

UNIVERZITA KARLOVA

# 3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

*Stomatologická klinika*



**Bc. Tereza Moučková**

**Stanovení antimikrobiální aktivity medicínsky  
významných léčivých rostlin na bakterii  
*Streptococcus mutans***

*Determination of antimicrobial activity of medically  
importans medicinal plants on bacteria  
*Streptococcus mutans**

*Bakalářská práce*

Praha 2021

**Autor práce:** Bc. Tereza Moučková

**Studijní program:** Dentální hygienistka

**Bakalářský studijní obor:** Specializace ve zdravotnictví

**Vedoucí práce:** Mgr. Lucia Mališová, PhD.

**Pracoviště vedoucího práce:** Ústav mikrobiologie 3. LF UK,  
FNKV a SZÚ

**Předpokládaný termín obhajoby:** červen 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci vypracovala samostatně a použila výhradně uvedené citované prameny, literaturu a další odborné zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby má bakalářská práce byla používána ke studijním účelům.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací. Potvrzuji, že tištěná i elektronická verze v Studijním informačním systému UK je totožná.

V Praze dne 30. dubna 2021

Bc. Tereza Moučková

## **Poděkování:**

Ráda bych touto cestou poděkovala především mé vedoucí Mgr. Lucii Mališové, PhD. za trpělivost, ochotu a odborné vedení mé bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala Bc. Ivetě Vrbové za vedení a podporu při praktickém provedení všech pokusů. V neposlední řadě své rodině a přátelům, kteří mi poskytli duševní oporu.

## Seznam zkratek

ADA – American dental association

KR – kontrola růstu

MBC – minimální baktericidní koncentrace

MH –F bujon – Müller-Hinton bujon

MIC – minimální inhibiční koncentrace

*S. mutans* – *Streptococcus mutans*

TNF – Tumor necrosis factor

# Obsah

<b>OBSAH</b> .....	<b>6</b>
<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>1. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
1.1. <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> .....	9
1.1.1. <i>Genetická a fenotypová variabilita S. mutans</i> .....	10
1.1.2. <i>Metabolismus sacharidů u S. mutans</i> .....	10
1.2. STANOVENÍ CITLIVOSTI K ANTIMIKROBIÁLNÍM LÁTKÁM .....	12
1.2.1. <i>Kvantitativní metody</i> .....	13
1.2.2. <i>Kvalitativní metody</i> .....	14
1.2.3. <i>Kombinované metody</i> .....	14
1.3. TESTOVANÉ MEDICÍNSKY VÝZNAMNÉ LÉČIVÉ ROSTLINY .....	15
1.3.1. <i>Heřmánek pravý (Matricia chamomila)</i> .....	15
1.3.2. <i>Šalvěj lékařská (Salvia officinalis)</i> .....	16
1.3.3. <i>Řepík lékařský (Agrimonia eupatoria)</i> .....	17
1.3.4. <i>Prha arnika (Arnica montana)</i> .....	17
1.3.5. <i>Měsíček lékařský (Calendula officinalis)</i> .....	18
1.4. CHLORHEXIDIN – CHEMICKÝ PROSTŘEDEK KONTROLY ZUBNÍHO PLAKU .....	19
1.5. TESTOVANÉ ÚSTNÍ VODY .....	20
1.5.1. <i>Herbadent professional – koncentrát bylinné ústní vody</i> .....	20
1.5.2. <i>Elmex caries protection</i> .....	21
1.5.3. <i>Curaprox Perio Plus 0,05 % Balance</i> .....	21
1.5.4. <i>Listerine Total Care</i> .....	21
<b>2. PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>23</b>
2.1. HYPOTÉZY .....	23
2.2. METODIKA .....	24
2.2.1. <i>Stanovení minimální inhibiční koncentrace potenciálně antimikrobiálních látek vůči bakterii S. mutans</i> .....	24
2.2.2. <i>Stanovení účinnosti ústních vod – expoziční test</i> .....	24
2.3. MATERIÁL .....	25
2.3.1. <i>Vzorky bylin</i> .....	25
2.3.2. <i>Chemikálie</i> .....	25

2.3.3. Bakterie.....	26
2.3.4. Přístroje:.....	26
2.3.5. Kultivační půdy .....	26
2.4. STANOVENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE LÁTEK VŮČI BAKTERII <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> .....	27
2.4.1. Příprava Müller-Hinton bujonu.....	27
2.4.2. Příprava inokula a jeho standartizace.....	27
2.4.3. Příprava Chlorhexidinu.....	28
2.4.4. Příprava vodných extraktů testovaných léčivých rostlin.....	28
2.4.5. Inokulace mikrotitrační destičky .....	30
2.5. EXPOZIČNÍ TEST .....	31
2.5.1. Příprava testovaných ústních vod.....	31
2.5.2. Příprava inokula a jeho standartizace.....	31
2.5.3. Provedení testu.....	32
<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>33</b>
STANOVENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE LÁTEK VŮČI BAKTERII <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> .....	33
EXPOZIČNÍ TEST .....	35
<b>DISKUZE .....</b>	<b>36</b>
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>39</b>
<b>SOUHRN .....</b>	<b>40</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>41</b>
<b>LITERATURA.....</b>	<b>42</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ: .....</b>	<b>49</b>
<b>SEZNAM TABULEK:.....</b>	<b>49</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH: .....</b>	<b>50</b>

## Úvod

Důsledná ústní hygiena je základem zdraví celého organismu. V dnešní době si na trhu můžeme pro tento účel vybrat z nepřeberného množství různých přípravků, a to jak na chemické, tak i přírodní bázi. V této bakalářské práci jsme se zajímali o to, zda mají bylinné přípravky inhibiční účinek na jednu z nejnámějších bakterií sídlící v dutině ústní – *Streptococcus mutans*, či se dokonce vyrovnají přípravkům chemickým. Cílem bylo stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální bakteriostatické koncentrace (MBC) těchto léčivých rostlin a zjištění účinnosti běžně dostupných ústních vod na bakterii *S. mutans*.

Zvolili jsme pět potenciálně léčivých bylin, které dle literatury vykazují bakteriostatické či baktericidní účinky<sup>1,2,3,4,5</sup>. Jsou to konkrétně: Heřmánek pravý, Měsíček lékařský, Prha arnika, Řepík lékařský a Šalvěj lékařská. Všechny tyto byliny se již velmi dlouhou dobu používají v lidovém léčitelství a je velmi jednoduché si jejich roztoky připravit doma.

Mezi nejúčinnější chemické látky, používané při předcházení vzniku zubního plaku, patří Chlorhexidin diglukonát. Právě z důvodu jeho běžné dostupnosti a účinnosti jsme si ho vybrali jako kontrast k bylinným extraktům.

Chemické látky, působící inhibičně na růst bakterií v dutině ústní, nacházíme téměř ve všech ústních vodách. V této bakalářské práci byly testovány ústní vody Herbadent professional, Elmex caries protection, Listerine Total care a Curaprox Plus 0,05 % Balanced. Podrobili jsme je expozičnímu testu na výše zmíněnou bakterii, s cílem zjistit, zda budou mít bakteriostatický nebo baktericidní účinek. Zajímalo nás, jestli budou ústní vody reagovat tak, jak popisuje výrobce v příbalových letáčích.

---

<sup>1</sup> CRUCERIU Daniel, BALACESCU Ovidiu, RAKOSY Elena. Calendula officinalis: Potential Roles in Cancer Treatment and Palliative Care. *Integr Cancer Therapy*. 2018, **17**(4), str.5

<sup>2</sup> KRIPLANI, Priyanka, Kumar GUARVE a Uttam S. BAGHAEL. Arnica montana L. – a plant of healing: review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*., 2017, **69** (8), str.8

<sup>3</sup> PEREIRA Olivia R., CATARINO Marcelo D., AFONSO Andrea F, SILVA Artur M.S., CARDOSO Susana M., Salvia elegans, Salvia greggii and Salvia officinalis Decoctions: Antioxidant Activities and Inhibition of Carbohydrate and Lipid Metabolic Enzymes. *Molecules*. 2018, **23**(12), str.1

<sup>4</sup> MEHMOOD, Malik H., MUNIR, Siraj, KHALID, Uzair A., ASRAR, Mudassir, & GILANI, A. H. Antidiarrhoeal, antisecretory and antispasmodic activities of Matricaria chamomilla are mediated predominantly through K<sup>+</sup>-channels activation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, (2015), **15**(1), str. 2

<sup>5</sup> AKBAR, Shahid. *Handbook of 200 Medicinal Plants*. Stockton: Springer. ISBN 978-3-030-16807-0., str. 121

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1. *Streptococcus mutans*

*S. mutans* je fakultativně anaerobní grampozitivní bakterie. Na jeho povrchu se nachází kapsle (virulenční faktor). Je to kataláza a oxidáza negativní, alfa-hemolytický, nepohyblivý kok, který neprodukuje spory<sup>6</sup>.

*S. mutans* je kariogenní bakterie, která se nejvíc uplatňuje v etiologii zubního kazu. Tato bakterie sídlí v plaku. Kromě kazu může způsobovat i infekční endokarditidu, bakterémii či jiné nemoci.

V roce 1924 ji poprvé izoloval z kariézní léze J. Clark a kvůli jejímu oválnému tvaru ji nazval *S. mutans*. Celosvětového zájmu se této bakterii dostalo až v 60. letech 19. století, kdy se zjistilo, že je významným etiologickým faktorem vzniku zubního kazu<sup>7</sup>.

*S. mutans* je přirozenou součástí dentálního plaku. Jeho velký kariogenní potenciál tkví ve třech základních atributech:

- Syntetizuje velké množství extracelulárních polysacharidů, které pomáhají trvalé kolonizaci plaku a vytvoření extracelulární matrix. Díky této vlastnosti mohou do plaku nasednout ostatní acidogenní a acidorezistentní druhy bakterií, které tuto schopnost tvorby nemají.
- Transportuje a metabolizuje široké spektrum sacharidů na organické kyseliny – acidogenita.
- Odolává stresujícímu enviromentálnímu prostředí, obzvláště v relativně nízkém pH – acidurita<sup>8</sup>.

---

<sup>6</sup> *Microbiology info* [online]. BIOCHEMICAL TEST AND IDENTIFICATION © [cit. 2021-03-29]. Dostupné z: <https://microbiologyinfo.com/biochemical-test-and-identification-of-streptococcus-mutans/>

<sup>7</sup> LIMEBACK, Hardy, ed. *Preventivní stomatologie*. Přeložil Jana KAIFEROVÁ, přeložil Zdeněk BROUKAL. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0094-1., str. 59

<sup>8</sup> LEMOS James A., PALMER Simon R., ZENG Liu, WEN Zo T., KAJFAZ John K, The Biology of Streptococcus mutans. *Microbiol Spectr.* 2019;7(1), str.1

<sup>14</sup> CORNEJO Omar E., LEFÉBURE Tristan, BITAR Paulina D., LANG Ping, RICHARDS Vincent P., EILERTSON Kirsten, DO Thuy, BEIGHTON David, ZENG Lin, Evolutionary and population genomics of the cavity causing bacteria *Streptococcus mutans*. *Mol Biol Evol*, 2013. **30** (4), str. 890

### 1.1.1. Genetická a fenotypová variabilita *S. mutans*

Tato bakterie může být klasifikována do čtyř různých sérologických podtypů/skupin (c, e, f, k) v závislosti na struktuře rhamnoso-glukosových polysacharidových zbytků na povrchu buňky. Kmeny izolované z dentálního plaku patří převážně k sérotypu c (75 %), sérotypu e (20 %), nejméně zastoupenými jsou sérotypy f a k (5 %)<sup>9</sup>.

*S. mutans* je jednou z nejlépe prozkoumaných bakterií. Studie ukázaly, že se genom této bakterie skládá minimálně z 3 000 možných genů, přičemž všechny kmeny mají společný jaderný genom.

Ten se skládá z přibližně 1 490 genů. Krom toho obsahuje i 73 unikátních genů, které jsou potřebné pro jeho metabolismus sacharidů a acidorezistence<sup>10</sup>.

### 1.1.2. Metabolismus sacharidů u *S. mutans*

*S. mutans* využívá k získávání energie výhradně glykolýzu. Hlavním, avšak ne jediným, substrátem jeho energetického metabolismu je sacharóza. Sacharóza je  $\beta$ -2,1 disacharid skládající se z jedné molekuly glukosy a jedné molekuly fruktosy. *S. mutans* vyvinul mnoho různých cest, jak metabolizovat tento nejznámější kariogenní disacharid<sup>11</sup>.

Extracelulárně je sacharóza štěpena enzymy glukosyltransferasou a fruktosyltransferasou na glukany a fruktany. Uspořádání glukánů hraje klíčovou roli ve virulenci kmene, protože v podobě extracelulární matrix přispívají ke tvorbě zubního plaku a biofilmu. Na rozdíl od glukánů, které jsou štěpeny enzymem dextransou, fruktany rozkládá enzym fruktanasa a slouží jako krátkodobé zdroje extracelulárních sacharidů<sup>12</sup>.

