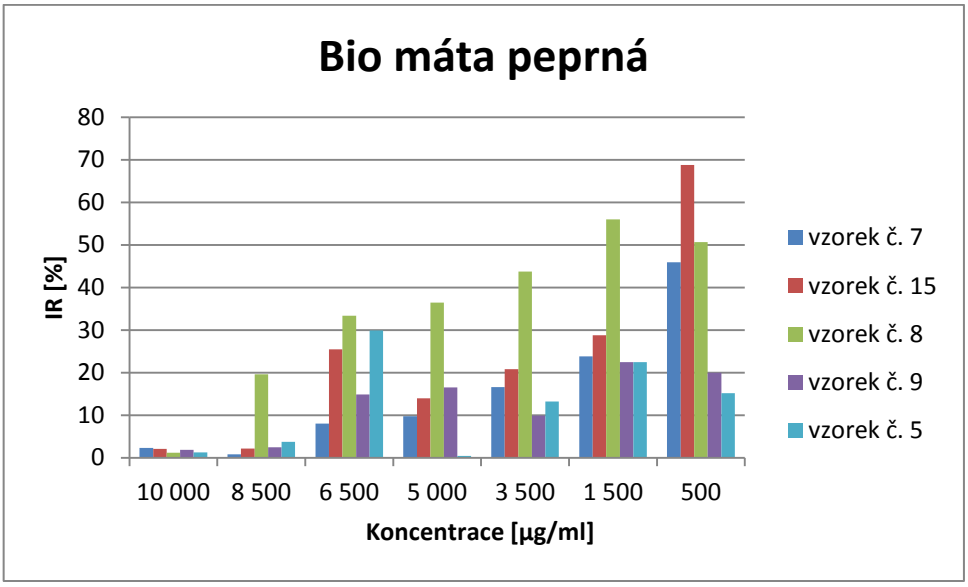
Na obrázku 12 můžeme vidět závislost růstu mikroorganizmů na koncentraci EO máty peprné. Lze říci, že izolované mikroorganizmy byly významně inhibovány tímto olejem v koncentraci vyšší než 1500 µg/ml. Nejlepší antimikrobiální účinky oleje můžeme vidět u vzorku č. 16 (identifikován jako *E. faecalis*). U vzorků č. 14 a č. 12, které byly také přiřazeny ke druhu *E. faecalis*, došlo při koncentraci 8 500 µg/ml k nárůstu mikroorganizmů. Tento nárůst mohl být způsobem tím, že daná antimikrobní látka zde pro tyto mikroorganizmy mohla působit jako živné médium a po vyčerpání živin opět došlo k poklesu. Další větší nárůst byl u toho vzorku při koncentraci 1 500 µg/ml. Poměrně vysoký nárůst mikroorganizmů je zaznamenán u koncentrace 1500 µg/ml a 500 µg/ml a to konkrétně u vzorku

č. 10 (identifikován jako *E. faecalis*). Zde již máta peprná neměla dostatečné antimikrobiální působení proti daným mikroorganizmům.



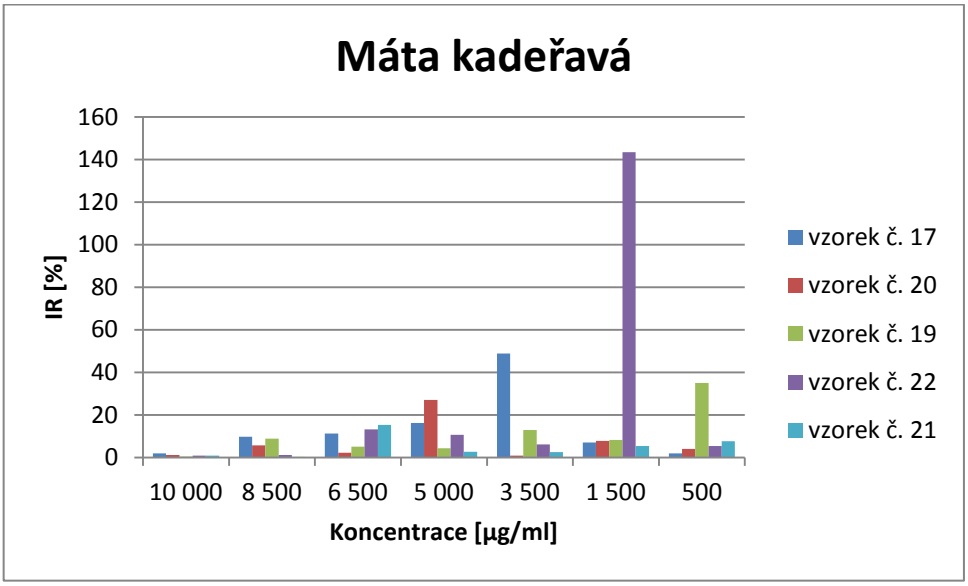
Obrázek 12: Vliv mikroemulze s obsahem EO máty peprné na jednotlivé izoláty

U mikrotitrační destičky, kde byl použit, jako antimikrobní látka EO máty peprné v BIO kvalitě můžeme vidět postupný nárůst mikroorganizmů s klesající koncentrací. K největšímu pomnožení došlo při koncentraci 1 500 µg/ml a 500 µg/ml, což můžeme vidět na obrázku 13. Nejméně tento olej působil na vzorek č. 8 (pomocí metody MALDI identifikován jako *E. faecalis*). Souhrnně můžeme říct, že silice máty peprné v BIO kvalitě nemá zřejmě dostatek antimikrobních látek pro inhibici daných mikroorganizmů. Ve srovnání s olejem máty peprné, který nemá deklarovánu kvalitu BIO, je tedy BIO máta peprná slabším inhibičním agens.



