

UNIVERZITA KARLOVA
3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Stomatologická klinika



Bc. Lada Bodnárová

**Stanovení in vitro účinnosti potencionálně
antimikrobiálních látek u modelového organismu
Streptococcus mutans**

*Determination of in vitro efficacy of potentially
antimicrobial agents in a model organism
Streptococcus mutans*

Bakalářská práce

Praha, květen 2021

Autor práce: Bc. Lada Bodnárová

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Bakalářský studijní obor: Dentální hygienistka

Vedoucí práce: **Mgr. Lucia Mališová, Ph.D.**

Pracoviště vedoucího práce: **Ústav mikrobiologie 3. LF UK, FNKV,
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 10. května 2021

Bc. Lada Bodnárová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala školitelce práce Mgr. Lucii Mališové, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, Bc. Ivetě Vrbové za odborné vedení, kontrolu a trpělivost během provádění výzkumu praktické části a Ing. Jindře Ševčíkové a Mgr. Petře Křížové za zprostředkování cenných rad a informací k bakalářské práci. Rovněž bych ráda poděkovala doc. MUDr. Heleně Žemličkové, Ph.D. a Mgr. Vladislavu Jakubů za možnost provedení výzkumu na půdě Státního zdravotního ústavu, Centra epidemiologie a mikrobiologie. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému příteli za trpělivost a veškerou dodanou podporu během mých studií.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
ÚVOD.....	8
1 TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 LÉČIVÉ ROSTLINY.....	10
1.1.1 <i>Majoránka zahradní (Majorana hortensis Moench, Origanum majorana)</i>	11
1.1.2 <i>Fenykl obecný (Foeniculum vulgare Miller)</i>	11
1.1.3 <i>Tymián obecný (Thymus vulgaris L.)</i>	12
1.1.4 <i>Hřebíčkovce vonný (Syzygium aromaticum)</i>	13
1.1.5 <i>Bedrník anýz (Pimpinella anisum L.)</i>	14
1.2 STREPTOCOCCUS MUTANS.....	14
1.3 CHLORHEXIDIN V ZUBNÍM LÉKAŘSTVÍ	17
1.4 ÚSTNÍ VODY CURAPROX PERIO PLUS+.....	19
1.4.1 <i>Perio Plus+ Balance C^X-P + CHX 0,05</i>	20
1.4.2 <i>Perio Plus+ Regenerate C^X-P + CHX 0,09</i>	21
1.4.3 <i>Perio Plus+ Protect C^X-P + CHX 0,12</i>	21
1.4.4 <i>Perio Plus+ Forte C^X-P + CHX 0,20</i>	21
2 PRAKTICKÁ ČÁST	23
2.1 CÍL PRÁCE	23
2.2 VÝZKUMNÉ OTÁZKY	23
2.3 HYPOTÉZY	24
2.4 METODIKA	24
2.5 STANOVENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE	25
2.5.1 <i>Princip metody</i>	25
2.5.2 <i>Použitý mikroorganismus</i>	25
2.5.3 <i>Potencionálně antimikrobiální látky</i>	25
2.5.4 <i>Chlorhexidin diglukonát</i>	26
2.5.5 <i>Materiál</i>	26

2.5.6	<i>Přístroje</i>	26
2.5.7	<i>Příprava navážky testovaných bylin</i>	27
2.5.8	<i>Příprava sterilních filtrátů sledovaných bylin</i>	28
2.5.9	<i>Příprava mikrotitračních destiček</i>	28
2.5.10	<i>Příprava inokula <i>S. mutans</i> metodou suspendovaných kolonií</i>	30
2.5.11	<i>Inokulace mikrotitračních destiček</i>	31
2.5.12	<i>Kontrola počtu bakterií <i>Streptococcus mutans</i> v inokulu</i>	31
2.5.13	<i>Inkubace mikrotitračních destiček</i>	31
2.5.14	<i>Odečítání výsledků</i>	31
2.5.15	<i>Výsledky testu</i>	32
2.6	EXPOZIČNÍ TEST	34
2.6.1	<i>Princip metody</i>	34
2.6.2	<i>Použitý mikroorganismus</i>	34
2.6.3	<i>Testované ústní vody</i>	34
2.6.4	<i>Materiál</i>	34
2.6.5	<i>Přístroje</i>	35
2.6.6	<i>Příprava inokula</i>	35
2.6.7	<i>Provedení expozičního testu</i>	35
2.6.8	<i>Kontrola růstu a počtu bakterií <i>Streptococcus mutans</i></i>	36
2.6.9	<i>Výsledky expozičního testu</i>	37
2.7	DISKUZE.....	40
	ZÁVĚR	45
	SOUHRN	46
	SUMMARY	47
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	48
	SEZNAM TABULEK	55
	SEZNAM OBRÁZKŮ	56
	SEZNAM PŘÍLOH	57
	PŘÍLOHY	59

Seznam použitých zkratek

β -NAD	β -nikotinamid adenin dinukleotid
CFU	Colony Forming Units (jednotky tvořící kolonie)
ČL	Čajová lžička
G+	Gram-pozitivní
CHX	Chlorhexidin diglukonát
KR	Kontrola růstu
MH-F	Mueller-Hinton bujón obohacený o 5 % lyzát koňské krve a 20 mg/l β -NAD), s upravenými Ca^{++} a Mg^{++} kationty
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
PL	Polévková lžíce
ppm	Parts per million
PVP/VA	Polyvinylpyrrolidone/Vinyl Acetate
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
SLS	Sodium lauryl sulfate

Úvod

V současné době se mnoho lidí ubírá směrem zdravého životního stylu. S tímto trendem se zvyšuje poptávka po zboží, které je co nejvíce přírodě vlastní. Ať už je to zájem o potraviny v bio kvalitě či z farmářských trhů nebo od lokálních dodavatelů. Kosmetiku spousta zákazníků vybírá podle toho, jestli je její složení co nejvíce přírodní a jestli nebylo testováno na zvířatech. Podobné je to i s farmaceutickými výrobky, pokud je to možné, tak si člověk vybere co nejvíce přírodní produkt.

Léčivé účinky různých medicínsky významných rostlin znali lidé od nepaměti. O tom svědčí dochované lékařské papyry ze 3. století před naším letopočtem, pocházející ze starého Egypta. Už v této době lidé znali blahodárné účinky bylin a používali je jako léčivý prostředek. Dokonce i v době, když už se dalo studovat léčitelství v rámci studia na lékařských univerzitách, tak se lidé stále obraceli na léčitele a babky kořenářky, které měly s bylinkářstvím nespočetné zkušenosti.

Toto téma jsem si zvolila právě proto, abych provedeným pokusem zjistila, jestli se v domácích podmínkách dokáže připravit účinný vodný extrakt medicínsky významných bylin, které by svým působením inhibovaly růst modelového organismu, bakterie *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). Byly zvoleny léčivé rostliny, u kterých je známý jejich antimikrobiální účinek a používají se při zánětech v dutině ústní nebo při bolestech zubů^{1, 2, 3}.

S. mutans je G⁺ fakultativně anaerobní bakterie patřící mezi primární kolonizátory dutiny ústní, a zároveň je považován za hlavní etiologický agens vzniku zubního kazu. Zubní kaz je celosvětově nejčastěji se vyskytující multifaktoriální infekční onemocnění. Tento modelový organismus byl zvolený na základě jeho dobrých kultivačních vlastností a snadné manipulaci s ním.

¹ MAHDIZADEH, Shahla, Maryam KHALEGHI GHADIRI a Ali GORJI. Avicenna's Canon of Medicine: a review of analgesics and anti-inflammatory substances. *Avicenna J Phytomed.* 2015, 5(3), 182–202.

² GREŠÍK, Valdemar. *Léčivé rostliny: jejich vlastnosti, účinky a použití. Evropa. Díl 2.* Praha: Eminent, 2013. ISBN 978-80-7281-460-2. S. 140.

³ SPILKOVÁ, Jiřina. *Farmakognozie.* Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3264-3. S. 315.

Cílem bakalářské práce je stanovení potencionálně antibakteriálního účinku čili možného bakteriostatického nebo baktericidního účinku, vodných extraktů léčivých rostlin s medicínským významem na bakterii *S. mutans*. Jedná se o tyto rostliny: majoránka zahradní (*Origanum majorana*), fenykl obecný (*Foeniculum vulgare*), tymián obecný (*Thymus vulgaris*), hřebíčkovec vonný (*Syzygium aromaticum*) a bedrník anýz (*Pimpinella anisum*). Vodné extrakty budou připravovány v maximálních koncentracích dle doporučeného dávkování.

Druhým cílem práce je stanovení bakteriostatického nebo baktericidního účinku antibakteriální látky chlorhexidin diglukonát na bakterii *S. mutans* v dostupných ústních vodách s jeho různou koncentrací a porovnání jeho účinku s účinkem vodných extraktů testovaných léčivých rostlin.

1 Teoretická část

1.1 Léčivé rostliny

Nejstarší doložené lékařské papýry ze starého Egypta byly datovány na rok 2980 – 2700 před naším letopočtem. Již v této době se používaly byliny jako léčivý prostředek. Rozsáhlý herbář čínského císaře Šen Nona je z podobného období. Theophrastos Aristotelův žák vydal ve 3. století před naším letopočtem spisy Příčiny rostlinného růstu a Přírodopis rostlin, ve kterém byly popsány rostliny využívané v lékařství. V 1. století našeho letopočtu řecký lékař Dioscorides vydal *De materia medica*, jejíchž 2 svazky se věnují léčivým bylinám. Popisuje zde 580 rostlinných druhů, u většiny z nich léčivé účinky sám vyzkoušel, nebo se o nich dověděl. Ve středověku se medicínsky významnými rostlinami zabývali hlavně mniši v kláštorech⁴.

Dalším významným přírodopiscem a lékařem byl Ital Pietro Andrea Mattioli, který na základě Dioscoridových knih vydal v roce 1562 vlastní dílo, *Herbář aneb Bylinář*, které bylo přeloženo mimo jiné i do českého jazyka. V roce 1517 český lékař Jan Černý vydal nejstarší tištěný bylinář⁵.

Odborné vzdělávání lékařů vzniklo až po založení univerzit. Přesto bylo lékařů stále málo, tak ošetřovali hlavně léčitelé, kterým stačilo osvědčení o tom, že někoho zdárně vyléčili. Avšak nejvyhledávanějšími byly babky kořenářky, kterým se podařilo vyléčit nejen lehké nemoci, ale i zastavit vážné choroby, bezpečně pomocí medicínsky významných rostlin. Důležitou roli ve sběru bylinek hraje roční doba sbírání, například heřmánek či rmen by se měly trhat v období letního slunovratu, ideálně 24. července, nebo divizna, andělíka a jiné rostliny proti nemocem 2. července před východem slunce⁶.

K provedení pokusu praktické části práce byly vybrány 4 léčivé rostliny využívané pro své protizánětlivé a analgetické účinky v dutině ústní: majoránka zahradní (*Origanum majorana*) a bedrník anýz (*Pimpinella anisum*) proti

⁴ AUTOR neznámý. *Bylinky naší prabáby*. Praha: Lunarion, 1991. ISBN 80-900170-8-8. S. 3.

⁵ AUTOR neznámý. *Bylinky naší prabáby*. S. 4.

⁶ AUTOR neznámý. *Bylinky naší prabáby*. S. 5.

bolestem zubů, fenykl obecný (*Foeniculum vulgare*) léčí stomatitidy⁷, tymián obecný (*Thymus vulgaris*) je součástí mnohých ústních vod s antibakteriálním účinkem⁸, hřebíčkovce vonný (*Syzygium aromaticum*) na bolest zubů s lokálním anestetickým a dezinfekčním účinkem⁹. Obrázky rostlin jsou zařazeny do příloh č. 1–5, seřazeny dle obsahu.

1.1.1 Majoránka zahradní (*Majorana hortensis* Moench, *Origanum majorana*)

Majoránka zahradní z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*) je jednoletou bylinou využívanou v potravinářství a lékařství. Používá se usušená nat' rostliny. Obsahuje silice, hořčiny a třísloviny, které dodávají příjemnou, pro majoránku typickou vůni a jemnou kořenitou chuť. Podobně jako fenykl má příznivé účinky při nadýmání a pocitech těžkosti¹⁰. Jako konzervační látku majoránku používali již staří Egypťané. Zároveň bylinu používali k ošetření ran¹¹. Majoránka má dezinfekční a protizánětlivý účinek. Z toho důvodu je vhodné ji používat i zevně v podobě kloktadla, které pomůže při zánětech v dutině ústní a také při bolestech zubů¹². Na přípravu bylinného výluhu bylo použito množství 1 ČL/200 ml¹³. Množství 1 ČL bylo změřeno na množství odpovídající 1,3 g/200 ml, to odpovídá množství 0,65 g/100 ml. Finální navážka majoránky byla 6,5 g.

1.1.2 Fenykl obecný (*Foeniculum vulgare* Miller)

Fenykl obecný je vytrvalá bylina z čeledi miříkovité (*Apiaceae*), pochází ze západní Asie a Středomoří. Drogu tvoří dvounažky sušeného, zralého plodu rostliny. Typická je pro něj kořená vůně s nádechem kafru. Hořkou chuť fenyklu

⁷ MAHDIZADEH, Shahla, Maryam KHALEGHI GHADIRI a Ali GORJI. Avicenna's Canon of Medicine: a review of analgesics and anti-inflammatory substances. *Avicenna J Phytomed.* 2015, 5(3), 182–202.

⁸ GREŠÍK, Valdemar. *Léčivé rostliny: jejich vlastnosti, účinky a použití. Evropa. Díl 2.* Praha: Eminent, 2013. ISBN 978-80-7281-460-2. S. 140.

⁹ SPILKOVÁ, Jiřina. *Farmakognozie.* Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3264-3. S. 315.

¹⁰ GREŠÍK, Valdemar. *Léčivé rostliny: jejich vlastnosti, účinky a použití. Čechy a Morava. Část 1.* Praha: Eminent, 2008. ISBN 9788072813315. S. 92.

¹¹ GREŠÍK, Valdemar. *Léčivé rostliny: jejich vlastnosti, účinky a použití. Čechy a Morava. Část 1.* S. 93.

¹² HUBÁČKOVÁ, Markéta. Bez majoránky by nebyl bramborák ani bramboračka. In: *Sazenička* [online]. 2018 [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: <https://sazenicka.cz/majoranka/>

¹³ MLČOCH, Zdeněk. Majoránka – účinky na zdraví, co léčí, použití, užívání, využití, pěstování. In: *Bylinky pro všechny* [online]. 2014 [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: <https://www.bylinkyprovsechny.cz/byliny-kere-stromy/byliny/113-majoranka-ucinky-na-zdravi-co-leci-pouziti-uzivani>

zapříčiňuje až jedna ze složek silice, fenchon¹⁴. Fenyklová silice je získávána destilací vodní parou z natě¹⁵. Fenchon a felandren v silici způsobují hořkou, kafrovitou příchuť. V těchto hořkých odrůdách je výrazně méně anetholu¹⁶.

Použití si najde především v pediatrii, protože působí proti nadýmavým efektem. Obvykle se připravuje jako nálev s jednou čajovou lžičkou sušených plodů a pije se 2–3x denně. Nadměrně vysoká dávka může vyvolávat pocit opojení spojený s křečemi¹⁷. Silice se používá při léčbě kašle, pro svoje sekretolytické působení¹⁸.

Fenykl má mimo jiné také protizánětlivý účinek, který se využívá v zubním lékařství. Šálek připraveného nálevu ze semen rostliny se používá jako ústní voda při onemocnění dásní¹⁹. Při zánětech hrtanu se připravuje odvar, který se užívá jako kloktadlo²⁰. Pro přípravu bylinného výluhu se použila 1 ČL sušených plodů na 250 ml²¹. 1 ČL plodů fenyklu odpovídala množství 4,4 g/250 ml, to odpovídá množství 3,5 g/100 ml. Finální navážka byla 35 g. Plody byly navíc podrceny ve třecí misce.

1.1.3 Tymián obecný (*Thymus vulgaris* L.)

Tymián obecný (*Thymus vulgaris* L.) patří do čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). Droga získávaná ze sušených listů a květů obsahuje až z jedné poloviny vonnou silici thymol, známou pro svůj antibakteriální, antifungální a anthelmintický účinek. Další obsažené látky v silici jsou carvacrolem, cymenem, trísloviny a flavonoidy. Tymián je využíván jako kloktadlo, nebo součást přípravků bojujících proti zánětu v dutině ústní²².