---

<sup>9</sup> CORNEJO Omar E., LEFÉBURE Tristan, BITAR Paulina D., LANG Ping, RICHARDS Vincent P., EILERTSON Kirsten, DO Thuy, BEIGHTON David, ZENG Lin, Evolutionary and population genomics of the cavity causing bacteria *Streptococcus mutans*. *Mol Biol Evol*, str. 891

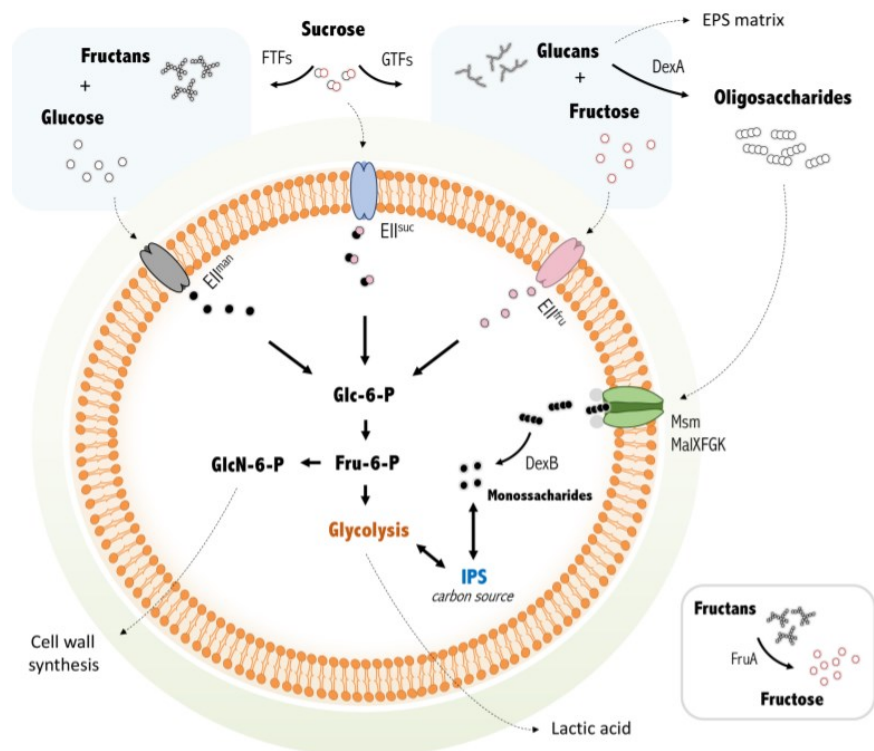
<sup>10</sup> MATSUMOTO-NAKANO, Michiyo, Dental Caries. Elsevier. 2014, 1(9), str. 3

<sup>11</sup> LEMOS James A., PALMER Simon R., ZENG Liu, WEN Zo T., KAJFAZ John K, The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr*. 2019;7(1), str.1

<sup>12</sup> MINČÍK, Jozef. *Kariologie*. Praha: StomaTeam, 2014. ISBN 978-80-904377-2-2., str. 64

Speciálními přenašeči se tyto metabolity dostanou do intracelulárního prostoru, kde jsou dále štěpeny oligosacharidy na monosacharidy a jsou fosforylovány na fruktosa-6-fosfát, který je výchozí sloučeninou pro glykolýzu. Produktem glykolýzy jsou organické kyseliny, zejména kyselina mléčná. Z fruktosa-6-fosfátu se tvoří také glukosamin-6-fosfát, který představuje zásobárnu energie pro *S. mutans* v časech hladovění<sup>13</sup>. (Obr. 1)

**Obrázek 1:** Schéma metabolismu sacharidů bakterie *Streptococcus mutans*



Zdroj: Lemos James A., Palmer Simon R., Zeng Liu, Wen Zo T., Kajfasz John K., The. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr.* 2019 Jan;7(1) 1-18

<sup>13</sup> Lemos James A., Palmer Simon R., Zeng Liu, Wen Zo T., Kajfasz John K., The Biology of *Streptococcus mutans*, str. 1

## 1.2. Stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám

Antimikrobiální látky patří společně s dezinfekčními prostředky mezi chemické prostředky kontroly mikrobiálního růstu.

Důležitým kritériem pro zhodnocení účinku antimikrobiálních látek je jejich koncentrace a doba kontaktu. Účinek antimikrobiální látky pro bakterii může být letální (baktericidní) či způsobuje inhibici růstu (bakteriostatický).

Testování citlivosti je prováděno různými metodami:

- Kvantitativními:
  - Agarová diluční metoda
  - Mikrodiluční metoda
- Kvalitativními:
  - Diskový difúzní test
  - Kombinované testy
  - E-test

Díky těmto testům jsme schopni stanovit (MIC) antimikrobiální látky či dezinfekčního prostředku, která je schopná inhibovat růst bakterií. Hodnotu MIC udáváme v mg/l nebo µg/l. MBC je zase koncentrace látky, která usmrtí 99,9 % bakterií.

Metodiku stanovování MIC určuje The European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Stanovuje i tzv. breakpointy, což jsou hraniční hodnoty hladiny dané antimikrobiální látky v krevním séru. Tyto hodnoty společně s MIC pomáhají k určení citlivosti nebo rezistence bakterie k antimikrobiálním látkám<sup>14</sup>.

---

<sup>14</sup> BROOK, Itzhak, Hannah M. WEXLER a Ellie J. C. GOLDSTEIN. Antianaerobic Antimicrobials: Spectrum and Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. © [cit. 2020-02-21]. 2013 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3719496/>

## 1.2.1. Kvantitativní metody

### 1.2.1.1. Agarová diluční metoda

Tuto metodu provádíme na 12-15 agarových půdách vhodných pro konkrétní vyšetřovanou bakterii. V každé půdě je rozpuštěna jedna antimikrobiální látka. Jednotlivé půdy se liší koncentrací antimikrobiální látky a stoupají dvojnásobně.

Na agar je následně naočkováno standartní inokulum. Touto metodou lze tedy vyšetřit naráz 16-20 kmenů. Plotna, na které ještě došlo k zástavě růstu mikroba, odpovídá hodnotě MIC<sup>15</sup>.

### 1.2.1.2. Mikrodiluční metoda

Ke stanovení citlivosti bakterie touto metodou používáme mikrotitrační destičku s 96 jamkami. Tyto jamky jsou naplněny živným tekutým médiem (např. Müller-Hinton bujonem). V každém sloupci se nachází antimikrobiální látka s klesající koncentrací (od řádku A k řádku H). Tato koncentrace je s každým dalším řádkem dvojnásobně menší.

Zásadním krokem je příprava bakteriální suspenze ve fyziologickém roztoku o hodnotě 0,5 Mc Farlandovy optické denzity. Tato kultura se pomocí jehlového inokulátoru naočkuje do všech jamek mikrotitrační destičky. Následuje inkubace za podmínek vhodných pro daný bakteriální druh.

Pro odečítání výsledků umístíme destičku nad zrcátko či tmavou destičku a pozorujeme zákal media. Podle zákalu stanovíme MIC<sup>16</sup>.

---

<sup>15</sup> Skripta ke cvičení z mikrobiologie, [online]. MUNI IS © [cit. 2021-02-03],2020  
Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif>

<sup>16</sup> Skripta ke cvičení z mikrobiologie, [online]. MUNI IS © [cit. 2021-02-03],2020  
Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif>

## 1.2.2. Kvalitativní metody

### 1.2.2.1. Diskový difúzní test

V tomto testu využíváme papírové disky nebo tablety, které jsou nasycené určitým množstvím antimikrobiální látky. Díky této metodě můžeme dobře rozlišit citlivost a rezistenci bakterií k dané antimikrobiální látce. Na agar v Petriho misce se nanese vatovým tamponem rovnoměrně testované inokulum.

Po zaschnutí se na agar aplikuje disk s předepsaným množstvím antimikrobiální látky. Následně se plotna inkubuje dle podmínek konkrétní bakterie. Účinné látky z disku difundují do okolí a vznikají tzv. inhibiční zóny (IZ). Průměr této zóny se měří v mm a porovnává se s referenčními hodnotami dle EUCAST<sup>17</sup>.

## 1.2.3. Kombinované metody

### 1.2.3.1. E – test

Tato metoda v sobě kombinuje princip diskového difúzního testu a diluční metody. Na vhodný agar se aplikuje testované inokulum. Po zaschnutí se aplikuje tzv. proužek E – testu. Tento proužek je chemicky inertní 5 mm široký a 50 mm dlouhý a je nasycen antimikrobiální látkou.

Na něm je napsaný exponenciální gradient dané antimikrobiální látky a stupnice ředění dvojnásobnou geometrickou řadou. Antimikrobiální látka difunduje do okolí. IZ má tvar elipsy nebo obrácené kapky<sup>18</sup>.

---

<sup>17</sup> Skripta ke cvičení z mikrobiologie, [online]. MUNI IS © [cit. 2021-02-03],2020  
Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif>

<sup>18</sup> Skripta ke cvičení z mikrobiologie, [online]. MUNI IS © [cit. 2021-02-03],2020  
Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif>

### 1.3. Testované medicínsky významné léčivé rostliny

V dnešní době je v oblasti péče o dutinu ústní trendem návrat k lidovému léčitelství, které zahrnuje například používání bylin. Z tohoto důvodu je zajímavé zjistit, zda tradiční bylinky a odvary z nich budou mít srovnatelné účinky jako přípravky chemické a komerční.

#### 1.3.1. Heřmánek pravý (*Matricia chamomila*)

Heřmánek je jednoletá léčivá rostlina z čeledi hvězdnicovitých. Je bylinou přirozeně se vyskytující v jižní a východní Evropě (Příloha č.2)<sup>19</sup>.

Z rostliny se využívají usušené květy. Používá se pro své antiseptické a protizánětlivé účinky. Endogenním požitím se léčí obtíže spojené s bolestí břicha, silnou menstruací, při pomalém trávení, průjmu či nevolnosti. Výborné výsledky vykazuje při léčbě zánětů močových cest. Exogenně se používá na zanícenou pokožku, infekční kožní problémy, hemoroidy, na záněty úst, hrdla či očí<sup>20</sup>.

Silice heřmánku obsahují mnoho zajímavých terapeutických látek. Bylo nalezeno více než 120 sloučenin, patřících mezi sekundární metabolity. Patří mezi ně 28 terpenoidů, 36 flavonoidů a dalších 52 látek, mezi které patří kumariny a polyacetyleny<sup>21</sup>.

Potenciálně aktivní antimikrobiální látky jsou terpenoidy, spiroethery, flavonoidy a kumariny. Ukázalo se, že mají inhibiční účinky jak na gram-pozitivní, tak na gram-negativní bakterie<sup>22</sup>.

---

<sup>19</sup> MEHMOOD, Malik H., MUNIR, Siraj, KHALID, Uzair A., ASRAR, Mudassir, and GILANI, A. H. Antidiarrhoeal, antisecretory and antispasmodic activities of *Matricaria chamomilla* are mediated predominantly through K<sup>+</sup>-channels activation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, str. 631

<sup>20</sup> SINGH, Omar; KHANAM, Zakia; MISRA, Neelam. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviews*. 2011, **5**(9), s. 94

<sup>21</sup> SINGH, Omar; KHANAM, Zakia; MISRA, Neelam. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacogn Rev*, str. 82

<sup>22</sup> SHARIFI-RAD, Mehdi a Jolanta NAZARUK. *Matricaria* genus as a source of antimicrobial agents: From farm to pharmacy and food applications. *Elsevier*. 2018, **2018**(215), str.83

Heřmánek je významným zdrojem apigeninu, flavonoidu, který dokáže selektivně inhibovat enzymy v signalizačních kaskádách a potlačit tak tvorbu protoonkogenů<sup>23</sup>.

### 1.3.2. Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*)

Šalvěj lékařská je aromatickou rostlinou z čeledi hluchavkovitých a používá se v kosmetickém průmyslu, gastronomii a v tradiční medicíně. Existuje mnoho druhů, nejčastěji kultivovaná je však *Salvia officinalis* (Příloha č.5)<sup>24</sup>.

Tato bylina vykazuje výborné antibakteriální vlastnosti, zejména ve svých odvarech. Má také významnou antioxidační aktivitu a uvádí se, že napomáhá v boji s rakovinou a demencí či zmírňuje bolest<sup>25</sup>.

Výplachy z šalvěje se často používají při zánětu dásní, aftách a otocích v dutině ústní<sup>26</sup>.

Extrakt z této rostliny vykazuje pro-apoptotický a inhibiční účinek na rakovinné bujení. Jako nejúčinnější látky se uvádějí  $\alpha$ -humelen, malool, kyselina ursolová, kyselina rozmarýnová a polyfenoly<sup>27</sup>.

Vodné roztoky šalvějových listů vykazaly účinnost v redukci volných radikálů jako  $\text{NO}^*$   $\text{O}_2^*$  či redukují  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$ , které vznikají v těle při nadměrném vystavení stresu, kdy se generuje velké množství volných radikálů v elektronově transportním řetězci mitochondrií<sup>28</sup>.