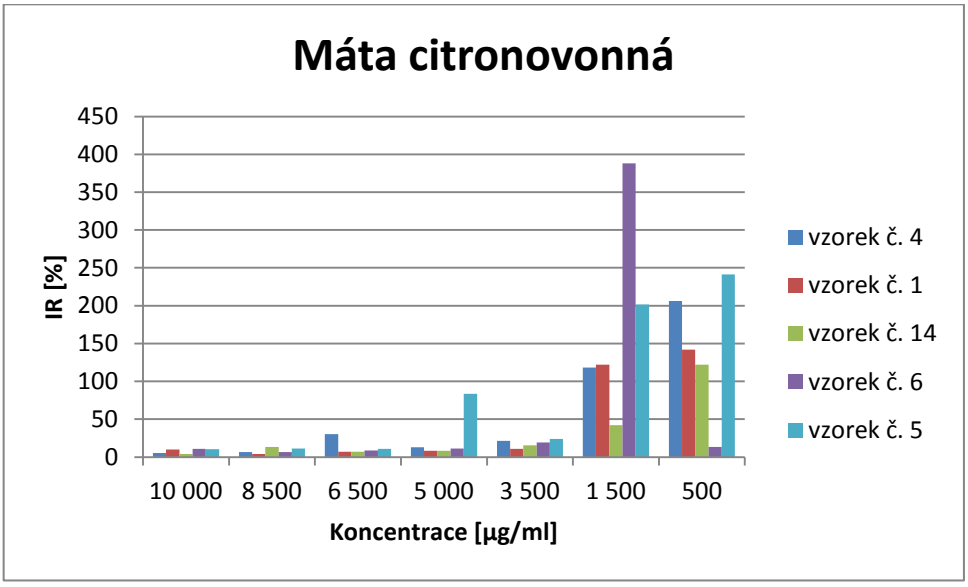
Obrázek 13: Vliv mikroemulze s obsahem EO máty peprné v BIO kvalitě na jednotlivé izoláty

Dalším testovaným mátovým olejem byl EO máty kadeřavé. Výsledky jsou graficky znázorněny na obrázku 14. Z grafu je patrné že máta kadeřavá má poměrně dobré antimikrobiální vlastnosti. U většiny izolátů došlo k poklesu hodnoty indexu růstu i při nízkých koncentracích dané antimikrobiální látky. Vzorek č. 20 (*Lisinibacillus sphaericus*) má větší nárůst mikroorganizmů při koncentraci 5 000 µg/ml a s další koncentrací následně došlo k poklesu. Obdobný průběh, můžeme vidět u vzorku č. 17 (*E. faecalis*) při koncentraci 3 500 µg/ml a u vzorku č. 22 (*Staphylococcus warneri*) při koncentraci 1500 µg/ml.



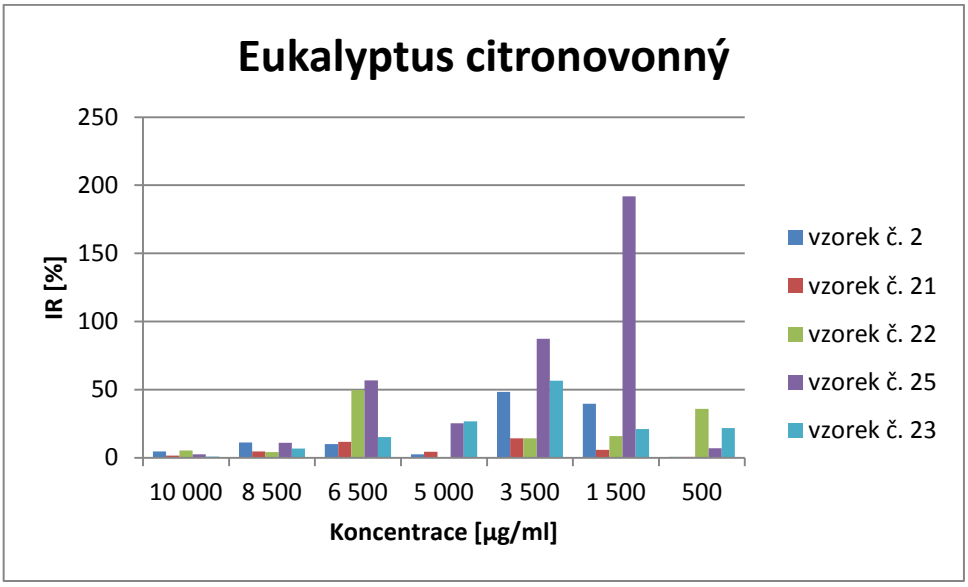
Obrázek 14: Vliv mikroemulze s obsahem EO máty kadeřavé na jednotlivé izoláty

Posledním testovaným mátovým olejem byl EO máty citrovonné. Nejvyšší nárůst mikroorganizmů, který můžeme vidět na obrázku 15, je při koncentraci 1 500 µg/ml a 500 µg/ml. Pouze u vzorku č. 5 došlo k většímu nárůstu již při koncentraci 5 000 µg/ml a u vzorku č. 4 při koncentraci 6 500 µg/ml. K inhibici mikroorganizmů dochází spíše při vyšších koncentracích, můžeme tedy říci, že máta citronovonná je dobrou antimikrobiální látkou při vyšších koncentracích. Izoláty č. 4 a 5 nebyly jednoznačně identifikovány.