K léčení zánětu dásní nebo bolestí v krku se doporučuje použití jednoho šálků nálevu, jako kloktadla či ústní vody, a to vždy ráno a večer²³. Sušené

¹⁴ GREŠÍK, Valdemar. *Léčivé rostliny: jejich vlastnosti, účinky a použití. Čechy a Morava. Díl 1.* S. 40.

¹⁵ SPILKOVÁ, Jiřina. *Farmakognozie.* S. 284.

¹⁶ SPILKOVÁ, Jiřina. *Farmakognozie.* S. 283.

¹⁷ GREŠÍK, Valdemar. *Léčivé rostliny: jejich vlastnosti, účinky a použití. Čechy a Morava. Část 1.* S. 92.

¹⁸ SPILKOVÁ, Jiřina. *Farmakognozie.* S. 282.

¹⁹ CURTIS, Susan. *Domácí bylinář: příprav, uvař a smíchej léčivé bylinky.* Praha: Ikar, 2012. ISBN 978-80-249-1809-9. S. 57.

²⁰ AUTOR neznámý. *Bylinky naší prabáby.* S. 20.

²¹ MRÁKOTOVÁ, Alena. Fenykl – výborný pomocník při kolikách a nadýmání. In: *Zdravě.cz* [online]. Praha, 2010 [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: <https://nadymani-a-plynatost.zdrave.cz/fenykl-pomocnik-pri-kolikach-a-nadymani/>

²² GREŠÍK, Valdemar. *Léčivé rostliny: jejich vlastnosti, účinky a použití. Evropa. Díl 2.* S.140.

²³ CURTIS, Susan. *Domácí bylinář: příprav, uvař a smíchej léčivé bylinky.* S. 116.

tymiánové natě se použily 2 ČL/250 ml na přípravu tymiánového výluhu²⁴. 1 ČL tymiánové natě vážila 2,7 g/125 ml, množství požité na 100 ml bylo dopočítáno klasickou trojčlenkou se zaokrouhlením na jedno desetinné místo na 2,2 g, navážka 22 g.

Droga je účinné expektorancium se sekretolytickým účinkem. Spasmolytické účinky flavonoidů zmírňují křeče při dávivém kašli. Při nadužívání způsobuje thyreotoxikózy²⁵.

1.1.4 Hřebíčkovec vonný (*Syzygium aromaticum*)

Hřebíčkovec vonný (syn. kořený) z čeledi myrtovité (*Myrtaceae*) je pěstovaný v tropických oblastech. Droga se získává sušením nerozvinutých, ale již vyvinutých květních pupat. Sbírají se z matečné rostliny v době, kdy spodní část pupat začíná měnit barvu ze zelené do karmínové červeně. Suší se na přímém slunci do červenohnědé barvy. Hřebíčková silice obsahuje až z 95% fenoly, hlavně eugenol. Eugenol se ve značné míře využívá ve stomatologii pro své desinfekční a lokálně anestetické účinky²⁶.

V zubním lékařství se nejčastěji využívá v podobě hřebíčkové tinktury a jako součást zubních past a ústních vod. Pro své antibakteriální účinky využívá v prevenci vzniku zubního kazu a parodontitidy. Používání hřebíčkovce se datují do doby před naším letopočtem v Indii, Indonésii, Řecku a Egyptě²⁷. Sušených plodů hřebíčkovce se na přípravu výluhu použilo v množství 1 ČL/250 ml²⁸. Čajová lžička byla navážena na 3,6 g. Na 100 ml bylo naváženo 1,5 g sušených plodů. Pro navážku bylo použito desetinasobné množství, tedy 15 g ve třecí misce podrcených plodů.

²⁴TYMIÁN OBECNÝ sypaný bylinný čaj. In: *Centrum bylin* [online]. Brno [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: <https://www.centrum-bylin.cz/TYMIAN-OBECNY-sypany-bylinny-caj>

²⁵ SPILKOVÁ, Jiřina. *Farmakognozie*. S. 284.

²⁶ SPILKOVÁ, Jiřina. *Farmakognozie*. S. 315.

²⁷ STAŇKOVÁ-KRÖHNOVÁ, Magdaléna. *Bylinky pro děti a maminky 2: praktické použití léčivých rostlin pro rodiny s dětmi od jara do zimy*. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2606-9. S. 186.

²⁸ Hřebíček a jeho léčebné účinky. In: *Jidelníček pro zdraví* [online]. [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: <http://jidelnicekprozdravi.cz/hrebicek-a-jeho-lecebne-ucinky/>

1.1.5 Bedrník anýz (*Pimpinella anisum L.*)

Bedrník anýz je jednoletá bylina, náleží do čeledi miříkovitých rostlin (*Apiaceae*). Charakteristickou anýzovou vůní udává anethol. Droga se získává usušením dvounažek²⁹. Silice obsahuje kromě anetholu ještě mastné oleje, bílkoviny, cukr a sliz³⁰. Dimer anetholu, dianethol, způsobuje toxicitu silice. Siličná droga a silice se využívá v lékařství a potravinářském průmyslu. Působí jako expektorancium, podporuje sekreci v dýchacích cestách. Dále se uplatňuje také v přípravcích používaných jako laxativa, pro svůj spasmolytický a karminativní účinek³¹. V zubním lékařství se anýzová silice, pro svůj baktericidní účinek, přidává do ústních vod a zubních past. Účinně bojuje také proti zápachu z úst³². Odvar z celého bedrníkového plodu byl připraven podle doporučení 2 PL/500 ml³³, to odpovídalo množství 4,08 g/100 ml, respektive 40,8 g pro navážku. Bedrníkové plody bylo rovněž potřeba podrtit ve třecí misce.

1.2 *Streptococcus mutans*

S. mutans je prokaryotická buňka z říše *Bacteria* (*Eubacteria*). Prokaryotická buňka na rozdíl od eukaryotické buňky neobsahuje buněčné organely, bývá obvykle menší velikosti, má neohrazené jádro a její ostatní cytoplazmatické struktury také nejsou ohraničeny membránou. Tato skupina prokaryot se na Zemi objevila zhruba před 3,8 miliardami let, oddělením z ancestrální linie buněk³⁴.

²⁹ SPILKOVÁ, Jiřina. *Farmakognozie*. S. 282.

³⁰ GREŠÍK, Valdemar. *Léčivé rostliny: jejich vlastnosti, účinky a použití. Evropa. Díl 2*. S. 22.

³¹ SPILKOVÁ, Jiřina. *Farmakognozie*. S. 283.

³² SKRUŽNÁ, Jarmila. Bedrník anýz. In: *Medicina.cz: První český zdravotnický portál* [online]. 2002 [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: <http://medicina.cz/clanky/3756/34/Bedrnik-anyz/>

³³ VORLOVÁ, Michaela. Anýz léčí kašel, uklidňuje a zlepšuje trávení. In: *Bylinky.eu* [online]. 2007 [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: <https://www.bylinky.eu/anyz-leci-kasel-uklidnuje-a-zlepsuje-traveni.html>

³⁴ KOLÁŘOVÁ, Libuše. *Obecná a klinická mikrobiologie*. Praha: Galén, 2020. ISBN 978-80-7492-477-4. S. 99.

Tabulka č. 1 – Taxonomické zařazení *Streptococcus mutans*

Kmen	<i>Firmicutes</i>
Třída	<i>Bacili</i>
Řád	<i>Lactobacillales</i>
Čeleď	<i>Streptococcaceae</i>
Rod	<i>Streptococcus</i>
Druh	<i>S. mutans</i>

Zdroj: Renáta Šafránková, Česká národní sbírka typových kultur, Státní zdravotní ústav, Praha.

Řadí se do skupiny grampozitivních aerobních koků, společně s bakteriemi rodu *Enterococcus* a *Staphylococcus*. Strukturu buněčné stěny grampozitivních bakterií tvoří silná vrstva peptidoglykanů. Peptidoglykan je polymer složený z opakujících se podjednotek N-acetylmuramové kyseliny a N-acetylglukosaminu. Buněčná stěna dále obsahuje polysacharidy a proteiny s antigenními vlastnosti. V mikroskopovaném preparátu jsou buňky *S. mutans* uspořádané do typických řetízků, které mají různou délku³⁵.

S. mutans je viridující streptokok. Viridující proto, že po kultivaci na Columbia agaru vytváří α -hemolýzu³⁶, je to částečná hemolýza hemoglobinu, která se následně projevuje tvořením zelené zóny kolem kolonií na Columbia agaru³⁷.

Vyskytuje se přirozeně v dutině ústní, ve slině i zubním plaku. Nejčastěji je izolován z kariogenního plaku. Přežívá v pH <5,5, to je hranice, při které už ostatní mikroorganismy hynou. *S. mutans* je acidogenní a zároveň acidotolerantní. Dokáže syntetizovat extracelulární polysacharidy (glukany) pomocí glukosyltransferáz a za přítomnosti sacharózy. Tímto mechanismem docílí pevné adhezi k povrchu zubu a následné tvorby adhezivního a vysoce kariogenního zubního plaku. Dlouhodobé působení laktátu a pyruvátu, které *S. mutans* dokáže vytvářet anaerobní glykolýzou, způsobuje demineralizaci skloviny. Kromě syntetizace extracelulárních polysacharidů, tvoří ještě

³⁵ KOLÁŘOVÁ, Libuše. *Obecná a klinická mikrobiologie*. S. 107.

³⁶ KOLÁŘOVÁ, Libuše. *Obecná a klinická mikrobiologie*. S. 111.

³⁷ KOLÁŘOVÁ, Libuše. *Obecná a klinická mikrobiologie* S. 108.

intracelulární polysacharidy. Tyto polysacharidy udržují metabolické pochody v době, kdy mikroorganismy nemají dostatečný přísun živin, v podstatě slouží jako zásobárna energie a živin pro ostatní mikroorganismy³⁸.

Demineralizace skloviny je způsobena disociací kyseliny uvnitř skloviny a odloučením H^+ iontu. H^+ iont napadá sklovinné krystaly v místech, kde jsou vázány ionty CO_3^{2-} a Mg^{2+} . Z krystalické mřížky se tak uvolňují krystaly Ca^{2+} , OH^- , PO_4^{3-} , F^- , Na^+ , CO_3^{2-} a Mg^{2+} a difundují rozšířenými póry směrem k povrchu skloviny a dále do zubního plaku. Pokud není tento proces zastaven odstraněním kariogenních nox, tak pokračuje dále i v dentinu³⁹.

Pro určení individuálního rizika vzniku zubního kazu ve stomatologické ordinaci slouží jednoduše proveditelný speciální test Dentocult[®] SM Strip mutans. Dentocult[®] se používá pro stanovení počtu *S. mutans* ve slině. Vysoký podíl kariogenních bakterií obsažených ve slině vede k vysokému riziku vzniku zubního kazu. Jedná se hlavně o bakterii *S. mutans* a bakterie rodu *Lactobacillus*. Mezi další rizikové faktory patří častá konzumace kariogenních potravin s vysokým obsahem nízkomolekulárních sacharidů. Dále velké množství plaku, které je způsobeno nedostatečnou ústní hygienou, hyposialie a nízká pufrační kapacita sliny, status chrupu, nedostatečné zásobení fluoridy a nepřímé faktory, kterými jsou životní styl, stres, chronická onemocnění a s nimi spojená trvalá medikace⁴⁰.

Indikací mikrobiologických testů je několik. Používají se k doplnění klinického vyšetření, k motivaci pacienta, stanovení rizika vzniku zubního kazu u dětí a mladistvých, plánování následných preventivních a terapeutických postupů a použití vhodných výplňových materiálů a podle výsledků se dá stanovit také frekvence kontrolních vyšetření.

³⁸ HELLWIG, Elmar, Thomas ATTIN a Joachim KLIMEK. *Záchovná stomatologie a parodontologie*. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0311-4. S. 27.

³⁹ HELLWIG, Elmar, Thomas ATTIN a Joachim KLIMEK. *Záchovná stomatologie a parodontologie*. S. 34.

⁴⁰ HELLWIG, Elmar, Thomas ATTIN a Joachim KLIMEK. *Záchovná stomatologie a parodontologie*. S. 68.

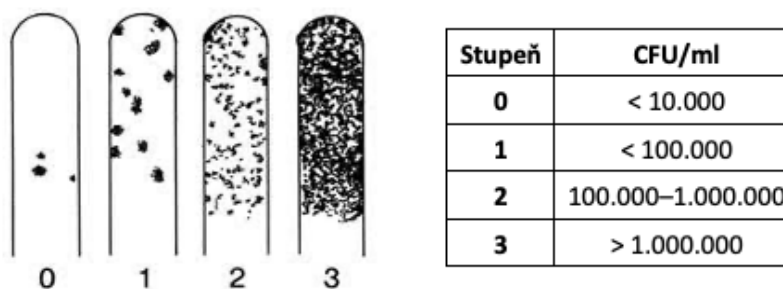
Obrázek 1 – Dentocult® SM Strip mutans



Zdroj: <https://shika.okinawa/wp-content/uploads/2019/06/デントカルト-300x207.jpg>

V Dentocult® sadě nalezneme testovací proužky pro testování stimulované sliny (kulatý konec proužku) a zubního plaku (hranatý konec proužku), parafínové kuličky, lahvičky se selektivním kultivačním médiem, bacitracinové disky, štítky a návod k použití⁴¹.

Obrázek 2 – Vyhodnocení testu Dentocult® SM Strip mutans



Stupeň	CFU/ml
0	< 10.000
1	< 100.000
2	100.000–1.000.000
3	> 1.000.000

Zdroj: <http://www.laboratorveseli.cz/dokumenty/Dentocult-cz.pdf>

1.3 Chlorhexidin v zubním lékařství

Významný baktericidní a bakteriostatický účinek chlorhexidinu byl objeven anglickou firmou I. C. I. (Imperial Chemical Industries Limited) v roce

⁴¹ MERGLOVÁ, Vlasta. Mikrobiologické testy v prevenci zubního kazu. *Vox paediatricae*. 2005, 5(8), 18-19. ISSN 1213-2241.

1954. V roce 1957 byly publikovány jeho pozitivní účinky při léčbě gingivitidy, avšak detailnější vědecké studie o jeho působení na tvorbu zubního plaku byly provedeny až v 70. letech⁴².

Chlorhexidin patří mezi bisbiguanidy s nejčastějším použitím ve formě vodného roztoku 0,1–0,2 % diglukonátové soli. Působí antimikrobiálně proti kariogenním i parodontopatogenním bakteriím. Nejčastěji se používá v ústních vodách jako výplach dutiny ústní, ale využívá se také třeba ve formě gelu, který je možné nanášet přímo do parodontálních kapes. Je prokázán baktericidní účinek na gram-pozitivní bakterie a ve vysokých dávkách také ovlivňuje gramnegativní bakterie. Vyznačuje se svojí vysokou substantivitou, to znamená, že jeho bakteriostatické účinky trvají i nějakou dobu po výplachu. Retenční schopnost je zapříčiněná vazbou mezi kationtovými skupinami chlorhexidinu a aniontovými skupinami bakterií obsažených v zubním plaku a mucinózního povlaku sliznice dutiny ústní⁴³.

Výrazná bakteriostatický účinek byl prokázán již při použité koncentraci 0,0002 %. Kariogenní bakterie *S. mutans* proti této látce vykazuje velmi výraznou citlivost. Chlorhexidin prokázal významný antiadhezivní účinek proti parodontopatogenní bakterii *Porphyromonas gingivalis*. Retence na zubech, sliznici a k bakteriálnímu povlaku po výplachu 0,2 % roztokem zaznamenala bakteriostatický účinek po dobu 12 hodin. Doba retence je ale ovlivněna množstvím sekrece sliny a v ní obsažených kationtů Ca_2^+ a také přítomností H^+ iontů. Bylo prokázáno, že dobu retence po výplachu dutiny ústní 0,2 % roztokem chlorhexidinu ovlivňuje tenzid, sodium lauryl sulfát (natriumlaurylsulfát, SLS), obsažený v zubních pastách, a to až po dobu 120 minut. Proto se doporučuje během chlorhexidinových výplachů používat zubní pasty bez sodium lauryl sulfátů anebo dodržovat časovou prodlevu 30 minut mezi čištěním zubů a výplachem obsahující chlorhexidin⁴⁴.