Listy šalvěje pomáhá při zánětech a při potlačení bolesti, například při periferní neuropatii způsobené chemoterapií či při faryngitidě. Za sloučeniny,

---

<sup>23</sup> MCKAY, Diane a Jeffrey BLUMBERG. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea. *Phytoterapy research*. 2006, **2006**(20), str.251

<sup>24</sup> PEREIRA Olívia R., CATARINO Marcelo D., AFONSO Andrea F., SILVA Artur M.S., CARDOSO Susana M. *Salvia elegans*, *Salvia greggii* and *Salvia officinalis* Decoctions: Antioxidant Activities and Inhibition of Carbohydrate and Lipid Metabolic Enzymes. *Molecules*. 2018, **23**(12), str. 1-3

<sup>25</sup> PEREIRA Olívia R., CATARINO Marcelo D., AFONSO Andrea F., SILVA Artur M.S., CARDOSO Susana M. *Salvia elegans*, *Salvia greggii* and *Salvia officinalis* Decoctions: Antioxidant Activities and Inhibition of Carbohydrate and Lipid Metabolic Enzymes. *Molecules*, str. 2

<sup>26</sup> Kloktání Šalvěje [online]. ČESKÁ ORDINACE © [cit. 2021-03-29]. 2009 Dostupné z: <https://www.ceskaordinace.cz/kloktani-salveje-ckr-1057-9626.html>

<sup>27</sup> PEREIRA Olívia R., CATARINO Marcelo D., AFONSO Andrea F., SILVA Artur M.S., CARDOSO Susana M. *Salvia elegans*, *Salvia greggii* and *Salvia officinalis* Decoctions: Antioxidant Activities and Inhibition of Carbohydrate and Lipid Metabolic Enzymes. *Molecules*, str. 4

<sup>28</sup> LOPRESTI, Adrian. L. (2016). Salvia (Sage): A Review of its Potential Cognitive-Enhancing and Protective Effects. *Drugs in R&D*, **17**(1), str. 62

kteřé způsobují tento efekt jsou považovány flavonoidy a terpeny, kyselina rozmarýnová, manool, karnosol a kyselina ursolová<sup>29</sup>.

Antiseptický účinek vykazuje tato bylina vůči grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Za tuto vlastnost jsou zodpovědní karsonol, kyselina ursolová a kyselina oleanová<sup>30</sup>.

### 1.3.3. Řepík lékařský (*Agrimonia eupatoria*)

Řepík lékařský je léčivá bylina patřící do čeledi růžovitých. Nacházíme ji ve velké části Evropy, jihovýchodní Asii, Severní Americe a Mexiku (Příloha č.1)<sup>31</sup>.

Tato bylina je známá pro své antiflogistické, vysušující, hepatoprotektivní a hypoglykemické účinky<sup>32</sup>. Tlumí bolest zanícených dásní a hrdla, hojí ústní sliznice a dásně<sup>33</sup>.

Hlavními účinnými látkami jsou polyfenoly katechin, procyanidin, flavonoly a flavonové deriváty. Polyfenoly vykazují antioxidační vlastnosti a dokáží ovlivnit intracelulární redoxní status tím, že pomáhají imunitnímu systému vychytávat volné radikály. *In vivo* studie ukázala, že tyto sloučeniny mají vliv na průběh mnohých nemocí, při kterých je přítomný záněť<sup>34</sup>.

Dále má diuretické a urinosurické vlastnosti. Alkoholovo-vodný extrakt vykazuje inhibiční aktivitu na růst bakterie *Helicobacter pylori*<sup>35</sup>.

### 1.3.4. Prha arnika (*Arnica montana*)

Prha arnika neboli také Arnika horská je bylina z čeledi hvězdnicovitých, užívaná v lidovém léčitelství. Vyskytuje se zejména v Evropě (Příloha č.3). Je

---

<sup>29</sup> JAKOVLJEVIC, Martina, Stela JOKIC a Maja MOLNAR. Bioactive profile of various salvia officinalis L. preparation. *Plants*. 2013, **8**(55), str. 7

<sup>30</sup> GHORBANI, Ahmad a Mahdi ESMAELIZADEH. Pharmacological properties of Salvia officinalis and its components. *Elsevier*. 2017, **2017**(7), str. 433-440

<sup>31</sup> *Řepík lékařský* [online]. ATLAS ROSTLIN © [cit. 2015-01-11]. Dostupné z: <http://kvetena.cz/herbarium/herbarium.aspx?majorcat=1x>

<sup>32</sup> KUCZMENNOVA A, GÁL P, VARINSKÁ L, TREML J, KOVÁČ I, NOVOTNÝ M, Agrimonia eupatoria L. and Cynara cardunculus L. Water Infusions: Phenolic Profile and Comparison of Antioxidant Activities. *Molecules*. 2015;**20**(11): str. 20539-20542

<sup>33</sup> *Řepík lékařský* [online]. ATLAS ROSTLIN © [cit. 2015-01-11]. Dostupné z: <http://kvetena.cz/herbarium/herbarium.aspx?majorcat=1x>

<sup>34</sup> CORREIA, Helena S. a Maria Teresa BATISTA. The activity of an extract and fraction of Agrimonia eupatoria L. against reactive species. *BioFactors*. 2007, **2007**(29), 91-104., str. 92

<sup>35</sup> AKBAR, Shahid. *Handbook of 200 Medicinal Plants*. Stockton: Springer, str. 121

to léčivá rostlina používaná pro své protizánětlivé, antifungicidní, antisklerotické, antioxidační a hojivé účinky. Tyto účinky se využívají i při léčbě zánětů či hojení v dutině ústní<sup>36</sup>.

Obsahuje přes 37 účinných sloučenin. Patří mezi ně seskviterpeny, flavonoidy, terpenoidy, fenolové kyseliny<sup>37</sup>.

Za protizánětlivý účinek mohou seskviterpenové laktony, které signifikantně snižují zánět, jenž je zprostředkován pomocí proteinového komplexu NF $\kappa$ B. Tento komplex aktivuje buňky imunitního systému – T buňky, B buňky a epitelální buňky. Polysacharidy obsažené v arnice jsou známy svou immunostimulační schopností, navýšením fagocytózy granulocyty a aktivací makrofágů k uvolnění tumor necrosis faktoru (TNF)<sup>38</sup>.

Antimikrobiální účinek vykazuje vůči streptokokům *S. sobrinus*, *S. mutans*. Zodpovědné za to jsou deriváty thymolu obsažené v kořeni rostliny. Její akoholový extrakt z kořenů zas působí fungicidně<sup>39</sup>.

### 1.3.5. Měsíček lékařský (*Calendula officinalis*)

Měsíček lékařský je léčivá rostlina z čeledi hvězdčovitých. Jejím přirozeným habitatem je jih Evropy a Orientu. Jako ostatní výše zmíněné rostliny, i měsíček je používán v tradiční medicíně a je součástí jak farmaceutického, tak kosmetického průmyslu (Příloha č.4)<sup>40</sup>.

Měsíček lékařský má protizánětlivé, antibakteriální, antivirové a antispasmodické účinky. Pomáhá v hojení ran, popálenin, vyrážek, zánětu v dutině ústní či hrdle<sup>41</sup>.

---

<sup>36</sup> JANČA, Jiří; ZENTRICH, Josef A. Herbář léčivých rostlin 1. díl. Praha: Eminent, 2008. ISBN 978-80-7281-365-0., str.94

<sup>37</sup> SUGIER Piotr, JAKUBOWITZ-Gil Joanne, SUGIER Danuta, KOWALSKI Radoslaw, GAWLIK-DZIKI Urszula, KOŁODZIEJ Barbara, DZIKI Dariusz. Chemical Characteristics and Anticancer Activity of Essential Oil from *Arnica Montana* L. Rhizomes and Roots. *Molecules*. 2020 ;**25**(6), str. 3-6

<sup>38</sup> BELLAVITE, Paolo, MARZOTTO, Marta, & BONAFINI, Clara Arnica montana experimental studies: confounders and biases? *Journal of Integrative Medicine*, (2018). **16**(2), str.2

<sup>39</sup> KRIPLANI, Priyanka, GUARVE Kumar a BAGHAEL Uttam S.. Arnica montana L. – a plant of healing: review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **2017**, str. 6-10

<sup>40</sup> Měsíček lékařský, [online]. BYLINKOPEDIE© [cit. 2021-01-16]. Dostupné z: <https://bylinkopedie.cz/mesicek-lekarsky/>

<sup>41</sup> CRUCERIŮ Daniel, BALASCENCU Ovidiu, RAKOSY Elena. Calendula officinalis: Potential Roles in Cancer Treatment and Palliative Care. *Integr Cancer Ther*. str. 2-8

Hlavními sekundárními metabolity jsou saponiny, kyselina oleanová a flavonoidy (astragalín, hyperosid, isoquercitrin a rutin). Dalšími jsou karotenoidy jako flavoxanthin a auroxanthin. Za hlavní účinné látky jsou považovány triterpendiolové estery faradiol laureát, faradiol myristát a faradiol palmitát. Méně významnými látkami jsou steroidy, ostatní terpenoidy, tokoferoly, chininy, polysacharidy a některé minerály jako vápník, sodík, draslík, hořčík, železo a měď<sup>42</sup>.

Extrakt z měsíčku lékařského vykazuje i výraznou cytotoxickou aktivitu a jsou nadějně v léčbě rakoviny<sup>43</sup>.

#### **1.4. Chlorhexidin – chemický prostředek kontroly zubního plaku**

Chemické prostředky pro kontrolu zubního plaku musí splňovat následující požadavky: zvyšovat odolnost tvrdých zubních tkání, likvidovat již vytvořený plak, usnadnit mechanické odstraňování plaku a v neposlední řadě i snížit škodlivost plaku. Aby si pacient byl schopný aplikovat tuto látku dlouhodobě sám, nesmí mít chemická látka žádné nežádoucí vedlejší účinky<sup>44</sup>.

Velice účinným prostředkem v kontrole zubního plaku je Chlorhexidin diglukonát. Je to zatím jediná známá látka, která má takové antibakteriální schopnosti, že za určitých okolností je schopna nahradit mechanické čištění zubů<sup>45</sup>.

Má velkou afinitu k buněčným stěnám mikroorganismů a podle použité koncentrace působí buď bakteriostaticky, nebo baktericidně. Rozpouští se ve vodě, k výplachu úst se používá v koncentracích 0,05 % až 0,2 %. Při použití slabších koncentrací 2x denně zabraňuje tvorbě nového plaku a znatelně redukuje zralý plak<sup>46</sup>.

---

<sup>42</sup> BRAUN, L. a COHEN M. *Herbs and Natural Supplements: Volume 2: An Evidence-Based Guide*. 4. Chatswood: Elsevier Health Sciences, 2015. ISBN 9780729581738., str. 136

<sup>43</sup> CRUCERIU Daniel, BALASCENCU Ovidiu, RAKOSY Elena. *Calendula officinalis: Potential Roles in Cancer Treatment and Palliative Care. Integr Cancer Ther.* str. 2-8

<sup>44</sup> KILIAN, Jan. *Prevence ve stomatologii*. 2. rozš. vyd. Praha: Galén, c1999. ISBN 80-7262-022-3. str. 64

<sup>45</sup> KILIAN, Jan. *Prevence ve stomatologii*, str. 73

<sup>46</sup> HAYDARI, Maliha, BARDAKCI, Ayse G., KOLDSLAND, Odd C., AAS, Anne M., SANDVIK, Leiv, & PREUS, Hans R. Comparing the effect of 0.06% -, 0.12% and 0.2% Chlorhexidine on plaque, bleeding and side effects in an experimental gingivitis model: a parallel group, double masked randomized clinical trial. *BMC Oral Health*, (2017), 17(1). str. 2

Soli Chlorhexidinu zůstávají v ústech i několik hodin až dní a udržují povrch zubu prostý plaku po delší dobu. Dlouhodobější používání Chlorhexidinu diglukonátu má však vedlejší účinky. Hřbet jazyka a zuby se zabarvují do hněda, vyvolává chuťové poruchy a přetrvávající pocit hořké chuti. Po okamžitém vysazení tyto nechtěné účinky samovolně vymizí<sup>47</sup>.

## 1.5. Testované ústní vody

V této bakalářské práci byly použity následující čtyři ústní vody: Herbadent professional, Elmex caries protection, Curaprox Perio Plus+ Balance, Listerine total care. Tyto přípravky jsou dostupné běžnému uživateli. Kromě Curaprox Perio Plus 0,05 % Balance, neobsahuje ani jedna z nich Chlorhexidin diglukonát.

Naším záměrem bylo zjištění účinnosti těchto ústních vod vůči bakterií *S. mutans*.

### 1.5.1. Herbadent professional – koncentrát bylinné ústní vody

Ústní voda Herbadent professional vyrábí česká firma Herbadent (Praha). Tato ústní voda obsahuje Šalvěj lékařskou, Řepík lékařský, Mátu pepřnou, Fenykl obecný, Heřmánek pravý, Hřebíček a Mochnu nátržník, a naopak neobsahuje fluoridy či Chlorhexidin. Extrakt z bylin pomáhá v léčbě zánětu dásní a parodontitidy.

Používání ústní vody Herbadent je vhodné před stomatologickým ošetřením pro omezení počtu bakterií v ústech nebo po ošetření na zklidnění sliznic a pro snížení rizika bakteriémie po zákroku. Zředí se v poměru 1:10<sup>48</sup>.

---

<sup>47</sup> KILIAN, Jan. *Prevence ve stomatologii*, str. 73

<sup>48</sup> Herbadent e-shop [online]. HERBADENT: © [cit. 2021-04-12] 2021 Dostupné z: <https://shop.herbament.cz/>: Herbadent [online]. [cit. 2021-01-15]. Dostupné z: <http://www.herbament-professional.cz/>

### 1.5.2. Elmex caries protection

Ústní voda Elmex caries protection neobsahuje alkohol ani barviva. Složení této ústní je voda, propylen glykol, PEG-40 hydrogenovaný Castor Oil, Olafur (obsah fluoridů 1400 ppm), glycerin, benzoát sodný, kyselina levulonová, levulinát sodný, aroma, sacharin, fluorid sodný, anisát sodný. Anisát sodný, kyseliny levulonová a levulinát sodný jsou látky, které inhibují růst bakterií<sup>49</sup>.