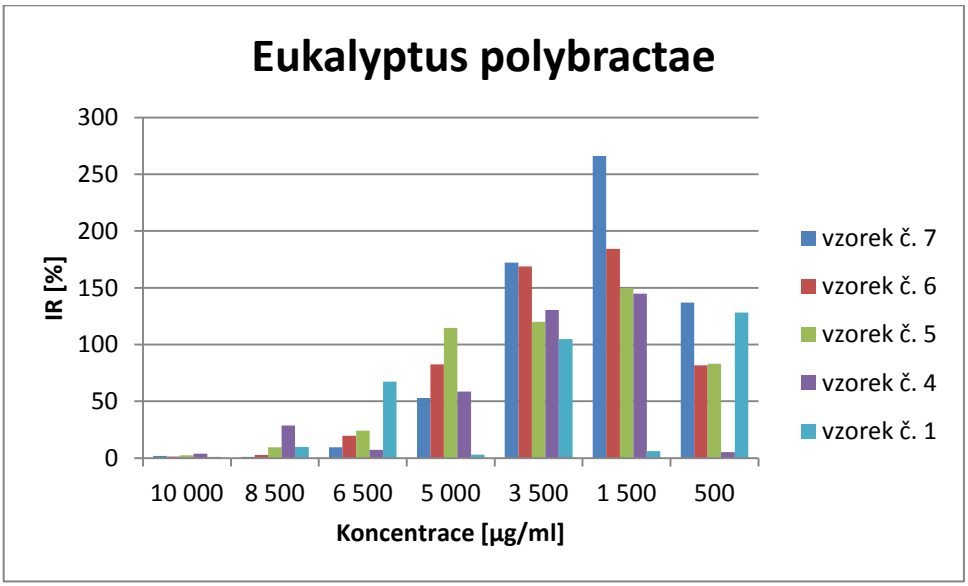
Obrázek 15: Vliv mikroemulze s obsahem EO máty citronovonné na jednotlivé izoláty

Dále byly zkoušeny antimikrobiální účinky eukalyptových olejů. Jako první jsou prezentovány výsledky získané s použitím mikroemulze EO eukalyptu citronovonného (*Eucalyptus citriodora*). Z obrázku 16 je patrné, že nejlépe tento olej působil na vzorek č. 21 (rod *Enterococcus*). Poměrně špatné působení můžeme vidět u vzorku č. 25 (identifikován *jako Staphylococcus hominis*), kde od koncentrace 6 500 µg/ml dochází k nárůstu mikroorganizmů. U vzorku č. 23 (*E. faecalis*) docházelo s klesající koncentrací k pomnožení mikroorganizmů, kde největší vzestup je při koncentraci 3 500 µg/ml. Vysoký nárůst a následný prudký pokles můžeme vidět u vzorku č. 22 (*Staphylococcus warneri*) při koncentraci 6 500 µg/ml. Při koncentraci 3 500 µg/ml došlo k nárůstu i u vzorku č. 2. U toho vzorku došlo s klesající koncentrací jen k mírnému poklesu.



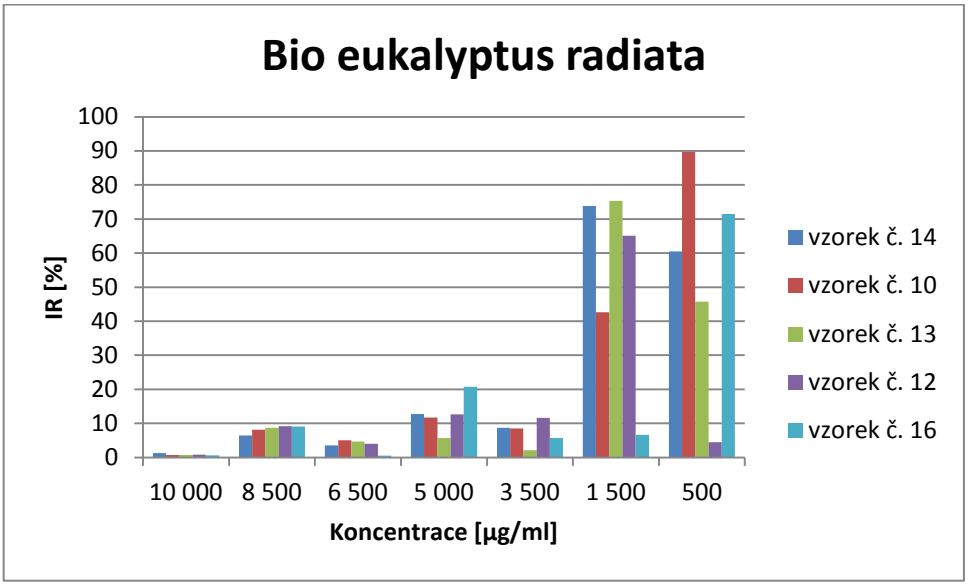
Obrázek 16: Vliv mikroemulze s obsahem EO Eucalyptus citriodora na jednotlivé izoláty

Na obrázku 17 můžeme vidět, že s klesající koncentraci EO z *Eucalyptus polybractea* docházelo k nárůstu mikroorganizmů. Největší vzestup je při koncentraci 1 500 µg/ml. U vzorku č. 1 můžeme vidět od koncentrace 6 500 µg/ml vždy vzestup s následným prudkým poklesem, další vzestup je při koncentraci 3 500 µg/ml a 500 µg/ml. Z naměřených dat vyplívá, že daná antimikrobní látka nemá na vybrané mikroorganizmy dostatečný inhibiční účinek.