⁴² RUPPERT, Martin a Ulrich SHLAGENHAUF. Chlorhexidin v zubním lékařství. *Quintessenz. Parodontologie*. 2004, 5(1), 26-34. ISSN 1213-0125. S. 27.

⁴³ HELLWIG, Elmar, Thomas ATTIN a Joachim KLIMEK. *Záchovná stomatologie a parodontologie*. S. 311.

⁴⁴ RUPPERT, Martin a Ulrich SHLAGENHAUF. Chlorhexidin v zubním lékařství. S. 27.

Chlorhexidin je v zubním lékařství používán již řadu let. Řadí se mezi nejspolehlivější a nejefektivnější antiseptikum, což dokládají také provedené vědecké studie⁴⁵.

Vedlejší účinky dlouhodobého používání chlorhexidinu ve vysokých koncentracích se projevují zbarvením zubů a ovlivněním vnímání především slané a hořké chuti. Za vzniklé zbarvení může volná kationtová skupina molekul chlorhexidinu, oslabující bakteriální buněčnou stěnu, která na sebe navazuje barviva obsažená v kávě, čaji, tabákových výrobcích a dalších potravinách. Druhá volná kationtová skupina se váže k povrchu zubů či sliznice. Zbarvení je pouze estetický problém, který se dá většinou bez problémů odstranit profesionální dentální hygienou, depuračními pastami nebo metodou air-polishing (pískování, air-flow). Chlorhexidin blokuje specifické receptory chuťových pohárků na jazyku. Ovlivnění chuti je reverzibilní, k navrácení do normálu dochází po vysazení preparátů⁴⁶.

1.4 Ústní vody Curaprox Perio Plus+

Produktová řada ústních vod Perio Plus+ od švýcarské firmy Curaprox, spojuje antibakteriální účinek chlorhexidinu a Citrox®, neobsahuje alkohol⁴⁷. Citrox® je bioflavonoid extrahovaný z citrusových plodů. Tato látka vykazuje vysokou antimikrobiální aktivitu vůči mikroorganismům nacházejícím se v dutině ústní. Vzhledem ke svému potenciálu se dnes využívá v terapeutických přípravcích dentální hygieny, především v ústních vodách⁴⁸.

Citrox® je patentovaný komplex přírodního antiseptika, který je získávaný z rostliny pomerančovníku hořkého (*Citrus aurantium*)⁴⁹. Komplex kombinovaný s aminokyselinou polylysin podporuje dobu účinku a zvyšuje účinnost Citrox®. Ke všem ústním vodám s obsahem chlorhexidinu se doporučuje používat zubní

⁴⁵ HEINZ, Bernd, Mehrdad Arjomand KERMANIE a Sören JEPSEN. Použití chlorhexidinu v zubním lékařství. *Quintessenz. Parodontologie*. 2000, 1(2), 47-63. ISSN 1213-0125. S. 47.

⁴⁶ RUPPERT, Martin a Ulrich SHLAGENHAUF. Chlorhexidin v zubním lékařství. S. 28.

⁴⁷ Perio Plus+ mix, 4x100ml. In: *Curaprox: B2B portál pro profesionály* [online]. [cit. 2020-11-13]. Dostupné z: <http://www.curaproxprofi.cz/produkty/perio-plus-mix-4x100ml-565/>

⁴⁸ HOOPER, S. J., M. A. O. LEWIS, M. J. WILSON a D. W. WILLIAMS. Antimicrobial activity of Citrox® bioflavonoid preparations against oral microorganisms. *British Dental Journal*. 2011, 210(1), E22-E22. ISSN 0007-0610. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bdj.2010.1224

⁴⁹ CURADENT AG - BETTER HEALTH FOR YOU. *Curaprox: Ústní voda Perio Plus+ Forte CX – P + CHX 0,20*. Kriens, 2020. Příbalový leták.

pasty bez laurylsulfátu sodného (SLS, syn. laurylsíran sodný, dodecylsulfát sodný, dodecylsíran sodný) z toho důvodu, že SLS je povrchově aktivní látka a detergent, tudíž neutralizuje účinky chlorhexidinu. Negativní účinky chlorhexidinu, jako je typické zbarvení zubů, se dají očekávat pouze minimálně, protože Perio Plus dokáže chránit přirozenou bělost zubů⁵⁰. Kopolymer PVP/VA obsažený ve všech ústních vodách Perio Plus dokáže tvořit ochranný film na povrchu zubů a dásně. Kombinace tohoto kopolymeru s xylitolem zajišťuje až 12 hodinové působení, tím vytváří silnou ochranu před zubním kazem⁵¹.

Obrázek 3 – Ústní vody Curaprox Perio Plus⁺



Foto autor

1.4.1 Perio Plus+ Balance C^X – P + CHX 0,05

Tato ústní voda je doporučována pacientům, kteří mají problémy s dásněmi (gingivitis), během ortodontické léčby, nebo pokud se jedná o pacienta se zhoršenou motorikou. Perio Plus Balance je obohacena fluoridem sodným (230 ppm), proto je vhodná také pro osoby se zvýšeným rizikem vzniku zubního kazu, kvůli fixnímu ortodontickému aparátu, nebo léky či věkem způsobené kvasinkové infekci v dutině ústní.

⁵⁰ CURADENT AG - BETTER HEALTH FOR YOU. Curaprox: Ústní voda Perio Plus+ Regenerate CX – P + CHX 0,09. Kriens, 2020. Příbalový leták.

⁵¹ CURADENT AG - BETTER HEALTH FOR YOU. Curaprox: Ústní voda Perio Plus+ Protect CX – P + CHX 0,12. Kriens, 2020. Příbalový leták.

Doporučuje se použití 10 ml nezředěného roztoku, vyplachovat po dobu 60 sekund, ideálně po čištění zubů, vždy ráno a večer. Tuto ústní vodu je možné používat dlouhodobě, a to až po dobu 6 měsíců⁵².

1.4.2 Perio Plus+ Regenerate C^X– P + CHX 0,09

Ústní voda Regenerate se doporučuje po stomatologických zákrocích v dutině ústní, při gingivitis, pokud nastane poranění mukózy a gingivy a při problémech s ortodontickým aparátem či protézou. Obsahuje navíc kyselinu hyaluronovou, která podporuje regeneraci tvorbou dalšího ochranného filmu, kromě již zmíněného PVP-VA a zvyšuje obsah vlhkosti.

Doporučuje se používat 10 ml nezředěného výplachu, ráno i večer, po dobu 60 sekund v maximální době užívání 1 měsíc. Neobsahuje fluoridy⁵³.

1.4.3 Perio Plus+ Protect C^X– P + CHX 0,12

Perio Plus Protect je vhodné používat během chronických zánětů v dutině ústní. Obecně je to vždy, kdy je potřeba zvýšit hygienické nároky v dutině ústní a tím eliminovat počet nežádoucích mikroorganismů v ústech, například při problémech s implantáty (periimplantitis), protézami (orální kandidózy) a během ortodontické léčby, kde citlivost a bolestivost zubů znesnadňuje péči o dutinu ústní. Neobsahuje fluoridy.

Doporučuje se užívání 2x denně, ráno i večer, ideálně po čištění zubů. Opět se doporučuje použití 10 ml nezředěné ústní vody a vyplachovat po dobu 60 sekund. Doba možného používání ústní vody vkuse se změnila na dobu 3 týdnů, kvůli vyšší koncentraci obsaženého chlorhexidinu⁵⁴.

1.4.4 Perio Plus+ Forte C^X– P + CHX 0,20

Vlivem nejvyšší koncentrace chlorhexidinu (0,20 %) obsaženého v této ústní vodě, je doporučováno její použití před a po stomatochirurgických

⁵² CURADENT AG - BETTER HEALTH FOR YOU. *Curaprox: Ústní voda Perio Plus+ Balance CX – P + CHX 0,05*. Kriens, 2020. Příbalový leták.

⁵³ CURADENT AG - BETTER HEALTH FOR YOU. *Curaprox: Ústní voda Perio Plus+ Regenerate CX – P + CHX 0,09*. Kriens, 2020. Příbalový leták.

⁵⁴ CURADENT AG - BETTER HEALTH FOR YOU. *Curaprox: Ústní voda Perio Plus+ Protect CX – P + CHX 0,12*. Kriens, 2020. Příbalový leták.

a invazivních stomatologických zákrocích. Dále je možné použití při přetrvávajících akutních potížích spojených s implantáty, protézami či během ortodontické léčby. Vždy, když je potřeba eliminovat tvorbu a hromadění zubního plaku a snížení počtu nežádoucích bakterií v dutině ústní.

Doporučená doba používání se pohybuje mezi 3 až 7 dny. Platí stejný princip použití jako u předchozích ústních vod. Ovšem i přes minimalizaci možného zbarvení zubů v důsledku použití chlorhexidinu, je doporučeno nekouřit, nepít kávu, čaj a červené víno⁵⁵.

⁵⁵ CURADENT AG - BETTER HEALTH FOR YOU. *Curaprox: Ústní voda Perio Plus+ Forte CX – P + CHX 0,20*. Kriens, 2020. Příbalový leták.

2 Praktická část

2.1 Cíl práce

Cílem bakalářské práce je stanovení potencionálně antibakteriálního účinku čili možného bakteriostatického nebo baktericidního účinku, vodných extraktů léčivých rostlin s medicínským významem na bakterii *S. mutans*. Jedná se o tyto rostliny: majoránka zahradní (*Origanum majorana*), fenykl obecný (*Foeniculum vulgare*), tymián obecný (*Thymus vulgaris*), hřebíčkovec vonný (*Syzygium aromaticum*) a bedrník anýz (*Pimpinella anisum*). Vodné extrakty budou připravovány v maximálních koncentracích dle doporučeného dávkování.

Druhým cílem práce je stanovení bakteriostatického nebo baktericidního účinku antibakteriální látky chlorhexidin diglukonát na bakterii *S. mutans* v dostupných ústních vodách s jeho různou koncentrací a porovnání jeho účinku s účinkem vodných extraktů testovaných léčivých rostlin.

2.2 Výzkumné otázky

Výzkumná otázka č. 1:

Vykazuje některý z připravených vodných extraktů vybraných medicínských významných léčivých rostlin bakteriostatický nebo baktericidní účinnost na bakterii *S. mutans*? Pokud ano, jaká je jeho hodnota minimální inhibiční koncentrace?

Výzkumná otázka č. 2:

Po jaké době expozice budou mít testované ústní vody prokazatelný bakteriostatický nebo baktericidní účinek na bakterii *S. mutans*?

2.3 Hypotézy

Hypotéza č. 1:

Antibakteriální účinek vodných extraktů u vybraných medicínsky významných rostlin na bakterii *S. mutans* bude mít baktericidní nebo bakteriostatickou účinnost.

Hypotéza č. 2:

Z dostupných informací o chlorhexidinu diglukonátu víme, že působí antimikrobiálně od koncentrace 0,0002 %. Očekáváme baktericidní nebo bakteriostatický účinek chlorhexidinu v koncentraci 0,05 % na *S. mutans*.

Hypotéza č. 3:

Antimikrobiální účinek testované ústní vody s nejnižší koncentrací chlorhexidinu 0,05 % Perio Plus+ Balance, bude vykazovat bakteriostatickou nebo baktericidní účinnost již po době expozice 60 s, doporučená doba z příbalového letáku ústní vody.

2.4 Metodika

Metoda Stanovení minimální inhibiční koncentrace podle ČSN EN ISO 20776-1⁵⁶ byla zvolena a upravena pro zodpovězení výzkumnou otázkou č. 1.

Postup podle Standardní metody pro hodnocení dezinfekční účinnosti chemických látek podle Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica (příloha 1/1985)⁵⁷, tzv. Expoziční test byl vybrán a upraven pro potřeby této bakalářské práce k zodpovězení výzkumné otázky č. 2.

⁵⁶ 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: Český normalizační institut, 2007.

⁵⁷ 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.

2.5 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

2.5.1 Princip metody

Jedná se o kvantitativní stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám. Mikrodiluční metodou v bujónu se v tomto případě určuje minimální inhibiční koncentrace (MIC – minimum inhibitory concentration). MIC se stanovuje jako nejnižší možná koncentrace testované látky, která dokáže viditelně inhibovat růst bakteriální populace za definovaných podmínek. Hodnota MIC se udává v mg/l. Testování probíhá in vitro v mikrotitračních destičkách v tekutém kultivačním médiu o objemu 100 µl v jedné jamce s geometricky rostoucími koncentracemi (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8...) testované látky s potenciálně inhibičním účinkem. Do jamek se následně očkuje bakteriální suspenze o známém počtu mikroorganismů v maximálním objemu 5 µl. Inokulum testovaného mikroorganismu odpovídá 0,5 stupnice McFarlanda. Naočkování mikrotitrační destičky se provádí pomocí jehlového inokulátoru, následná inkubace destičky probíhá za standardních podmínek⁵⁸.

Po stanovení hodnoty MIC je možné z viditelně nenarostlé jamky bujón vyočkovat na agar, a tak zjistit, zda byl účinek testované látky na mikroorganismus baktericidní nebo bakteriostatický. V případě, že použítá bakterie po příslušné době kultivace na agaru nevyroste, jedná se o účinek baktericidní. V případě, že bakterie roste, je účinek pouze bakteriostatický.

Fotografická dokumentace pokusu se nachází v přílohách č. 9–16.

2.5.2 Použitý mikroorganismus

Streptococcus mutans – CNCTC 6699^T– kmen získaný z České národní sbírky typových kultur (CNCTC), příloha č. 6

2.5.3 Potencionálně antimikrobiální látky

Majoránka zahradní (*Origanum majorana*)

Fenykl obecný (*Foeniculum vulgare*)

⁵⁸ BEDNÁŘ, M., J. SMÍŠEK, J. SCHINDLER, V. NĚMEČKOVÁ a V. ADÁMKOVÁ. PŘÍRUČKA MIKROBIOLOGIE PRO BAKALÁŘE 3. LF UK: Diluční metoda. In: *Mikrobiologie 3.lf* [online]. Praha: Ústav mikrobiologie [cit. 2021-4-29]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/index.html>

Tymián obecný (*Thymus vulgaris*)

Hřebíčkovce vonný (*Syzygium aromaticum*)

Bedrník anýz (*Pimpinella anisum*)

- Výrobce: Valdemar Grešík (Česká republika, příloha č. 8)

2.5.4 Chlorhexidin diglukonát

Chlorhexidine digluconate solution – 20 % vodný roztok, číslo produktu C9394, uchováván dle doporučení výrobce při teplotě 2 – 8°C

(Sigma Aldrich)

2.5.5 Materiál

Mueller-Hinton bujón obohacený o 5 % lyzát koňské krve a 20 mg/l β-nikotinamid adenin dinukleotid (β-NAD), s upravenými Ca⁺⁺ a Mg⁺⁺ kationty (MH-F bujón) – příprava podle normy ISO 20776-1, dokumentu EUCAST a výrobce sušiny⁵⁹

(Oxoid)

Columbia krevní agar s 5 % defibrinované ovčí krve v Petriho miskách

(Oxoid)

Ředící roztoky:

Fyziologický roztok

Destilovaná voda

2.5.6 Přístroje

Automatická pipeta (Eppendorf)

Laboratorní předvážky (KERN)

Rychlovarná konvice

Laboratorní kahan s kličkami (FUEGO)

Vortex (VELP Scientifica)

Laminární box – typ Biohazard (Clean Air)

Termostat 35°C ±1°C (Thermo Scientific)

⁵⁹ THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING – EUCAST. *Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method.* Version 6.0, 2020, 5 s. Dostupné také z: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2020_manuals/Media_preparation_v_6.0_EUCAST_AST.pdf

Přístroj pro manuální odečet mikrotitračních destiček	(Dynatech)
Nástavec na skleněné pipety	(Hi-Tech Lab)
Třecí miska	
Čajový filtr	(Profissimo)
96 jamkové destičky	(Gama)
Mikrobiologická klička sterilní	(Hebios)
Inokulátor mikrotitračních destiček	(SZÚ)
Stříkačkové filtry – jednorázové, sterilní 0,2 μm	(Fisher Scientific)
Injekční stříkačky – objem 5 ml	(Chirana)
Plastové zkumavky s uzávěrem – sterilní	(Fisher Scientific)
Zákalový standard podle McFarlanda č. 0,5	(SZÚ)