### 1.5.3. Curaprox Perio Plus 0,05 % Balance

Přírodní složky obsažené v sérii ústních vod Perio Plus+ jsou velmi účinné v boji proti bakteriálnímu plaku i pro ochranu zubů a dásní před onemocněním dutiny ústní, jako je zubní kaz nebo onemocnění parodontu. Ústní voda Curaprox Perio Plus 0,05 % Balance obsahuje Chlorhexidin v koncentraci 0,05 %, xylitol, PVP – VA, 230 ppm fluoridů a polypeptid lysin, fluorid sodný a CITROX®.

Používá se k vyplachování dvakrát denně 10 ml po 60 sekundách. Tato ústní voda jako jediná obsahuje Chlorhexidin diglukonát a sloužila nám jako zástupce ústních vod s touto látkou<sup>50</sup>.

### 1.5.4. Listerine Total Care

Účinnou složkou v ústních vodách Listerine jsou esenciální oleje. Společně s Chlorhexidinem diglukonátem jsou esenciální oleje jako jediné uznávané společností ADA (American Dental Association)<sup>51</sup> jako látky pomáhající v boji se zubním plakem. Základními složkami těchto olejů je eukalyptol, thymol, mentol a metyl salicylát.

Tato ústní voda obsahuje fluoridy v množství 220 ppm, dále vodu, sorbitol, alkohol, poloxamer 407, aroma, kyselinu fosforečnou a sukralosu. Eliminuje výskyt zubního plaku, udržuje zdravé dásně, ničí bakterie

---

<sup>49</sup> *Elmex anti caries dental rinse [online]. ELMEX © [cit. 2021-01-15]. 2020, Dostupné z: <https://www.elmex.cz/products/product-range/caries-protection/elmex-anti-caries-dental-rinse>*

<sup>50</sup> *Curaprox Perio Plus Balanced [online]. CURAPROX © [cit. 2021-01-15]. Dostupné z: <https://www.curaprox.com/cz-cs/perio-plus>*

<sup>51</sup> *Mouthrinse [online]. ADA © [cit. 2021-02-03]. Dostupné z: <https://www.ada.org/en/member-center/oral-health-topics/mouthrinse>*

v mezizubním prostoru, posiluje zubní sklovinu a zabraňuje její demineralizaci. Ústní voda se používá každé ráno a večer po vyčištění zubů, vyplachuje se 20 ml po dobu 30 sekund<sup>52</sup>.

---

<sup>52</sup> *Listerine total care anticavity mouthwash* [online]. LISTERINE © [cit. 2021-01-15]. Dostupné z: <https://www.listerine.com/mouthwash/listerine-total-care/listerine-total-care-anticavity-mouthwash>

## 2. PRAKTICKÁ ČÁST

### 2.1 Hypotézy

**Hypotéza č. 1:** Vzhledem k běžně dostupným údajům o antiseptickém účinku vybraných medicínsky významných léčivých rostlin předpokládáme, že budou mít baktericidní nebo bakteriostatický účinek na bakterii *S. mutans*.

**Hypotéza č.2:** Vzhledem k informacím dostupným v příbalových letácích ústních vod předpokládáme, že koncentrace Chlorhexidinu diglukonátu 0,05 % bude inhibovat růst bakterie *S. mutans*.

**Hypotéza č. 3:** Vybrané ústní vody ve svých příbalových letácích deklarují léčbu zánětu dásní či ochranu před zubním kazem. Lze teda předpokládat, že budou mít bakteriostatický nebo baktericidní účinek na bakterii *S. mutans*.

## 2.2. Metodika

Pro zodpovězení hypotéz byla vybrána metoda Stanovení minimální inhibiční koncentrace podle ČSN EN ISO 20776-1 a upravena pro potřeby tohoto výzkumu.

Pro expoziční test byl použit poupravený postup podle standardní metody pro hodnocení dezinfekční účinnosti chemických látek podle Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica<sup>53</sup>. V těchto testech stanovujeme hodnotu MIC a MBC.

Fotografická dokumentace se nachází v Příloze č.6 - č.12.

### 2.2.1. Stanovení minimální inhibiční koncentrace potenciálně antimikrobiálních látek vůči bakterii *S. mutans*

U vybraných bylinných extraktů se stanovovaly MIC (dle ČSN EN ISO 20776)<sup>54</sup> Principem je postupné ředění testované látky v jamkách mikrotitrační destičky. Každá následující koncentrace je poloviční než koncentrace předchozí, jedná se tedy o ředění geometrickou řadou.

V každém testování musí být pozitivní kontrola růstu bakterie (zde *S. mutans*), kdy jamka na mikrotitrační destičce obsahuje pouze živné médium a testovaný mikroorganismus bez testované látky.

### 2.2.2. Stanovení účinnosti ústních vod – expoziční test

Jedná se o kvalitativní metodu, která umožňuje stanovit nejkratší dobu účinné expozice dezinfekce (zde ústních vod) na vybrané bakterie. Tuto metodu lze použít pro srovnání různých přípravků s předpokládaným antibakteriálním účinkem.

Principem této metody je expozice bakterie a dezinfekčního přípravku či antimikrobiální látky. Po určitých časech se odeberou ze zkumavky vzorky

---

<sup>53</sup> KNEIFLOVÁ, Jana. 84-19611. Příloha č. 1/1985 Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica: Standardní metody pro hodnocení dezinfekční účinnosti chemických látek. Praha: Institut hygieny a epidemiologie, 1985, 25 s. ISSN 0862-5956. ÚVTEI 73 027

<sup>54</sup> ČSN EN ISO 20776 1: Klinické laboratorní zkoušky a zkušební systémy pro diagnostiku in vitro – Zkoušení citlivosti původců infekcí a hodnocení účinnosti prostředků pro stanovení antimikrobiální citlivosti - Část 1: Referenční metody pro zkoušení aktivity antimikrobiálních činidel in vitro proti rychle rostoucím aerobním bakteriím způsobujícím infekční nemoci. PRAHA: CEN, 2007.

testované suspenze a kultivují se podle podmínek daných specifické bakterii. Po inkubaci se odečítá zákal v jednotlivých zkumavkách a hodnotí se, zda má dezinfekční prostředek či antimikrobiální látka na bakterii bakteriostatický či baktericidní účinek.

Po kultivaci se sleduje růst nebo naopak nepřítomnost růstu použité bakterie (stanovení MBC)<sup>55</sup>.

## **2.3. Materiál**

### **2.3.1. Vzorky bylin**

Všechny zkoumané byliny byly zakoupeny od firmy Valdemar Grešík v balení po 50 g, v běžné obchodní síti. Byly skladovány na suchém a tmavém místě a testování proběhlo před ukončením jejich data spotřeby. Byly to konkrétně:

- Heřmánek pravý, květ
- Měsíček lékařský, květ bez zákrytu
- Prha arnika, květ
- Řepík lékařský, nať
- Šalvěj lékařská, nať

### **2.3.2. Chemikálie**

Destilovaná voda, fyziologický roztok, Chlorhexidin diglukonát (20% vodný roztok, Sigma Aldrich), Herbadent Professional, Elmex caries protection, Listerine total care, Curaprox Perio Plus 0,05 % Balance

---

<sup>55</sup>KNEIFLOVÁ, Jana. 84-19611. Příloha č. 1/1985 Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica: Standardní metody pro hodnocení dezinfekční účinnosti chemických látek. Praha: Institut hygieny a epidemiologie, 1985, 25 s. ISSN 0862-5956. ÚVTEI 73 027.

### **2.3.3. Bakterie**

*Streptococcus mutans* Clarke, kmen z České národní sbírky typových kultur (CNCTC) uchovávaný pod číslem 6699T (další sbírková označení bakterie ATCC 25175, NCTC 10449)

### **2.3.4. Přístroje:**

Laboratorní předvážky (Kern)

Box s laminárním prouděním (Clean Air)

Termostat  $36 \pm 1$  °C (Thermo Scientific)

Čajové filtry, (Profissimo)

Rychlovarná konvice

Kahan (FUEGO)

Vortex (VELP Scientifica)

Mikrobiologická klička (Hebios)

Automatická pipeta (Eppendorf)

Inokulátor (Biotec.de)

Nástavec na skleněné pipety (Hi-Tech Lab)

Laboratorní sklo a pomůcky (kádinky, petriho misky, mikrotitrační destička, skleněné pipety)

Sterilní jednorázové stříkačkové filtry (0,2 µm)

Sterilní jednorázové mikrobiologické kličky 1µl (Hebios)

Zákalový standard podle Mc Farlanda č. 2 (Státní zdravotní ústav)

### **2.3.5. Kultivační půdy**

#### **2.3.5.1. Bujon**

Müller–Hinton bujón s upravenými kationty ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) s 5 % lyzátu koňské krve a 20 mg/l  $\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotidu (MH-F bujón) – příprava podle postupu výrobce sušiny (Oxoid), normy ISO 20776-1 a dokumentu EUCAST – Příprava půd EUCAST (The European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing), rozplněný do zkumavek po 5 ml.

### **2.3.5.2. Agar**

Columbia krevní agar s přidáním 5 % defibrinované ovčí krve v Petriho miskách (Oxoid)

## **2.4. Stanovení minimální inhibiční koncentrace látek vůči bakterii *Streptococcus mutans***

### **2.4.1. Příprava Müller-Hinton bujonu**

Müller-Hinton bujon s upravenými kationty se připraví a autoklávuje podle pokynů výrobce. Na 1 l půdy se přidává o 100 ml méně deionizované vody (900 ml), půda se ochladí na teplotu 42–45 °C a následně se přidá 100 ml 5 % lyzované koňské krve a 1 ml zásobního roztoku  $\beta$  – NAD (20 mg/l). Směs se dobře promíchá.

### **2.4.2. Příprava inokula a jeho standartizace**

Použitý mikroorganismus *S. mutans* je uchováván v konzervačním médiu a uložen při - 80 °C. Pomocí bakteriologické kličky byl z konzervačního média odebrán cca 1  $\mu$ l a pomocí křížového roztěru byla bakterie naočkována na Columbia agar. Kultivace probíhala v termostatu při  $35 \pm 1$  °C, 24 hodin. Po kultivaci byla zkontrolována čistota bakterie.

Příprava inokula byla provedena metodou suspendovaných kolonií. Vyrostlé kolonie bakterie *S. mutans* na Columbia agaru byly pomocí mikrobiologické kličky přeneseny do fyziologického roztoku. Pomocí McFarlandovi stupnice byla určena hodnota 2, což odpovídá počtu  $6 \times 10^8$  CFU/ ml. Pro potřeby kontrolního vzorku se připravené inokulum zředilo na  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml.

Kontrola růstu byla připravena napipetováním 0,5 ml inokula o koncentracích  $10^{-6}$  a  $10^{-8}$  CFU/ml na Columbia agar v Petriho misce. Ta byla dána do inkubátoru o teplotě  $35 \pm 1$  °C.

### 2.4.3. Příprava Chlorhexidinu

Vstupní koncentrace Chlorhexidin diglukonátu byla 20 %. Naředěním vstupní koncentrace Chlorhexidinu diglukonátu destilovanou vodou 1:10 (1 ml Chlorhexidinu diglukonátu a 9 ml destilované vody) byla připravena výchozí 2% koncentrace.

Pomocí křížového pravidla byly spočítány a do zkumavek naředěny sestupné koncentrace použité v testu (viz. Tabulka č. 1). Použité koncentrace odpovídaly koncentracím Chlorhexidinu diglukonátu běžně dostupného v ústních vodách, ale byly připraveny i koncentrace nižší. Ředění ze zásobního roztoku se provádělo MH-F bujonem.

Po promíchání obsahu zkumavek bylo do každé přidáno 100 ml Chlorhexidinu diglukonátu do příslušných řádků v mikrotitrační destičce. V řádku A byla pak koncentrace nejvyšší a postupně se snižovala (Tab. č.1). Řádek H sloužil jako kontrola růstu bakterie. Testování proběhlo v tripletech.

**Tabulka 1:** Testované koncentrace Chlorhexidinu diglukonátu

Testovaná koncentrace CHX	Ředění (ml)	
	2 % CHX	MH-F bujón
0,12 %	0,12	1,88
0,09 %	0,09	1,91
0,07 %	0,07	1,93
0,05 %	0,05	1,95
0,025 %	0,025	1,975
0,010 %	0,010	1,990
0,005 %	0,005	1,995

Zdroj: autorka

### 2.4.4. Příprava vodných extraktů testovaných léčivých rostlin

Vodné extrakty léčivých rostlin z Prhy arniky, Měsíčku lékařského, Heřmánku pravého a Řepíku lékařského byly připraveny podle maximálního dávkování doporučeného výrobcem (firmou Grešík) pro nálev – 2 čajové lžičky spařit 250 ml horké vody a louhovat 15 minut.

Vodný extrakt Šalvěje lékařské byl připraven o silnější koncentraci podle doporučení dávkování pro kloktadlo – 4 čajové lžičky spařit 250 ml horké vody a louhovat 15 minut.

U jednotlivých léčivých rostlin bylo zjištěno množství v gramech zvážením množství byliny odpovídající 1 čajové lžičce. Následně byl proveden přepočítav navážky jednotlivých léčivých rostlin na 100 ml vody.