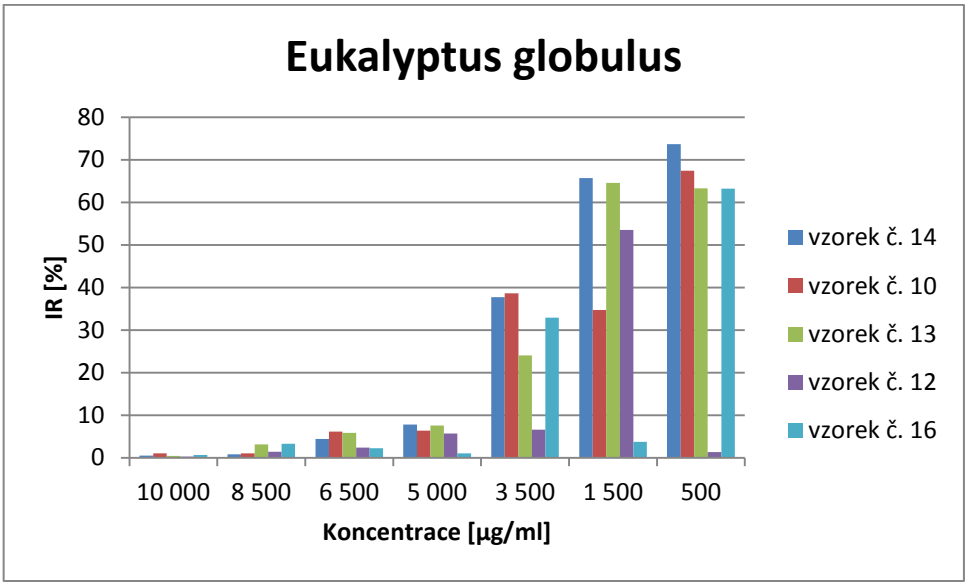
Obrázek 17: Vliv mikroemulze s obsahem EO Eucalyptus polybractea na jednotlivé izoláty

Esenciální olej *Eucalyptus radiata* v kvalitě BIO při nízkých koncentracích nemá inhibiční účinek na vybrané mikroorganizmy. Z obrázku 18 je patrné, že při koncentraci 1 500 µg/ml došlo k prudkému nárůstu mikroorganizmů. Nejméně tento eukalyptový olej působil na vzorek č. 10 (*E. faecalis*) a můžeme zde vidět poměrně velké pomnožení, stejně jako u vzorku č. 14 (pravděpodobně také *E. faecalis*). U tohoto oleje, jakožto antimikrobní látky, docházelo k nárůstu a následnému poklesu vždy s klesající koncentrací. Nejnižší nárůst byl zaznamenán u vzorku č. 16.



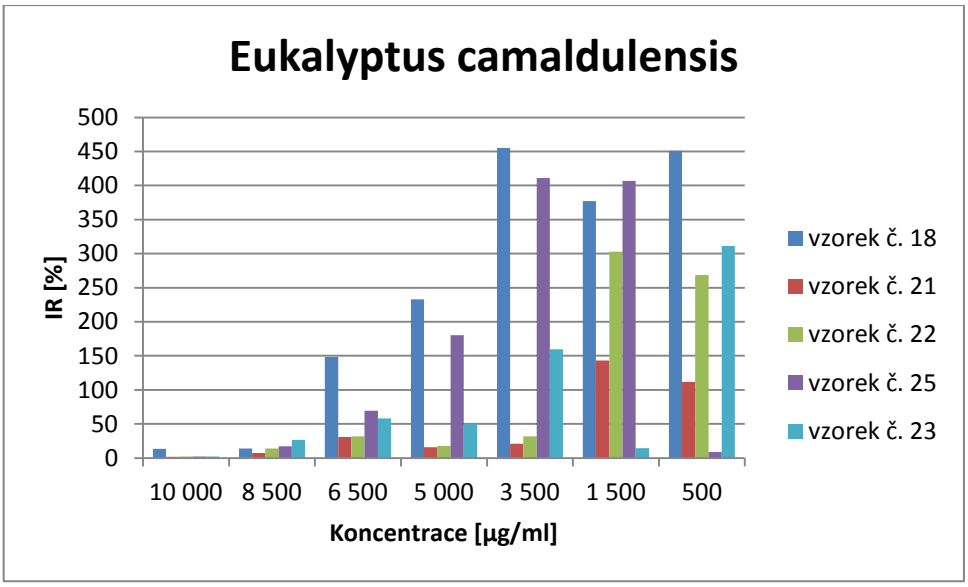
Obrázek 18: Vliv mikroemulze s obsahem EO Eucalyptus radiata v BIO kvalitě na jednotlivé izoláty

Dalším testovaným eukalyptovým olejem byl EO *Eucalyptus globulus*. Z obrázku 19 je patrné, že docházelo k postupnému růstu mikroorganizmů u všech vzorků již od koncentrace 8 500 µg/ml. S klesající koncentrací antimikrobní látky se tento růst zvyšoval. Nejvyšší postupný nárůst můžeme vidět u vzorku č. 14 a naopak nejnižší nárůst je viditelný u vzorku č. 12. *Eucalyptus globulus*, zřejmě neobsahuje dostatek antimikrobních látek pro inhibici daných mikroorganizmů. Vzorky 12 a 14 byly identifikovány jako *E. faecalis*.



Obrázek 19: Vliv mikroemulze s obsahem EO Eucalyptus globulus na jednotlivé izoláty

Posledním testovaným olejem byl EO získaný z *Eucalyptus camandulensis*. Tato silice má nejnižší inhibiční působení na vzorek č. 18 a č. 25 při koncentraci 3 500 µg/ml, což můžeme vidět na obrázku 20. Oba tyto izoláty byly *identifikovány jako Staphylococcus hominis*. U vzorků č. 22 a č. 21 (*E. faecalis*) je patrné, že daný esenciální olej zde působil inhibičně až do koncentrace 1 500 µg/ml. Při této koncentraci již došlo k nárůstu a pomnožení mikroorganizmů.