Laboratorní sklo – odměrný válec, NTS lahve, Erlenmeyerovy baňky, pipety, zkumavky

2.5.7 Příprava navážky testovaných bylin

Pro přípravu bylinných odvarů bylo využito doporučené množství z českých zdrojů. Doporučené dávkování bylo uváděno v polévkových lžících (PL) či čajových lžičkách (ČL). Toto množství bylo potřeba nejprve převést na gramy a potom dané množství přepočítat na objem 100 ml. Zásobní roztoky testovaného koření (tj. odvary) byly připraveny v desetkrát vyšších koncentracích z důvodu následného ředění MH-F bujónem při přípravě vlastní mikrotitrační destičky, odvažoval se tedy desetinásobek množství daného koření na 100 ml objemu destilované vody. Pro přehlednost byly vstupní hodnoty, přepočty, následná navážka a případná úprava převedeny do tabulky (Tabulka č. 2)

Tabulka č. 2 – Příprava navážek

	Množství	Váha 1 ČL/PL	Přepočet	Navážka	Podrcení
Majoránka	1 ČL/200 ml	1,3 g	0,65 g/100 ml	6,5 g	Ne
Fenykl	1 ČL/250 ml	4,4 g	3,5 g/100 ml	35 g	Ano
Tymián	2 ČL/250 ml	2,7 g	2,2 g/100 ml	22 g	Ne
Hřebíčkovec	1 ČL/250 ml	3,6 g	1,5 g/100 ml	15 g	Ano
Bedrník	2 PL/500 ml	10,2 g	4,08 g/100 ml	40,8 g	Ano

2.5.8 Příprava sterilních filtrátů sledovaných bylin

Pro louhování bylinných nálevů bylo připraveno 5 sterilních Erlenmeyerových baněk. Do každé baňky byla vložena příslušná navážka koření vypočítaná podle Tabulky č. 2 a zalita 100 ml vroucí destilované vody. Baňky se překryly a nálevy se nechaly louhovat po dobu 15 minut. Po vylouhování se roztoky přefiltrovaly do sterilních lahví přes čajový filtr. Každý nálev přes jeden čajový filtr, do jedné láhve. Následně byly roztoky sterilizovány filtrací přes filtry s póry o velikosti 0,2 μm . Pracovní koncentrace nálevů byly připraveny smícháním 1 ml sterilního odvaru s 9 ml MH-F bujónu do sterilních zkumavek. Připraveným ředěním vznikly nálevy potenciálně antimikrobiálních látek, které byly použity do mikrotitračních destiček.

2.5.9 Příprava mikrotitračních destiček

Každá z potenciálně inhibičních látek byla testována ve 3 sloupcích mikrotitrační destičky (v tripletu). Do jamek mikrotitračních destiček řádku A bylo dávkováno 100 μl roztoku s nejvyšší koncentrací potencionálně antimikrobiálního činidla. Pro použitý kmen bakterie *S. mutans* byly ponechány 3 jamky na každý triplet zkoušky s obsahem 100 μl MH-F bujónu v řádku H mikrotitrační destičky. Tyto jamky sloužily jako kontrola růstu bakterie.

Nejvyšší koncentrace testovaných látek byla ponechána v prvních řádcích mikrotitračních destiček (řádek A). Do druhých řádků (řádky B) bylo přidáno 100 μl MH-F bujónu a 100 μl připravených odvarů o nejvyšší koncentraci. Do řádků C až G bylo napipetováno 100 μl MH-F bujónu. Následným přenášením 100 μl počínaje řádkem B a konče řádkem G bylo provedeno sériové ředění

testovaných látek. Skladba mikrotitračních destiček byla zaznamenána do tabulek (Tabulka č. 3, Tabulka č. 4).

Jeden triplet mikrotitrační destičky byl použit pro chlorhexidin (CHX). Původní koncentrace CHX 20 % byla naředěna na výchozí koncentraci 2 %, 1 ml CHX + 9 ml destilované vody. Pomocí křížového pravidla byly vypočítány koncentrace CHX použité do mikrotitrační destičky (Tabulka 5). Vybrané koncentrace odpovídají obsahu CHX v ústních vodách a také byly připraveny koncentrace další. Ředění bylo provedeno pomocí MH-F bujónu. Napipetované množství bylo následně promícháno přístrojem Vortex.

Tabulka č. 3 – Popis mikrotitrační destičky č. 1: Majoránka, fenykl, tymián, hřebíčkovec, kontrola růstu (KR)

	Majoránka			Fenykl			Tymián			Hřebíčkovec		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6.500 mg/l			35.000 mg/l			22.000 mg/l			15.000 mg/l		
B	3.250 mg/l			17.500 mg/l			11.000 mg/l			7.500 mg/l		
C	1.625 mg/l			8.750 mg/l			5.500 mg/l			3.750 mg/l		
D	812,5 mg/l			4.375 mg/l			2.750 mg/l			1.875 mg/l		
E	406,25 mg/l			2.187,5 mg/l			1.375 mg/l			937,5 mg/l		
F	203,125 mg/l			1.093,75 mg/l			687,5 mg/l			468,75 mg/l		
G	101,5625 mg/l			546,875 mg/l			343,75 mg/l			234,375 mg/l		
H (KR)	100 µm MH-F bujón			100 µm MH-F bujón			100 µm MH-F bujón			100 µm MH-F bujón		

Tabulka č. 4 – Popis mikrotitrační destičky č. 2: Bedrník, chlorhexidinu (CHX), kontrola růstu (KR)

	Bedrník			CHX								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	40.800 mg/l			0,20 %								
B	20.400 mg/l			0,15 %								
C	10.200 mg/l			0,12 %								
D	5.100 mg/l			0,10 %								
E	2.550 mg/l			0,09 %								
F	1.275 mg/l			0,07 %								
G	637,5 mg/l			0,05 %								
H (KR)	100 µm MH-F bujón			100 µm MH-F bujón								

Tabulka č. 5 – Použité koncentrace chlorhexidinu a jeho ředění

Požadovaná koncentrace CHX	Ředění	
	CHX 2 %	MH-F bujón
0,20 %	2 %	1,8 ml
0,15 %	2 %	1,85 ml
0,12 %	2 %	1,88 ml
0,10 %	2 %	1,9 ml
0,09 %	2 %	1,91 ml
0,07 %	2 %	1,93 ml
0,05 %	2 %	1,95 ml

2.5.10 Příprava inokula *S. mutans* metodou suspendovaných kolonií

S. mutans, kmen získaný z České národní sbírky typových kultur (CNCTC 6699^T), uchovávaný v konzervačním médiu, uložený při teplotě -80°C, se bakteriologickou kličkou odebral v množství přibližně 1 µl a křížovým roztěrem byl naočkován na Columbia agar. Po kultivaci bylo nutné provést kontrolu čistoty bakterie.

Z inkubované agarové půdy (příloha č. 7), 24 hodin při $35 \pm 1^\circ\text{C}$, se mikrobiologickou kličkou nabralo 3–5 kolonií bakterií kmene *S. mutans*, ty byly přeneseny do zkumavky s fyziologickým roztokem. Zákal suspenze byl upraven podle zákalového standardu č. 0,5 McFarlanda, což odpovídá množství bakterií $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

2.5.11 Inokulace mikrotitračních destiček

Naočkování mikrotitračních destiček proběhlo do 15 minut od přípravy suspenze inokula z důvodu zachování životaschopnosti bakterií. Do mikrotitrační destičky byla pomocí jehlového inokulátoru naočkována bakteriální suspenze, cca 1 – 2 μl na 1 jamku.

2.5.12 Kontrola počtu bakterií *Streptococcus mutans* v inokulu

Kontrola počtu životaschopných bakterií byla provedena tak, že se z jamky určené pro kontrolu růstu (KR) odpipetovalo 10 μl suspenze bezprostředně po její inokulaci. Tato suspenze se následně smíchala s 10 ml fyziologického roztoku. 100 μl této suspenze se vyočkovalo na Columbia agar, kultivace probíhala po dobu 24 hodin při $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Druhý den se po kultivaci spočítaly kolonie na Petriho misce. Napočítáno bylo 72 kolonií *S. mutans*. Požadovaný počet bakterií podle ISO normy, který měl být v rozmezí 20–80 kolonií (což odpovídá počtu přibližně 5×10^5 CFU/ml), tak byl splněn.

2.5.13 Inkubace mikrotitračních destiček

Mikrotitrační destičky po inokulaci byly před inkubací opatřeny víčkem. Tím bylo zabráněno jejich možnému vyschnutí. Inkubace proběhla v termostatu při teplotě $35 \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 18 hodin v běžné atmosféře.

2.5.14 Odečítání výsledků

Výsledky mohly být odečteny pouze za splnění předpokladu počtu bakterií přibližně 5×10^5 CFU/ml, což bylo splněno. Dalším předpokladem byl prokazatelný růst bakterie *S. mutans* v kontrolách růstu v jamkách řádku H mikrotitračních destiček, i tento předpoklad byl splněn. Po dokončené kultivaci mikrotitračních destiček byla pomocí přístroje pro manuální odečet

mikrotitračních destiček odečtena MIC, růst (respektive zákal), nebo nepřítomnost zákalu v jednotlivých jamkách mikrotitračních destiček s testovanými léčivými bylinkami a chlorhexidinem.

Obrázek 4 – Inkubované mikrotitrační destičky připravené na odečítání výsledku MIC, majoránka (M), fenykl (F), tymián (T), hřebíčkovce (H), kontrola růstu (KR), bedrník (A), chlorhexidin (CHX), kontrola růstu (KR)

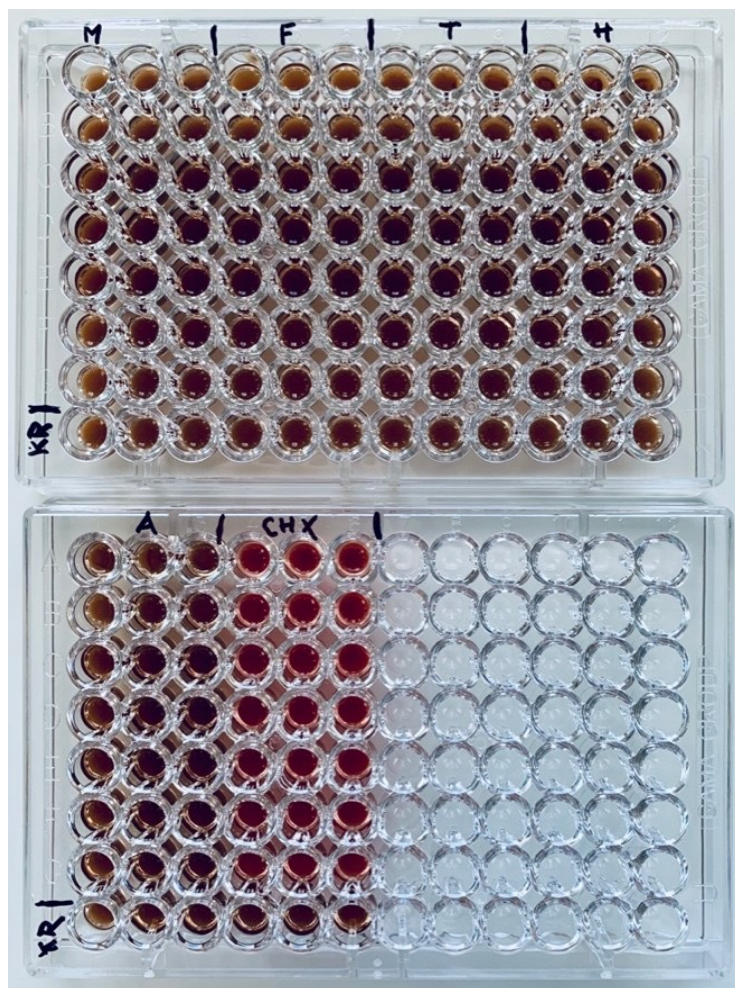


Foto autor

2.5.15 Výsledky testu

Ani jedna z potencionálně antimikrobiální látek ve vodném roztoku neinhibovala růst bakterie *S. mutans*. To znamená, že byl pozorován růst (respektive zákal) u všech testovaných vodných extraktů léčivých bylinek v řádku s nejvyšší koncentrací. Hodnota MIC pro majoránku zahradní (*Origanum majorana*) byla >6.500 mg/l, MIC vodného extraktu fenyklu obecného

(*Foeniculum vulgare*) >35.000 mg/l, MIC tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*) >22.000 mg/l, MIC hřebíčkovce vonného (*Syzygium aromaticum*) >15.000 mg/l a hodnota MIC vodného extraktu bedrníku anýzu (*Pimpinella anisum*) byla >40.800 mg/l.

Chlorhexidin inhiboval růst bakterie ve všech použitých koncentracích, nebyl pozorován růst (respektive zákal) ani u nejnižší testované koncentrace CHX, která byla 0,05 %. Pro kontrolu baktericidního, nebo bakteriostatického účinku bylo provedeno vyočkování z jamek s koncentrací 0,05 % CHX v množství 100 μ m na Columbia agar. Inkubace proběhla při teplotě $35 \pm 1^\circ\text{C}$, 24 hodin. Po inkubaci nebyl pozorován žádný růst bakterie *S. mutans*, účinek CHX v koncentraci 0,05 % byl baktericidní.

2.6 Expoziční test

2.6.1 Princip metody

Expoziční test je kvalitativní metoda, kterou lze použít pro srovnání různých látek s antibakteriálním účinkem a umožňuje stanovit nejkratší dobu účinné expozice.

Vhodná bakterie se naočkuje v množství $10^8 - 10^9$ CFU/ml do zkoušené látky a po určené době expozice se definované množství testované látky s mikroorganismem naočkuje do tekuté kultivační půdy. Po následné kultivaci se hodnotí růst nebo nepřítomnost růstu vybrané bakterie v porovnání s kontrolou.

2.6.2 Použitý mikroorganismus

Streptococcus mutans – CNCTC 6699^T – kmen získaný z České národní sbírky typových kultur (CNCTC)

2.6.3 Testované ústní vody

Curaprox Perio Plus+ Balance CHX 0,05

Curaprox Perio Plus+ Regenerate CHX 0,09

Curaprox Perio Plus+ Protect CHX 0,12

Curaprox Perio Plus+ Forte CHX 0,20

2.6.4 Materiál

Mueller-Hinton bujón obohacený o 5 % lyzát koňské krve a 20 mg/l β -nikotinamid adenin dinukleotid (β -NAD), s upravenými Ca^{++} a Mg^{++} kationty (MH-F bujón) – příprava podle normy ISO 20776-1, dokumentu EUCAST a výrobce sušiny⁶⁰ (Oxoid)

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

Ředící roztoky:

Fyziologický roztok

⁶⁰ THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING – EUCAST. Pozn. 63.

2.6.5 Přístroje

Automatická pipeta	(Eppendorf)
Laboratorní kahan s kličkami	(FUEGO)
Termostat 36°C ±1°C	(Thermo Scientific)
Automatická pipeta	(Eppendorf)
Vortex	(VELP Scientifica)
Nástavec na skleněné pipety	(Hi-Tech Lab)
Zákalový standard podle McFarlanda č. 2	(SZÚ)

Laboratorní sklo – Erlenmeyerovy baňky, pipety, zkumavky

2.6.6 Příprava inokula

Bakterie se uchovává v mrazu v konzervovaném stavu. Sterilní mikrobiologickou kličkou bylo odebráno malé množství konzervačního média s bakteriemi a vyočkováno na Columbia agar. V termostatu proběhla kultivace.

Vyrostlé kolonie *S. mutans* z připravené kultury na Columbia agaru byly sterilně přeneseny nad kahanem vyžíhanou mikrobiologickou kličkou do zkumavky tak, aby vznikl zákalový standard č. 2 podle McFarlanda s obsahem mikroorganismu 6×10^8 CFU/ml. Kolonie do zkumavky byly přeneseny tak, že se mikrobiologická klička s koloniemi třela o stěnu zkumavky u hladiny fyziologického roztoku. Tímto způsobem vznikla požadovaná bakteriální suspenze.

2.6.7 Provedení expozičního testu

K testování byly použity ústní vody Curaprox z řady Perio Plus+, Balance, Regenerate, Protect a Forte o různé koncentraci chlorhexidinu. Perio Plus+ Balance o nejnižší koncentraci 0,05 % chlorhexidinu, Perio Plus+ Regenerate obsahem chlorhexidinu 0,09 %, Perio Plus+ Protect 0,12 % a Perio Plus+ Forte s nejvyšší koncentrací chlorhexidinu 0,20 %.