Z důvodu následné potřeby naředění vodného extraktu rostlin MH-F bujónem při přípravě mikrotitrační destičky byla připravena 10x vyšší navážka testovaných bylin. Navážky v gramech a desetinásobné vstupní koncentrace jsou uvedeny v Tabulce č.2.

**Tabulka 2:** Navážky na přípravu vodných extraktů léčivých rostlin

<b>Léčivá rostlina</b>	<b>Navážka (g)</b>	<b>Voda (ml)</b>	<b>Vstupní koncentrace (mg/l)</b>
Prha arnika	5,2	100	52 000
Šalvěj lékařská	26,4	100	264 000
Měsíček lékařský	4,8	100	48 000
Heřmánek pravý	8,8	100	88 000
Řepík lékařský	13,2	100	132 000

Zdroj: autorka

Vypočítané a navážené množství testované léčivé rostliny bylo zalito 100 ml vroucí destilované vody a louhováno podle doporučeného postupu 15 minut.

Pro odstranění velkých částí rostliny byl pro první nesterilní filtraci použit běžný čajový filtr. Po zchlazení nesterilního vodného extraktu bylin byla pomocí injekční stříkačky a stříkačkového filtru o velikosti pórů 0,2 µm provedena sterilní filtrace.

Naředěním sterilních vodných extraktů testovaných rostlin MH-F bujónem 1:10 (1 ml vodného extraktu vstupní desetinásobné koncentrace byl smíchán s 9 ml MH-F bujónu) byla do sterilních zkumavek připravena výchozí nejvyšší koncentrace bylin doporučená k užití.

Jednotlivé koncentrace vodných extraktů byly naředěny pomocí sériového ředění. Do každého řádku A až H bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  MH-F bujónu. Do řádků A až B bylo přeneseno 100  $\mu\text{l}$  extraktu s nejvyšší doporučenou výslednou koncentrací léčivé rostliny. Dále se promícháním a přenesením 100  $\mu\text{l}$  z řádku B do řádku C mikrotitrační destičky provedlo naředění extraktu na poloviční koncentraci. Tak bylo provedeno ve všech dalších řádcích D až G. V řádku H byl pouze MH-F bujón a sloužil jako kontrola růstu bakterie. Každá léčivá rostlina byla testována v tripletu.

#### **2.4.5. Inokulace mikrotitrační destičky**

Jehlovým inokulátorem bylo do každé jamky přidáno 1-2  $\mu\text{l}$  připraveného inokula bakterie *S. mutans*. Po inokulaci byla destička naočkována bakteriemi během 30 minut od standartizace suspenze inokula, aby byla zachována početní koncentrace životaschopných buněk (Tab.č. 3).

Z jamky pro kontrolu růstu bylo odebráno 10  $\mu\text{l}$  suspenze a následně naředěno v 10 ml bujónu. Poté se 100  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku rozlilo na agarovou plotnu a nechalo inkubovat přes noc v  $35 \pm 1$  °C po dobu  $18 \pm 2$  hod v běžné atmosféře. Po kultivaci byl odečten růst v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky.

Konečné inokulum v mikrotitrační destičce musí obsahovat  $5 \times 10^5$  CFU/ml (rozmezí  $2 \times 10^5$  CFU/ml až  $8 \times 10^5$  CFU/ml). Kontrola počtu bakterií v inokulu byla provedena bezprostředně po inokulaci mikrotitrační destičky. Z jamky určené pro kontrolu růstu použitého mikroorganismu bylo odebráno 10  $\mu\text{l}$  a přeneseno do 10 ml fyziologického roztoku. Po promíchání bylo 100  $\mu\text{l}$  vyočkováno na Columbia agar. Petriho miska s agarem byla kultivována v termostatu při  $35 \pm 1$  °C, 24 hodin. Po kultivaci byly narostlé kolonie *S. mutans* spočítány.

**Tabulka 3:** Schéma inokulace mikrotitrační destičky

	<b>ARNIKA</b>	<b>ŠALVĚJ</b>	<b>MĚSÍČEK</b>	<b>HEŘMÁNEK</b>	<b>ŘEPÍK</b>	<b>CHLORHEXIDIN</b>
<b>A</b>	5200	26400	4800	8800	13200	0,12 %
<b>B</b>	2600	13200	2400	4400	6600	0,09 %
<b>C</b>	1300	6600	1200	2200	3300	0,07 %
<b>D</b>	650	3300	600	1100	1650	0,05 %
<b>E</b>	325	1650	300	550	825	0,025 %
<b>F</b>	162,5	825	150	275	412,5	0,010 %
<b>G</b>	81,25	412,5	75	137,5	206,25	0,005 %
<b>H</b>	KR	KR	KR	KR	KR	KR

Zdroj: autorka

Poznámky k tabulce č.: KR – kontrola růstu

## 2.5. Expoziční test

### 2.5.1. Příprava testovaných ústních vod

Do Erlenmayerových baněk bylo odměřeno 9,9 ml testované ústní vody. Ústní voda Herbadent professional byla testována jako koncentrát a také připravená k použití (ředěná 1:10, tedy 1 ml koncentrátu na 9 ml destilované vody).

### 2.5.2. Příprava inokula a jeho standartizace

Použitý mikroorganismus *S. mutans* je uchováván v konzervačním médiu a uložen při - 80 °C. Pomocí bakteriologické kličky byl z konzervačního média odebrán cca 1 $\mu$ l a pomocí křížového roztěru byla bakterie naočkována na Columbia agar. Kultivace probíhala v termostatu při 35  $\pm$  1 °C, 24 hodin. Po kultivaci byla zkontrolována čistota bakterie.

Vyrostlé kolonie bakterie *S. mutans* na Columbia agaru byly pomocí mikrobiologické kličky přeneseny do fyziologického roztoku. Zákal suspenze byl upraven tak, by odpovídal stupni č. 2 McFarlandova zákalového standardu. Takto připravená suspenze obsahuje přibližně 6 x 10<sup>8</sup> kolonie tvořících jednotek v 1 ml (CFU/ml).

Stanovení přesného počtu zárodků bylo provedeno zředovací metodou. Suspenze odpovídající stupni č. 2 McFarlandova zákalového standardu byla naředěna fyziologickým roztokem na  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  a  $10^{-8}$ . Z posledních 2 ředění bylo vyočkováno 0,5 ml na 2 Petriho misky s Columbia agarem. Petriho misky s agarem byly dále kultivovány v termostatu při  $35 \pm 1$  °C, 24 hodin. Po kultivaci byly spočítány narostlé kolonie bakterie *S. mutans* a stanoven počet CFU/ml v použité bakteriální suspenzi.

### 2.5.3. Provedení testu

Do zkumavky bylo napipetováno 9,9 ml testované ústní vody a bylo přidáno inokulum bakterie *S. mutans* odpovídající stupni č.2 McFarlandova zákalového standardu v množství 0,1 ml.

Expoziční čas byl stanoven na 30 s, 60 s (což je doporučená doba použití ústní vody) a dále na 30 minut a 60 minut. Po uplynutí těchto časů bylo odebráno ze zkumavky 10  $\mu$ l vzorku a naočkováno do zkumavky s 5 ml MH-F bujónu. Vzorky byly po ukončení expozice vyočkovány vždy do nové zkumavky s 5 ml MH-F bujónu (Tab.č.4)

Tabulka 4: Schéma expozičního testu

Zkumavka	Ústní voda	Bakteriální suspenze
1	Herbadent professional koncentrovaný 9,9 ml	0,1 ml
2	Herbadent professional ředěný 9,9 ml	
3	Elmex caries protection 9,9 ml	
4	Listerine total care 9,9 ml	
5	Curaprox Perio Plus 0,05 % Balance CHX 9,9 ml	

Zdroj: autorka

Zkumavky byly inkubovány v inkubátoru po dobu 24 hodin při teplotě  $35 \pm 1$  °C. Kontrolní zkumavka, která neobsahovala žádnou ústní vodu a sloužila ke kontrole růstu bakterie, obsahovala 5 ml bujónu a 10  $\mu$ l inokula naředěného fyziologickým roztokem na  $10^{-2}$ .

## Výsledky

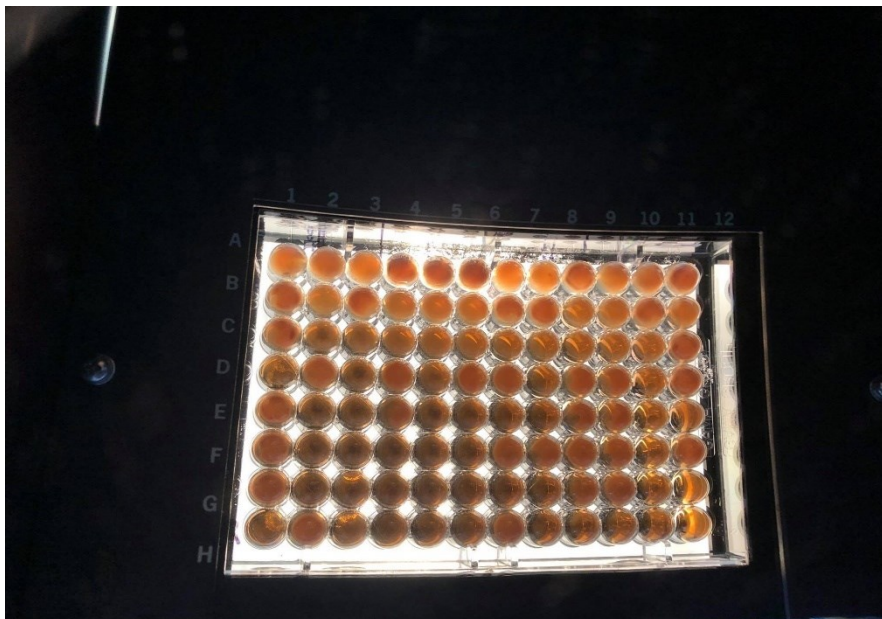
### Stanovení minimální inhibiční koncentrace látek vůči bakterii *Streptococcus mutans*

Díky dostatečnému růstu bakterie *S. mutans* v jamkách určených pro kontrolu růstu v řádku H destičky a vyhovujícímu počtu bakterií očkovaných do jamek  $4,2 \times 10^5$  CFU/ml mohla být odečtena MIC (zákal nebo nepřítomnost růstu) u testovaných medicínsky významných léčivých rostlin a Chlorhexidinu diglukonátu.

Ve všech jamkách byl zaznamenán růst (zákal), dokonce i v řádku s nejvyšší koncentrací A (Obr. č.2). Ani v jedné jamce tedy nedošlo k inhibici růstu bakterie. Lze předpokládat, že MIC je u vodných extraktů Řepíku lékařského vyšší než 13 200 mg/l, u Měsíčku lékařského vyšší než 4 800 mg/l, u Šalvěje lékařské vyšší než 26 400 mg/l, u Prhy arniky vyšší než 5 200 mg/l a u Heřmánku pravého je to vyšší než 8 800 mg/l.

U Chlorhexidinu diglukonátu nebyl zaznamenán růst ani v nejnižší testované koncentraci, stanovená MIC byla tedy nižší než 0,005 % (Obr.č. 3). Abychom zjistili, zda má Chlorhexidin diglukonát baktericidní či bakteriostatický účinek, byl celý obsah jamek s koncentrací 0,005 % (řádek G) vyočkován na Columbia agar. Petriho misky s agarem byly kultivovány v termostatu při  $35 \pm 1$  °C, 24 hodin. Po kultivaci nebyl na agarech zaznamenán růst použitého mikroorganismu *S. mutans*. Účinek Chlorhexidinu diglukonátu v koncentraci 0,005 % byl tedy baktericidní.

**Obrázek 2:** Mikrotitrační destička I. (Odečítání zákalu vodných extraktů heřmánku, šalvěje, arniky a měsíčku. Zákal vidíme ve všech jamkách, nedošlo tedy k inhibici růstu.)



Zdroj: archiv autorky

**Obrázek 3:** Mikrotitrační destička II (V prvních třech sloupcích, můžeme odečíst zákal extraktu řepíku: zde nedošlo k inhibici růstu. V posledních třech sloupcích jsou koncentrace Chlorhexidinu diglukonátu, které inhibovaly růst bakterie ve všech jamkách.)



Zdroj: archiv autorky

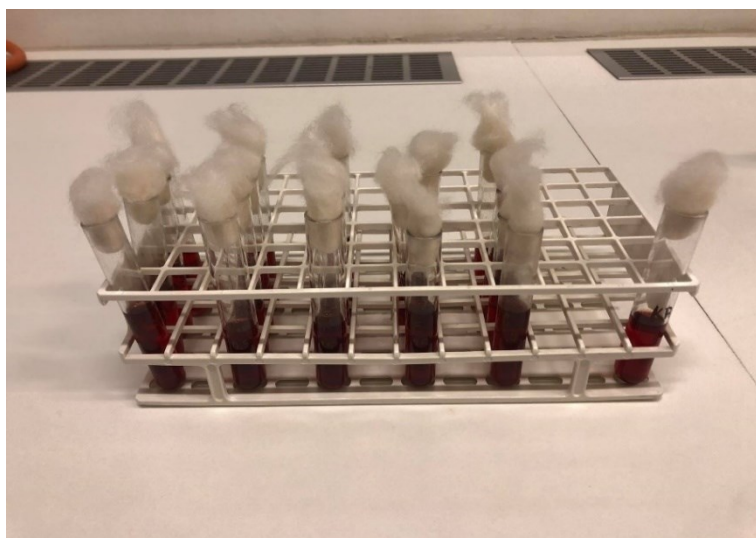
## Expoziční test

Počet CFU/ml bakterie *S. mutans* v inokulu odpovídal požadovanému limitu  $10^8 - 10^9$  CFU/ml ( $2,2 \times 10^9$  CFU/ml), kontrolní růst bakterie *S. mutans* ve zkumavce s 5 ml MH-F bujónu byl vyhovující (růst ve formě zákalu), proto bylo možné vyhodnotit vlastní expoziční test.