Obrázek 20: Vliv mikroemulze s obsahem EO Eucalyptus calmadulensis na jednotlivé izoláty

7.5 Závěrečná diskuse všech výše uvedených výsledků

Pro stanovení citlivosti mikroorganizmů dutiny ústní na antimikrobní látky bylo použito několik metod. V první řadě však byly tyto mikroorganizmy izolovány ze vzorků ortodontických zámků a poté byly identifikovány pomocí metody MADLI - TOF MS. Byla také provedena mikroskopie čistých kultur získaných izolátů a Gramovo barvení. Izolováno bylo celkem 25 čistých kultur. Pomocí barvení a mikroskopie bylo zjištěno, že většina izolátů náleží do skupiny grampozitivních koků. Toto zjištění bylo dále potvrzeno výsledky metody MALDI-TOF MS. Převážně byl zjištěn výskyt G+ koků, konkrétně mikroorganizmy rodu *Enterococcus*. Nejvíce byl zastoupen druh *Enterococcus faecalis*. Dostupná literatura potvrzuje, že v zubním plaku je možný výskyt mikroorganizmů rodu *Enterococcus* a konkrétně druhu *Enterococcus faecalis* [12, s. 20].

Vzhledem k tomu, že izoláty pocházely ze vzorků ortodontických zámků kolonizovaných mikroorganizmy, byl u těchto izolátů proveden průkaz tvorby biofilmu pomocí Christensenovy metody na mikrotitračních destičkách. Tvorba biofilmu byla prokázána u většiny vzorků, u některých byla tato schopnost silnější, u některých slabší. Výsledky byly rozděleny do tří kategorií na základě vypočítané OD. Pouze vzorek 10 neměl potvrzenou schopnost tvorby biofilmu. Literatura uvádí, že během vývoje zubního plaku je největší zastoupení G+ koků, méně pak tyčinek a G- koků a tyčinek [11, s. 37]. Můžeme tedy dané stanovení v porovnání s literaturou potvrdit.

V následující fázi praktické části práce byl studován vliv esenciálních olejů na růst těchto izolátů, které se mohou podílet na tvorbě zubního plaku. K průkazu antimikrobiální aktivity byly vybrány esenciální oleje z rostlin druhu máta a eukalyptus. Testování bylo provedeno pomocí difúzní i diluční metody.

Pro stanovení inhibičních zón pomocí diskové difuzní metody bylo použito 24 izolátů a 10 esenciálních olejů. Stanovením byla zjištěna vyšší účinnost eukalyptových olejů oproti olejům mátovým. Antibakteriální účinky esenciálních olejů byly prokázány i v bakalářské práci Žajdlíkové Vladěny, kde taktéž byla zjištěna větší antibakteriální účinnost eukalyptových olejů oproti olejům mátovým. [61, s. 51].

Při hodnocení mikrodiluční metody bylo zjištěno, že jednotlivé inhibiční účinky testovaných EO se liší. Mátovým olejem s nejvyšším antibakteriálním působením byl esenciální olej z máty kadeřavé, který i při nižších koncentracích vykazoval výborné inhibiční účinky na izolované mikroorganizmy, a to jak na izoláty identifikované jako enterokoky, tak i na

izoláty rodu *Staphylococcus*. Dalším velmi účinným olejem byl EO máty peprné a citronovonné, kde k většímu nárůstu mikroorganizmů došlo až od koncentrace 1 500 μg/ml. U eukalyptových olejů byl obdobný výsledek zjištěn u EO *Eucalyptus radiata* v BIO kvalitě. Inhibiční účinek i při nejnižších koncentracích byl zaznamenán také u *Eucalyptus citriodora*. U ostatních použitých EO docházelo s poklesem koncentrace daného oleje k nárůstu mikroorganizmů.

Každý esenciální olej může obsahovat 20 a více komponent v různých koncentracích, tím pádem je zde i různé zastoupení antimikrobiálních látek. Konkrétní složení oleje je navíc ovlivněno celou řadou faktorů, například druhem rostliny, ze které je získáván [28, s. 447]. Odlišnosti v antibakteriální aktivitě EO získaných ze stejného rodu ale jiného druhu rostliny byly pozorovány i v této práci a jsou tedy ve shodě s dostupnou literaturou.

Práce naznačuje možné využití mátových a eukalyptových olejů v ústní hygieně. Bylo prokázáno, že testované EO mohou inhibovat mikroorganizmy podílející se na vzniku zubního plaku. Antimikrobiálních účinků těchto olejů by mohlo být využito například při formulaci ústních vod. Prospěšné by takové ústní vody byly zejména pro ortodonticky léčené pacienty, u kterých přítomnost ortodontických zámků zvyšuje riziko kolonizace mikroorganizmy, vzniku zubního plaku a potenciálního vzniku zubního kazu či jiných obtíží.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zjistit citlivost mikroorganizmů dutiny ústní k antimikrobním látkám ze skupiny esenciálních olejů. Pro praktickou část práce byly použity ortodontické zámky s adherovanými mikroorganizmy pocházejícími z dutiny ústní. Nejprve byly ze vzorků izolovány čisté kultury mikroorganizmů a ty byly dále charakterizovány a identifikovány pomocí metody MALDI-TOF MS. Ze získaných 25 izolátů bylo pomocí této metody spolehlivě identifikováno 20 mikrobiálních druhů. Identifikace byla ve shodě s výsledky mikroskopické charakteristiky.