Do čtyř sterilních Erlenmeyerových baněk o objemu 50 ml bylo automatickou pipetou přeneseno přesně 9,9 ml ústní vody, do každé baňky vždy jeden druh ústní vody. Následně byla do všech čtyř Erlenmeyerových baněk

přidána bakteriální suspenze připravená podle zákalového standardu č. 2 McFarlanda v množství 0,1 ml.

Po stanovené době expozice bylo z každé baňky vyočkováno 0,01 ml suspenze testovaných ústních vod do zkumavek s 5 ml MH-F bujónu. Doba expozice, po kterou testované ústní vody působily na bakterii *S. mutans*, byla určena na 1 minutu, 10 minut a 60 minut. Zkumavky byly následně vloženy do termostatu. Inkubace proběhla 24 hodin při teplotě $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.6.8 Kontrola růstu a počtu bakterií *Streptococcus mutans*

Kontrola byla provedena naředěním suspenze připravené podle zákalového standardu č. 2 McFarland na koncentraci 10^{-2} , vyočkována v množství 0,1 ml do 5 ml MH-F bujónu na Columbia agar. Následně proběhla inkubace přes noc při $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Přesný počet bakterií byl stanoven dodatečně zředovací metodou a kultivací na Columbia agaru. Do připravených čtyř zkumavek s 9,9 ml fyziologického roztoku bylo pipetou přeneseno 0,1 ml základní suspenze, vždy novou špičkou. Vznikla řada ředění 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} . Z posledních dvou zkumavek (10^{-6} , 10^{-8}) se přeneslo 0,5 ml suspenze na Petriho misky s Columbia agarem. Pro každou koncentraci byly použity 2 Petriho misky.

Petriho misky s Columbia agarem s ředěním 10^{-6} po kultivaci obsahovaly cca 300 kolonií bakterie *S. mutans*, pro stanovení počtu byly počítány kolonie na Columbia agaru s ředěním 10^{-8} .

Celkem bylo nalezeno 27 kolonií na obou Petriho miskách s Columbia agarem. Počet CFU/ml v základní suspenzi byl:

$$27 \times 10^8 = 2,7 \times 10^9 \text{ CFU/ml}$$

Požadavek na množství mikroorganismů 6×10^8 – 10^9 CFU/ml pro tento test byl splněn.

Obrázek 5 – Kolonie *S. mutans* na Columbia agaru (vlevo ředění 10^{-6} , vpravo ředění 10^{-8})

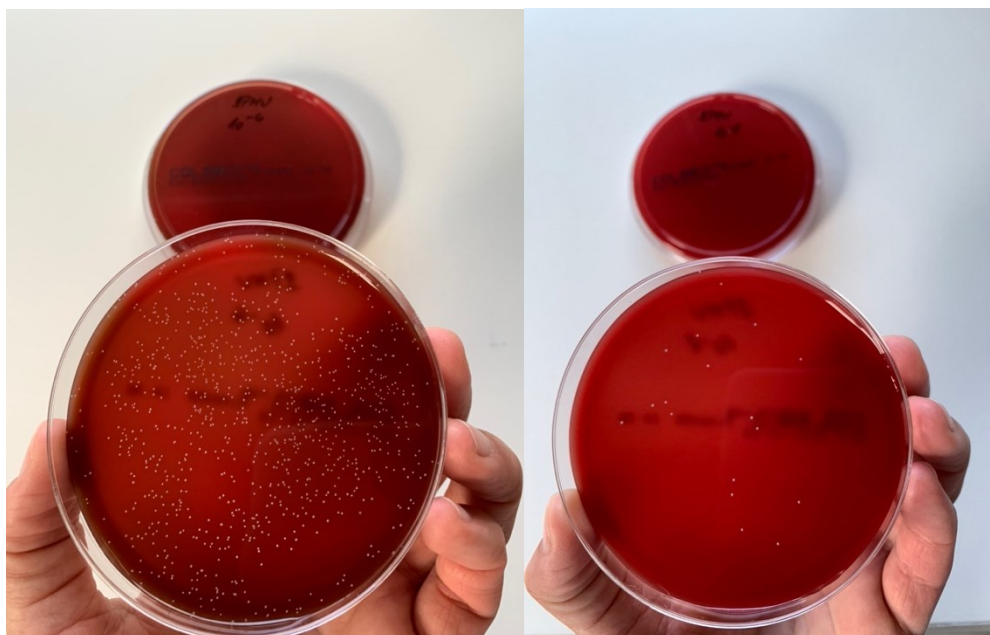


Foto autor

2.6.9 Výsledky expozičního testu

Výsledky expozičního testu byly hodnoceny po kultivaci a porovnány se zkumavkou kontroly růstu v MH-F bujónu (KR). Hodnotila se přítomnost zákalu a/nebo sedimentu. Všechny zkumavky s testovanými vzorky po expozici ústních vod s chlorhexidinem, s délkou trvání expozice 1 minuta, 10 minut a 60 minut, byly bez zákalu a neobsahovaly sediment. Ve zkumavce s KR byl pozorován zákal. Pro přehlednost byly výsledky zpracovány do tabulky (Tabulka 6).

Tabulka č. 6 – Výsledky expozičního testu (přítomnost + / nepřítomnost –)

	Perio Plus+ Balance CHX 0,05			Perio Plus+ Regenerate CHX 0,09		
Doba expozice	1 minuta	10 minut	60 minut	1 minuta	10 minut	60 minut
Zákal	–	–	–	–	–	–
Sediment	–	–	–	–	–	–

	Perio Plus+ Protect CHX 0,12			Perio Plus+ Forte CHX 0,20		
Doba expozice	1 minuta	10 minut	60 minut	1 minuta	10 minut	60 minut
Zákal	–	–	–	–	–	–
Sediment	–	–	–	–	–	–

	Kontrola růstu (KR)
Zákal	+
Sediment	+

Obrázek 6 – Perio Plus+ Balance 0,05 a Perio Plus+ Regenerate 0,09 s kontrolní zkumavkou (KR), vyočkované po 1 minutě

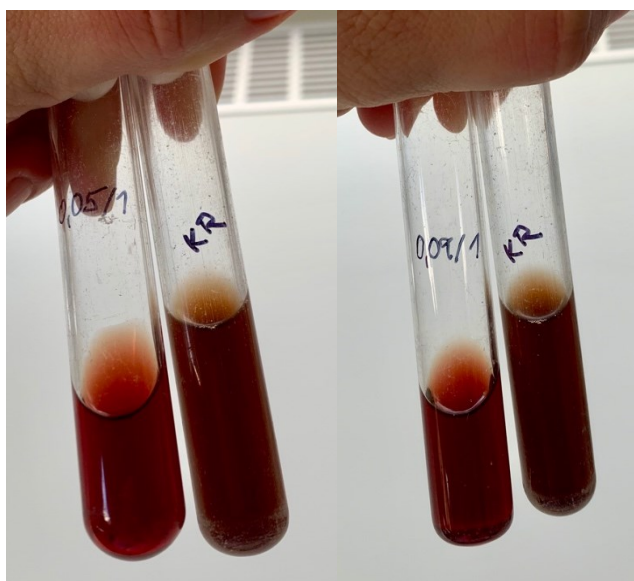


Foto autor

Obrázek 7 – Perio Plus+ Protect 0,12 a Perio Plus+ Forte 0,20 s kontrolní zkumavkou (KR), vyočkované po 1 minutě

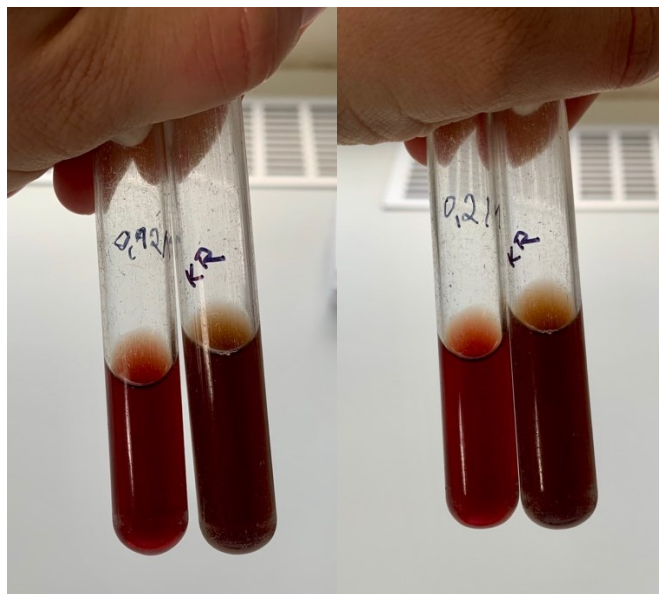


Foto autor

Pro zjištění baktericidního nebo bakteriostatického účinku ústních vod Perio Plus s obsahem chlorhexidinu na bakterii *S. mutans*, bylo provedeno kontrolní vyočkování zkumavek s MH-F bujónem s nejnižší dobou expozice, ve kterých nebyl pozorován růst (zákal).

Z každé zkumavky s MH-F bujónem s expoziční dobou 1 minuta bylo vyočkováno 2x 0,5 ml vzorku na Petriho misky s Columbia agarem. Kultivace agaru byla 24 hodin při teplotě $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Pro ověření čistoty bakteriální suspenze *S. mutans* bylo vyočkováno ze zkumavky KR množství 0,1 ml na Petriho misky s Columbia agarem. Následná kultivace byla 24 hodin při teplotě $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Obrázek 8 – Příprava před vyočkováním bakteriální suspenze ze zkumavek ve stojanu na Petriho misky s Columbia agarem

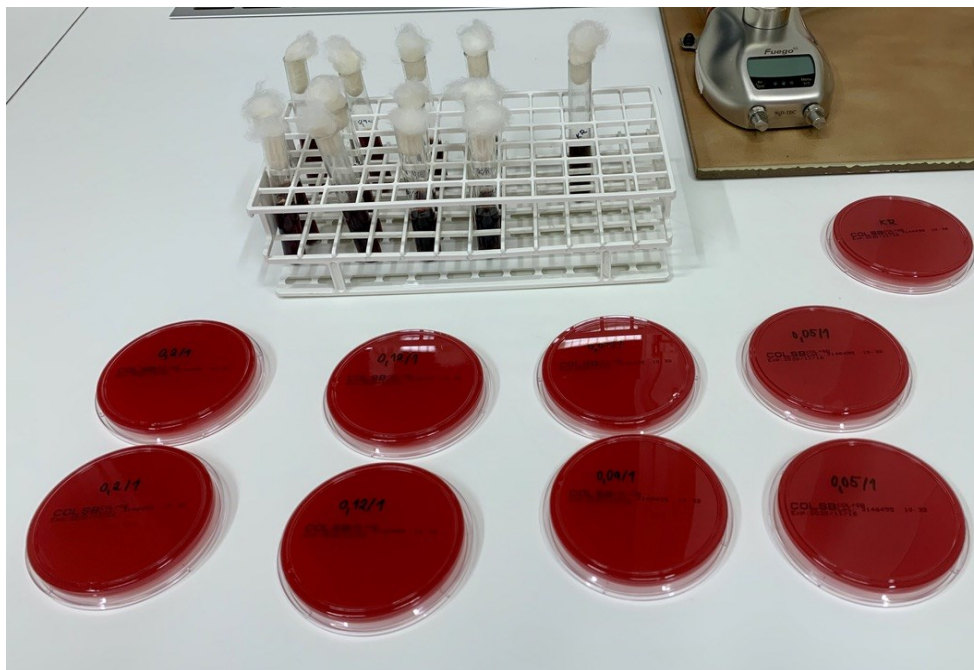


Foto autor

Kultivace ani jednoho vzorku neprokázala přítomnost *S. mutans*.

Všechny druhy ústních vod Perio Plus již po době expozice 1 minuty, což je doba výplachu dutiny ústní doporučená výrobcem, prokázaly baktericidní účinek na bakterii *S. mutans*.

2.7 Diskuze

Hypotéza č. 1 „Antibakteriální účinek vodných extraktů u vybraných medicínsky významných rostlin na bakterii *S. mutans* bude mít baktericidní nebo bakteriostatickou účinnost“, **nebyla potvrzena ani u jednoho testovaného vzorku vodných extraktů** medicínsky významných rostlin. Žádná testovaná léčivá bylina nevykazovala inhibiční účinek na růst bakterie *S. mutans*, ani v nejvyšší použité koncentraci. Hodnoty MIC vodných extraktů byly následující: majoránka zahradní (*Origanum majorana*) >6.500 mg/l, fenykl obecný (*Foeniculum vulgare*) >35.000 mg/l, tymián obecný (*Thymus vulgaris*) >22.000 mg/l, hřebíčkovec vonný (*Syzygium aromaticum*) >15.000 mg/l, bedrník anýz (*Pimpinella anisum*) >40.800 mg/l.

Účinnost etanolového extraktu majoránky zahradní je popsána v zajímavé srovnávací studii, která inkorporovala 2 % extrakt do formy hydrogelu a srovnávala jeho účinnost se stejnou koncentrací CHX. Extrakt in vitro vykazoval antimikrobiální účinnost a účinnost proti tvorbě orálního biofilmu na bakterii *S. mutans* a *Streptococcus sobrinus*⁶¹. Antimikrobiální aktivitu alkoholového extraktu prokázaly i další studie⁶². Vodný extrakt majoránky antimikrobiální aktivitu nevykazoval, 70 % etanolový extrakt ano⁶³.

Vodný extrakt fenyklu obecného vykazoval antimikrobiální účinnost na bakterii *S. mutans* při koncentraci 5000 µg/ml MIC⁶⁴. 100 % koncentrace vodného extraktu z fenyklových semen vykazuje baktericidní účinnost, 50 % extrakt již také vykazuje inhibici růstu *S. mutans*⁶⁵. Metanolový extrakt fenyklových semen vykazuje podobnou inhibiční aktivitu jako 0,2 % CHX⁶⁶.

Studie Hammad a kol. zkoumala účinnost antimikrobiálních vlastností vodných extraktů tymiánu obecného v různých koncentracích na bakterii *S. mutans*. Nejvyšší účinnost prokázal 20 % vodný extrakt s dobou expozice 48 hodin. Extrakt z 96 % inhiboval růst *S. mutans* a významně snížil adhezi *S. mutans* k epitelialním buňkám tvářové sliznice⁶⁷. Babpour et al. neprokázali účinnost vodného ani etanolového extraktu připraveného ve 150 ml roztoku s 15 g mletého sušeného tymiánu. Stejný závěr měla v jejich studii i meduňka lékařská, škumpa

⁶¹ VACA-CHÁVEZ, Maricarmen, Jorge Jesús RODRÍGUEZ-ROJAS, Uziel CASTILLO-VELÁZQUEZ, et al. Antimicrobial and Antibiofilm Effect of Hydrogel with Origanum vulgare on Culture of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus. *International journal of odontostomatology*. 2021, **15**(1), 213-221. ISSN 0718-381X. Dostupné z: doi:10.4067/S0718-381X2021000100213

⁶² HICKL, Joachim, Aikaterini ARGYROPOULOU, Maria Eleni SAKAVITSI, et al. Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of Streptococcus mutans. *PLOS ONE*. 2018, **13**(12). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0207574

⁶³ KRUMINA, G, L RATKEVICH, V NIKOLAJEVA, A BABARIKINA a D BABARYKIN. Influence of plant extracts on the growth of oral pathogens Streptococcus mutans and Candida albicans in vitro. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*. 2015, **64**(1), 62-67. ISSN 1736-6046. Dostupné z: doi:10.3176/proc.2015.1.08

⁶⁴ Antibacterial Potency of Aqueous Plant Extracts against Streptococcus mutans. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*. 2014, **22**(2), 85-89. ISSN 109.1566.

⁶⁵ An In-vitro assessment of the antimicrobial efficacy of fennel and sesame seed extracts against Streptococcus mutans. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. 2018, **5**(4), 308-312. ISSN 2394-3211.