Po kultivaci nebyl nalezen zákal ani ve zkumavce s nejkratší dobou expozice. Následně bylo provedeno vyočkování 0,5 ml vzorku z každé zkumavky na Columbia agar pro zjištění baktericidního a bakteriostatického účinku. Petriho misky s agarem byly kultivovány v termostatu při  $35 \pm 1$  °C, 24 hodin (Obr.č. 4).

Testované ústní vody Elmex caries protection, Listerine total care, Curaprox Perio Plus 0,05 % Balance a koncentrát Herbadent professional nevykazovaly po kontrolním vyočkování na agary ani při nejkratší době expozice (30 sekund) růst zkoumaného mikroorganismu *S. mutans*. Jejich účinek byl baktericidní. Ústní voda Herbadent professional připravená k použití pro výplachy úst, tj. naředěná 1:10 vykazovala po kontrolním vyočkování na agar nárůst bakterie *S. mutans* po době expozice 30 s a 60 s. Z toho vyplývá, že účinek této ústní vody byl po době expozice 60 s a méně bakteriostatický. Po době expozice 30 minut a více již bakterie *S. mutans* na kontrolních agarech nerostla, účinek ústní vody byl již baktericidní.

**Obrázek 4:** Expoziční test – zkumavky s ústními vodami



Zdroj: archiv autorky

## Diskuze

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení možné MIC bylinných extraktů vybraných potenciálně léčivých rostlin Heřmánku pravého, Měsíčku lékařského, Prhy arniky, Řepíku lékařského a Šalvěje lékařské vůči bakterii *S. mutans*. Účinky těchto extraktů se dále porovnávaly s účinkem Chlorhexidinu diglukonátu. Vedlejším cílem práce bylo podrobení ústních vod expozičnímu testu také vůči bakterii *S. mutans*, a zjištění, zda mají baktericidní či bakteriostatický účinek.

Tato bakterie byla vybrána jako vhodný modelový organismus pro své dobré kultivační vlastnosti<sup>56</sup> a velký význam při tvorbě zubního kazu<sup>57</sup>.

Bakterie způsobující zánět dásní (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Agregobacter actinomycetemcomitan* a jiné) jsou velmi náročné na kultivaci a v rámci této bakalářské práce se proto netestovaly<sup>58</sup>.

Při stanovení MIC u bylinných extraktů studie uvádí, že extrakty těchto bylin jsou nejvíce účinné ve svých alkoholových roztocích<sup>59,60,61,62,63</sup>.

V této bakalářské práci nás zajímalo využití bylin, jakožto prostředků pro domácí použití, extrakty proto nemohly být připraveny rozpuštěním v alkoholu. Použití alkoholových extraktů by také mohlo vést k falešně pozitivním výsledkům, kde by inhibovala růst bakterie samotná koncentrace použitého alkoholu<sup>64</sup>.

Pro běžného uživatele bylin, je nejnadhnější cestou přípravy bylinného odvaru či výluhu macerace ve vodě. Bylinné extrakty řepíku, měsíčku, šalvěje,

---

<sup>56</sup> Vyšetření antimikrobiotické citlivosti bakterií [online]. SZU © [cit. 2021-02-03], Dostupné z <http://www.szu.cz/vysetreni-antibioticke-citlivosti-bakterii>

<sup>57</sup> MINČÍK, Jozef. *Kariologie*. str. 60-62

<sup>58</sup> PAGE Roy C. Gingivitis. *J Clin Periodontol*, 2018, **13**(5), str. 346-347

<sup>59</sup> PEREIRA Olivia R., CATARINA Marcelo D., ASONSO Andrea F., SILVA Artur M.S., CARDOSO Susana M., str. 1

<sup>60</sup> MEHMOOD, Malik H., MUNIR, Siraj, KHALID, Uzair A., ASRAR, Mudassir, & GILANI, A. H. Antidiarrhoeal, antisecretory and antispasmodic activities of *Matricaria chamomilla* are mediated predominantly through K<sup>+</sup>-channels activation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, str. 2

<sup>61</sup> AKBAR, Shahid. *Handbook of 200 Medicinal Plants*.str. 121

<sup>62</sup> KRIPLANI, Priyanka, GUARVE, Kumar a S. BAGHAEL, Uttam, Arnica montana L. – a plant of healing: review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **2017**, str. 8

<sup>63</sup> CRUCERIU Daniel, BALACESCU Ovidiu, RAKOSY Elena. *Calendula officinalis*: Potential Roles in Cancer Treatment and Palliative Care. *Integr Cancer Therapy*, str.5

<sup>64</sup> Can alcohol kill germs? *Healthline* [online] © [cit. 2021-03-01]. Dostupné z: <https://www.healthline.com/health/does-alcohol-kill-germs#can-it-kill-germs>

arniky a heřmánku byly v této bakalářské práci taktéž připraveny ve vodných roztocích, pro simulaci doma připravených odvarů či kloktadel.

U všech testovaných léčivých rostlin byl zaznamenán růst i v řádku s nejvyšší koncentrací vodného roztoku bylin. Ani v jedné jamce mikrotitrační destičky tedy nebyla pozorována inhibice růstu bakterie *S. mutans*. Hodnoty MIC byly u vodných roztoků bylin následovné: u Řepíku lékařského vyšší než 13 200 mg/l, u Měsíčku lékařského vyšší než 4 800 mg/l, u Šalvěje lékařské vyšší než 26 400 mg/l, u Prhy arniky vyšší než 5 200 mg/l a u Heřmánku pravého vyšší než 8 800 mg/l. Tyto výsledky platí pouze pro tuto bakterii a nejdou zobecnit na jiné bakterie, které se v dutině ústní nacházejí.

U stanovení MIC Chlorhexidinu diglukonátu jsme očekávali, že tato látka bude inhibovat růst testované bakterie<sup>65</sup>. Podle studií, inhibují růst i tak nízké koncentrace chlorhexidinu jako 2 µg/ml<sup>66</sup>. Při stanovení MIC jsme pozorovali inhibici růstu *S. mutans* ve všech použitých koncentracích, tedy i v koncentraci 0,005 %, která je nižší než koncentrace běžně používaná v ústních vodách. Tento výsledek je v souladu s literaturou, která uvádí, že i velmi nízké koncentrace Chlorhexidinu diglukonátu jako 0,06 % inhibují růst bakterií<sup>67</sup>.

Abychom zjistili, zda koncentrace 0,005 % má účinek baktericidní či bakteriostatická, vyočkovali jsme celý obsah této jamky na Columbia agar a nechali ho inkubovat 35 ± 1 °C, 24 hodin. Po uplynutí této doby nebyl na agaru zaznamenán růst použitého mikroorganismu *S. mutans*, účinek Chlorhexidinu diglukonátu byl tedy baktericidní.

V expozičním testu jsme chtěli zjistit, zda vystavení bakterie *S. mutans* vybraným ústním vodám povede k inhibici jejího růstu.

Použité ústní vody byly Herbadent professional (ředěný a koncentrovaný), Elmex carries protection, Listerine total care, Curaprox Perio Plus 0,05%

---

<sup>65</sup> HAYDARI, Maliha, BARDAKCI, Ayse G., KOLDSLAND, Odd C., AASS, Anne M., SANDVIK, Leiv, & PREUS, Hans R. Comparing the effect of 0.06% -0.12% and 0.2 % Chlorhexidine on plaque, bleeding and side effects in an experimental gingivitis model: a parallel group, double masked randomized clinical trial. *BMC Oral Health*, (2017), 17(1), str. 311

<sup>66</sup> SO YEON, Lee; SI YOUNG, Lee Susceptibility of Oral Streptococci to Chlorhexidine and Cetylpyridinium Chloride. *Biocontrol Science*, (2019). 24(1), str.18

<sup>67</sup> SREENIVASAN, Parvati. K., & GITTINS, Evelyn). Effects of low dose chlorhexidine mouthrinses on oral bacteria and salivary microflora including those producing hydrogen sulfide. *Oral Microbiology and Immunology*, str.10

Balance. V časech 30 s, 60 s, 30 min a 60 min byly odebrány vzorky z reakční zkumavky. Ani v jednom odebraném vzorku nebyl po inkubaci nalezen nárůst bakterie, ani u vzorků s nejkratší dobou expozice.

Pro kontrolu jsme vyočkovali množství 0,5 ml vzorku z každé zkumavky na Columbia agar a nechali inkubovat v termostatu při  $35 \pm 1$  °C, 24 hodin. Ani po inkubaci jsme u většiny zmíněných ústních vod nepozorovali růst bakterie *S. mutans* a to ani u nejkratší doby expozice 30 s. Účinek ústních vod byl baktericidní.

Jediná ústní voda – naředěný Herbadent professional 1:10 (připravený podle doporučení výrobce) vykazoval v době expozice 30 s a 60 s nárůst bakterie *S. mutans*. Z toho můžeme říct, že účinek této ústní vody je po době expozice 60 s bakteriostatický. V ostatních časech 30 min a 60 min již nebyl pozorován nárůst bakterie *S. mutans* a lze říci, že v těchto dobách expozice je ústní voda baktericidní. Výrobce na svých stránkách uvádí, že ředěním se zmenšují antibakteriální účinky, čímž můžeme vysvětlit baktericidní účinky až po delší časové expozici<sup>68</sup>.

Přílohy 13–21 obsahují volně prodejné přípravky, které obsahují bylinné výtažky. Používají se zejména k léčbě zánětu dásní, při kterém se neuplatňuje bakterie *S. mutans*, a proto nelze vyloučit jejich příznivý vliv na onemocnění.

---

<sup>68</sup> HERBADENT SHOP [online]. © [cit. 2021-03-21]. Dostupné z: <https://shop.herbadent.cz/ustni-vody/koncentrat-ustni-vody-250-ml/>

## Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá porovnáním účinnosti testovaných bylinných extraktů a ústních vod na bakterii *S. mutans* a stanovení MIC/MBC vybraných léčivých rostlin. Zajímalo nás, zda bylinné extrakty budou inhibovat růst bakterie stejně účinně, jako roztoky Chlorhexidinu diglukonátu a zda ústní vody budou fungovat tak, jak se píše v propagačních materiálech.

Testované potenciálně léčivé rostliny nevykázaly v použitých koncentracích a způsobu přípravy inhibiční účinky na růst bakterie. Testované roztoky Chlorhexidinu diglukonátu vykázaly účinnost i v té nejmenší koncentraci 0,005 %, tedy nižší koncentraci, než které jsou běžně obsažené v ústních vodách.

V expozičním testu jsme zjistili, že testované ústní vody (koncentrovaný Herbadent professional, Elmex caries protection, Listerine total care, Curaprox Plus 0,05 % Balanced) vykázaly baktericidní účinky v nejkratší době expozice 30 s. Ředěný Herbadent professional byl v expozičních časech 30 s a 60 s bakteriostatický a v časech 30 min a 1 h baktericidní. Aby byla tato ústní voda baktericidní, musela by být v ústech delší dobu, než je běžné.

Tyto výsledky lze uplatnit pouze na použitou bakterii a způsob přípravy. Nelze je tedy aplikovat vůči všem bakteriím sídlícím v dutině ústní.

Ačkoliv nebyly bylinné extrakty úspěšné v inhibici této bakterie, nelze vyloučit jejich příznivý vliv na onemocnění dutiny ústní, zejména jsou-li rozpuštěny v alkoholovém extraktu a používají se na léčbu zánětu dásní.

## Souhrn

V této bakalářské práci se zabýváme stanovením minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) potenciálně léčivých bylin na bakterii *S. mutans*, porovnáním tohoto účinku s Chlorhexidinem diglukonátem a zjištěním účinnosti běžně dostupných ústních vod na bakterii *S. mutans*.

Zajímalo nás, zda mají testované léčivé byliny Měsíček lékařský, Prha arnika, Šalvěj lékařská, Heřmánek pravý a Řepík lékařský inhibiční vliv na bakterii *S. mutans*. v porovnání k Chlorhexidinu diglukonátu. Dále nás zajímalo, zda komerčně prodávané ústní vody Herbadent professional, Elmex Caries protection, Listerine Total care a Curaprox Plus 0,05 % Balanced budou mít deklarovaný vliv na bakterii *S. mutans*.

Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) jsme postupovaly dle normy ISO 20776-1. Expoziční test pro stanovení účinnosti ústních vod probíhal dle Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica<sup>69</sup>.