Dále byla u těchto izolátů provedena zkouška jejich schopnosti tvořit biofilm, a tedy aktivně se účastnit vzniku zubního plaku. Schopnost tvorby biofilmu byla testována pomocí Christensenovy metody modifikované pro použití mikrotitračních destiček. Inkubace zaočkovaných mikrotitračních destiček byla prováděna 24 hodin nebo 48 hodin za aerobních či anaerobních podmínek. Souhrnně lze říct, že schopnost tvorby biofilmu byla prokázána prakticky u všech izolátů. Jednotlivé druhy se lišily v intenzitě vzniklé biofilmové struktury. Silnější schopnost tvorby biofilmu byla pozorována u vzorků kultivovaných 48hodin aerobně.

V další části práce byla sledována antibakteriální aktivita deseti esenciálních olejů. Pět olejů bylo získáno z rostlin rodu *Mentha* a pět z rostlin rodu *Eucalyptus*. Inhibiční účinky olejů byly sledovány přímo na bakteriích izolovaných z ortodontických zámků. Pomocí difúzní diskové metody bylo zjištěno, že větší účinnost mají oleje eukalyptové oproti mátovým.

Antibakteriální aktivita byla testována i mikrodiluční metodou, kterou byla zjišťována inhibiční účinnost esenciálních olejů při různých koncentracích. Inhibiční účinek byl i zde sledován na skupině mikroorganizmů izolovaných z ortodontických zámků. Výsledky ukazují, že se vzrůstající koncentrací EO dochází ke zvýšení inhibiční aktivity olejů. Účinné i při nízkých koncentracích pak byly především EO máty kadeřavé, EO máty citronovonné, EO *Eucalyptus citriodora* a EO *Eucalyptus radiata* v BIO kvalitě.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] BINAR, J. a P. ČERNOCHOVÁ. Vliv ortodontických adhezivních materiálů na růst bakterií in vitro. *Ortodoncie*. Brno: 2007. ISSN 1210-4272.

[2] MARTIN, R. *Mikrobiální biofilm*.. Univerzita Palackého v Olomouci: 2011. ISBN 978-80-244-2747-8.

[3] RULÍK, M. a V. HOLÁ. *Mikrobiální biofilmy: 1. Všudypřítomný a přitom málo známý fenomén*. 2012.

[4] DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Atlanta, Georgia, USA: 200289.

[5] SCHINDLER, J. *Ze života bakterií*.. Praha: Academia: 2008, 143 s.. ISBN 978-80-200-1666-9.

[6] HELLWING, E. J. KLIMEK a T. ATTIN. *Záchovná stomatologie a paradontologie*. GRADA publishing.

[7] KOLEBRANDER, P. E. P. G. D. P. I. EGLAND a R. J. PALMER JR. Genome-genome interactions: bacterial communities in initial dental plaque. TRENDS in Microbiology. [online]. 2005. DOI 10.1016/j.tim.2004.11.005

[8] MARSH, P.D. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. [online]. DOI 10.1159/000077756

[9] KILIAN, J. *Prevence ve stomatologii*. Praha: Karolinum: 1999. ISBN 80-7184-976-6.

[10] HALAČKOVÁ, Z. Záchovná stomatologie a paradontologie. Recenze. *Česká stomatologie*. Praha: ČSL JEP Praha, 2003 roč. 51/103, s. 157-58. ISSN 1210-7891.

[11] FIALA, B. a M. ČERMÁKOVÁ. *Paradontologické minimum pro studenty stomatologie*. Olomouc: 1991.

[12] ŠKACH, M. *Základy Paradontologie: Učebnice pro lékařské fakulty*. Praha: Aviceum, 1983.

[13] PRSTKOVÁ, K. *Zubní kámen*. Brno: 2008. Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav antropologie. Vedoucí práce Doc. RNDr. Eva Drozdová Ph.D.

[14] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. Masarykova Univerzita, 2007. ISBN 80-210-4207-9.

[15] GOLDMAN, E. a L. H. GREEN. *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, 2008. ISBN 9781466587397.

[16] FORRSTEN, S. D.. B. M. a A. C. OUWEHAND. In: *Streptococcus mutans, Caries and Simulation Models.* [online]. DOI 10.3390/nu2030290

[17] MAKAROVA, K. et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. [online]. DOI 10.1073/pnas.0607117103

[18] SCHELL, M. A. et al. The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal …. [online]. 2002. doi.org/10.1073/pnas.212527599

[19] PRESCOTT, L. M. J. P. HARLEY a D. A. KLEIN. *Microbiology*. (Fifth Edition). McGraw-Hill Higher Education, 2001. ISBN 0072320419.

[20] BUŇKOVÁ, L. *Mikrobiologie potravin a kosmetiky*. Zlín. Univerzita Tomáše Bati.

[21] RYAN, K. J. C. G. RAY a J. C. SHERRIS. *Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases*. 4th Edition. Hardcover edition. 2003. ISBN 978-0071818216.

[22] BETSY, T. a J. KEOGH. *Microbiology Demystified: A Self-teaching Guide.* McGraw-Hill Professional, 2005. ISBN 0071446508.

[23] SHAN, H. N. a M. D. COLLINS. *Proposal To Restrict the Genus Bacteroides (Castellani and Chalmers) to Bacteroides fragilis and …*. 1989.

[24] LOESCHE, W. J. S. S. SOCRANSKY a R. J. GIBBONS. *Bacteroides Oralis, Proposed New Species Isolated from the Oral Cavity of Man*. 1964.

[25] SLOTS, J. Selective medium for isolation of Actinobacillus actinomycetemcomitans. 1982, s. 606-09.

[26] FISHER, R. G. a M. R. DENISON. *Veillonella parvula Bacteremia without an Underlying Source*. 1996, 34 s..