⁶⁶ GULATI, RK, P BHATNAGAR a A BHATNAGAR. Antimicrobial Efficacy of Chemical and Herbal Agents against Streptococcus mutans: An in vitro study. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*. 2018, **18**(1), 1-5. ISSN 15190501. Dostupné z: doi:10.4034/PBOCI.2018.181.50

⁶⁷ HAMMAD, M, A-K SALLAL a H DARMANI. Inhibition of Streptococcus mutans adhesion to buccal epithelial cells by an aqueous extract of Thymus vulgaris. *International Journal of Dental Hygiene*. 2007, **5**(4), 232-235. ISSN 1601-5029. Dostupné z: doi:10.1111/j.1601-5037.2007.00266.x

koželužská a šácholan velkokvětý⁶⁸. Esenciální olej tymiánu obecného vykazoval antimikrobiální aktivitu nejen u *S. mutans*. Pomocí agarové diluční metody a mikrodiluční metody byl zkoumán jeho účinek také na *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis* a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*⁶⁹. Poslední 2 zmíněné bakterie hrají důležitou roli v etiopatogenezi parodontitidy⁷⁰. Účinnost esenciálních olejů, etanolu, triklosanu, CHX a jejich kombinace popisuje studie Gonçalves et al⁷¹.

Diluční a agarovou diluční metodou nepotvrdila účinnost vodného extraktu hřebíčkovce vonného studie Krumina a kolektivu, zkoumající účinnost na *S. mutans* a *Candidu albicans*. Vyšší antibakteriální aktivitu vykazoval v etanolovém roztoku⁷². Srovnávací studie vodného extraktu a hřebíčkovce vonného extrahovaného v metanolu, vykazuje inhibiční účinky u obou extraktů s mírně vyšším účinkem u alkoholového extraktu⁷³.

Baktericidní účinnost hydroalkoholového extraktu získaného macerací z bedrníku anýze na *S. mutans* prokázali Kermanshah s kolektivem. Pokus byl proveden makrodiluční bujónovou metodou, MIC byla 12,5 µg/l⁷⁴. Agarovou diluční metodou došli ke stejnému závěru^{75, 76}.

⁶⁸ BABPOUR, E., S. A. ANGAJI a S. M. ANGAJI. Antimicrobial effects of four medicinal plants on dental plaque. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009, **3**(3), 132-137. ISSN 1996-0875.

⁶⁹ FANI, Mohammadmehdi a Jamshid KOHANTEB. In Vitro Antimicrobial Activity of Thymus vulgaris Essential Oil Against Major Oral Pathogens. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 2017, **22**(4), 660-666. ISSN 2156-5872. Dostupné z: doi:10.1177/2156587217700772

⁷⁰ STRAKA, Michal. *Etiopatogeneze parodontitid a jejich vztah k systémovým onemocněním*. Praha: StomaTeam, 2016, 166 s. ISBN 978-80-904377-3-9. S. 24.

⁷¹ GONÇALVES, G. M. S., M. BOTTARO a A. C. NILSON. Effect of the Thymus vulgaris essential oil on the growth of Streptococcus mutans. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada: Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*. 2011, **32**(3), 375-380. ISSN 1808-4532.

⁷² KRUMINA, G, L RATKEVICH, V NIKOLAJEVA, A BABARIKINA a D BABARYKIN. Influence of plant extracts on the growth of oral pathogens Streptococcus mutans and Candida albicans in vitro. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*. 2015, **64**(1), 62-67. ISSN 1736-6046. Dostupné z: doi:10.3176/proc.2015.1.08

⁷³ RAHIM, Zubaidah Haji Abd a Hasnah Begum Said Gulam KHAN. Comparative studies on the effect of crude aqueous (CA) and solvent (CM) extracts of clove on the cariogenic properties of Streptococcus mutans. *Journal of Oral Science*. 2006, **48**(3), 117-123. ISSN 1343-4934. Dostupné z: doi:10.2334/josnusd.48.117

⁷⁴ KERMANSHAH, H., S. HASHEMI KAMANGAR, S. ARAMI, A. MIRSALEHIAN, M. KAMALINEJAD, M. KARIMI a F. JABALAMOLI. In vitro evaluation of antibacterial activity of hydroalcoholic extract of Salvia officinalis and Pimpinella anisum against cariogenic bacteria. *Journal of Dental Medicine*. 2009, **22**(2), 149-154. ISSN 1024-641X.

⁷⁵ KERMANSHAH, H., H. KAMANGAR, S. ARAMI, A. MIRSALEHIAN, M. KAMALINEGAD, M. KARIMI a F. JABALAMELI. Comparison of Antibacterial Effect of Hydroalcoholic Extract of Four Plants against Cariogenic Microorganisms by two in Vitro Methods. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2011, **13**(6), 21-29. Dostupné také z: <http://jbums.org/article-1-3921-en.html>

⁷⁶ KERMANSHAH, H., H. KAMANGAR, S. ARAMI, A. MIRSALEHIAN, M. KAMALINEGAD, M. KARIMI, F. JABALAMELI a MJ. FARD. The effect of hydro alcoholic extract of seven plants on cariogenic bacteria--an in vitro evaluation. *Oral Health and Dental Management*. 2014, **13**(2), 395-401.

Etanol je nejčastěji používané organické rozpouštědlo⁷⁷, které s největší pravděpodobností lépe extrahuje aktivní rostlinné látky⁷⁸. Alkoholové bylinné extrakty se často udávají jako účinnější, v porovnání s vodnými extrakty^{79, 80}.

Hypotéza č. 2 „Z dostupných informací o chlorhexidinu diglukonátu víme, že působí antimikrobiálně od koncentrace 0,0002 %. Očekáváme baktericidní nebo bakteriostatický účinek chlorhexidinu v koncentraci 0,05 % na *S. mutans*“, byla **potvrzena**. Provedená mikrodiluční metoda vykazovala inhibici růstu bakterie *S. mutans*, v jamkách řádku G, tripletu CHX (sloupce 4, 5, 6) mikrotitrační destičky nebyl pozorován růst bakterie. Kontrolním vyočkováním vzorků na agarové plotny a jejich inkubací, byla prokázána baktericidní účinnost testovaných vzorků.

Bakteriostatický účinek CHX na *S. mutans* byl prokázán již při koncentraci 0,0002 %. Čím více kolonií *S. mutans* obsahovalo inokulum, tím vyšší musela být použita dávka CHX pro dosažení baktericidního účinku. Hennessey uvádí, že koncentrace *S. mutans* 10⁸/ml vyžadovala 50x více CHX než u koncentrace 1000/ml, aby byl inhibován růst bakterie⁸¹.

Hypotéza č. 3 „Antimikrobiální účinek testované ústní vody s nejnižší koncentrací chlorhexidinu 0,05 % Perio Plus+ Balance, bude vykazovat bakteriostatickou nebo baktericidní účinnost již po době expozice 60 s, doporučená doba z příbalového letáku ústní vody“, **potvrdila baktericidní účinnost** u testovaného vzorku ústní vody s expozičním časem 60 s. Ověření účinnosti bylo provedeno kultivací testovaného vzorku.

⁷⁷ DOG, Tieraona Low. Smart Talk on Supplements and Botanicals: Herbal Teas Versus Tinctures; Standardized Extracts; Green Tea. *Alternative and Complementary Therapies*. 2009, **15**(3), 101-103. ISSN 1076-2809. Dostupné z: doi:10.1089/act.2009.15309

⁷⁸ KOÇ, Ayşe Nedret, Sibel SILICI, Filiz KASAP, Hatice Tuna HÖRMET-ÖZ, Hikmet MAVUS-BULDU a Barış Derya ERCAL. Antifungal Activity of the Honeybee Products Against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. *Journal of Medicinal Food*. 2011, **14**(1-2), 128-134. ISSN 1096-620X. Dostupné z: doi:10.1089/jmf.2009.0296

⁷⁹ KRISCH, J., M. TÖLGYESI, T. PAPP a C. VÁGVÖLGYI. Effect of fruit juices and pomace extracts on the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Acta Biologica Szegediensis*. 2008, **52**(2), 267-270. Dostupné také z: <http://abs.bibl.u-szeged.hu/index.php/abs/article/view/2639/2631>

⁸⁰ MALINI, M., G. ABIRAMI, V. HEMALATHA a G. ANNADURAI. Antimicrobial activity of ethanolic and aqueous extracts of medicinal plants against waste water pathogens. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology*. 2013, **3**(2), 40-42.

⁸¹ HENNESSEY, T. D. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *Journal of Periodontal Research*. 1973, **8**(s12), 61-67. ISSN 0022-3484. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0765.1973.tb02166.x

Rozdílnost výsledků může být dána použitím rozdílných metod extrakce bylin a množstvím použité navážky. Jednotlivé vzorky bylin mohou být také rozdílné, záleží na použité šarži již koupeného sušeného výrobku, každá jednotlivá rostlina může obsahovat rozdílný podíl aktivních látek, záleží také na oblasti původu a podmínkách, ve kterých rostlina vyrůstala, dále i na sběru rostliny, ale určitou roli může také mít postup sušení či metoda skladování. Různorodost výsledků ovlivňuje i použitá metoda stanovení citlivosti antimikrobiálních extraktů.

Výsledky studií poukazují na důležitost dalšího zkoumání alternativní léčby, pomocí medicínsky významných léčivých bylin. Tyto byliny se dají považovat za zajímavé terapeutické doplňky v oblasti dentální hygieny. Další výzkum by mohl použít etanolové extrakty medicínsky významných rostlin či zkoumat vliv extraktů na parodontopatogenní bakterie.

Závěr

Ústní voda Curaprox Perio Plus⁺ Balance o koncentrací CHX 0,05 % prokázala po 60 s expozici baktericidní účinnost na primárního kolonizátora dutiny ústní a hlavní etiologický agens vzniku zubního kazu, bakterii *S. mutans*. Baktericidní účinnost byla ověřena vyočkováním vzorku po 1 minutě na Columbia agar a jeho následnou kultivací a odečtením výsledku. Curaprox Perio Plus⁺ Balance se dá nepřetržitě používat až po dobu 6 měsíců, s minimálním negativním účinkem v podobě zbarvení zubů, díky inovativnímu složení, které podporuje přirozenou bělost zubů, a navíc má velmi příjemnou chuť. Ideální je její profylaktické použití u pacientů s potřebou chemické kontroly plaku. Může to být pacient s gingivitidou, ortodontický pacient, osoba se sníženou manuální zručností, pacient s léky či věkem indukovanou kandidovou infekcí, ale i pacienti dlouhodobě nemocní na lůžkových oddělení.

Vodné extrakty medicínsky významných léčivých rostlin v použité maximální koncentraci, jsou na hlavní kariogenní bakterii neúčinné. Ani jedna z bylin nevykazovala potenciál inhibice růstu bakterie *S. mutans*. Vzhledem. K negativnímu výsledku se nedá pokus se stejným záměrem aplikovat do domácího prostředí pacienta.

Souhrn

Bakalářská práce s názvem „Stanovení in vitro účinnosti potencionálně antimikrobiálních látek u modelového organismu *Streptococcus mutans*“ zkoumá problematiku účinnosti vodných extraktů medicínsky významných léčivých rostlin na bakterii, hlavní etiologický agens vzniku zubního kazu, *S. mutans*. Byly vybrány léčivé rostliny s prokázaným antibakteriálním, protizánětlivým, případně analgetickým účinkem. Použité léčivé rostliny: majoránka zahradní (*Origanum majorana*), fenykl obecný (*Foeniculum vulgare*), tymián obecný (*Thymus vulgaris*), hřebíčkovec vonný (*Syzygium aromaticum*) a bedrník anýz (*Pimpinella anisum*). Účinnost byla srovnávána s jednou nejčastěji používanou antimikrobiální látkou ve stomatologii, chlorhexidin diglukonát v koncentracích od 0,05 do 0,2 %. Pokus byl proveden pro zjištění možné přírodní alternativy tak, aby si vodné extrakty z bylin byl schopen pacient vytvořit doma sám. Souvisí to se zvyšujícím se trendem používání přírodních produktů v domácnosti. Cílem druhého experimentu bylo zjistit, jaký typ účinku (bakteriostatický nebo baktericidní) mají běžně dostupné ústní vody s chlorhexidinem v koncentracích 0,2 %, 0,12 %, 0,09 % a 0,05 % na bakterii *S. mutans* po různé době expozice.

Klíčová slova

Antimikrobiální látky, bylinné extrakty, chlorhexidin diglukonát, léčivé rostliny, minimální inhibiční koncentrace (MIC), *Streptococcus mutans*

Summary

This bachelor's thesis entitled, "Determination of in vitro efficacy of potentially antimicrobial agents in a model organism *Streptococcus mutans*," examines the issue of efficacy of aqueous extracts of medically important medicinal plants on bacteria, the main etiological agent of tooth decay, *S. mutans*. The following medicinal plants were chosen for their proven antibacterial, anti-inflammatory or analgesic effect. The medicinal plants used: garden marjoram (*Origanum majorana*), fennel (*Foeniculum vulgare*), thyme (*Thymus vulgaris*), clove (*Syzygium aromaticum*) and anise (*Pimpinella anisum*). The efficacy was compared with one of the most commonly used antimicrobials in dentistry, chlorhexidine digluconate, in concentrations from 0,05 to 0,2 %. The experiment was performed to determine a possible organic alternative, so that the patient could create aqueous extracts of herbs at home. This is based on the increasing interest in the use of organic products in the household. The aim of the second experiment was to determine the level of effectiveness (bacteriostatic or bactericidal) of commonly available mouthwashes with chlorhexidine in concentrations of 0,2 %, 0,12 %, 0,09 % and 0,05 % in treating *S. mutans* after different lengths of exposure.

Key words

Antimicrobial agents, herbal extracts, chlorhexidine digluconate, medicinal plants, minimum inhibitory concentration, *Streptococcus mutans*

Seznam použitých zdrojů

Knižní zdroje:

Bylinky naší prabáby. Praha: Lunarion, 1991. ISBN 80-900170-8-8.

CURTIS, Susan. *Domácí bylinář: příprav, uvař a smíchej léčivé bylinky*. Praha: Ikar, 2012. ISBN 978-80-249-1809-9.

GREŠÍK, Valdemar. *Léčivé rostliny: jejich vlastnosti, účinky a použití. Evropa. Díl 2*. Praha: Eminent, 2013. ISBN 978-80-7281-460-2.

GREŠÍK, Valdemar. *Léčivé rostliny: jejich vlastnosti, účinky a použití. Čechy a Morava. Díl 1*. Praha: Eminent, 2008. ISBN 9788072813315.

HELLWIG, Elmar, Thomas ATTIN a Joachim KLIMEK. *Záchovná stomatologie a parodontologie*. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0311-4.

KOLÁŘOVÁ, Libuše. *Obecná a klinická mikrobiologie*. Praha: Galén, 2020. ISBN 978-80-7492-477-4.

SPILKOVÁ, Jiřina. *Farmakognozie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-802-4632-643.

STAŇKOVÁ-KRÖHNOVÁ, Magdaléna. *Bylinky pro děti a maminky 2: praktické použití léčivých rostlin pro rodiny s dětmi od jara do zimy*. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2606-9.

STAŇKOVÁ-KRÖHNOVÁ, Magdaléna. *Bylinky pro děti a maminky: praktické použití léčivých rostlin pro rodiny s dětmi od jara do zimy*. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-802-4723-129.

STRAKA, Michal. *Etiopatogeneze parodontitid a jejich vztah k systémovým onemocněním*. Praha: StomaTeam, 2016, 166 s. ISBN 978-80-904377-3-9.

ŠVIHOVEC, Jan, Jan BULTAS, Pavel ANZENBACHER, Jaroslav CHLÁDEK, Jan PŘÍBORSKÝ, Jiří SLÍVA a Martin VOTAVA. *Farmakologie*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.

Vědecké články:

An In-vitro assessment of the antimicrobial efficacy of fennel and sesame seed extracts against *Streptococcus mutans*. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. 2018, **5**(4), 308-312. ISSN 2394-3211.

Antibacterial Potency of Aqueous Plant Extracts against *Streptococcus mutans*. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*. 2014, **22**(2), 85-89. ISSN 109.1566.

BABPOUR, E., S. A. ANGAJI a S. M. ANGAJI. Antimicrobial effects of four medicinal plants on dental plaque. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009, **3**(3), 132-137. ISSN 1996-0875.