Testované roztoky potenciálně léčivých bylin nevykázaly inhibici v růstu bakterie *S. mutans*. Z toho vyplývá že MIC je u extraktu Řepíku lékařského vyšší než 13 200 mg/l, u extraktu Měsíčku lékařského vyšší než 4 800 mg/l, MIC vodného extraktu šalvěje lékařské >26 400 mg/l, MIC vodného extraktu prhy arniky >5 200 mg/l a MIC vodného roztoku heřmánku pravého >8 800 mg/l. Všechny koncentrace Chlorhexidinu diglukonátu vykázaly inhibici růstu bakterie. Expozičním testem jsme zjistili, že ústní vody Herbadent professional (koncentrovaný), Elmex caries protection, Listerine Total care a Curaprox Plus 0,05% Balanced účinkovali baktericidně na bakterii *S. mutans* ve všech testovaných časech. Naředěný Herbadent professional vykázal v časech 30 s a 60 s bakteriostatické účinky a v časech 30 min a 60 min účinky baktericidní.

Tyto výsledky lze uplatnit pouze na použitou bakterii a způsob přípravy. Nelze je tedy aplikovat vůči všem bakteriím sídlícím v dutině ústní.

---

<sup>69</sup> KNEIFLOVÁ, Jana. 84-19611. Příloha č. 1/1985 Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica: Standardní metody pro hodnocení dezinfekční účinnosti chemických látek. Praha: Institut hygieny a epidemiologie, 1985, 25 s. ISSN 0862-5956. ÚVTEI 73 027

## Summary

In this bachelor thesis we focused on detection of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of potentially medicinal herbs to bacteria *S. mutans*, comparing this effect with Chlorhexidine digluconate and to verify the efficacy of commonly available mouthwashes on *S. mutans*.

We tested if medicinal herbs *Matricia chamomilla*, *Salvia officinalis*, *Arnica montana*, *Calendula officinalis* and *Agrimonia eupatoria* have inhibitory effect on oral bacteria *S. mutans*. Next aim of this thesis was to verify the effect of mouthrinse Herbadent professional, Elmex caries protection, Listerine total care, Curaprox Plus 0.05 % Balanced on *S. mutans*.

Standart ISO 20776-1 was used for detection of MIC and MBC in this experiment, mouthrinse exposure test was performed according to the Acta hygienica, epidemiologica et mikrobiologica (attachment 1/1985).

Water solutions of potential medicinal herbs didn't show any inhibitory effect on bacteria *S. mutans*. MIC of this solution were different: in case of *Agrimonia eupathoria*, MIC was higher than 13 200 mg/l, MIC of *Calendula officinalis* higher than 4 800 mg/l, MIC of *Salvia officinalis* higher than 26 400 mg/l, MIC of *Arnica Montana* higher than 5 200 mg/l and MIC of *Matricia chamomilla* higher than 8 800 mg/l. All of Chlorhexidine digluconate concentrations inhibited the growth of *S. mutans* (even concentration lower than 0.005 %).

Exposure test revealed strong inhibitory effect of mouthrinse concentrated Herbadent proffesional, Elmex caries protection, Listerine total care and Curaprox Plus 0.05 % Balanced at all times to tested bacteria. Only diluted Herbadent professional had bacteriostatic effect at 30 s, 60 s and bactericidal effect at 30 min and 60 min.

Results of this thesis can be applied only to *S. mutans* and water solutions of used herbs.

## Literatura

### Knihy:

AKBAR, Shahid. *Handbook of 200 Medicinal Plants*. Stockton: Springer, 2020. ISBN 978-3-030-16807-0

BRAUN, Lesley a Marc COHEN. *Herbs and Natural Supplements: Volume 2: An Evidence-Based Guide. 4*. Chatswood: Elsevier Health Sciences, 2015. ISBN 9780729581738.

ČSN EN ISO 20776 1: Klinické laboratorní zkoušky a zkušební systémy pro diagnostiku in vitro – Zkoušení citlivosti původců infekcí a hodnocení účinnosti prostředků pro stanovení antimikrobiální citlivosti – Část 1: Referenční metody pro zkoušení aktivity antimikrobiálních činidel in vitro proti rychle rostoucím aerobním bakteriím způsobujícím infekční nemoci. PRAHA: CEN, 2007.

JANČA, Jiří; ZENTRICH, Josef A. *Herbář léčivých rostlin 1. díl*. Praha: Eminent, 2008. ISBN 978-80-7281-365-0.

KILIAN, Jan. *Prevence ve stomatologii. 2. rozš. vyd.* Praha: Galén, c1999. ISBN 80-7262-022-3.

LIMEBACK, Hardy, ed. *Preventivní stomatologie*. Přeložil Jana KAIFEROVÁ, přeložil Zdeněk BROUKAL. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0094-1.

MINČÍK, Jozef. *Kariologie*. Praha: StomaTeam, 2014. ISBN 978-80-904377-2-2.

## Články:

BELLAVITE, Paolo, MARZOTTO, Marta and BONAFINI, Clara. Arnica montana experimental studies: confounders and biases? *Journal of Integrative Medicine*, 2018. **16** (2), 72–76.

BROOK, Itzhak, Hannah M. WEXLER a Ellie J. C. GOLDSTEIN. Antianaerobic Antimicrobials: Spectrum and Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology, 2013. **26** (3), 526-546

CORNEJO Omar E., LEFÉBURE Tristan, BITAR Paulina D., LANG Ping, RICHARDS Vincent P., EILERTSON Kirsten, DO Thuy, BEIGHTON David, ZENG Lin, Evolutionary and population genomics of the cavity causing bacteria *Streptococcus mutans*. *Mol Biol Evol*, 2013. **30** (4), 881–893

CORREIA, Helena S. a Maria Teresa BATISTA. The activity of an extract and fraction of *Agrimonia eupatoria* L. against reactive species. *BioFactors*. 2007, **29**(6), 91-104.

CRUCERIU Daniel, BALACESCU Ovidiu, RAKOSY Elena. *Calendula officinalis*: Potential Roles in Cancer Treatment and Palliative Care. *Integr Cancer Therapy*. 2018, **17**(4), 1068-1078.

GHORBANI, Ahmad a Mahdi ESMAEILIZADEH. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Elsevier*. 2017, **2017**(7), 433–440.

HAYDARI, Maliha, BARDAKCI, Ayse G., KOLDSLAND, Odd C., AASS, Anne M., SANDVIK, Leiv, & PREUS, Hans R. Comparing the effect of 0.06% -, 0.12% and 0.2% Chlorhexidine on plaque, bleeding and side effects in an experimental gingivitis model: a parallel group, double masked randomized clinical trial. *BMC Oral Health*, (2017), **17**(1), 310-313

JAKOVLJEVIC, Martina, Stela JOKIC a Maja MOLNAR. Bioactive profile of various salvia officinalis L. preparation. *Plants*.2013, **8**(55), 1-30.

KATO, Tsetsuko, Hiromi IJIMA a Kazuyuki ISHIHARA. Antibacterial effects of listerine on oral bacteria. *Tokyo dental collegium*. 1990, **4**(31), 301–307

KRIPLANI, Priyanka, Kumar GUARVE a Uttam S. BAGHAEL. Arnica montana L. – a plant of healing: review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*., 2017, **69**(8), 1-21.

KNEIFLOVÁ, Jana. 84-19611. Příloha č. 1/1985 Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica: Standardní metody pro hodnocení dezinfekční účinnosti chemických látek. Praha: Institut hygieny a epidemiologie, 1985, 25 s. ISSN 0862-5956. ÚVTEI 73 027.

KUCZMANNOVÁ Anika, GÁL Peter, VARINSKÁ Lenka, TREML Jakub, KOVÁČ Ivan, NOVOTNÝ Martin, Agrimonia eupatoria L. and Cynara cardunculus L. Water Infusions: Phenolic Profile and Comparison of Antioxidant Activities. *Molecules*. 2015, **20**(11), 20538-20550.

LEMOS James A., PALMER Simon R., ZENG Liu, WEN Zo T., KAJFAZ John K,. The Biology of Streptococcus mutans. *Microbiol Spectr*. 2019;**7**(1), 1-18

LOPRESTI, Adrian. L. (2016). Salvia (Sage): A Review of its Potential Cognitive-Enhancing and Protective Effects. *Drugs in R&D*, **17**(1), 53–64

MATSUMOTO-NAKANO, Michiyo, Dental Caries. *Elsevier*. 2014,**1**(9), str. 1-5

MCKAY, Diane a Jeffrey BLUMBERG. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea. *Phytoterapy research*. 2006, **2006**(20), 519-530

MEHMOOD, Malik H., MUNIR, Siraj, KHALID, Uzair A., ASRAR, Mudassir, & GILANI, A. H. Antidiarrhoeal, antisecretory and antispasmodic activities of *Matricaria chamomilla* are mediated predominantly through K<sup>+</sup>-channels activation. (2015), **15**(1), 629-632

PAGE Roy C., Gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1986, **13**(5):345-59.

PEREIRA Olivia R., CATARINO Marcelo D., AFONSO Andrea F, SILVA Artur M.S., CARDOSO Susana M., *Salvia elegans*, *Salvia greggii* and *Salvia officinalis* Decoctions: Antioxidant Activities and Inhibition of Carbohydrate and Lipid Metabolic Enzymes. *Molecules.* 2018, **23**(12) ,3169 -3173

SREENIVASAN, Parvati. K., & GITTINS, Evelyn). Effects of low dose chlorhexidine mouthrinses on oral bacteria and salivary microflora including those producing hydrogen sulfide. *Oral Microbiology and Immunology.* (2004, **19**(5) 1-19

SHARIFI-RAD, Mehdi a Jolanta NAZARUK. *Matricaria* genus as a source of antimicrobial agents: From farm to pharmacy and food applications. *Elsevier.* 2018, **2018**(215), 76-88

SINGH, Omar; KHANAM, Zakia; MISRA, Neelam. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviews.* 2011, **5**(9), 82-96

SO YEON, Lee; SI YOUNG, Lee (2019). Susceptibility of Oral Streptococci to Chlorhexidine and Cetylpyridinium Chloride. *Biocontrol Science*, **24**(1), 13–21

SUGIER Piotr, JAKUBOWITZ-Gil Joanna, SUGIER Danuta, KOWALSKI Radoslaw, GAWLIK-DZIKI Urszula, KOLODZIEJ Barbara, DZIKI Dariusz. Chemical Characteristics and Anticancer Activity of Essential Oil from *Arnica Montana* L. Rhizomes and Roots. *Molecules.* 2020, **25**(6), 1-21

### **Webové stránky:**

Ben and Anna ústní voda Sensitive pasta [online]. PILULKA: © [cit. 2021-04-12] 2021 Dostupné z: <https://www.pilulka.cz/ben-anna-ustni-voda-500ml>

Biomed Biocomplex zubní pasta [online]. DOCSIMON: © [cit. 2021-04-12] 2021 Dostupné z: <https://www.docsimon.cz/zbozi/biomed-biocomplex-zubni-pasta-100g>

Biochemical test and identification of Streptococcus mutans [online]. MICROBIOLOGICAL INFO © [cit. 2021-03-29]. Dostupné z: <https://microbiologyinfo.com/biochemical-test-and-identification-of-streptococcus-mutans/>

Can alcohol kill germs? [online]. HEATLINE: © [cit. 2021-03-01]. 2016, Dostupné z: <https://www.healthline.com/health/does-alcohol-kill-germs#can-it-kill-germs>

Elmex anti caries dental rinse [online]. ELMEX © [cit. 2021-01-15]. 2020, Dostupné z: <https://www.elmex.cz/products/product-range/caries-protection/elmex-anti-caries-dental-rinse>

Herbadent e-shop [online]. HERBADENT: © [cit. 2021-04-12] 2021 Dostupné z: <https://shop.herbament.cz>

Heřmánek lékařský [online]. BYLINKY PRO VŠECHNY © [cit. 2015-01-11]. Dostupné z: <https://www.bylinkyprovsechny.cz/byliny-kere-stromy/byliny/61-hermanek-pravy-ucinky-vliv-na-lidske-zdravi>

Kloktání Šalvěje [online]. ČESKÁ ORDINACE © [cit. 2021-03-29]. Dostupné z: <https://www.ceskaordinace.cz/kloktani-salveje-ckr-1057-9626.html>

Listerine total care mouthwash [online]. LISTERINE © [cit. 2021-01-15]. Dostupné z: <https://www.listerine.com/mouthwash/listerine-total-care/listerine-total-care-anticavity-mouthwash>

Měsíček lékařský, [online]. BYLINKOPEDIE© [cit. 2021-01-16]. Dostupné z: <https://bylinkopedie.cz/mesicek-lekarsky>

Microbiogy info [online]. BIOCHEMICAL TEST AND IDENTIFICATION © [cit. 2021-03-29]. Dostupné z: <https://microbiologyinfo.com/biochemical-test-and-identification-of-streptococcus-mutans>

Mouthrinse, [online]. ADA: © [cit. 2021-02-03]. 2021, Dostupné z: <https://www.ada.org/en/member-center/oral-health-topics/mouthrinse/>

Perio Plus [online]. CURAPROX © [cit. 2021-01-15].2021, Dostupné z: <https://www.curaprox.com/cz-cs/perio-plus>

Prha Arnika [online]. BYLINNÝ HEŘBÁŘ © [cit. 2015-01-11]. Dostupné z: <https://www.bylinnyherbar.cz/arnika-prha-chlumni-arnika-horska>

Řepík lékařský [online]. ATLAS ROSTLIN © [cit. 2015-01-11]. Dostupné z: <http://kvetena.cz/herbarium/herbarium.aspx?majorcat=1>

Skripta ke cvičení z mikrobiologie, [online]. MUNI IS © [cit. 2021-02-03], Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif>

Splat Professional Herbal complex pasta [online]. NA ZUBY: © [cit. 2021-04-12] 2021 Dostupné z: <https://www.nazuby.cz/splat-professional-herbal-complex-ustni-voda-275-ml>