[27] SEMERÁKOVÁ, Z. Spondylodiscitida a psoatický absces způsobené bakterií Veillonella parvula? Praha: 2014, s. 359-62.

[28] SARTORATTO, A. et al. COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM AROMATIC. Brasil: 2003, č. 35, s. 275-80. ISSN 1517-8382.

[29] BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. [online]. doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106

[30] HUSSAIN, A. I. *Characterization and Biological Activities of Essential Oils of Some Species of Lamiaceae*. Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Agriculture, Pakistan: 2009.

[31] BACÍLKOVÁ, B. a H. PAULUSOVÁ. *Vliv sinic a jejich hlavních účinných látek na mikroorganismy a na archivní materiál*. Praha: 2012.

[32] BERGER, R. G. *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Universität Hannover, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 2007. ISBN 9783540493389.

[33] BOWLES, E. J. *The Chemistry of Aromatherapeutic Oils*. 3rd Edition. 2003. ISBN 9781741140514.

[34] ING. JIŘÍ KREJČÍ, C. *KOSMETIKA A KOSMETOLOGIE*. Zlín: Fakulta technologická Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

[35] SAHOO, P. (. A. *EXTRACTION OF ESSENTIAL OIL AND ITS*. Department of Chemical Engineering, 2006.

[36] K. HÜSNÜ CAN BAS, G. B. *ESSENTIAL OILS Science, Technology,and Applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. ISBN 978-1-4200-6315-8.

[37] CÍDLOVÁ, H. *Pedagogická fakulta Masarikova iniverzita* [online]. Dostupné také z: http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech-old/soubory/operace/ separacni_metody/destilace.pdf

[38] BAGAMBOULA CF, U. M.. D. J. Food Microbial. 2004, č. 21 (33).

[39] AIT-OUAZZOU, A. L. S.. A. A.. L. A.. R. C.. H. A.. P. R.. C. P. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial aktivity of Mentha pulegium, Juniperus …. 2012, č. 1, s. 313-19.

[40] TZAKOU O, P. D. C. I. H. C. Planta Med. *Planta Med*. 2001, č. 67 (81).

[41] ŽAJDLÍKOVÁ, V. *Antibakteriální účinnost esenciálních olejů získaných z rostlin Eucalyptus a Mentha*. 2013. Bakalářská práce. Univerzita tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.

[42] BASER, K. H. C. *Handbook of essentials oils: science, technology, and applications*. Boca Raton: CRC Press/Taylor, 2010. ISBN 978-1-4200-6315-8.

[43] DJENANE, D. A. M.. Y. J.. I. L.. G. D.. Antioxidant and antibakterial effects of Lavandula and Mentha Essentials oils in minced BEF …. Meat Science, 2012, č. 92, s. 667-74.

[44] Léčivé rostliny - Bylinky. *Zdraví na dlani web o zdraví* [online]. Dostupné také z: http://www.zdravinadlani.cz/lecive-rostliny/mata-peprna

[45] Reálné zemědělství a vše kolem něj. *Reálné zemědělství a vše kolem něj* [online]. 2014. Dostupné také z: http://zivotnafarme.infoblog.cz/clanek/mata-peprna-39924/

[46] *Antibakteriální účinnost esenciálních olejů získaných z rostlin Eucalyptus a Mentha*. Zlín: 2013. Bakalářská práce. Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati.

[47] Herbář Wendys. *Herbář Wendys* [online]. 2015 [cit. 2015-Květen]. Dostupné z: http://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/132-mentha-arvensis-mata-rolni

[48] KORBELÁŘ, J. a Z. ENDRIS. *Naše rostliny v lékařství*. 5. Praha: Avicenum, 1981.

[49] R.O. J. C. S. S. *Máta citronová* [online]. Dostupné také z: http://www.justnahrin.cz/bylina/mata-citronova

[50] Eucalyptus Oil: Esential oil. *Mercola* [online]. Dostupné také z: http://articles.mercola.com/herbal-oils/eucalyptus-oil.aspx

[51] ORWA C, A. M. K. R.. J. R. S. A. *Tree reference and selection guide* [online]. 2009. Dostupné také z: http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp

[52] DREW J. KING, R. M. G. A. I. E. W. *Terpene deployment in Eucalyptus polybractea; relationships with*. Australia: CSIRO, 2004, č. 31, s. 451-60.

[53] Eucalyptus camaldulensis. [Primefact for profitable, adaptive and sustainable primary industries] [online]. 2010. Dostupné také z: http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0004/356080/eucalyptus-camaldulensis.pdf

[54] Organic Eucalyptus radiata. *Laboratoire Altho* [online]. 2015. Dostupné také z: http://www.laboratoirealtho.fr/eng/eucalyptus-radiata-bio/

[55] E. GOLDMAN, L.H. G. *Practical handbook of microbiology*. 2nd edition. CRC Press, 2009. ISBN 978-0-8493-9365-5.

[56] KALEMBA, D. A. A. K. *Antibacterial and Antifungal Properties od Essential Oils. Current Medicinal Chemistry*. 2010, č. 10, s. 813-29.

[57] VAN DEN BOOM D. W. M.. E. R. E. Methods in molecular biology. 2013, č. 1015.

[58] KOTLÍK, P. MOŽNOSTI POUŽITÍ MICELÁRNÍCH KOLOIDŮ A MIKROEMULZÍ. *Chemické Listy*. Ústav chemické technologie restaurování památek, Vysoká škola chemicko technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha: 2014, č. 108, s. 1113-18.