DOG, Tieraona Low. Smart Talk on Supplements and Botanicals: Herbal Teas Versus Tinctures; Standardized Extracts; Green Tea. *Alternative and Complementary Therapies*. 2009, **15**(3), 101-103. ISSN 1076-2809. Dostupné z: doi:10.1089/act.2009.15309

FANI, Mohammadmehdi a Jamshid KOHANTEB. In Vitro Antimicrobial Activity of *Thymus vulgaris* Essential Oil Against Major Oral Pathogens. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 2017, **22**(4), 660-666. ISSN 2156-5872. Dostupné z: doi:10.1177/2156587217700772

GONÇALVES, G. M. S., M. BOTTARO a A. C. NILSON. Effect of the *Thymus vulgaris* essential oil on the growth of *Streptococcus mutans*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada: Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*. 2011, **32**(3), 375-380. ISSN 1808-4532.

GULATI, RK, P BHATNAGAR a A BHATNAGAR. Antimicrobial Efficacy of Chemical and Herbal Agents against *Streptococcus mutans*: An in vitro study. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*. 2018, **18**(1), 1-5. ISSN 15190501. Dostupné z: doi:10.4034/PBOCI.2018.181.50

HAMMAD, M, A-K SALLAL a H DARMANI. Inhibition of *Streptococcus mutans* adhesion to buccal epithelial cells by an aqueous extract of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Dental Hygiene*. 2007, **5**(4), 232-235. ISSN 1601-5029. Dostupné z: doi:10.1111/j.1601-5037.2007.00266.x

HEINZ, Bernd, Mehrdad Arjomand KERMANIE a Sören JEPSEN. Použití chlorhexidinu v zubním lékařství. *Quintessenz. Parodontologie*. 2000, **1**(2), 47-63. ISSN 1213-0125.

HENNESSEY, T. D. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *Journal of Periodontal Research*. 1973, **8**(s12), 61-67. ISSN 0022-3484. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0765.1973.tb02166.x

HICKL, Joachim, Aikaterini ARGYROPOULOU, Maria Eleni SAKAVITSI, et al. Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *PLOS ONE*. 2018, **13**(12). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0207574

HOOVER, S. J., M. A. O. LEWIS, M. J. WILSON a D. W. WILLIAMS. Antimicrobial activity of Citrox® bioflavonoid preparations against oral microorganisms. *British Dental Journal*. 2011, **210**(1), E22-E22. ISSN 0007-0610. Dostupné z: doi: 10.1038/sj.bdj.2010.1224

KERMANS SHAH, H., H. KAMANGAR, S. ARAMI, A. MIRSALEHIAN, M. KAMALINEGAD, M. KARIMI, F. JABALAMELI a MJ. FARD. The effect of hydro alcoholic extract of seven plants on cariogenic bacteria--an in vitro evaluation. *Oral Health and Dental Management*. 2014, **13**(2), 395-401.

KERMANS SHAH, H., H. KAMANGAR, S. ARAMI, A. MIRSALEHIAN, M. KAMALINEGAD, M. KARIMI a F. JABALAMELI. Comparison of Antibacterial Effect of Hydroalcoholic Extract of Four Plants against Cariogenic Microorganisms by two in Vitro Methods. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2011, **13**(6), 21-29. Dostupné také z: <http://jbums.org/article-1-3921-en.html>

KERMANS SHAH, H., S. HASHEMI KAMANGAR, S. ARAMI, A. MIRSALEHIAN, M. KAMALINEJAD, M. KARIMI a F. JABALAMOLI. In vitro evaluation of antibacterial activity of hydroalcoholic extract of *Salvia officinalis* and *Pimpinella anisum* against cariogenic bacteria. *Journal of Dental Medicine*. 2009, **22**(2), 149-154. ISSN 1024-641X.

KOÇ, Ayşe Nedret, Sibel SILICI, Filiz KASAP, Hatice Tuna HÖRMET-ÖZ, Hikmet MAVUS-BULDU a Barış Derya ERCAL. Antifungal Activity of the Honeybee Products Against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. *Journal of Medicinal Food*. 2011, **14**(1-2), 128-134. ISSN 1096-620X. Dostupné z: doi:10.1089/jmf.2009.0296

KRISCH, J., M. TÖLGYESI, T. PAPP a C. VÁGVÖLGYI. Effect of fruit juices and pomace extracts on the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Acta Biologica Szegediensis*. 2008, **52**(2), 267-270. Dostupné také z: <http://abs.bibl.u-szeged.hu/index.php/abs/article/view/2639/2631>

KRUMINA, G, L RATKEVICH, V NIKOLAJEVA, A BABARIKINA a D BABARYKIN. Influence of plant extracts on the growth of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in vitro. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*. 2015, **64**(1), 62-67. ISSN 1736-6046. Dostupné z: doi:10.3176/proc.2015.1.08

MAHDIZADEH, Shahla, Maryam KHALEGHI GHADIRI a Ali GORJI. Avicenna's Canon of Medicine: a review of analgesics and anti-inflammatory substances. *Avicenna J Phytomed*. 2015, **5**(3), 182–202.

MALINI, M., G. ABIRAMI, V. HEMALATHA a G. ANNADURAI. Antimicrobial activity of ethanolic and aqueous extracts of medicinal plants against waste water pathogens. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology*. 2013, **3**(2), 40-42.

MERGLOVÁ, Vlasta. Mikrobiologické testy v prevenci zubního kazu. *Vox paediatricae*. 2005, **5**(8), 18-19. ISSN 1213-2241.

RAHIM, Zubaidah Haji Abd a Hasnah Begum Said Gulam KHAN. Comparative studies on the effect of crude aqueous (CA) and solvent (CM) extracts of clove on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans*. *Journal of Oral Science*. 2006, **48**(3), 117-123. ISSN 1343-4934. Dostupné z: doi:10.2334/josnusd.48.117

RUPPERT, Martin a Ulrich SHLAGENHAUF. Chlorhexidin v zubním lékařství. *Quintessenz. Parodontologie*. 2004, **5**(1), 26-34. ISSN 1213-0125.

VACA-CHÁVEZ, Maricarmen, Jorge Jesús RODRÍGUEZ-ROJAS, Uziel CASTILLO-VELÁZQUEZ, et al. Antimicrobial and Antibiofilm Effect of Hydrogel with *Origanum vulgare* on Culture of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *International journal of odontostomatology*. 2021, **15**(1), 213-221. ISSN 0718-381X. Dostupné z: doi:10.4067/S0718-381X2021000100213

Legislativní dokumenty:

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: Český normalizační institut, 2007.

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.

THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING – EUCAST. *Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method*. Version 6.0. 2020, 5 s. Dostupné také z:
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2020_manuals/Media_preparation_v_6.0_EUCAST_AST.pdf

Jiné zdroje:

CURADENT AG – BETTER HEALTH FOR YOU. *Curaprox: Ústní voda Perio Plus+ Regenerate CX – P + CHX 0,09*. Kriens, 2020. Příbalový leták.

CURADENT AG – BETTER HEALTH FOR YOU. *Curaprox: Ústní voda Perio Plus+ Balance CX – P + CHX 0,05*. Kriens, 2020. Příbalový leták.

CURADENT AG – BETTER HEALTH FOR YOU. *Curaprox: Ústní voda Perio Plus+ Protect CX – P + CHX 0,12*. Kriens, 2020. Příbalový leták.

CURADENT AG – BETTER HEALTH FOR YOU. *Curaprox: Ústní voda Perio Plus+ Forte CX – P + CHX 0,20*. Kriens, 2020. Příbalový leták.

On-line zdroje:

BEDNÁŘ, M., J. SMÍŠEK, J. SCHINDLER, V. NĚMEČKOVÁ a V. ADÁMKOVÁ. PŘÍRUČKA MIKROBIOLOGIE PRO BAKALÁŘE 3. LF UK: Diluční metoda. In: *Mikrobiologie 3.lf* [online]. Praha: Ústav mikrobiologie [cit. 2021-4-29]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/index.html>

Hřebíček a jeho léčebné účinky. In: *Jidelníček pro zdraví* [online]. [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: <http://jidelnicekprozdravi.cz/hrebicek-a-jeho-lecebne-ucinky/>

HUBÁČKOVÁ, Markéta. Bez majoránky by nebyl bramborák ani bramboračka. In: *Sazenička* [online]. 2018 [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: <https://sazenicka.cz/majoranka/>

MLČOCH, Zdeněk. Majoránka – účinky na zdraví, co léčí, použití, užívání, využití, pěstování. In: *Bylinky pro všechny* [online]. 2014 [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: <https://www.bylinkyprovsechny.cz/byliny-kere-stromy/byliny/113-majoranka-ucinky-na-zdravi-co-leci-pouziti-uzivani>

MRÁKOTOVÁ, Alena. Fenykl – výborný pomocník při kolikách a nadýmání. In: *Zdravě.cz* [online]. Praha, 2010 [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: <https://nadymani-a-plynatost.zdrave.cz/fenykl-pomocnik-pri-kolikach-a-nadymani/>

Perio Plus+ mix, 4x100ml. In: *Curaprox: B2B portál pro profesionály* [online]. [cit. 2020-11-13]. Dostupné z: <http://www.curaproxprofi.cz/produkty/perio-plus-mix-4x100ml-565/>

SKRUŽNÁ, Jarmila. Bedrník anýz. In: *Medicina.cz: První český zdravotnický portál* [online]. 2002 [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: <http://medicina.cz/clanky/3756/34/Bedrnik-anyz/>

TYMIÁN OBECNÝ sypaný bylinný čaj. In: *Centrum bylin* [online]. Brno [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: <https://www.centrum-bylin.cz/TYMIAN-OBECNY-sypany-bylinny-caj>

VORLOVÁ, Michaela. Anýz léčí kašel, uklidňuje a zlepšuje trávení. In: *Bylinky.eu* [online]. 2007 [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: <https://www.bylinky.eu/anyz-leci-kasel-uklidnuje-a-zlepsuje-traveni.html>

Zdroje grafických děl:

Dentocult® SM. In: *Izumikazi Family Dentistry* [online]. 2019 [cit. 2021-04-10]. Dostupné z: <https://shika.okinawa/wp-content/uploads/2019/06/デントカルト-300x207.jpg>

DLOUHÝ, František. Fenykl obecný (*Foeniculum vulgare*). In: *Botanická fotogalerie* [online]. 1902 [cit. 2020-11-05]. Dostupné z: http://www.botanickafotogalerie.cz/highslide/images/large/104/Foeniculum_vulgare13.jpg

DLOUHÝ, František. Majoránka zahradní (*Majorana hortensis*). In: *Botanická fotogalerie* [online]. 1902 [cit. 2020-11-06]. Dostupné z: http://www.botanickafotogalerie.cz/highslide/images/large/137/Majorana_hortensis7.jpg

DLOUHÝ, František. Tymián obecný (*Thymus vulgaris* L.). In: *Botanická fotogalerie* [online]. 1902 [cit. 2020-11-06]. Dostupné z: http://www.botanickafotogalerie.cz/highslide/images/large/137/Thymus_vulgaris2.jpg

KÖHLER, Franz Eugen. *Pimpinella anisum*. In: *Wikimedia* [online]. 1897 [cit. 2020-11-06]. Dostupné z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3b/Koehler1887-PimpinellaAnisum.jpg>

KÖHLER, Franz Eugen. *Syzygium aromaticum*. In: *Wikimedia* [online]. 1897 [cit. 2020-11-06]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4b/Syzygium_aromaticum_-_Köhler-s_Medizinal-Pflanzen-030.jpg

Vyhodnocení testu Dentocult®. In: *Laboratoř Veselý* [online]. Orion Diagnostica [cit. 2021-04-10]. Dostupné z: <http://www.laboratorveseli.cz/dokumenty/Dentocult-cz.pdf>

Seznam tabulek

<i>Tabulka č. 1 – Taxonomické zařazení Streptococcus mutans.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabulka č. 2 – Příprava navážek</i>	<i>28</i>
<i>Tabulka č. 3 – Popis mikrotitrační destičky č. 1: Majoránka, fenykl, tymián, hřebíčkový, kontrola růstu (KR).....</i>	<i>29</i>
<i>Tabulka č. 4 – Popis mikrotitrační destičky č. 2: Bedrník, chlorhexidinu (CHX), kontrola růstu (KR).....</i>	<i>30</i>
<i>Tabulka č. 5 – Použité koncentrace chlorhexidinu a jeho ředění</i>	<i>30</i>
<i>Tabulka č. 6 – Výsledky expozičního testu (přítomnost + / nepřítomnost –)</i>	<i>38</i>

Seznam obrázků

<i>Obrázek 1 – Dentocult[®] SM Strip mutans</i>	17
<i>Obrázek 2 – Vyhodnocení testu Dentocult[®] SM Strip mutans</i>	17
<i>Obrázek 3 – Ústní vody Curaprox Perio Plus⁺</i>	20
<i>Obrázek 4 – Inkubované mikrotitrační destičky připravené na odečítání výsledku MIC, majoránka (M), fenykl (F), tymián (T), hřebíčkovec (H), kontrola růstu (KR), bedrník (A), chlorhexidin (CHX), kontrola růstu (KR)</i>	32
<i>Obrázek 5 – Kolonie S. mutans na Columbia agaru (vlevo ředění 10⁻⁶, vpravo ředění 10⁻⁸)</i>	37
<i>Obrázek 6 – Perio Plus+ Balance 0,05 a Perio Plus+ Regenerate 0,09 s kontrolní zkumavkou (KR), vyočkované po 1 minutě</i>	38
<i>Obrázek 7 – Perio Plus+ Protect 0,12 a Perio Plus+ Forte 0,20 s kontrolní zkumavkou (KR), vyočkované po 1 minutě</i>	39
<i>Obrázek 8 – Příprava před vyočkováním bakteriální suspenze ze zkumavek ve stojanu na Petriho misky s Columbia agarem</i>	40

Seznam příloh

<i>Příloha č. 1 – Majoránka zahradní</i>	59
<i>Příloha č. 2 – Fenykl obecný</i>	59
<i>Příloha č. 3 – Tymián obecný</i>	60
<i>Příloha č. 4 – Hřebíčkovce vonný</i>	60
<i>Příloha č. 5 – Bedrník anýz</i>	61
<i>Příloha č. 6 – Streptococcus mutans – CNCTC 6699^T – kmen získaný z České národní sbírky typových kultur (CNCTC)</i>	61
<i>Příloha č. 7 – Kultivace S. mutans na Columbia agaru</i>	62
<i>Příloha č. 8 – Použité medicínsky významné léčivé bylinky, výrobce Valdemar Grešík</i>	62
<i>Příloha č. 9 – Příprava před navázkou bylin a provedení pokusu</i>	63
<i>Příloha č. 10 – Louhování navážek medicínsky významných léčivých bylin</i>	63
<i>Příloha č. 11 – Filtrace vylouhovaných bylinných nálevů</i>	64
<i>Příloha č. 12 – Provedení sterilizace filtrátů přes filtry s póry o velikosti 0,2 μm</i>	64
<i>Příloha č. 13 – Připravené sterilní filtráty léčivých bylin před aplikací do mikrotitrační destičky</i>	65
<i>Příloha č. 14 – Příprava mikrotitračních destiček v laminárním boxu</i>	65
<i>Příloha č. 15 – Mikrotitrační destička po inkubaci připravená na odečtení výsledků (majoránka, fenykl, tymián, hřebíčkovce, kontrola růstu)</i>	66

Příloha č. 16 – Mikrotitrační destička po inkubaci v odečítacím stroji (bedrník, chlorhexidin, kontrola růstu) 66

Přílohy

Příloha č. 1 – Majoránka zahradní



Zdroj: http://www.botanickafotogalerie.cz/highslide/images/large/137/Majorana_hortensis7.jpg, Dlouhý František

Příloha č. 2 – Fenykl obecný



Zdroj: http://www.botanickafotogalerie.cz/highslide/images/large/104/Foeniculum_vulgare13.jpg, Dlouhý František

Příloha č. 3 – Tymián obecný



Zdroj: http://www.botanickafotogalerie.cz/highslide/images/large/137/Thymus_vulgaris2.jpg, Dlouhý František

Příloha č. 4 – Hřebíčkovce vonný



Zdroj: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4b/Syzygium_aromaticum_-_Köhler-s_Medizinal-Pflanzen-030.jpg, Köhler Franz Eugen

Příloha č. 5 – Bedrník anýz



Zdroj: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3b/Koehler1887-PimpinellaAnisum.jpg>, Köhler Franz Eugen