Šalvěj lékařská (Salvia officinalis), [online]. BYLINKOPEDIE© [cit. 2021-01-16]. Dostupné z: <http://www.herbalista.cz/bylinky/salvej-lekarska-salvia-officinalis>

Šalvějový krém na dásně [online]. PILULKA: © [cit. 2021-04-12] 2021  
Dostupné z: <https://www.weleda.cz/product/s/salvejovu-balzam-na-dasne>

Ústní voda [online]. Dr. LANDA: © [cit. 2021-04-12] 2021 Dostupné z:  
<https://shop.herbadent.cz/>)<http://www.drlanda.eu/cs/ustni-voda>

Vyšetření antimikrobiotické citlivosti bakterií [online]. SZU © [cit. 2021-02-03],  
Dostupné z: <http://www.szu.cz/vysetreni-antibioticke-citlivosti-bakterii>

## Seznam obrázků:

<i>Obrázek 1: Schéma metabolismu sacharidů bakterie Streptococcus mutans.....</i>	<i>11</i>
<i>Obrázek 2: Mikrotitrační destička I.krotitrační destička I. ....</i>	<i>34</i>
<i>Obrázek 3: Mikrotitrační destička II .....</i>	<i>34</i>
<i>Obrázek 4: Expoziční test - zkumavky s ústními vodami.....</i>	<i>35</i>

## Seznam tabulek:

<i>Tabulka 1: Testované koncentrace Chlorhexidinu diglukonátu .....</i>	<i>28</i>
<i>Tabulka 2: Navážky na přípravu vodných extraktů léčivých rostlin.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabulka 3: Schéma inokulace mikrotitrační destičky.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabulka 4: Schéma expozičního testu.....</i>	<i>32</i>

## Seznam příloh:

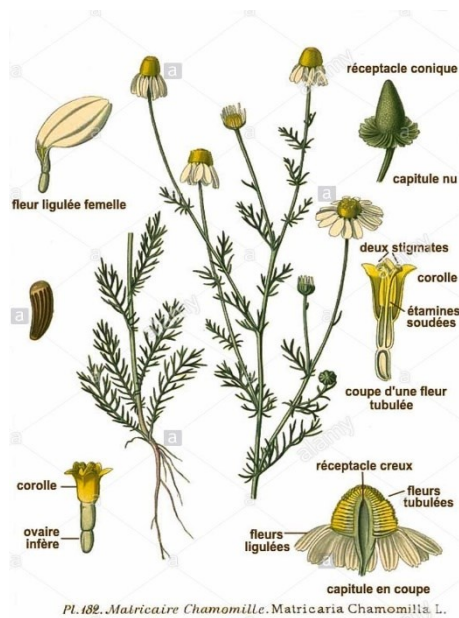
<i>Příloha 1: Řepík lékařský</i> .....	51
<i>Příloha 2. Heřmánek pravý</i> .....	51
<i>Příloha 3: Prha Arnika</i> .....	52
<i>Příloha 4 : Měsíček lékařský</i> .....	52
<i>Příloha 5: Šalvěj lékařská</i> .....	53
<i>Příloha 6: Mikrotitrační destička</i> .....	53
<i>Příloha 7: Inokulace mikrotitrační destičky</i> .....	54
<i>Příloha 8: Testované léčivé rostliny</i> .....	54
<i>Příloha 9: Macerace testovaných léčivých rostlin</i> .....	55
<i>Příloha 10: Extrakty z testovaných bylin</i> .....	55
<i>Příloha 11: Injekční stříkačka a stříkačkový filtr</i> .....	56
<i>Příloha 12: Vyočkované kolonie S. mutans</i> .....	56
<i>Příloha 13: bylinná ústní voda Herbadent professional</i> .....	57
<i>Příloha 14: bylinná ústní voda Herbadent Original</i> .....	57
<i>Příloha 15: šalvějový balzám na dásně Weleda</i> .....	58
<i>Příloha 16: ústní voda s výtažkem šalvěje Ben and Anna</i> .....	58
<i>Příloha 17: ústní voda Splat professional s výtažkem Šalvěje</i> .....	59
<i>Příloha 18: zubní pasta Biomed s výtažkem Šalvěje a Měsíčku</i> .....	59
<i>Příloha 19: ústní voda Dr. Landa s výtažkem Řepíku</i> .....	60
<i>Příloha 20: Herbadent professional gel na dásně</i> .....	60
<i>Příloha 21: Herbadent original gel na dásně</i> .....	61

## Příloha 1: Řepík lékařský



Zdroj: Řepík lékařský [online]. ATLAS ROSTLIN © [cit. 2015-01-11]. Dostupné z: <http://kvetena.cz/herbarium/herbarium.aspx?majorcat=1>

## Příloha 2: Heřmánek pravý



Zdroj: Heřmánek lékařský [online]. BYLINKY PRO VŠECHNY © [cit. 2015-01-11]. Dostupné z: <https://www.bylinkyprovsechny.cz/byliny-kere-stromy/byliny/61-hermanek-pravy-ucinky-vliv-na-lidske-zdravi>

### Příloha 3: Prha Arnika



Zdroj: *Prha Arnika* [online]. BYLINNÝ HERBÁŘ © [cit. 2015-01-11]. Dostupné z:  
<https://www.bylinnyherbar.cz/arnika-prha-chlumni-arnika-horska>

### Příloha 4: Měsíček lékařský



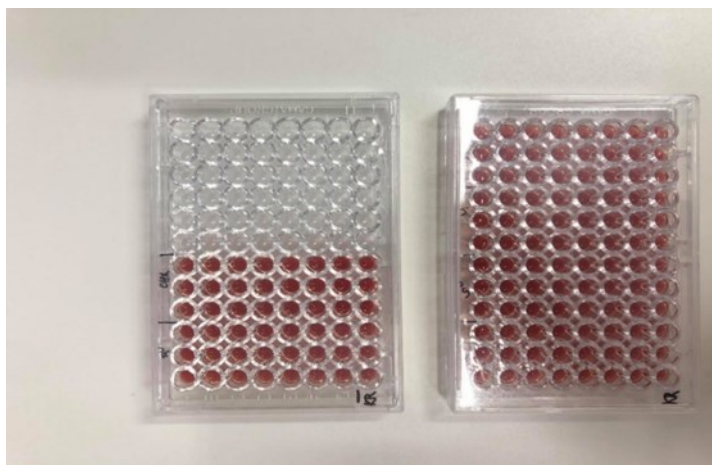
Zdroj: Měsíček lékařský, [online]. BYLINKOPEDIE © [cit. 2021-01-16]. Dostupné z: <https://bylinkopedie.cz/mesicek-lekarsky>

#### Příloha 5: Šalvěj lékařská



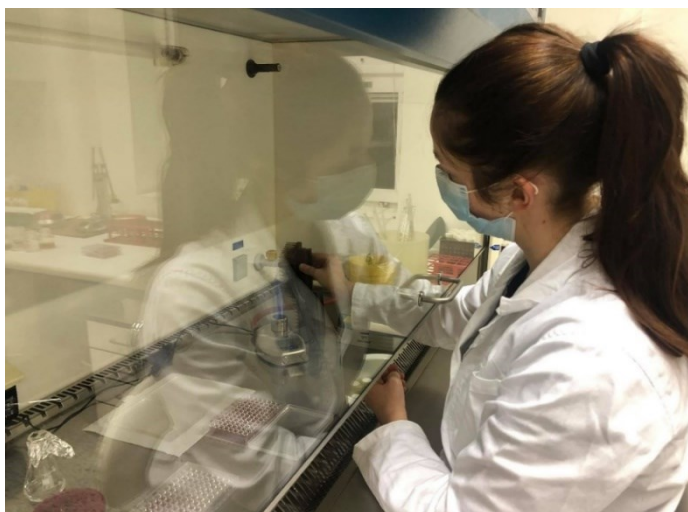
Zdroj: Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*), [online]. BYLINKOPEDIE© [cit. 2021-01-16]. Dostupné z: <http://www.herbalista.cz/bylinky/salvej-lekarska-salvia-oficinalis>

#### Příloha 6: Mikrotitrační destička



Zdroj: archiv autorky

### **Příloha 7: Inokulace mikrotitrační destičky**



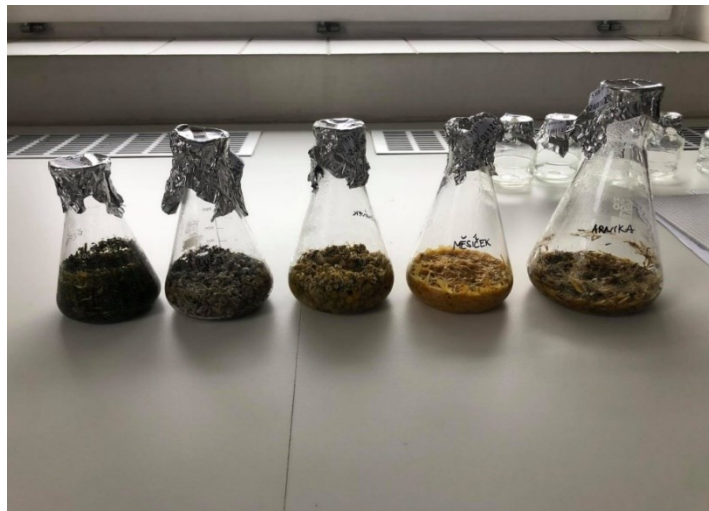
Zdroj: archiv autorky)

### **Příloha 8: Testované léčivé rostliny**



Zdroj: archiv autorky

**Příloha 9: Macerace testovaných léčivých rostlin**



Zdroj: archiv autorky

**Příloha 10: Extrakty z testovaných bylin**



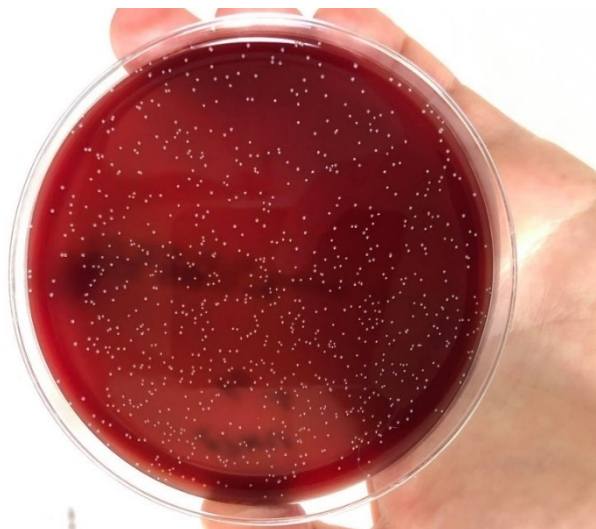
Zdroj: archiv autorky

**Příloha 11:** Injekční stříkačka a stříkačkový filtr



Zdroj: archiv autorky

**Příloha 12:** Vyočkované kolonie *S. mutans*



Zdroj: archiv autorky

**Příloha 13:** bylinná ústní voda Herbadent professional



Zdroj: Herbadent e-shop [online]. HERBADENT: © [cit. 2021-04-12] 2021 Dostupné z:  
<https://shop.herbament.cz/>

**Příloha 14:** bylinná ústní voda Herbadent Original



Zdroj: Herbadent e-shop [online]. HERBADENT: © [cit. 2021-04-12] 2021 Dostupné z:  
[https://shop.herbament.cz](https://shop.herbament.cz/)

**Příloha 15:** šalvějový balzám na dásně Weleda



Zdroj: Šalvějový krém na dásně [online]. PILULKA: © [cit. 2021-04-12] 2021 Dostupné z:  
<https://www.weleda.cz/product/s/salvejovu-balzam-na-dasne>

**Příloha 16:** ústní voda s výtažkem šalvěje Ben and Anna



Zdroj: Ben and Anna ústní voda Sensitive pasta [online]. PILULKA: © [cit. 2021-04-12] 2021 Dostupné z:  
<https://www.pilulka.cz/ben-anna-ustni-voda-500ml>

**Příloha 17:** ústní voda Splat professional s výtažkem Šalvěje



Zdroj: Splat Professional Herbal complex pasta [online]. NA ZUBY: © [cit. 2021-04-12] 2021 Dostupné z: <https://www.nazuby.cz/splat-professional-herbal-complex-ustni-voda-275-ml>

**Příloha 18:** zubní pasta Biomed s výtažkem Šalvěje a Měsíčku



Zdroj: Biomed Biocomplex zubní pasta [online]. DOCSIMON: © [cit. 2021-04-12] 2021 Dostupné z: <https://www.docsimon.cz/zbozi/biomed-biocomplex-zubni-pasta-100g>

**Příloha 19:** ústní voda Dr. Landa s výtažkem Řepíku



Zdroj: *Ústní voda* [online]. Dr. LANDA: © [cit. 2021-04-12] 2021 Dostupné z:  
<https://shop.herbadent.cz/><http://www.drlanda.eu/cs/ustni-voda>

**Příloha 20:** Herbadent professional gel na dásně



Zdroj: Herbadent e-shop [online]. HERBADENT: © [cit. 2021-04-12] 2021 Dostupné z:  
<https://shop.herbadent.cz/>

**Příloha 21:** Herbadent original gel na dásně



Zdroj: Herbadent e-shop [online]. HERBADENT: © [cit. 2021-04-12] 2021 Dostupné z:  
<https://shop.herbament.cz>