[59] KHANNA SURABHI, K. O. N. A. G. A. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, Microemulsions: Developmental …. RJPBCS , October – December 2010 , č. 1(4), s. 683-706. ISSN: 0975-8585.

[60] *Emulsion*. Civil Engineering, 1995, č. 996. ISSN:0885-7024.

[61] TRUONG THANH HUONG, M. K. R. G. B. R.N. K. L. T. O. Z. V. A. R. K. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. Journal of Metallomics and Nanotechnologies, 2014, č. 1, s. 64-66.

[62] JULÁK, J. *Identifikace bakterií metodami instrumentální chemické analýzy*. Praha: Karolinum, 1998.

[63] HAVLIŠ, J. *Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF*. Vesmír 78, 1999.

[64] JAROŠOVÁ, V. *Tvorba biofilmu u Streptococcus pneumoniae*. Praha: 2015.

Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.

[65] HASSAN, A. et al. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Salvador: Braz J Infect Dis , 2011, č. 4, s. 305-11. ISSN 1413-8670.

[66] HOLÁ, I. V. *Metody průkazu tvorby biofilmu u lékařsky významných mikrobů*. Masarikova univerzita v Brně: 2007. Dizertační práce. Lékařská fakulta, Mikrobiologický ústav.

[67] KÁNTOR, A. *Vplyv mikroorganizmov na finálnu kvalitu vína*. 2016. Dizertačná práca. SPU Nitra.

[68] DOSOUDILOVÁ, Š. *Molekulární biologická podstata klinicky významných antibiotických rezistencí bakterií*. Brno: 2011. Bakalářská práce. MASARYKOVA UNIVERZITA, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie.

[69] GARTI, N. *Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals* [http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpDCRBFN09/delivery-controlled-release]. Boca Raton, Fla. : CRC Press ; Cambridge : Woodhead, 2008. ISBN 9781420074369.

[70] PETR KOTLÍK, M. Š. K. D. A. F. *Vodné mikroemulze, teorie a praxe*. 2014. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav chemické technologie restaurování památek.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Aerobní kultivace
AN	Anaerobní kultivace
BHI	Brain Hearth Infusion Broth
CFU	Odhad životaschopných buněk v 1 ml vzorku (colony forming units)
EO	Esenciální olej
G+	Grampozitivní mikroorganizmus
G-	Gramnegativní mikroorganizmus
HLB	Hydrofilně lipofilní rovnováha
K	Kok
MPB	Masopeptonový bujon
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometer
MRS	Lactobacillus MRS Broth
MH	Muller Hilton Agar
NA	Nutrient Agar
NaCl	Chlorid sodný
OD	Optická denzita
PAL	Povrchově aktivní látka
SCDA	Soyabean Casein Digest Agar
TSB	Trypton-sojový bujon
T	Tyčinka

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Isopren [34, s. 10] 21
Obrázek 2: Linalool [33, s. 140] 21
Obrázek 3: Menthol [33, s. 140] 21
Obrázek 4: Citral 22
Obrázek 5: Strukturní vzorec menthonu [32, s. 184] 22
Obrázek 6: Destilační aparatura 1. zdroj tepla 2. destilační baňka 3. destilační hlava 4. teploměr 5. chladič 6. přívod chladicí vody 7. odtok chladicí vody 8. předloha (jímadlo na destilát) 9. přívod vakua, vodní vývěva 10. nástavec (alonž) [36] 23
Obrázek 7: Schéma rozdělené tenzidů [33, s. 6] 29
Obrázek 8: Schéma hmotnostního spektrometru MALDI-TOF MS [51, s. 65] 32
Obrázek 9: Christensenova zkumavková metoda [55, s. 13] 33
Obrázek 10: Christensenova metoda mikrotitrační destičky [55, s. 14] 34
Obrázek 11: Vliv mikroemulze EO máty luční na jednotlivé izoláty 55
Obrázek 12: Vliv mikroemulze s obsahem EO máty peprné na jednotlivé izoláty 56
Obrázek 13: Vliv mikroemulze s obsahem EO máty peprné v BIO kvalitě na jednotlivé izoláty 57
Obrázek 14: Vliv mikroemulze s obsahem EO máty kadeřavé na jednotlivé izoláty 57
Obrázek 15: Vliv mikroemulze s obsahem EO máty citronovonné na jednotlivé izoláty 58
Obrázek 16: Vliv mikroemulze s obsahem EO Eucalyptus citriodora na jednotlivé izoláty 59
Obrázek 17: Vliv mikroemulze s obsahem EO Eucalyptus polybractea na jednotlivé izoláty 59
Obrázek 18: Vliv mikroemulze s obsahem EO Eucalyptus radiata v BIO kvalitě na jednotlivé izoláty 60
Obrázek 19: Vliv mikroemulze s obsahem EO Eucalyptus globulus na jednotlivé izoláty 61
Obrázek 20: Vliv mikroemulze s obsahem EO Eucalyptus calmadulensis na jednotlivé izoláty 61

SEZNAM TABULEK

Tab. 1.Přehled nejčastějších mikroorganizmů zubního plaku [8, s. 39] [3, s. 20] 15
Tab. 2. Pipetované objemy a koncentrace EO v roztoku 43
Tab. 3. Výsledky pro jednotlivé vzorky z imerzní mikroskopie 45
Tab. 4. Výsledky pro metodu MALDI-TOF MS 47
Tab. 5. Tvorba biofilmu pro jednotlivé vzory aerobní a anaerobní kultivací 48
Tab. 6. Výsledky měření diskové difuzní metody pro eukalyptové oleje, velikost zón v [mm] 53
Tab. 7. Výsledky měření diskové difuzní metody pro mátové oleje, velikost zón v [mm] 53