Příloha č. 6 – *Streptococcus mutans* – CNCTC 6699^T – kmen získaný z České národní sbírky typových kultur (CNCTC)

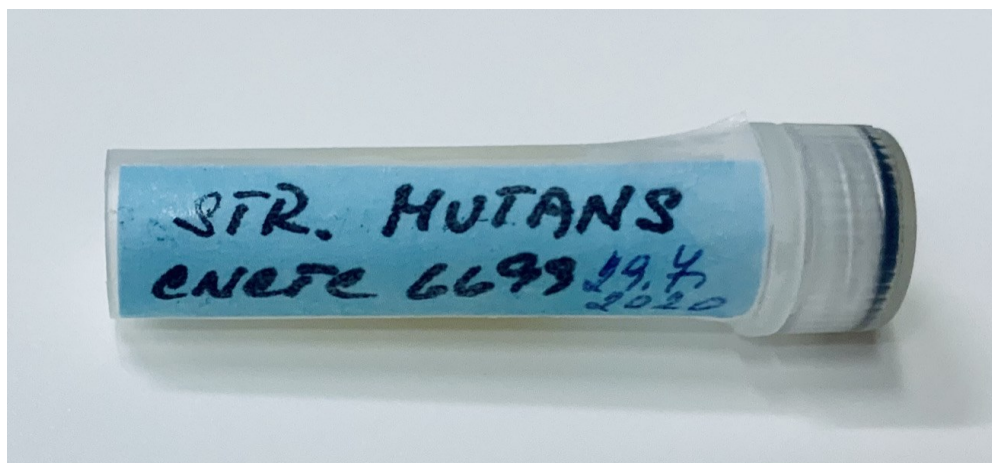


Foto autor

Příloha č. 7 – Kultivace *S. mutans* na Columbia agaru

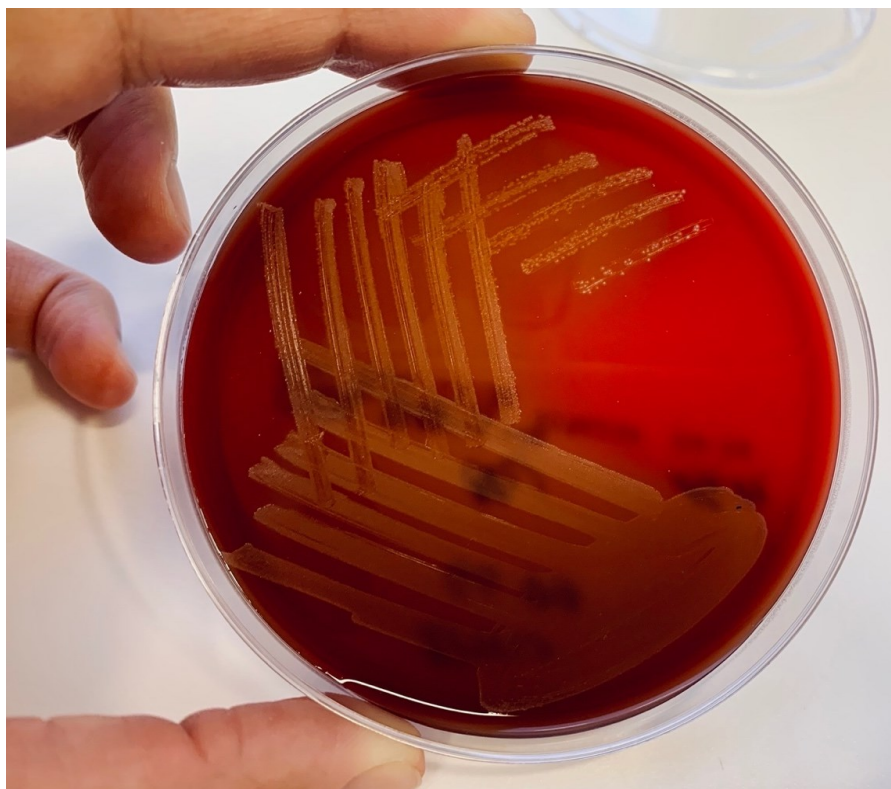


Foto autor

Příloha č. 8 – Použité medicínsky významné léčivé bylinky, výrobce Valdemar Grešík



Foto autor

Příloha č. 9 – Příprava před navázkou bylin a provedení pokusu



Foto autor

Příloha č. 10 – Louhování navážek medicínsky významných léčivých bylin



Foto autor

Příloha č. 11 – Filtrace vylouhovaných bylinných nálevů



Foto autor

Příloha č. 12 – Provedení sterilizace filtrátů přes filtry s póry o velikosti 0,2 μ m

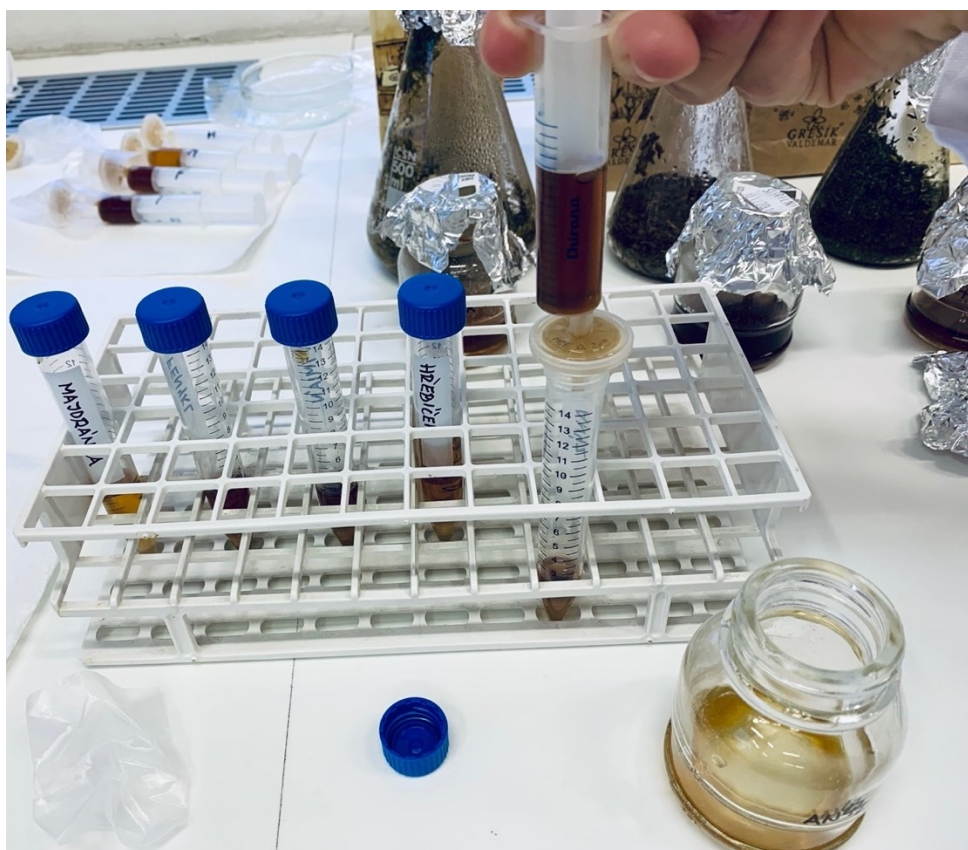


Foto autor

Příloha č. 13 – Připravené sterilní filtráty léčivých bylin před aplikací do mikrotitrační destičky

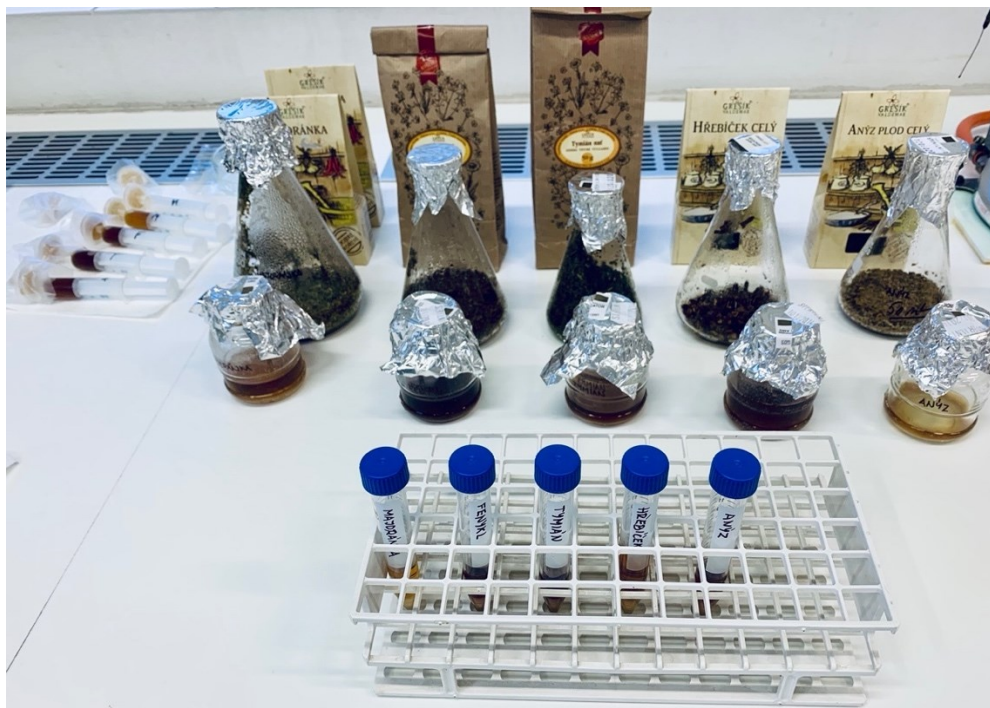


Foto autor

Příloha č. 14 – Příprava mikrotitračních destiček v laminárním boxu

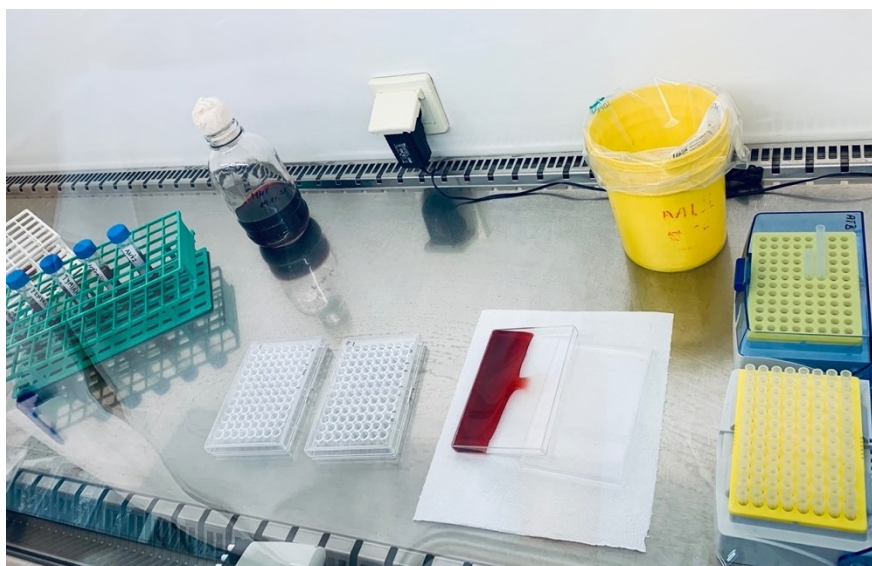


Foto autor

**Příloha č. 15 – Mikrotitrační destička po inkubaci připravená na odečtení výsledků
(majoránka, fenykl, tymián, hřebíčkovec, kontrola růstu)**

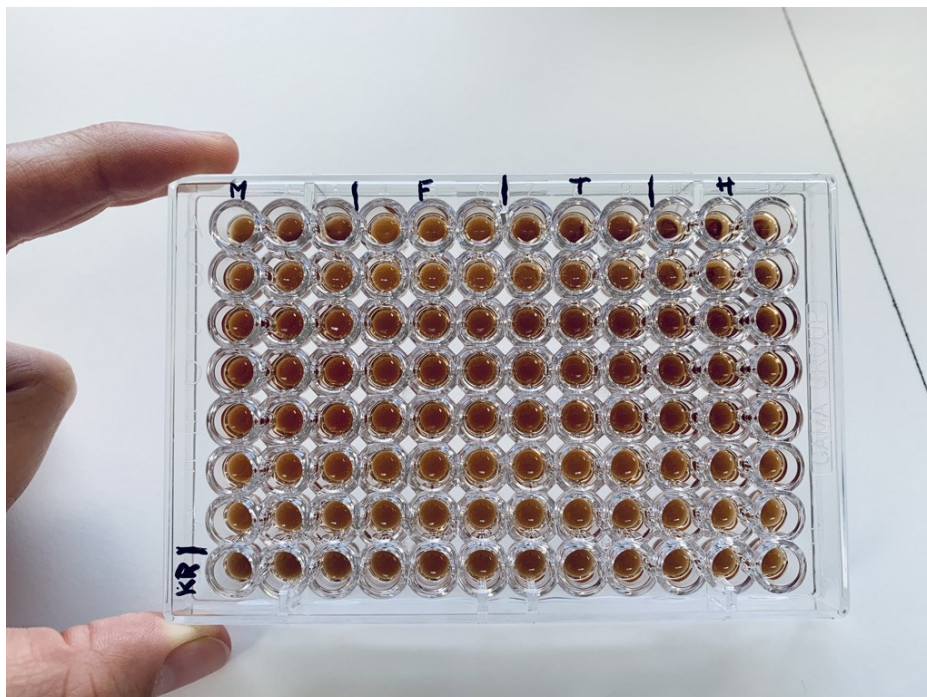


Foto autor

**Příloha č. 16 – Mikrotitrační destička po inkubaci v odečítacím stroji (bedrník,
chlorhexidín, kontrola růstu)**

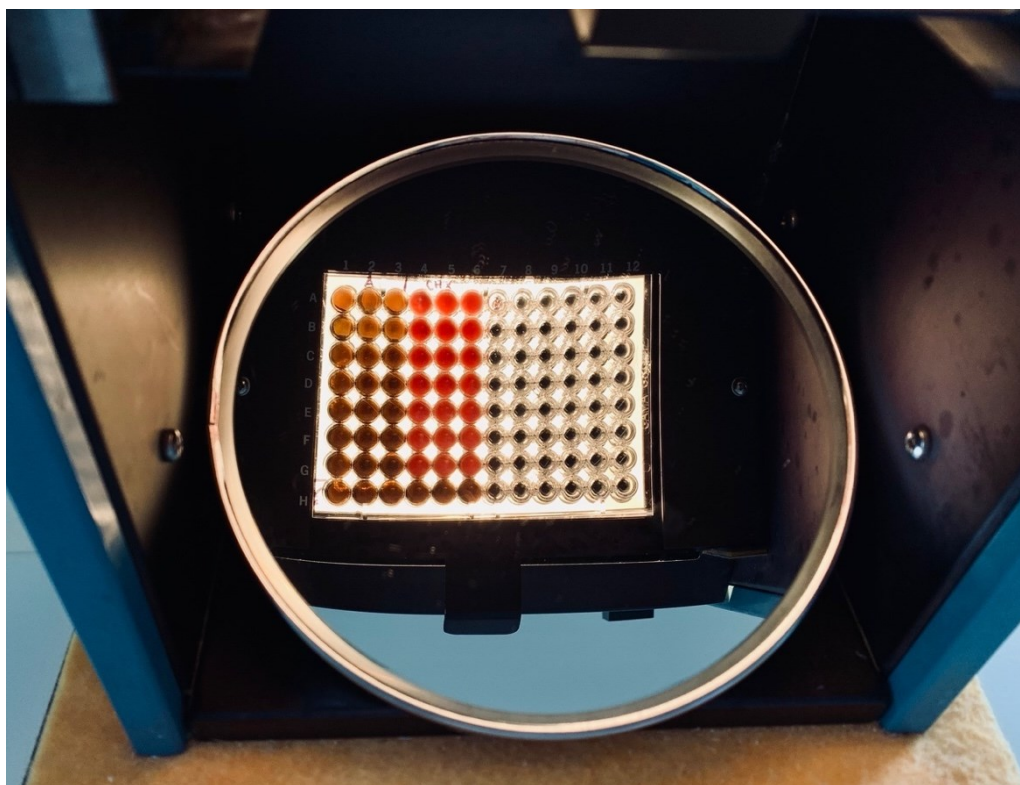


Foto autor